

WACŁAW STACHOWICZ

IDENTYFIKACJA ŻYWNOSCI UTRWALANEJ RADIACYJNIE

DETECTION OF FOODS PRESERVED BY RADIATION

Z Laboratorium Identyfikacji Napromieniowania Żywności
Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie
Dyrektor Instytutu: doc. dr inż. *L. Waliś*

W pracy omówiono fizyczne, chemiczne i biologiczne metody analityczne, umożliwiające identyfikację napromieniowania żywności.

WSTĘP

Utrwalanie żywności przy pomocy promieniowania jonizującego (promieniowanie *gamma* i X oraz prędkie elektrony o energii 5–10 MeV) została oficjalnie uznana w 1983 roku przez ekspertów FAO i WHO za metodę nadającą się do powszechnego stosowania w odniesieniu do dużej grupy produktów żywnościowych oraz całkowicie bezpieczną dla zdrowia konsumenta.

XV tom Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO (Codex Alimentarius) podaje maksymalną dawkę promieniowania (10 kGy), przy pomocy której można konserwować żywność oraz maksymalną energię promieniowania jonizującego jaka może być stosowana (5 MeV dla promieniowania *gamma* i X oraz 10 MeV dla przyspieszonych elektronów), co ma na celu całkowitą eliminację możliwości wystąpienia radioaktywności wzbudzonej w napromieniowanym produkcie żywnościowym. Edycja wymienionego dokumentu poprzedzona była trwającymi ponad 12 lat badaniami chemicznymi, biochemicznymi, fizycznymi, jak również testami biologicznymi. Owocem tych badań było ponad 2000 publikacji naukowych oraz sformułowanie przez grupę ekspertów FAO/WHO opinii, że promieniowanie nie wywołuje niekorzystnych zmian w żywności.

Obecnie ponad 40 krajów dopuszcza obrót handlowy żywnością konserwowaną radiacyjnie, a w 24 z nich produkty spożywcze są napromieniowane w skali przemysłowej. Wprawdzie nie ma oficjalnych ustaleń odnośnie międzynarodowego obrotu napromieniowaną żywnością, lecz dziś już wiadomo, że obrót taki istnieje.

Szczególnie szybki rozwój technologii radiacyjnego utrwalania żywności obserwuje się ostatnio w krajach azjatyckich (Chiny, Birma, Indonezja i inne), które są importerem wielu produktów spożywczych i przypraw na dużą skalę. Można zatem oczekiwać, że w nadchodzących latach na międzynarodowym rynku żywnościowym znajdować się będzie coraz więcej produktów utrwalanych radiacyjnie.

Obok krajów akceptujących napromieniowaną żywność są i takie, które nie dopuszczają jej do obrotu towarowego. Jednym z tych krajów są np. Niemcy, gdzie wszakże poddaje się obróbce radiacyjnej przyprawy przeznaczone na eksport. Są także organizacje konsumenckie przeciwstawiające się powszechnemu spożywaniu żywności konserwowanej radiacyjnie.

Decydującą rolę przy formułowaniu opinii na ten temat odgrywają czynniki emocjonalne (skojarzenia z Hiroszimą i Czarnobylem), a nie merytoryczne.

Ekspertki FAO, IAEA, WHO, ITC/UNCTAD i GATT na Międzynarodowej Konferencji poświęconej zagadnieniom napromieniowania żywności, w Genewie w 1988 roku z udziałem przedstawicieli ponad 100 krajów świata, wyrazili w dokumencie końcowym pogląd, że „*jakkolwiek wykrywanie zmian w napromieniowanej żywności jest trudne, byłoby celowe opracowanie metod detekcji takiej żywności, aby wesprzeć system kontroli administracyjnej dotyczącej napromieniowanej żywności oraz zwiększyć zaufanie konsumentów do tego rodzaju kontroli.*” To słuszne i jakże uzasadnione stwierdzenie zawarte w dokumencie genewskim, przyczyniło się do intensyfikacji badań, mających na celu opracowanie metod kontroli napromieniowanej żywności. Prace nad wykrywaniem napromieniowanej żywności prowadzono już wcześniej [1]. W latach siedemdziesiątych, w ramach Wspólnoty Europejskiej (CEC) zapoczątkowano programy badawcze dotyczące opracowania metod wykrywania napromieniowanej żywności oraz zainicjowano międzynarodowe testy identyfikacyjne, realizowane od lat osiemdziesiątych pod patronatem CEC (Community Bureau of Reference CEC). Od roku 1989 do roku 1994 funkcjonował pod auspicjami WHO, FAO i IAEA międzynarodowy program ADMIT (Analytical Detection Methods for Irradiation Treatment of Food), w którym uczestniczyli eksperci i czołowe laboratoria światowe, zajmujące się wykrywaniem napromieniowanej żywności. Zarówno w testach CEC jak i w pracach ADMIT uczestniczył od szeregu lat i uczestniczy nadal Instytut Chemii i Techniki Jądrowej (IChTJ) w Warszawie [4,5].

Wykrywanie napromieniowanej żywności nie jest rzeczą łatwą. Wszystkie, również najnowsze metody kontroli jakości żywności są w tym przypadku bezużyteczne, gdyż zakres zmian fizycznych i chemicznych zachodzących pod wpływem promieniowania w żywności jest znikomy. Jak wykazały badania produktów spożywczych, w wyniku absorpcji 100 eV energii promieniowania jonizującego w żywności może powstać średnio jedna cząsteczka produktu ($G = 1$) co oznacza, że przy dawce 1 kGy można spodziewać się obecności zaledwie sześciu nowych cząsteczek na każde 10 milionów cząsteczek zawartych w napromieniowanym produkcie. Są to zwykle te same produkty cząsteczkowe, jakie występują w napromieniowanej żywności w nieco niższych stężeniach, bądź takie, które powstają np. podczas termicznej obróbki żywności (gotowanie, smażenie itp.) Z uwagi na różnorodność produktów jakie mogą być poddawane obróbce radiacyjnej, jak i znikomości zmian radiacyjnych jakie w nich zachodzą, nie ma i chyba nie będzie jednej uniwersalnej metody wykrywania napromieniowanej żywności. Testowane są różne metody fizyczne, chemiczne, mikrobiologiczne i biologiczne, dające szansę na uzyskanie pozytywnych wyników w odniesieniu do konkretnych produktów żywnościowych [11]. Korzystając z wyników chemii radiacyjnej uzyskanych na modelowych układach organicznych, poddaje się szczególnie dokładnemu badaniu te składniki żywności, w których można oczekiwać obecności specyficznego produktu radiacyjnego, bądź też te, w których mogą

występować trwale produkty o charakterze rodnikowym lub stabilne defekty sieci krystalicznej. Najbardziej obiecującym obiektem badań identyfikacyjnych są stałe składniki żywności o zbitej, czasem również krystalicznej budowie, z małą zawartością wody. W metodach mikrobiologicznych wykorzystuje się wysoką efektywność dezaktywacji bakterii pod wpływem promieniowania, a w metodach biologicznych – ograniczanie efektywności i szybkości kiełkowania oraz wzrostu zarodników w polu promieniowania jonizującego.

Obecnie znanych jest blisko dwadzieścia metod analitycznych, które stosowane są do wykrywania napromieniowanej żywności:

METODY FIZYCZNE

Wśród analitycznych metod fizycznych wykrywania napromieniowania w żywności, najlepsze wyniki uzyskano dotychczas stosując metody spektroskopii elektro-nowego rezonansu parametrycznego (EPR) i termoluminescencji (TL). Prowadzone są również próby wykorzystania metod wiskozymetrycznych, pomiaru oporności elektrycznej oraz pomiarów spektrofotometrycznych w bliskiej podczerwieni (NIR).

Metoda spektroskopii EPR umożliwia wykrywanie w napromieniowanych produktach żywnościowych relatywnie trwałych indywiduów paramagnetycznych charakteryzujących się obecnością niesparowanych elektronów, takich jak rodniki lub centra paramagnetyczne, które zaobserwowano w niewielkich ilościach w napromieniowanych kościach i ościach, w skorupkach nasiennych, w łodygach suchych roślin itp. Indywidua te powstają w miejscach stabilizacji ładunku w sieci krystalicznej mikrokryształitów lub w zbitej masie składnika żywności, do której nie ma dostępu woda i tlen. W napromieniowanych kościach obserwuje się je po wielu latach. Zaletą metody EPR jest to, iż jest ona nieniszcząca, dzięki czemu próbki mogą być badane wielokrotnie np. w celu ustalenia zależności kinetycznych (trwałości sygnałów w czasie). Pomiar charakteryzuje się wysoką czułością (10^{-12} mola), umożliwiając określanie wysokości dawki zastosowanej przy napromieniowaniu. Metodyka pomiaru jest prosta, jednak wymaga posługiwania się wzorcem odniesienia, którym są nienapromieniowane próbki tego samego produktu. Próbkę przeznaczoną do badań EPR oddziela się od części miękkich i osusza. Do pomiaru mogą być stosowane bądź próbki sproszkowane, bądź w kawałkach o wymiarach nie przekraczających 25 mm długości i 3 mm średnicy. Próbki są umieszczane w kwarcowych lub polietylenowych rurkach pomiarowych. Masa próbek nie przekracza zwykle 100 mg. Metoda polega na identyfikacji w rejestrowanych widmach EPR specyficznych sygnałów nie występujących w próbkach nienapromieniowanych lub na stwierdzeniu kilkakrotnego wzrostu sygnału w stosunku do próbek nienapromieniowanych.

Przygotowanie próbek i suszenie trwa do 2 godz., a pomiar EPR i identyfikacja ok. 1 godz. W pomiarach rutynowych czas ten może być znacznie skrócony. Na podstawie identyfikacji sygnałów EPR w niewielkich fragmentach kości i ości można identyfikować napromieniowanie tusz zwierząt rzeźnych, drobiu i ryb, również po dłuższym okresie przechowywania tych produktów w chłodni. Dobre wyniki uzyskano badając suszone daktyle, figi i rodzynki, truskawki oraz niektóre orzechy.

Pozytywne wyniki, wymagające jednak pogłębionych badań uzyskano badając owoce cytrusowe, banany, cebulę, morele, gruszki, papaje, orzechy kokosowe, suszone grzyby i warzywa, niektóre przyprawy oraz skorupiaki.

Metodą EPR można wykryć z wysokim stopniem wiarygodności napromieniowany makaron, żelatynę wieloskładnikowe przyprawy żywnościowe [9, 10, 13, 14, 15, 16].

Metoda termoluminescencji (TL) polega na programowanym ogrzewaniu próbki i rejestracji wyzwalanej w postaci świecenia nagromadzonej w niej uprzednio energii. W przypadku napromieniowanej żywności energia ta bywa zmagazynowana w postaci naprężeń sieci krystalicznej, związków meastabilnych, także stabilizowanych ładunków (elektrony) i rodników zlokalizowanych w suchych jej fragmentach. Indywidualia te charakteryzują się często dużą trwałością, szczególnie gdy zlokalizowane są w mineralnych składnikach żywności. Dlatego metoda termoluminescencji okazała się szczególnie przydatna do badania przypraw i ziół, w których znajdują się ziarenka minerałów i krzemionki. Metodyka pomiaru jest następująca: po rozdrobnieniu wprowadza się próbkę o masie od 1 do 3 mg do światłoszczelnej komory na metalowej miseczce, która jest ogrzewana ze stałym gradientem wzrostu temperatury wynoszącym 5–10°C na sekundę. Intensywność emitowanego światła jest mierzona czułym detektorem sprzężonym z fotopowielaczem. Wynik uzyskuje się w postaci wykresu krzywej świecenia. W ocenie wyników wykorzystywana jest bądź amplituda, bądź pole pod krzywą świecenia w przedziale temperatur 120–300°C. Próbki są wygrzewane dwukrotnie; drugi zapis ma na celu eliminację świecenia pochodzącego z tła. Odpowiedź, czy próbka była napromieniowana czy nie, uzyskuje się przez porównanie krzywych świecenia próbek napromieniowanych i nienapromieniowanych. Ze względu na znaczne różnice intensywności świecenia próbek tych samych produktów napromieniowanych identycznymi dawkami, lecz pochodzących z różnych krajów, a nawet z różnych plantacji, obecnie dla uwiarygodnienia wyników stosuje się separację składników mineralnych z przypraw i ziół przy pomocy roztworów o dużej gęstości (najczęściej poliwolframian sodu) i pomiar termoluminescencji wydzielonej w ten sposób frakcji mineralnej.

Separacja minerału oraz dopromieniowanie badanych próbek odpowiednio dobranymi dawkami, umożliwiającymi normalizację wyników powodują, że metoda termoluminescencji w odniesieniu do większości przypraw i ziół dostępnych na rynku pozwala na uzyskiwanie bardzo wysokiego stopnia wykrywalności napromieniowania, sięgającego 100%. Dobre rezultaty identyfikacji napromieniowania metodą termoluminescencji uzyskano badając obok przypraw suszone produkty żywnościowe pochodzenia roślinnego. Koszt zestawu termoluminescencyjnej aparatury pomiarowej wynosi ok. 35 tys. USD [2, 3, 4, 5].

Chemoluminescencja (CL) jest drugą metodą analityczną wykorzystującą zjawisko świecenia. W tym przypadku czynnikiem wywołującym świecenie jest proces chemiczny zachodzący z chwilą dodania do próbki luminolu. Światło wyzwalane w toku reakcji ulega wzmocnieniu w fotopowielaczu i przetworzeniu na impulsy w analizatorze. Choć zasada budowy aparatury jest podobna jak w przypadku aparatury TL, jest ona znacznie prostsza, a tym samym tańsza. Zakres możliwości wykorzystania metody CL do wykrywania napromieniowanych przypraw i ziół jest

jednak znacznie mniejszy niż metody TL, ponieważ powtarzalność wyników jest ciągle niezadowalająca [4,5].

Metoda wiśkozymetryczna oparta jest na pomiarze lepkości żelowych rozтворów wodnych otrzymanych przez wygrzewanie silnie rozdrobnionych przypraw przy pomocy czulego wiśkozymetru. Pozytywne wyniki uzyskano oznaczając lepkość w przyprawach zawierających ponad 25% skrobi, których wilgotność w czasie składowania nie przekraczała 75 %. Dawka stosowana do radiacyjnej konserwacji musi przewyższać 4 kGy. W przeciwnym przypadku nie uzyskuje się zmian lepkości, mogących stanowić dowód napromieniowania. Wykorzystywany jest w tym przypadku proces częściowej degradacji skrobi pod wpływem napromieniowania, prowadzący do obniżenia lepkości. [3, 4, 5].

Metoda pomiaru lepkości elektrycznej testowana była wyłącznie na napromieniowanych ziemniakach. Badanie polega na mierzeniu oporności przy dwóch częstotliwościach przykładanego w okresach sekundowych prądu (0,1–1,0 mA) wynoszących 5 Hz i 50 Hz. Pomiary prowadzi się w temperaturze 20°C. Elektrody oddalone są o 10 mm. Jeżeli stosunek oporności przy obu częstotliwościach (50 Hz/5 Hz) jest wyższy od wartości 0,36 oznacza to, że bulwy są nienapromieniowane, gdy jest niższy – że są napromieniowane. Opisaną metodą wykrywano ziemniaki napromieniowane dawką 50 Gy, w sześć miesięcy po zbiorze. Bardzo istotne znaczenie ma temperatura pomiaru, usytuowanie elektrod w bulwie, rodzaj i charakterystyka elektrod, wartość A/V. Metoda jest ciągle w stadium badawczym. Wielu specjalistów ma do niej stosunek sceptyczny [4, 5].

Metoda pomiaru absorpcji w bliskiej podczerwieni (NIR) była dotychczas testowana na sproszkowanych próbkach niektórych przypraw (pieprz i papryka). Stosowana jest wyłącznie technika refleksyjna, w której stosuje się drobno sproszkowany proszek nałożony na szlifowaną płytkę kwarcową z dociśnięciem (ok. 1 N/cm²). Widma rejestruje się w układzie log (1/R) w zakresie 1000–2500 nm. Z uwagi na niewielkie zmiany stosuje się wielokrotny zapis widma z obróbką komputerową. Zmiany widmowe rejestruje się w kilku zakresach widma: przypisywane są one głównie zmianom zachodzącym w olejach roślinnych – składnikach badanych przypraw. Dotychczas pozytywne wyniki uzyskano badając próbki różnych gatunków pieprzu i mielonej papryki, napromieniowane stosunkowo wysokimi dawkami [4, 5].

Do wykrywania napromieniowanej żywności, testowane są również metody fizyczne takie jak: kalorymetria różnicowa, analiza termograwimetryczna, metody dyfrakcji promieniowania X, pomiar temperatury wrzenia ekstraktów wodnych. Przy zastosowaniu tych metod nie uzyskano jednak zadowalających wyników.

METODY CHEMICZNE

Metody te polegają na oznaczaniu, głównie metodami chromatograficznymi, zawartości produktów cząsteczkowych, które po napromieniowaniu występują w zwiększonych ilościach w próbkach. Najlepsze wyniki uzyskano oznaczając lotne produkty częściowego rozkładu lipidów w żywności zawierającej ponad 5% tłuszczów.

Metoda oznaczania lotnych produktów częściowego rozkładu kwasów tłuszczowych opiera się na wykorzystaniu stosunkowo mniejszej odporności radiacyjnej tłuszczów, w których pod wpływem promieniowania jonizującego zachodzi pękanie wiązań estrowo-karbonylowych. Należy zaznaczyć, że podobne procesy przebiegają np. podczas smażenia. Jednym z produktów destrukcji lipidów są węglowodory (powyżej 10 atomów węgla w łańcuchu) dające się stosunkowo łatwo separować i oznaczać chromatograficznie, a ich stężenie w próbkach żywności napromieniowanej jest kilkakrotnie wyższe niż w nienapromieniowanej.

Procedura wykrywania napromieniowania jest następująca: ekstrahuje się przy pomocy mieszaniny pentan-izopentan lub heksanu węglowodory z rozdrobnionej masy badanego produktu, odparowuje nadmiar rozpuszczalnika, oddestylowuje lotne węglowodory i rozdziela na polarne i niepolarne na kolumnie z silica gelem lub z florisilem. Produkty niepolarne są następnie badane metodą chromatografii gazowej. Na podstawie porównania wysokości pików odpowiadających wybranym węglowodorom, tj. tym, które wykazują po napromieniowaniu największe zmiany stężenia w danym produkcie, (najczęściej tetradekan, heksaden i heptadekan) stwierdza się, czy żywność była napromieniowana, czy nie. Wstępnego rozdzielania produktów radiacyjnej dekompozycji lipidów można także dokonywać metodą chromatografii cieczowej. Prowadzone są próby wykorzystania systemu programowanego ogrzewania próbek do 300°C w przepływie gazu nośnego, absorpcji węglowodorów na odpowiedniej kolumnie, desorpcji termicznej tych ostatnich i analizie na chromatografie gazowym. W tym przypadku procedura analityczna jest znacznie uproszczona i analiza odbywa się na chromatografie gazowym wyposażonym w odpowiednie przystawki. Metoda daje bardzo dobre wyniki w przypadku żywności zawierającej powyżej 5% tłuszczu. Z wysokim stopniem prawdopodobieństwa wykrywane są produkty napromieniowania takie jak drób, wieprzowina, krewetki [4, 5, 8].

Metoda oznaczania cyklobutanonów pozwala wykrywać napromieniowanie w produktach, które zawierają tłuszcze w ilościach powyżej 0,5%, oraz co najmniej 100 mg kwasów tłuszczowych. Cyklobutanony są to czterocząonowe cykliczne pochodne butanu, powstające w niewielkich ilościach w procesie przemian radiacyjnych tłuszczów. Najczęściej oznacza się zawartość 2-alkilobutanonu. Metodyka oznaczania jest złożona, ponieważ wymaga stosowania skomplikowanej techniki ekstrakcyjnej, a następnie separacji chromatograficznej produktów oraz identyfikacji cyklobutanonów metodą spektrometrii mas. Konieczne jest także syntezowanie odpowiednich wzorców (cyklobutanony z odpowiednimi podstawnikami alkilowymi charakterystycznymi dla danego produktu), niezbędnych przy identyfikacji. Stosując tę metodę wykrywano napromieniowanie w drobiu, wieprzowinie, krewetkach, a także w udkach żabich, rybach, owocach awokado, niektórych przyprawach i produktach jajecznych [4, 5, 17].

Metoda oznaczania o-tyrozyny, która powstaje w produktach mięsnych w wyniku reakcji fenyloalaniny (składnik białka) z rodnikami hydroksylowymi OH generowanymi radiacyjnie w wodzie zawartej w tkance, jest szybka i stosunkowo prosta. Po hydrolizie w osuszonej próbce (wymrażanie) orto-tyrozyna może być oznaczona bez dalszego oczyszczania metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

wej (HPLC). Jednakże potwierdzenie wyniku analizy wymaga zebrania frakcji zawierającej o-tyrozynę i zidentyfikowanie jej metodą GS-Ms.

Mięso napromieniowane dawką ok. 5 kGy, zawiera ok. 10 razy więcej o-tyrozyny niż nienapromieniowane. Zawartość o-tyrozyny w nienapromieniowanym mięsie zależy jednak od różnych czynników zewnętrznych, a w napromieniowanym od mocy dawki i temperatury. Z tych względów metoda nie jest w pełni wiarygodna. Najlepsze wyniki uzyskano badając napromieniowane krewetki. [4, 5, 7].

Metoda badania uszkodzeń DNA jest z pewnością metodą przyszłościową. Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) obecny jest w komórkach wszystkich produktów żywnościowych, zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i roślinnego. Pod wpływem promieniowania następują charakterystyczne uszkodzenia w DNA, polegające na destrukcji członów pirymidynowych i purynowych, utlenianiu tymin, fragmentacji struktur jedno- i dwuniciowych, sieciowaniu poprzecznym nici itp. Uszkodzenia radiacyjne DNA mogą być identyfikowane metodami takimi jak stosowane są w radiobiologii do badania DNA i RNA (chromatografia gazowa i cieczowa, spektrometria mas, fluorymetria i inne). Obecnie czynione są próby adaptacji tych metod do potrzeb wykrywania napromieniowanej żywności. Jak dotychczas nie uzyskano pozytywnych wyników w badaniach destrukcji zasad pirymidynowych i purynowych, ze względu na wysokie zawartości testowanych produktów w żywności. Stosowanie prób immunologicznych w celu stwierdzenia radiacyjnego utleniania tyminy do glikolu tymidyny również nie dało pozytywnych wyników, choć jest to metoda dobrze sprawdzająca się w badaniach czystego DNA. Perspektywiczne wydaje się natomiast stosowanie przeciwciał monoklonalnych, do identyfikacji uszkodzeń pojedynczych nici DNA. Do badania fragmentacji nici DNA wywołanych działaniem promieniowania stosowane są różne metody, jak eluowanie na filtrach, fluorymetria, analiza enzymatyczna grup końcowych, elektroforeza. Obiecujące wyniki uzyskano stosując elektroforezę mitochondrialnego DNA oraz elektroforezę mikrożelową wyizolowanych komórek. Obserwacja mikroskopowa umożliwia określenie wymiarów „kometek” migrujących z komórek po elektroforezie, stanowiących odbicie fragmentacji i DNA. „Kometki” wokół komórek napromieniowanych są wyraźnie większe i bardziej asymetryczne. Metoda ta, nazywana potocznie „metodą kometkową”, ma szansę zastosowania do wykrywania napromieniowanego mięsa, ryb, krewetek, owoców, grzybów i warzyw. Należy wszakże zaznaczyć, że podobne do radiacyjnych zmiany kształtu „kometek” występują np. w żywności nieświeżej lub konserwowanej innymi metodami. Z tego względu pozytywny wynik testu kometkowego może stanowić jedynie wstępną informację o napromieniowaniu, wymagającą bezwzględnie potwierdzenia inną metodą [4, 5].

Metoda oznaczania H_2 i CO. Wodór i tlenek węgla powstają w niewielkich ilościach podczas napromieniowania takich produktów jak mrożone mięso, zboża, przyprawy. W czasie długiego przechowywania produktów gazy te wydelfundowują. Stwierdzono jednak, że H_2 wydelfundowuje z mrożonego mięsa po kilku tygodniach, a CO dopiero po kilku miesiącach. Tak więc, w niektórych przypadkach oznaczanie wymienionych gazów może posłużyć do identyfikacji napromieniowania. Procedura oznaczania jest niezwykle prosta. Próbkę żywności w ilości kilkuset gramów, umieszczoną w naczyniu szklanym, stanowiącym część zamkniętego układu obiegowego

gazu, podgrzewa się w piecyku mikrofalowym, a wydzielone gazy analizuje przy pomocy wbudowanych sensorów. Podobnie jak „metoda kometkowa”, oznaczanie H_2 i CO w żywności może być traktowane wyłącznie jako wstępny test identyfikacyjny, wymagający potwierdzenia [5]. Metody tego rodzaju, tzw. *metody screeningowe*, pozwalają na szybkie wstępne sklasyfikowanie badanych próbek i poddanie tylko niektórych złożonym oznaczeniom identyfikacyjnym.

Inne metody chemiczne, testowane z punktu widzenia możliwości zastosowania ich do wykrywania napromieniowanej żywności, to np. nie w pełni jeszcze udokumentowane nadutlenie lipidów i oznaczanie tlenków cholesterolu, których nie obserwuje się w większości nienapromieniowanych produktów żywnościowych. Metody te znajdują się w stadium wstępnego opracowania.

METODY MIKROBIOLOGICZNE

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne przypraw i ziół jest wysokie i wynosi 10^3 – 10^8 mikroorganizmów na gram. Po napromieniowaniu tych produktów dawką 7–10 kGy, zanieczyszczenie spada o kilka rzędów. Fakt ten stanowi podstawę metod mikrobiologicznych wykrywania napromieniowania w tych produktach.

Metoda APC/DEFT. Opracowana w Finlandii metoda polega na różnicowym określaniu liczby bakterii, zawartych w próbkach żywności zliczanych dwiema technikami mikrobiologicznymi: konwencjonalną, zliczania bakterii żywych na płytkach agarowych (APC – aerobic plate count) oraz techniką filtrów epifluorescencyjnych (DEFT – direct epifluorescent filtration technique) zliczania wszystkich bakterii – żywych i martwych. Określoną nadwyżkę produktu zawieszają się w roztworze fizjologicznym, wytrząsają i odfiltrują na bibule. Przesącz jest wykorzystywany do obliczania ilości bakterii obiema metodami – APC i DEFT. Ilość żywych mikroorganizmów określa się na płytkach agarowych (metoda APC), zliczając kolonie bakterii po inkubacji (30°C) trwającej 72 godziny. Metoda DEFT polega na podciśnieniowym odsączeniu wszystkich bakterii na sączkach membranowych w kolumnie filtracyjnej. Osad na sączku wybarwia się oranżem akrydynowym, a po wysuszeniu, nakropleniu olejku immersyjnego i przykryciu szkiełkiem nakrywkowym zlicza się ilość bakterii pod mikroskopem epifluorescencyjnym.

W napromieniowanym produkcie liczba zliczeń DEFT jest co najmniej cztery rzędy wyższa niż zliczeń APC. Metoda jest stosunkowo prosta i mogłaby być stosowana w każdym dobrze wyposażonym laboratorium mikrobiologicznym, wymaga jednak uzupełniających, specjalistycznych badań chemicznych z uwagi na to, że zbliżony wynik obniżenia zawartości żywych mikroorganizmów w przyprawach i ziołach uzyskuje się stosując do ich konserwacji tlenek etylenu lub inne fumiganty [4, 5, 12].

Test LAL. Test LAL (*Limbus Amoebocyte Lysate Test*) polega na określaniu ilości lipopolisacharydów (LPS) w błonach komórkowych przeżywających i nieprzeżywających napromieniowanie bakterii gram-ujemnych zawartych w badanej próbce. Zawartość LPS określana jest w jednostkach endotoksyny na gram próbki. Endotoksyna jest odporna na działanie podwyższonej temperatury i na działanie promieniowania, choć w ograniczonej skali.

Z uwagi na wymienione ograniczenia, metody mikrobiologiczne identyfikacji napromieniowania żywności są metodami screeningowymi [5].

METODY BIOLOGICZNE

Są oparte na wykorzystaniu efektów biologicznych towarzyszących napromienianiu, polegającym na ograniczeniu lub zatrzymaniu procesów życiowych, przede wszystkim w części nasiennej nie przetworzonych produktów roślinnych. Zakres obserwowanych zmian zależy na ogół od zastosowanej dawki promieniowania.

Metoda oceny efektywności kiełkowania została przetestowana na pestkach z napromieniowanych cytrusów oraz na ziarnach napromieniowanych zbóż. Pestki lub ziarna, w ilości wystarczającej do oceny statystycznej, umieszcza się na ligninie nasyconej pożywką roślinną i przechowuje w stałej temperaturze (25° C) do momentu pojawienia się kiełków (co najmniej 9 dni). Pierwszy test polega na zliczaniu pestek lub ziaren, które wykiełkowały w zbiorach próbek nienapromieniowanych i badanych. Tam, gdzie liczba kiełków jest znacznie mniejsza niż w porównawczych próbkach nienapromieniowanych lub nie ma ich w ogóle, mamy do czynienia z próbką napromieniowaną. Drugi test polega na porównywaniu długości korzenia po dalszych 12 dniach przechowywania (dłuższe korzonki pojawią się w próbkach nienapromieniowanych). Trzeci test przeprowadza się po kolejnych 19 dniach przetrzymywania próbek na pożywce i porównuje wysokości kiełków zielonych.

Statystycznie znamienne wyniki opisanych testów stanowią wiarygodny dowód napromieniowania próbek. Mankamentem metody jest jej długotrwałość. [4, 5, 18].

W metodzie połówkowej oceny biologicznej aktywności zarodkowej (*half-embryo*) usuwa się z pestek otoczki zewnętrzne i wewnętrzne, a wyizolowane zarodki umieszcza na ligninie zwilżonej wodą destylowaną i przetrzymuje w inkubatorze w temperaturze 35°C. Stosuje się ponadto lampy pobudzające. W takich warunkach zarodki kiełkują po 3–4 dniach. Zliczając zarodki, które wykiełkowały, ocenia się czy badane owoce były czy też nie napromieniowane. Normalizacja metody polega na sprawdzaniu, po jakim czasie wykiełkowało 50% zarodków. Dla każdej partii owoców należy przeprowadzić test, polegający na badaniu owoców nienapromieniowanych i napromieniowanych w laboratorium dawką 1–3 kGy. Zadowolające wyniki uzyskano w Japonii testując zarodki owoców cytrusowych [4, 5, 6].

Metoda wykrywania napromieniowania świeżych pieczarek polega na odcinaniu dolnych części kapelusza grzyba wraz z trzonem tak, aby w pozostałej części kapelusza odsłonić blaszki zarodnikowe. Grzyby badane i nienapromieniowane o zbliżonym okresie rozwoju i kształcie układa się, co najmniej po 10 sztuk z każdej grupy, na białym papierze. Po jednej, dwóch lub trzech dobach przechowywania w pokojowej temperaturze (w zależności od stanu świeżości badanych grzybów) podnosi się ostrożnie kapelusze i porównuje ilości zarodników na papierze. W przypadku grzybów nienapromieniowanych jest ich dużo (zaczernienie papieru), a w przypadku napromieniowanych niewiele (pojedyncze punkciki).

W celu uwiarygodnienia testu, należy jednocześnie zbadać w ten sam sposób grzyby nienapromieniowane i napromieniowane w laboratorium [5].

PODSUMOWANIE

Z przedstawionego przeglądu metod wykrywania napromieniowania żywności wynika, że nie ma i chyba nie będzie w najbliższym okresie jednej, uniwersalnej metody, która mogłaby być zastosowana w odniesieniu do dowolnego produktu spożywczego. Z drugiej strony należy mieć świadomość, że stopień wiarygodności metod identyfikacyjnych jest różny. Poza nielicznymi przypadkami stuprocentowej pewności wykrywania napromieniowania (np. badanie kości w produktach mięsnych i drobiu) wiarygodność wyniku zależy w dużej mierze od wysokości dawki promieniowania, rodzaju produktu i jego stanu. Z tego względu, aby mieć pewność identyfikacji napromieniowania, należy stosować dwie lub nawet trzy metody wykrywania w odniesieniu do jednego produktu. Mnogość opracowanych metod powoduje, że taka procedura staje się możliwa w odniesieniu do coraz większej grupy produktów spożywczych.

Istotną rzeczą jest, aby metody identyfikacji napromieniowanej żywności były możliwe do adaptacji w laboratoriach zlokalizowanych w różnych miejscach i w różnych częściach świata i aby wszędzie były w jednakowym stopniu wiarygodne. W tym celu przeprowadzane są międzynarodowe testy identyfikacji określonych produktów żywnościowych przy zastosowaniu metod wykrywania napromieniowania, najlepiej sprawdzających się w praktyce. Przeprowadzono szereg testów z wykorzystaniem metody EPR, badając prawidłowość oceny napromieniowania w drobiu, mięsie wieprzowym, rybach, suszonych owocach, orzechach pistacjowych. Testy te oparte na pomiarze termoluminescencji obejmowały badanie napromieniowania w przyprawach i ziołach najczęściej spotykanych w handlu. Test z wykorzystaniem metody oznaczania lotnych węglowodorów w lipidach przeprowadzono na mięsie drobiowym.

Ostatnio zostały zainicjowane dalsze testy dotyczące badania napromieniowania skorupiaków metodą EPR oraz test oparty na metodzie kometkowej oznaczania fragmentacji DNA w różnych produktach.

Analiza wyników testów stanowi podstawę opracowywania standardowych metod identyfikacji napromieniowanej żywności, wprowadzane są w niektórych krajach doi obowiązującego systemu kontroli jakości żywności.

Np. w Niemczech i we Francji, metody spektroskopii EPR i termoluminescencji są oficjalnie stosowane w przypadku badania produktu żywnościowego w celu ustalenia czy był on napromieniowany. W wymienionych krajach powołano instytucje, których celem jest wykonywanie tego rodzaju badań. Podobnie jest w Wielkiej Brytanii. Także w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie utworzono Laboratorium Identyfikacji Napromieniowania Żywności, które spełnia podobną rolę w Polsce. W Laboratorium mogą być wykonywane badania identyfikujące żywność metodami spektroskopii EPR oraz termoluminescencji. Prowadzone są prace, mające na celu uruchomienie w niedługim czasie „metody kometkowej” wykrywania uszkodzeń DNA oraz w terminie późniejszym metody oznaczania lotnych produktów częściowego rozkładu lipidów z zastosowaniem chromatografii gazowej.

Badanie nad opracowaniem metod wykrywania napromieniowania żywności są prowadzone w ICHTJ w ramach projektu badawczego KBN 5S 307 05103.

W. Stachowicz

DETECTION OF FOODS PRESERVED BY RADIATION

Summary

Analytical methods suitable for the detection of irradiated foods are reviewed. The detection methods are classified as physical, chemical, microbiological and biological, respectively. Reliability, robustness, sensitivity, accuracy and simplicity of each method are discussed.

PIŚMIENICTWO

1. *Dodd N., A.J. Swallow and Lay F.*: Use of ESR to identify irradiated food. *Radiat. Phys. Chem.*, 1985, 26, 451. 2. *Malec-Czechowska K., Danczewicz A.M., Szot Z.*: Metoda termoluminescencji w identyfikacji napromienionej żywności, Krajowe Sympozjum „Technika Jądrowa w Przemysle, Medycynie, Rolnictwie i Ochronie Środowiska”, 24–27 kwietnia 1995 Warszawa, Referaty 1995, 131. – 3. *Heide L., Boegl K.W.*: Detection methods for irradiated food – luminescence and viscosity measurements, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1990, 57, 201. – 4. IAEA, Analytical Detection Method for Irradiated Foods, FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, 1991, IAEA-TECDOC-587, ISSN 1011-4289, 1991 – 5. IAEA, Final Research Co-operation Meeting of the FAO/IAEA Co-ordinated Research Programme on Analytical Detection Methods for Irradiation Treatment of Foods (ADMIT), Joint FAO/IAEA Division Report, 1994. – 6. *Kawamura K., Uchiyama S. and Saito Y.*: Improvement of the half embryo test for detection of *gamma* irradiated grapefruit, *J. Food Science*, 1989, 46, 387. – 7. *Meier K., Buerging R., Froehlich D.*: Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated chicken and the comparison with other methods. *Radiat. Phys and Chem.*, 1990, 35, 332. – 8. *Nawar W.W., Zhu Z.R., Yoo Y.J.*: Radiolytic products of lipids as marker for the detection of irradiated meat, *Food Irradiation and the Chemist*, Wyd. D.E. Johnson, M.H. Stevenson (The Royal Society of Chemistry), 1990, 13. – 9. *Raffi J.J., Angel J.-P.*: Electron spin resonance of irradiated fruits, *Radiat. Phys. and Chem.*, 1989, 34, 891; – 10. *Raffi J.J., Stevenson M.H., Kent M. Theiry M., Belliaro J.J.*: European intercomparison on esr identification of irradiated foodstuffs, *Int. J. Food Science and Techn.*, 1992, 27, 111.

11. *Schreiber G.A., Helle N., Boegl K.W.*: Detection of irradiated food – methods and routine applications, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1993, 63, no 1, 105. – 12. *Sjoeberg A.M., Manninen M., Pinnioja S., Honkanen E., Latva-Kala K.*: Irradiation of species and its detection, *Food Revz Internat.* 1991, 7, 233. – 13. *Stachowicz W., Strzelczak-Burlińska G., Michalik J., Wojtowicz A., Dziedzic-Gocławska A., Ostrowski K.*: Application of epr spectroscopy for control of irradiated food, *J. Sci. Food Agric.* 1992, 58, 404. – 14. *Stachowicz W., Burlińska G., Michalik J., Dziedzic-Gocławska A., Ostrowski K.*: Application of EPR spectroscopy to radiation treated materials in medicine, dosimetry and agriculture, *Appl. Radiat. Isot.*, 1993, 44, 423. – 15. *Stachowicz W., Burlińska G., Michalik J., Dziedzic-Gocławska A., Ostrowski K.*: The role of long lived EPR active species produced by ionizing radiation in biological materials as used in medical, dosimetric and agricultural studies, *Nukleonika*, 1993, 38, 67. – 16. *Stachowicz W., Burlińska G., Michalik J., Dziedzic-Gocławska A., Ostrowski K.*: The EPR Detection of Foods Preserved with the Use of Ionizing Radiation, *Radiat. Phys. Chem.* 1995, 46, 771. – 17. *Stevenson M.H., Crone A.V.J., Hamilton J.T.G.*: The use of 2-alkyl cyclobutanones for the detection of irradiated lipid containing foods, *Recent Advances on the Detection of Irradiated Food*. Wyd. J.J. Raffi, J.J. Belliaro, BCR Information, EUR/14315/En, CEC Brussels, 1992, 319. – 18. *Uchiyama S., Konno S., Toyooka M., Kawamura Y., Saito J.*: Studies on identification of *gamma*-irradiated grapefruit by germination method, *J. Food Hygiene Soc. Japan*, 1989, 30, 152.

Dn. 1995.05.11

03-195 Warszawa, ul. Dorodna 16