

Besugárzás hatására zsírsavakból keletkező 2-alkil-ciklobutanonok kimutatása

Horvatovich Péter és Farkas József

Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem

Érkezett: 1997. december 29.

Élelmiszereknek ionizáló sugárzással – gyorsított elektronokkal vagy gamma sugárzással (^{60}Co , ^{137}Cs) – történő kezelése fizikai tartósítási módszer, mely számos előnnyel rendelkezik a többi tartósítási módszerrel szemben. Az alkalmazott dózistól függően a besugárzásos kezelésnek a következő hatásai vannak:

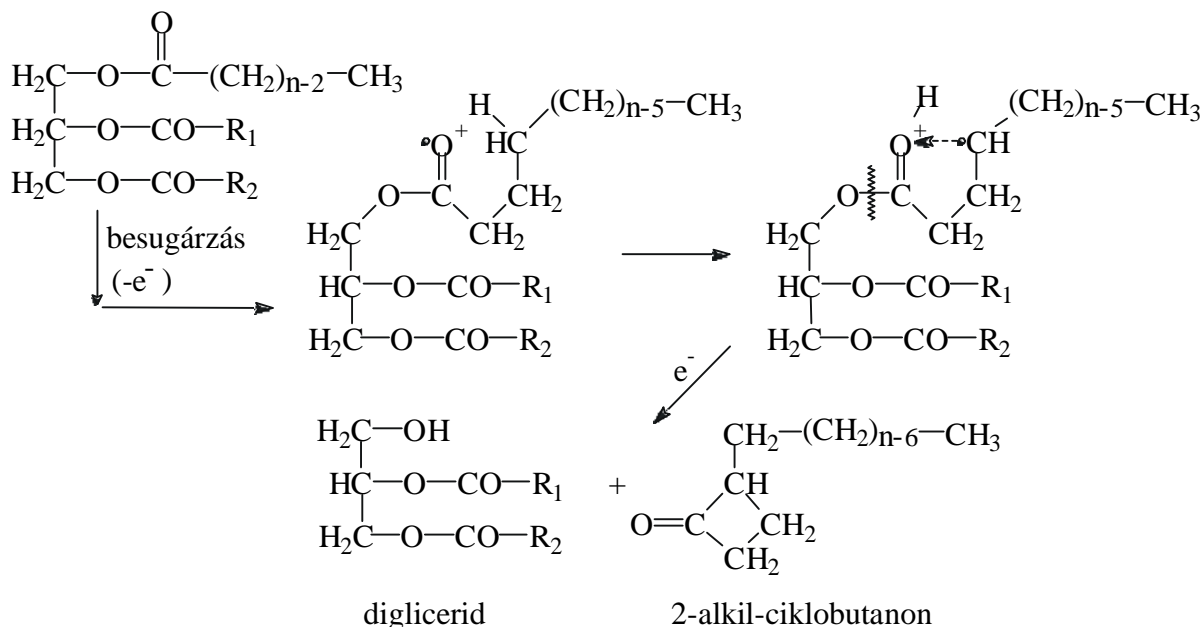
- gátolja a burgonya és a vöröshagyma tárolás alatti csírázását,
- károsítja a raktári rovarkártevőket és az élelmiszerekkel közvetíthető parazitákat,
- késlelteti egyes gyümölcsök utóérési folyamatait,
- elpusztítja az élelmiszerekkel közvetíthető spórát nem képző patogén baktériumokat, valamint
- csökkenti a fűszerek és más száraz adalékanyagok élő csíraszámát,
- blansírozással és gyorsfagyasztással kombinálva steril élelmiszerek előállítását teszi lehetővé kereskedelmi méretben.

A sugárzás az élő sejtekre kis részben közvetlenül, de főként a víz radiolitikus termékein keresztül hat és a sejt DNS állományát roncsolja, mely a sejt elhalását eredményezi (Von Sonntag 1987). Ennek eredményeként besugárzás hatására jelentősen megnövekszik az élelmiszerek mikrobiológia biztonsága, különösen más tartósítási eljárással kombinálva (pl. hőkezelés) alkalmazva. Mióta a FAO/WHO/IAEA Egyesített Szakértő Bizottsága megállapította a módszer toxicitási szempontból való ártalmatlanságát (Anon 1981), 37 ország fogadta el ezt az eljárást tartósítási kezelésként. Azonban a fogyasztók megfelelő tájékoztatása és a kereskedelem ellenőrzése érdekében, valamint azért, mert egyes országok (pl. Németország) nem engedélyezik az élelmiszerek besugárzását, szükség van specifikus és érzékeny detektálási módszerek kifejlesztésére.

2-alkil-ciklobutanonok a besugárzottság marker vegyületei

A besugárzottság kimutatására jelenleg számos fizikai, kémiai és mikrobiológiai módszer ismeretes (Rahman *et al.* 1995, Stevenson *et al.* 1992, Anon 1995, Raffi *et al.* 1989), melyek közül négy módszert szabványosított az Európai Unió (Raffi *et al.* 1993). Ezen közlemény a legígéretesebbnek mutató kémiai módszert, a 2-alkil-ciklobutanonok különböző módszerekkel történő kimutatását ismerteti.

Az ígéretesnek mutatkozó kémiai módszerek közül kettő a trigliceridek radiolízis termékeinek, a specifikusan keletkező illékony szénhidrogének (Bergaenzle *et al.* 1994) és a 2-alkil-ciklobutanonok kimutatásán alapul. A 2-alkil-ciklobutanonokat először LeTellier és Nawar (1972) mutatta ki nagy dózissal (60 kGy) besugárzott tiszta trigliceridekből. Ezek a vegyületek a trigliceridek zsírsav részéből keletkeznek a trigliceridek észter csoportjának az észter oxigén és az karbonil csoportja közötti kötése felbomlásával (1. ábra). A 2-alkil-ciklobutanonok a trigliceridek radiolitikus termékei közül az egyedüli gyűrűs vegyületek, melyek szénatom száma megegyezik a prekursor zsírsav szénatom számával és az alkil lánc a gyűrű 2 helyzetű szénatomjához kapcsolódik. A keletkezett 2-alkil-ciklobutanonok tükrözik az adott élelmiszer zsírsav összetételét és nem függenek a prekursor zsírsav telítetlen vagy telített voltától. 1 és 8 kGy közötti tartományban – melyet a legelterjedtebben alkalmaznak a gyakorlatban – a keletkezett 2-alkil-ciklobutanon mennyisége lineárisan változik az elnyelt dózissal (Rahman *et al.* 1996). Viszont jelenleg nem ismert ezen linearitás mértékének függése a besugárzás körülményeitől (pl. hőmérséklet, atmoszféra, az élelmiszerben levő antioxidánsok). Mivel a 2-alkil-ciklobutanonok mennyisége kis mértékben változik a tárolás és a hőkezelés hatására, ezért a módszer a besugárzás dózisének hozzávetőleges megállapítására alkalmas.



1. ábra: A 2-alkil-ciklobutanonok keletkezésének mechanizmusa (LeTellier & Nawar, 1972)

Jelenleg úgy látszik, hogy a 2-alkil-ciklobutanonok kizárólag csak besugárzás hatására keletkeznek és ezért URP-nek (Unique Radiolytic Product) nevezhetők, mivel viszonylag hosszú tárolás esetén sem

szenvednek jelentős, bomlást kiváltó markerei az ionizáló sugárkezelésnek (Stevenson 1992). Ezen vegyületek a besugárzás követő műveletek után (pl. hőkezelés, fagyasztva szárítás) is kimutathatók és mennyiségük csak kis mennyiségben csökken (Crone *et al.* 1992). Mivel nem besugárzott élelmiszerekben nem fordulnak elő, nincs a módszernek „alapvonala”, ellentétben a specifikusan keletkező szénhidrogének kimutatásával. A módszer másik előnye a szénhidrogének vizsgálatával szemben, hogy míg a szénhidrogének bekerülhetnek az élelmiszerekbe (pl. a csomagolóanyagból diffúzióval), addig a 2-alkil-ciklobutanonok esetén nem kell ettől tartani (Lembke *et al.* 1995).

Különböző kimutatási eljárások

A 2-alkil-ciklobutanon élelmiszerekből történő kimutatására alkalmas analitikai módszert először 1990-ben Stevenson és munkatársai írtak le (Stevenson *et al.* 1990), mely megegyezik a jelenleg érvényben levő Európai Unió szabvánnyal (lásd később). A módszer elterjedését és más módszer fejlesztését nagyban gátolta a megfelelő standardok hiánya, melyet szintetikus úton történő előállításal oldottak meg (Boyd *et al.* 1991). A módszert főleg nagy lipidtartalmú élelmiszerek vizsgálatára alkalmazták pl. csirke, marha, sertés, bányászati hús, nyers tojás (Crone *et al.* 1993). Az Európai Unió (BCR) (Stevenson *et al.* 1994b) és a FAO/IAEA az ADMIT (Analytical Detection Methods for Irradiation Treatment of Food) (Stevenson 1994a) program végrehajtása során nemzetközi laboratóriumi együttműködés keretében vizsgálták az eljárást, ami kiváló eredménnyel végződött és megnyitotta az utat a módszer - az Európai Unió szabványaként való - elfogadására.

Európai Unió szabványa szerinti kimutatás módszere

Az európai EN 1785 (Anon., 1997) szabvány szerint a 2-alkil-ciklobutanonok analízise három lépésből áll: az élelmiszer lipidtartalmának szilárd-folyadék extrakciója (hexánnal történő Soxhlet extrakció, 6 óra), a 2-alkil-ciklobutanonoknak a lipidtartalomtól florasilTM-en történő adszorpciós kromatografiás elválasztása és végül ezen vegyületeknek 98 és 112 ionjainak szelektív GC-MS analízise.

A szabványos módszer azonban csak viszonylag nagy 2-alkil-ciklobutanon koncentráció – nagy dózissal egészben besugárzott nagy lipidtartalmú élelmiszerek – esetén alkalmazható. Alkalmatlan viszont pl. készételek kis mennyiségben jelenlevő besugárzott alapanyagainak vagy alacsony lipidtartalmú élelmiszerek besugárzottságának kimutatására, melyek besugárzottsága ezáltal nem ellenőrizhető. A szabványos eljárás

alkalmazása gondot okoz a nagyon komplex élelmiszerek esetén is, valamint hátránya, hogy a kimutatási módszer sok szerves oldószer igényel, igen költséges, összetett és nagy az időigénye. Ezáltal alkalmatlan nagyszámú minta gyors analizisére. Az eljárás érzékenységének növelése, a végrehajtás egyszerűsítése, időigényének csökkentése és a kimutatási határ csökkentése érdekében eddig a következő kutatások váltak ismeretessé:

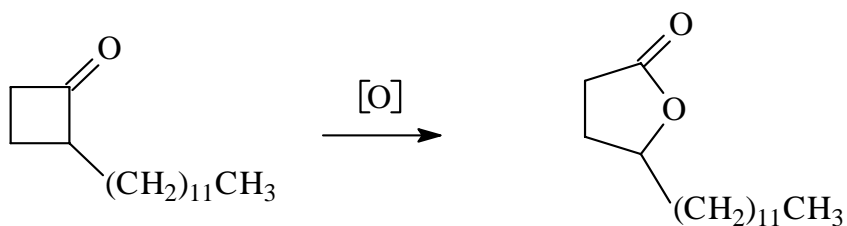
On-line LC-GC-MS

Rutin analizishez jobban használható, de szintén költséges, az eredeti szabvány szerinti módszerhez képest gyorsabb és specifikusabb eljárást dolgoztak ki Meier és munkatársai (Meier *et al.* 1995). A különbség az, hogy a 2-alkil-ciklobutanonokat az extrahált lipid tartalomtól a florisilTM-en történő elválasztás helyett HPLC-vel vizsgálták, mely on-line módon csatlakozott a GC-MS-hez. A módszer előnye, hogy gyorsabb, egyszerűbb és kevésbé oldószerigényes, mint a szabványban rögzített eljárás.

ELISA teszt

Laboratóriumi gyorsteszt kidolgozása céljából ELISA teszt kifejlesztését tűzték ki Stevenson és munkatársai (Hamilton 1995). Ahhoz, hogy a módszert megfelelően lehessen alkalmazni a besugárzottság kimutatására, olyan antitestekre van szükség, melynek nagy a kereszt-reaktivitása az élelmiszerekben legnagyobb mennyiségben előforduló zsírsavakból képződő 2-alkil-ciklobutanonokkal szemben (az oldallánc hossza legalább 10, 12 vagy 14 szénatomszámú legyen).

Először a rövid oldalláncú (C_3 , C_4 , C_5) karbonil végén hordozó fehérjéhez kapcsolt ciklobutanon származékokhoz hoztak létre antitesteket. Azonban a különböző származékok antitestjeinek kereszt-reaktivitása nagy mértékben függ az oldallánc hosszától és specifikusan hat a ciklobutanon gyűrűre. Mivel a kereszt-reaktivitás nem mutatkozott a magasabb oldalláncú 2-alkil-ciklobutanonokkal, ezért a 10 tagszámú oldallánccal rendelkező szintetizált származékokhoz készítettek antitesteket, melynek 73% és 13% a kereszt-reaktivitása a 12 és a 14 szénatomszámú oldallánccal rendelkező 2-dodecil-ciklobutanonnal és 2-tetradecil-ciklobutanonnal szemben. Továbbá kimutatták azt is, hogy igen nagy a kereszt-reaktivitása a 2-dodecil-ciklobutanonból oxigén felvétellel keletkező laktonnal szemben (2. ábra). Ez azonban elég specifikus a ciklobutanon gyűrűre, ugyanis nincs kereszt-reaktivitása az élelmiszerekben egyik leggyakrabban előforduló természetes laktonnal, a C-vitaminnal szemben. Más természetesen előforduló laktonokkal való interferálás kivédése azáltal biztosított, hogy az ELISA teszthez florisilTM-en tisztított extraktumot használnak, melyben bizonyítottan nincs jelen a laktonokból álló frakció.



2. ábra: A 2-dodecil-ciklobutanonokból oxigénfelvétellel keletkező lakton

SFE-TLC (off-line) gyorsteszt

Szintén egy egyszerű, a gyakorlatban jól használható, specifikus gyorsteszt kifejlesztését tűzték ki célul Rahman és munkatársai (Rahman 1996). A Soxhlet extrakció és a florisilTM-en történő tisztítás időigényes lépései helyet a sokkal szelektívebb CO₂-dal történő szuperkritikus extrakciót használták. Ezután optimalták a 2-alkil-ciklobutanonok gyors kimutatását szolgáló TLC módszer hordozó anyagát és az eluens összetételét. A módszer nagy előnye, hogy rendkívül gyors (8 óra helyet mindössze kb. 40 percet igényel), egyszerűbb, nem igényel drága berendezéseket és kevés a toxikus oldószer igénye. A módszer kidolgozásánál azonban hiányzott a szuperkritikus extrakció szelektivitásának optimalása.

További lehetséges módszerek

További alternatívát jelent a szuperkritikus extrakció optimalása, mely egyrészt magában foglalja az extrakciós paraméterek optimalását szelektivitás szempontjából, tehát azon hőmérséklet és nyomás megkeresését, ahol a 2-alkil-ciklobutanonok a legkevesebb zavaró komponenssel nyerhetők ki, másrészt a legjobb hatékonyságú csapda, valamint a működési paraméterek meghatározását. Végül érdemes összehasonlítani az eredeti Soxhlet és a szuperkritikus extrakció szelektivitását.

A szuperkritikus extrakció optimalása után a kimutatási határ csökkentése érdekében a 2-alkil-ciklobutanonokat megfelelő reagenssel, halogéntartalmú származékká célszerű alakítani és - a tömegspektrométeres detektálás helyet - a kb. százszor, ezerszer érzékenyebb elektronbefogásos detektort alkalmazni. Amennyiben sikerül ezt megvalósítani, amelyen jelenleg is fáradozunk, úgy a csekély lipidtartalmú élelmiszerek alacsony dózisu besugárzása, valamint a készételekben kis mennyiségben jelenlevő besugárzott alapanyagok kimutatása szintén lehetővé válik.

Irodalom jegyzék

- ANON. (1981), *Wholesomeness of Irradiated Food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee*, Technical Report Series 695, World Health Organisation, Geneva.
- ANON. (1995), *MAFF Food Irradiation Detection Test Seminar*, Food Science and Technology Today, vol **9** (3), pp.136-154

- ANON. (1997), *Produits alimentaires — Détection d'aliments ionisés contenant des lipides — Analyse par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse des 2-alkylcyclobutanones*, Afnor Ed., Norme Européenne EN 1785.
- BERGAENZLE, M., SANQUER, F., HASSELMANN C. & MARCHIONI E. (1994), *Detection of γ -Irradiated Raw-Milk Camembert Cheeses by Capillary Gas Chromatographic Analysis of Volatile Hydrocarbons*. Food Chemistry, **51**, pp 177-182
- BOYD D. R., CRONE A. V. J., HAMILTON J. T. G., HAND M. V., STEVENSON M. H., STEVENSON P. J. (1991), J. Agric. Food Chem., **39**, pp. 789
- CRONE A. V. J., HAMILTON J. T. G., STEVENSON M. H. (1992), J. Sci. Food Technol., **58**, pp. 249
- CRONE A. V. J., HAND M. V., HAMILTON J. T. G., SHARMA N. D., BOYD D. R., STEVENSON M. H. (1993), *Synthesis, Characterisation and Use of 2-Tetradecylcyclobutanone together with other Cyclobutanones as Markers for Irradiated Liquide Whole Egg*, Journal of the Science of Food and Agriculture, **62** (4), pp. 361-367, 17 ref
- HAMILTON L., ELLIOT C. T., STEVENSON M. H., MCCAUGHEY W. J., (1995), *The Use of 2-Alkylcyclobutanone in the Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of Irradiated Foods*, Food Science & Technology Today, **9** (3) ref 9, pp. 146-147
- LEMBKE P., BÖRNERT J., ENGELHARDT H. (1995), *Characterisation of Irradiated Food by SFE and GC-MSD*, J. Agric. Food Chem., **43**, pp. 38-45
- LETELLIER P. R., NAWAR W. W. (1972), *Alkylcyclobutanones from Radiolysis of Lipids*, Lipids, **7**, pp. 75-76
- NAWAR W. W. (1978), *Reaction Mechanism in Radiolysis of Fats*, J. Agric. Food Chem., **26**, pp. 21-25
- MEIER W., ARTHO A., NAEGELI P. (1996), *Detection of Irradiation of Fat-Containing Foods by On-Line LC-GC-MS of Alkylcyclobutanones*, Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, **87**, pp. 118-122
- RAFFI J. J., EVANS J. C., AGNEL J. P., ROWLANDS C. C., LESGARDS G. (1989), *ESR Analysis of Irradiated Frog's Legs and Fishes*, Int. J. Appl. Radiat. Isotop., **40**, pp. 1215-1218
- RAFFI J. J. (1993), *Concerted Action of the Community Bureau of Reference on Methods of Identification of Irradiated Foods*, BCR Information, Chemical Analysis, EUR 15261 EN, Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference.
- RAHMAN R., HAQUE A. K. M. M., SUMAR S. (1995), *Chemical and Biological Methods for the Identification of Irradiated Foodstuffs*, Nutrition & Food Science **23**, No. 1 pp. 4-11
- RAHMAN R., MATABUDALL D., HAQUE A. K., SUMAR S. (1996), *A Rapid Method (SFE-TLC) for the Identification of Irradiated Chicken*, Food Res. Intern., **2**, pp. 301-307
- STEVENSON M. H. (1992), *Progress in the Identification of Irradiated Foods*, Trends in Food Science & Technology, Vol. 3, pp. 257-262
- STEVENSON M. H., CRONE A. V. J. (1990), *Irradiation Detection*, **Nature**, **334**, pp. 202
- STEVENSON M. H., KILPATRICK D. J., MCMURRY C. H. (1994a), „*Report on the FAO/IAEA Collaborative Trial Using 2-Dodecylcyclobutanone to Detect Irradiated Chicken, Pork, and Liquid Whole Egg*,” FAO/IAEA, Vienna
- STEVENSON M. H., MEIER W., KILPATRICK D. J., (1994b), „*A European Collaborative Blind Trial Using Volatile Hydrocarbons 2-Dodecylcyclobutanone to Detect Irradiated Chicken Meat*,” Commission of the European Communities (BCR), Brussels, Luxembourg, EUR 15969 EN
- VON SONNTAG C. (1987), *DNA and Polynucleotide*. In "The Chemical Basis of Radiation Biology". Taylor and Francis, London (UK), pp. 221-275

**Besugárzás hatására zsírsavakból keletkező
2-alkil-ciklobutanonok kimutatása**
Horvatovich Péter és Farkas József

A besugárzottság kimutatására használatos módszerek közül a szerzők a 2-alkil-ciklobutanonok meghatározására szolgáló eljárást ismertetik. Értékelik az Európai Unió szabványa szerinti kimutatás módszerét és az ismertté vált irányokat. A továbblépés feladatai közül kiemelést érdemel a szuperkritikus extrakció optimalása és a kimutatási határ csökkentése.

**Detection of 2-Alkyl-cyclobutanones Formed from
Fatty Acids by Irradiation**
Horvatovich, P. and Farkas, J.

From the methods used for the detection of being irradiated, a procedure for detection of 2-alkyl cyclobutanones is reported. The detection method according to the European Union standard and the research directions published so far are evaluated. From the tasks of further development, optimisation of the supercritical extraction and the lowering of detection limit is stressed.

**Nachweis der durch Bestrahlung aus Fettsäuren
entstehenden 2-Alkyl-Cyklobutanon**
Horvatovich P. und Farkas J.

Von den für den Nachweis der Bestrahlung verwendeten Methoden wird das Verfahren zum Nachweis von 2-Alkyl-Cyklobutanon beschrieben. Die Standardmethode der Europäischen Union und die bekannt gewordenen Forschungsrichtungen werden diskutiert. Von den Aufgaben der Weiterentwicklung sind die Optimierung der superkritischen Extraktion und die Verringerung der Nachweisgrenzen hervorzuheben.