

Wang, M. K. Estes, Y. Seto, C. Humphrey, E. Pon, J. K. Iskander (1994): Norwalkvirus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: comparison and application of molecular method-based assays. *Journal of Clinical Microbiology and Immunology* 39, 213-215.

Lund, B. M. (2000): Freezing. U: Lund, B. M., T. C. Baird Parker, G. W. Gould, Editors, *The Microbiological Safety and Quality of Food Vol I*, Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, 122-145.

Lynt, R. K. (1966): Survival and recovery of enteroviruses from foods. *Applied Microbiology* 14, 218-222.

Moorhead, S. M., G. A. Dykes (2002): Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. *Letters in Applied Microbiology* 34, 72-76.

Palumbo, S. A., A. C. Williams (1991): Resistance of *Listeria*

monocytogenes to freezing. *Food microbiology* 8 (1), 63-68.

Xxx Pravilnik o načinu uzimanja uzoraka odnosno o metodama za obavljanje analiza i superanaliza namirnica i predmeta opće uporabe (NN 58/98)

Raj, H., J. Liston (1961): Survival of bacteria of public health significance in frozen sea foods. *Food Technology* 15, 429-434.

Shantz, E. J., E. A. Johnson (1992): properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiological Reviews* 56, 80-89.

* Rad je prezentiran kao poster na 3. hrvatskom mikrobiološkom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem (Poreč, 4. - 7. listopada 2004). ■

PRIMJENA EPR SPEKTROSKOPIJE PRI KONZERVIRANJU NAMIRNICA IONIZACIJSKIM ZRAČENJEM

II DIO. PROVJERA ISPRAVNOSTI DOZE U RAZNIM NAMIRNICAMA ŽIVOTINJSKOG PORIJEKLA KONZERVIRANIH IONIZACIJSKIM ZRAČENJEM

Maltar-Strmečki¹, N., B. Rakvin²

SAŽETAK

Primjena ionizacijskog zračenja u konzerviranju namirnica na svjetskom tržištu, zakonska regulativa vezana uz upotrebu tehnologije zračenja i zahtjev potrošača za jasnom deklaracijom ozračenih namirnica naglasila je potrebu razvoja analitičkih metoda za detekciju namirnica konzerviranih na takav način. Jedna od najpreciznijih metoda za identifikaciju ozračenih namirnica je metoda elektronske paramagnetske rezonancije (EPR). EPR spektroskopija

je fizikalna metoda koja promatra nesparene elektrone, posebno slobodne radikale uzrokovane primjenom zračenja. Može se upotrijebiti kao identifikacijski test ako su radikali stabilni tijekom komercijalnog roka upotrebe ozračenih namirnica, čije su komponente u čvrstom i suhom stanju, gdje je reaktivnost radikala međusobno i s vodom mala. Primjenjuje se na kostima u mesu i ribi, voću i povrću, te proizvodima takvih namirnica (čaj, začini i sl.), te namirnicama iz mora itd. U ovom radu opisana je primjena EPR spektroskopije u provjeri ispravnosti doze

¹Mr. sc. Nadica Maltar-Strmečki, asistent, Zavod za fiziku i biofiziku, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb

²Dr. sc. Boris Rakvin, znanstveni savjetnik, Institut "Ruđer Bošković", Zavod za fizičku kemiju, voditelj Laboratorija za magnetske rezonancije, Bijenička cesta 54, Zagreb, redoviti profesor, Zavod za fiziku i biofiziku, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb

u raznim namirnicama animalnog porijekla konzerviranih ionizacijskim zračenjem.

Ključne riječi: namirnica, ionizacijsko zračenje, detekcija, EPR

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) ili elektronska spinska rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda koja omogućuje detektiranje paramagnetskih centara (npr. radikala). Oni mogu biti proizvedeni ionizacijskim zračenjem. Slobodni radikali inducirani ionizacijskim zračenjem mogu se detektirati u čvrstim ili suhim dijelovima namirnica kao što su kosti (radikali hidroksiapatita), sjeme, koštice, ljuske i kora (radikali celuloze) ili u sušenom voću (radikali šećera) kao i u nekim začинима i čajevima (koji sadržavaju celulozu). Metoda je jednostavna, specifična i brza, no zahtjeva skupu opremu. Mjerenja nisu destruktivna i mogu se jednostavno ponavljati.

1. KONTROLA NAMIRNICA KONZERVIRANIH IONIZACIJSKIM ZRAČENJEM

Kontrola namirnica konzerviranih ionizacijskim zračenjem neophodno je važna zbog toga što je potrebno osigurati nadzor nad provedbom samog procesa ozračivanja, osigurati da je proces proveden sigurno i ispravno u skladu sa svim relevantnim propisima vezanim za ozračivanje namirnica i u skladu sa propisima koji se odnose na zdravstvenu ispravnost tako konzerviranih namirnica. Osim toga neophodno je osigurati sistem dokumentacije koja prati ozračene namirnice radi osiguranja da namirnice koje su konzervirane na takav način i ulaze

▼ **Tablica 1.** ECN (European Committee of Normalization) protokoli koji se odnose na primjenu EPR spektroskopije.

EN 1786	Foodstuffs-Detection of irradiated food containing bone by ESR spectroscopy.
EN 1787	Foodstuffs-Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy
EN 13708	Foodstuffs-Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy.

na međunarodno tržište zadovoljavaju navedene propise i da su ispravno označene.

Na osnovu brojnih znanstvenih istraživanja Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je u suradnji s Organizacijom Ujedinjenih naroda za prehranu i poljoprivredu (FAO) i Međunarodnom agencijom za atomsku energiju (IAEA) donijela zaključak: "Ozračivanje namirnica, kao metoda konzerviranja, ne uzrokuje nikakve promjene koje bi mogle izazvati radijacijski ili toksikološki rizik, niti uzrokuje mikrobiološke ili nutritivne promjene u namirnici" (WHO, 1981, 1994, 1999). Do danas, ozračivanje hrane je dozvoljeno u 40 zemalja za različite vrste namirnica. U nekim zemljama je zabranjena, no mnoge zemlje još nemaju nikakve propise. U našoj zemlji na snazi je Pravilnik o uvjetima konzerviranja namirnica i predmeta opće uporabe ionizacijskim zračenjem iz 1994. (NN RH 46/1997).

Iz navedenog je nastala potreba za razvojem jednostavne analitičke metode za detekciju namirnica konzerviranih ionizacijskim zračenjem. Jedna od najpreciznijih metoda koja se koristi je metoda EPR spektroskopije.

IAEA i Europska Unija (EU) pomogle su istraživačima organiziranim sastancima i usporednim testovima što je dovelo do usklađenih protokola za kontrolu namirnica konzerviranih ionizacijskim zračenjem. U tablici 1. dan je popis protokola koji se odnose na primjenu EPR spektroskopije.

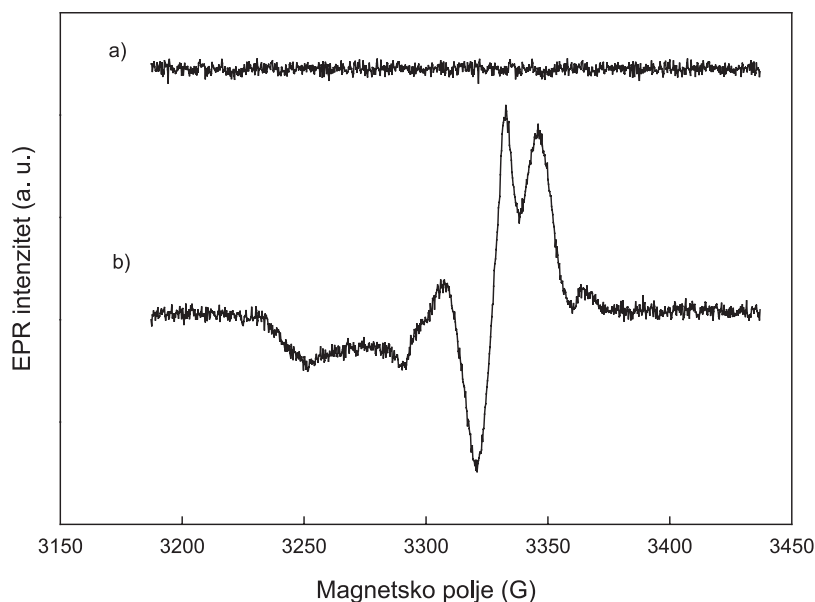
2. PRIMJENA EPR SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI ANIMALNIH NAMIRNICA KONZERVIRANIH IONIZACIJSKIM ZRAČENJEM

a) EPR detekcija mesa konzerviranog ionizacijskim zračenjem

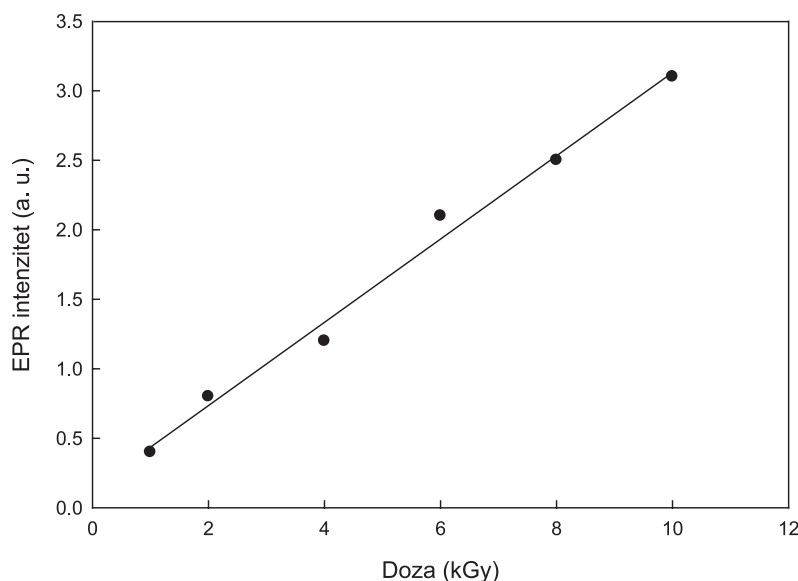
Istraživanje EPR signala induciranog zračenjem u kostima mesa započelo u svrhu postradijacijske dozimetrije (Ikeya i sur. 1980) i izračunavanja starosti mesa i školjki (Ikeya i sur. 1981). Detalji o najoptimalnijim uvjetima prilikom EPR detekcije ozračenih kostiju su publicirani te objedinjeni u protokolu EN 1786.

U neozračenom uzorku kosti nema signala (slika 1. a). Ozračeni uzorci pokazuju asimetričnu apsorpciju od hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (slika 1.

▼ **Slika 1.** Tipičan EPR spektar kosti peradi
a) neozračen uzorak
b) uzorak ozračen na 10 kGy



▼ **Slika 2.** Ovisnost EPR signala od dozi kod ozračenosti kosti pilećeg batka



b) koji je glavni sastojak kosti. Ako koštana srž nije odstranjena od kosti EPR spektar pokazuje dodatnu simetričnu apsorpciju (Raffi i sur. 1996).

Općenito, za snimanje dobrog spektra dovoljni su i mali dijelovi kosti, a preporučljivo je odstraniti svu koštanu srž. Umjesto kostiju, mogu se koristiti i zubi.

EPR spektroskopija se uspješno koristi na kosti

slijedećih vrsta mesa: pilećeg, žabljeg, janjećeg, gušćeg, junećeg, purećeg, pačjeg, svinjskog i zečjeg (Raffi 1998., Chawla i sur. 2002., Dulkan i sur. 1998., Polat i sur. 1997).

Najmanja doza koja se može detektirati je 500 Gy, ali u mnogim slučajevima i mnogo manja. Važno je naglasiti da rezultati detekcije ne ovise o grijanju uzorka (npr. kuhanje u vodi), ako u uzorku nema koštane srži. Detekcija ozračenih uzoraka moguća je i do 12 mjeseci nakon ozračivanja. Osim toga, EPR metoda se može koristiti i kao identifikacijska metoda sekundarnih produkata kao što su strojno iskošteno meso (SIM). Omogućava detekciju karakterističnog zračenjem induciranog signala u dijelovima kosti izvađenih iz ozračenog SIM.

Kao i za postradijacijsku dozimetriju, koristi se proporcionalnost intenziteta signala s dozom (slika 2.), te provjerava ispravnost primljene doze u kostima mesa (Polat i sur. 1997., Dulkan i sur. 1998). No, kemijski sastav i stupanj kristaliničnosti kosti utječe na broj radikala i intenzitet signala.

b) EPR detekcija riba konzerviranih ionizacijskim zračenjem

EPR signali neozračenih i ozračenih kostiju riba slični su signalima kostiju mesa. Tipovi EPR spektara prikazani su na slici 3. Treba naglasiti da spektri uzorka ozračenih s malim dozama do 2-3 kGy često pokazuju kombinaciju nespecifičnog (slika 3. a) i specifičnog signala (3. b). EPR protokoli uspješno se primjenjuju na kosti slijedećih riba: pastrva, sardina, losos, pišmolj, bakalar, skuša i sl. (Raffi i sur. 1996., Abdel-Rehim i sur. 1997). EPR detekcijska

metoda se može koristiti i za ostale vrste riba koje sadrže kost, no prethodno je potrebno provesti kinetičke studije da se provjeri da li je vrijeme života EPR signala duže od komercijalnog roka trajanja proizvoda.

Najmanja doza koja se može detektirati kod ozračenih zubi je 500 Gy, a za kosti riba 1 kGy. Detekcija je uspješna do 5 mjeseci nakon ozračivanja ako se riba čuva na 4-5°C, maksimalnoj temperaturi skladištenja ribe.

c) EPR detekcija namirnica koja sadrži školjke konzerviranih ionizacijskim zračenjem

Kompleksni signal uočen je kod ozračenih školjki, a sastoji se od preklapanja spektara različitih radikala koji su vezani uz kemijski sastav školjke, npr. signali hitina i Mn^{2+} .

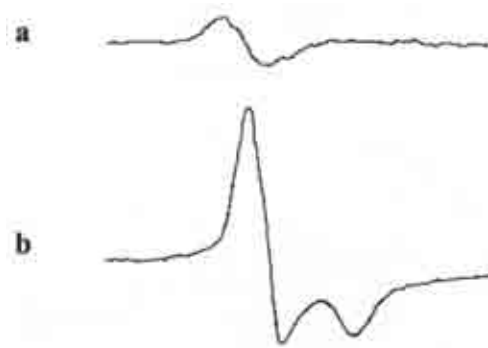
U slučajevima morskih plodova, kao što su mekušci, rakovi i školjke analiza EPR signala je relativno jednostavna. U neozračenom uzorku EPR signala nema ili je vrlo slab, dok je u ozračenom uzorku signal jak, što omogućuje detekciju do najmanje doze od 5 Gy. Gotovo da nema opadanja signala s vremenom, te se vrlo često koristi za datiranje fosilnih školjki.

S druge strane, signali detektirani u klijestima rakova, kao što su norveški škampi (Norway lobster) su vrlo kompleksni zbog velikog Mn^{2+} signala (slika 4.), te je razlika između ozračenog i neozračenog signala mala, što otežava identifikaciju ozračenog uzorka (Stewart i sur. 1992., 1996).

3. POTENCIJALNE PRIMJENE EPR SPEKTROSKOPIJE

Mnoge studije su rađene i na suhim produktima kao što je prah mliječnih proteinskih koncentrata (Kispeter i sur. 1992). EPR metoda primjenjena je i za detekciju ozračenih žitnih pahuljica s uobičajenim vodenim sadržajem (10-13%). Međutim, od dva

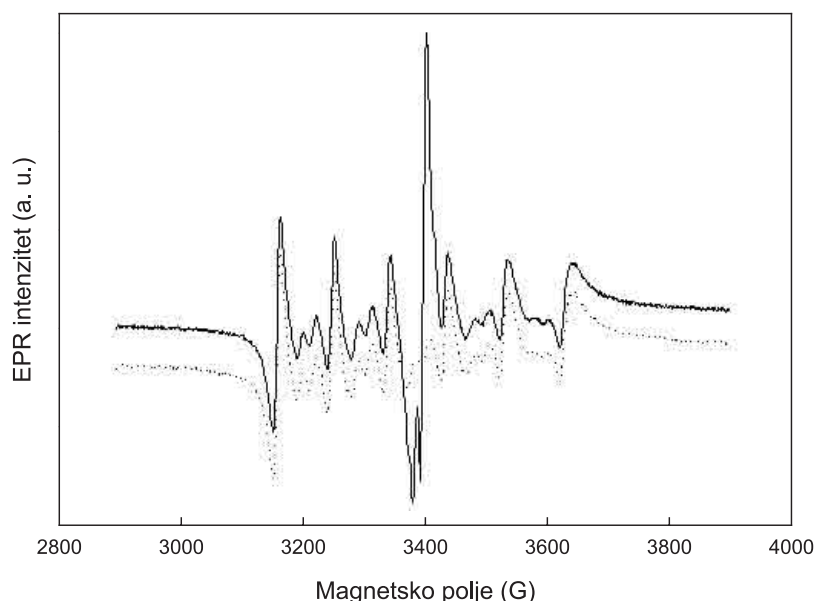
▼ Slika 3. EPR spektar kosti pastirve
a) neozračen uzorak
b) uzorak ozračen na 2 kGy



zračenjem inducirana radikala u škrobu specifičan je nestabilan (Raffi i sur. 1983). Stoga je detekcija ograničena na razdoblje od nekoliko mjeseci do jedne godine, ovisno o sastavu žitnih pahuljica (Cutrubinis i sur. 2004).

EPR tehnika je obećavajuća fizikalna metoda koju je moguće odmah uvesti u svrhu rutinske kontrole namirnica konzerviranih ionizacijskim zračenjem. Može se upotrijebiti kao identifikacijski test ako su radikali stabilni tijekom komercijalnog roka upotrebe

▼ Slika 4. EPR spektar klijesta norveškog škampa (Norway lobster). Neozračen uzorak prikazan je točkastom linijom, dok puna linija prikazuje uzorak ozračen na 5 kGy.



ozračene namirnice, odnosno u slučaju kad je reaktivnost radikala međusobno i s vodom mala. Prednosti metode su nedestruktivnost, brzina (uz osposobljeno osoblje) i mogućnost detekcije vrlo niskih doza zračenja. Nedostatak je ograničenje primjene na čvrste i suhe uzorke, te skupoća opreme. Metoda je osposobljena i primjenjuje se u Laboratoriju za magnetske rezonancije na Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu.

SUMMARY

APPLICATION OF EPR SPECTROSCOPY IN PRESERVATION OF FOODSTUFF WITH IONIZING RADIATION

PART 2. TESTING OF PRESCRIBED DOSE IN FOODSTUFF OF ANIMAL ORIGIN PRESERVED WITH IONISING RADIATION

Application of ionising radiation in the preservation of foodstuffs on the world food market, irradiation treatment regulations and demands of consumers for clear declaration of irradiated foodstuffs have emphasised the need for the development of analytical methods for the detection of foodstuffs preserved by ionising radiation. One of the most accurate methods for the identification of irradiated foodstuffs is EPR spectroscopy. EPR spectroscopy is a physical method for detecting unpaired electrons, especially free radicals induced by ionising radiation. EPR can be used as identification test if the radicals are stable over the maximum commercial shelf life of irradiated food with solid and dry components, and where the rigid structure of the matrix inhibits radicals reacting with each other or with food components present in the its wet portion. EPR can be applied to meat and fish bones, fruit and vegetables and the relative products (tea, seasonings, etc.), seafood, etc. This paper describes the use of EPR spectroscopy for assessing the dose level in various foodstuffs of animal origin preserved with ionising radiation.

Key words: foodstuffs, ionising radiation, detection, EPR

LITERATURA

Abdel-Rehim F., A.A. Badfar, H.A. Al-kahtani, H.M. Agutarboush (1997): The use of Electron spin resonance spectroscopy for detection of irradiated Mackerel, Appl. radiat. Isot. 48, 241-245.

Chawla S. P., P. Thomas, D.R. Bongirwar (2002): Factors influencing the yield of radiation induced electron spin resonance (ESR) signal in lamb bones, Food Research International 35,

467-473.

Cutrubinis M., H. Delincee, M. Stahl, O. Röder, H.J. Schaller (2004): Detection methods for cereal grains treated with low and high energy electrons, Radiat. Phys. Chem., in press.

Dulkan B., H. Tutluer, H.A. Fidanci, M. Polat (1998): ESR spectroscopic technique of testing for irradiation of chicken, Radiat. Phys. Chem. 51, 305-308.

EN 1786 (1996): Foodstuffs-Detection of irradiated food containing bone by ESR spectroscopy. Brussels. Belgium. European Committee of Standardization.

EN 1787 (2000): Foodstuffs-Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy. Brussels. Belgium. European Committee of Standardization.

EN 13708 (2001): Foodstuffs-Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy. Brussels. Belgium. European Committee of Standardization.

Ikeya M, T. Miki (1980): Electron spin resonance dating of animal and human bones. Science 207, 977-979.

Ikeya M, K. Ohamura (1981): Dating of fossil shells with electron spin resonance. J. Geology 89, 247-251.

Kispeter J., L.I. Horvath, L.I. Kiss (1992): Effect of ionizing - radiation on thermoluminescence and electron spin resonance intensities in milk protein concentrate powders. Food Strac. 11, 165-170.

Polat M., M. Korkmaz, B. Dulkan, Ö Korkmaz (1997): Detection of irradiated chicken and dosimetric properties of drumsticks bones, Radiat. Phys. Chem. 49, 363-369.

Raffi J., J.-P.L. Angel (1983): Influence of the physical structure of irradiated starches on their electron spin resonance spectra kinetics. J. Phys. Chem. 87, 2369-2373.

Raffi J., P. Stocker (1996): Electron Paramagnetic Resonance Detection of Irradiated Foodstuffs. Appl. Magn. Reson. 10, 357-373

Raffi J. (1998): Identifying irradiated foods, Trends in analytical chemistry 17, 226-233.

Stewart E. M., M.H. Stevenson, R. Gray (1992): Detection of irradiation in scampi tails-effects of sample preparation, irradiation dose and storage on epr response in the cuticle. Int. J. Food. Sci. Technol. 27, 125-132.

Stewart E. M., R. Gray (1996): A study on the effect of irradiation dose and storage on the esr signal in the cuticle of pink shrimp (pandalus montagni) from different geographical region. Appl. Radiat. Isot. 47, 1629-1632.

Xxx (1994): Pravilnik o uvjetima konzerviranja namirnica i predmeta opće uporabe ionizirajućim zračenjem. NN RH 46/1994.

World Health Organization (1981): Wholesomeness of Irradiated Food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO expert committee in food organization. WHO Tech. Rept. Ser. No. 659, WHO, Geneva.

World Health Organization (1994): Safety and nutritional adequacy of irradiated food. WHO, Geneva.

World Health Organization (1999): High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Tech. Rept. Ser. No. 890, WHO, Geneva.xxx (1994): Pravilnik o uvjetima konzerviranja namirnica i predmeta opće uporabe ionizirajućim zračenjem NN RH 46/1994. ■