

## PRIMENA EPR SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI SLOBODNIH RADIKALA U HRANI INDUKOVANIH $\gamma$ -ZRAČENJEM. IMPLEMENTACIJA STANDARDA EVROPSKE UNIJE

Aleksandar Ignjatović, Ivan Spasojević, Miloš Mojović

Fakultet za fizičku hemiju, Studentski trg 12-16, 11000 Beograd

*Nagrađeni rad mladog istraživača – komisija ME*

**Sadržaj** – U prezentovanom istraživanju su usvojeni i implementirani protokoli EU za detekciju hrane koja sadrži celulozu ili kristalni šećer, a koja je bila izložena jonizujućem zračenju, upotrebom EPR spektroskopije. Ustanovljeno je da se detekcija ozračenosti EPR spektroskopijom može uspešno primeniti na niz različitih namirnica koje se često obrađuju jonizujućim zračenjem. Osim toga praćenjem kinetike promene intenziteta EPR signala radikala celuloze, odnosno saharoze ustanovljeno je da se EPR spektroskopijom može utvrditi da li je hrana bila ozračena čak i nakon dužeg vremenskog perioda od vremena ozračivanja.

### 1. UVOD

Jonizujuće zračenje se često koristi za tretiranje različitih tipova namirnica u cilju povećanja njihovog higijenskog kvaliteta i roka upotrebe. Međutim, kako usled interakcije zračenja sa datim materijalom nastaju slobodni radikali, potencijalno opasni za ljudsko zdravlje, i kako može doći do kvalitativnih promena druge vrste (slobodni radikali su veoma reaktivni i mogu promeniti sastav namirnica), Evropska Unija (EU) i neke druge zemlje su ograničile upotrebu radijacije u obradi hrane i uvele kontrolu namirnica. Od šest protokola za detekciju ozračenih namirnica koji su usvojeni od strane Evropskog Komiteta za Normalizaciju, tri podrazumevaju upotrebu Elektronske Paramagnetne Rezonance (EPR-a) [1]. Evropski standard za detekciju ozračenih hrane koja sadrži celulozu [2] i evropski standard za detekciju hrane koja sadrži kristalni šećer [3] podrazumevaju upotrebu EPR spektroskopije, i od posebnog su značaja jer su u našoj zemlji ovi tipovi hrane najčešće obrađivani izlaganjem zračenju. Detekcija EPR-om je zasnovana na tome što jonizujuće zračenje indukuje stvaranje slobodnih radikala u hrani, koji su u čvrstim namirnicama najčešće dugoživeći, i koji se ovom metodom mogu direktno detektovati. Dok neozračena hrana uglavnom ima veoma slab EPR signal, ozračena hrana pokazuje jak EPR signal, tako da se na osnovu intenziteta pika u EPR spektru datog radikala može utvrditi da li je namirnica bila izložena jonizujućem zračenju. Cilj prezentovanog rada je savladavanje tehnike za detekciju ozračenih hrane koja sadrži celulozu odnosno kristalni šećer primenom EPR spektroskopije, kao i implementacija date tehnike na namirnice koje se u našoj zemlji obrađuju izlaganjem jonizujućem zračenju. Osim toga praćene su promene u intenzitetu EPR signala ozračenih hrane tokom vremena da bi se odredio period od trenutka ozračivanja, u kome je identifikacija moguća.

### 2. METODOLOGIJA

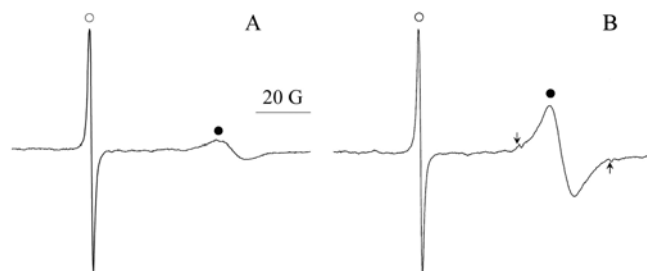
Namirnice koje sadrže celulozu: crni i beli biber, menta, crni i zeleni čaj, tri različite vrste kafe i mlevena sušena paprika nabavljeni su na lokalnoj pijaci, dok je kristalni šećer tri različita proizvođača kupljen u prodavnici. Svi uzorci su samleveni u fini prah i sušeni 1h/60°C neposredno pre ozračivanja. Sušenje je sprovedeno jer je dužina života

radikala indukovanih zračenjem zavisna od vlage [4]. Namirnice su izložene dozi  $\gamma$ -zračenja od 10 kGy, što je i preporučena doza za navedene svrhe [5], izvor je bio  $^{60}\text{Co}$ , a brzina zračenja 13,3 kGy/h. Nakon ozračivanja odmereno je po 20 mg od svakog uzorka (ozračenog i neozračenog - kontrole), koji su zatim spakovani u kvarcne kivete. Kivete su zatvorene Crytoseal-om sa obe strane da bi se sprečio ulazak atmosferske vlage. Merenja su vršena jednom nedeljno, 4 sedmice, a uzorci su između merenja držani na mračnom i suvom mestu. Izuzetak je paprika koja je kasnije uključena u eksperimentalnu proceduru, i ona je praćena 2 sedmice. Kao spoljašnji standard za određivanje relativnog intenziteta signala korišćen je EPR signal  $\text{Mn}^{2+}/\text{MgO}$  koji je u odvojenoj kiveti postavljan u rezonator zajedno sa kivetama u kojima su bili uzorci. U cilju dobijanja preciznih rezultata, kiveta sa standardom i kiveta sa uzorkom pozicionirane su u rezonatoru EPR-a uvek na isti način.

EPR spektri su snimani na sobnoj temperaturi korišćenjem Varian E104-A EPR spektrometra koji radi u X-oblasti (9.51 GHz). Uslovi merenja su bili sledeći: modulaciona amplituda 2 G; modulaciona frekvencija 100 Hz; mikrotalasna snaga 5 mW; oblast skeniranja 200 G, odnosno 1000 G, centar polja je bio na 3410 G, odnosno 3550 G. Spektri su snimljeni i obrađivani upotrebom EW softvera (Scientific Software).

### 3. REZULTATI

Sl. 1A prikazuje EPR signal hrane koja sadrži celulozu pre ozračivanja, u kome se može uočiti jedna slaba singletna linija. Nakon ozračivanja ta singletna linija je mnogo jača, a sa obe strane se može uočiti po jedna satelitska linija (Sl. 1B).

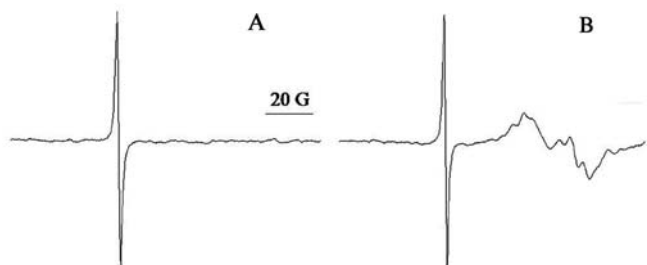


Sl. 1. EPR spektri radikala celuloze u neozračenom (A) i ozračenom (B) uzorku 14 dana nakon ozračivanja.  $\circ$  - pik mangana;  $\bullet$  - pik radikala celuloze; Strelice obeležavaju satelitske linije u spektru radikala celuloze.

Radikal celuloze ima tripletni spektar, sa jednom centralnom, intenzivnijom linijom i dve uske satelitske linije [6], i upravo je prisustvo tih satelitskih linija po protokolu EU nedvosmislen dokaz da je hrana ozračena [2]. Prisustvo satelitskih linija detektovano je na ozračenim uzorcima i nakon 14 dana od ozračivanja (Sl. 1B). Međutim, u većem broju studija [7,8,9] satelitske linije u ovom tripletu su se

pokazale kao nemoguće za detekciju, a tamo gde su detektovane signal se veoma brzo gasio, odnosno bio je veoma nestabilan [4]. Zato je predloženo da se detekcija potencijalne ozračenosti vrši na osnovu relativne visine centralnog pika [10]. Pikovi sa leve strane signala radikala celuloze na Sl. 1, pripadaju manganu, koji ima šest spektralnih linija, ali se u datom spektralnom opsegu može videti samo jedna. Mangan je korišćen kao spoljašnji standard, a intenzitet signala prikazan je kao relativni odnos visine centralnog pika u signalu radikala celuloze i visine pika mangana.

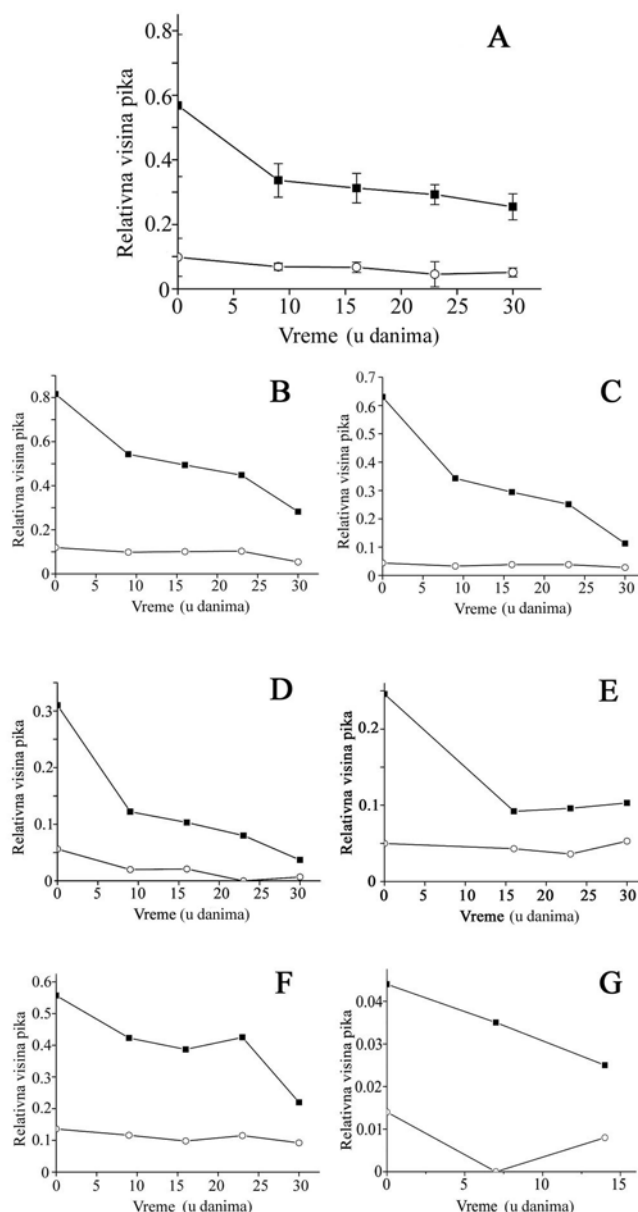
Neozračena kristalna saharoza gotovo da nema EPR signal (Sl. 2A).



Sl. 2. EPR spektri radikala šećera u neozračenom (A) i ozračenom (B) uzorku

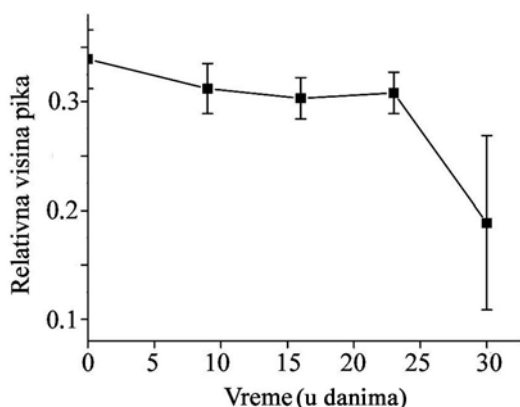
S druge strane, ozračena saharoza ima veoma intenzivan signal koji pokazuje multipletnost (Sl. 2B). Radi se o devet spektralnih linija koje su posledica hiperfinog cepanja EPR signala zbog uticaja okolnih jezgara na nespareni elektron radikala. Te linije pokazuju različit intenzitet jer su vezane za različite orijentacije molekula u odnosu na magnetno polje EPR-a. Ovakva hiperfina struktura spektra radikala šećera se može uočiti samo ako se šećer rekristalizuje iz rastvora sporom evaporacijom [11]. Kako su radikali šećera osetljivi na vlagu, nemoguće je rekristalizovati ozračeni šećer, a da se zadrži prisustvo radikala. Zato su ispitivanja obavljena na samlevenom šećeru, bez rekristalizacije. Međutim, u takvom uzorku ne postoji specifična usmerenost molekula u odnosu na magnetno polje, već su prisutne sve orijentacije, zbog čega se u velikoj meri intenziteti pojedinačnih linija usrednjavaju, te se gubi hiperfina struktura signala. Intenzitet signala radikala saharoze je prikazivan kao relativni odnos visine ovog širokog pika (od maksimuma do minimuma, koji su isti bez obzira na gubitak hiperfine strukture) i intenziteta pika mangana. Kinetika opadanja EPR signala radikala celuloze tokom 30 dana od ozračivanja je prikazana na Sl. 3. Relativni intenziteti EPR signala radikala celuloze u različitim namirnicama variraju, dok kinetike pokazuju izvesnu sličnost. Kinetika je od velikog značaja, jer od nje zavisi vremenski interval od trenutka izlaganja radijaciji u kome je identifikacija ozračenih namirnica moguća. Bitan pad u intenzitetu se u većini slučajeva dešava u prvih 7 dana od ozračivanja, nakon čega se visina EPR signala menja sporije. Za sve namirnice se EPR signali ozračenih uzoraka značajno razlikuju od signala kontrolnih uzoraka tokom čitavog perioda od 30 dana, što je dokaz da EPR detekcija ozračene hrane daje dobre rezultate i nakon dužeg vremenskog intervala. Osim toga, kod kafe, crnog čaja, crnog bibera, paprike i mente iz kinetike se može zaključiti da je razlika u intenzitetu signala ozračenih i neozračenih uzoraka prisutna i u relativno dugom periodu nakon prvih 30 dana, kojiko je trajao sam eksperiment. Na kinetiku veoma utiču vlažnost, temperatura, prisustvo vazduha i izlaganje svetlosti date namirnice pre i posle ozračivanja [1], tako da brzina opadanja signala može da bude veća u realnim uzorcima. Međutim intenziteti signala za dozu od 10 kGy, su dovoljno

veliki da detekcija bude moguća u dužem vremenskom periodu i pri realnim uslovima.



Sl. 3. Kinetika promene relativnog intenziteta EPR signala radikala celuloze u različitim namirnicama: A - Kafa (sve tri vrste kafe su uzete u obzir i rezultat je prikazan kao srednja vrednost  $\pm$  S.D.); B - Crni čaj; C - Zeleni čaj; D - Beli biber; E - Crni biber; F - Menta; G - Paprika; ■- Ozračeni uzorak; ○- Kontrola

Sl. 4. prikazuje kinetiku opadanja EPR signala radikala šećera. Ovaj radikal pokazuje izuzetnu stabilnost, posebno tokom prvih 20 dana. Ovo, kao i činjenica da neozračen šećer praktično nema EPR signal, čini detekciju ozračenog šećera EPR spektroskopijom veoma efikasnom. Ove karakteristike šećera su primećene i ranije pa je predložena i njegova upotreba u dozimetriji [12].



Sl. 4. Kinetika opadanja signala radikala šećera u ozračenom kristalnom šećeru. Kontrola skoro da nema signal (nije prikazana). Rezultat je prikazan kao srednja vrednost za relativne intenzitete signala kristalnog šećera tri različita proizvođača (srednja vrednost  $\pm$  S.D.).

#### 4. ZAKLJUČAK

EPR spektar ozračenih namirnica koje sadrže celulozu sadrži tri spektralne linije - jednu intenzivnu centralnu liniju i dve satelitske. Po protokolu EU, prisustvo te dve satelitske linije je nepobitan dokaz da je namirnica bila izložena jonizujućem zračenju. Međutim, te dve linije su vrlo kratkog veka, i ne mogu se koristiti za detekciju ozračenih hrane već nakon relativno kratkog vremenskog intervala. Iz tog razloga praćen je relativni intenzitet centralne linije. Kod radikala saharoze praćen je relativni intenzitet široke spektralne linije karakteristične za šećer u prahu. Uspešno su savladani protokoli EU za detekciju ozračenih hrane koja sadrži celulozu, odnosno kristalni šećer metodom EPR spektroskopije, i implementirani na veći broj različitih namirnica koje se frekventno obrađuju jonizujućim zračenjem. Utvrđeni su uslovi merenja i primenjena metoda za određivanje relativnog intenziteta linija preko upoređivanja sa linijom "magnetno" razblaženog mangana kao spoljašnjeg standarda. Osim toga, praćena je kinetika promene relativnog intenziteta signala ozračenih hrane tokom vremena, i ustanovljeno je da se EPR tehnikom može utvrditi da li je neka namirnica, koja sadrži celulozu, odnosno saharozu obrađivana jonizujućim zračenjem i nakon dužeg vremenskog perioda.

#### 5. LITERATURA

- [1] N.D. Yordanov and K. Aleksieva, "X- and Q- band EPR studies on fine powders of irradiated plants. New approach for detection of their radiation history by using Q-band EPR spectrometry," *Radiat. Phys. Chem.* vol. 69, pp. 59-64, 2004.
- [2] CEN EN 1787, "Determination of irradiated food containing cellulose: analysis by EPR," European Committee for Standardization, Brussels, Belgium 2000.
- [3] CEN EN 13708, "Detection of irradiated food containing crystalline sugar: analysis by EPR," European Committee for Standardization, Brussels, Belgium 2001.
- [4] I. Polonia et al, "Identification of irradiated peppers by electron spin resonance, thermoluminescence and viscosity," *Radiat. Phys. Chem.* vol. 46, pp. 757-760, 1995.

- [5] ACINIF, "Report on the safety and wholesomeness of irradiated foods by The Advisory Committee on Irradiated and Novel Foods," HMSO, London 1986.
- [6] J. Raffi and J.P.L. Agnel, "Electron spin resonance identification of irradiated fruits," *Radiat. Phys. Chem.* vol. 34, pp. 891-894, 1989.
- [7] M.F. Desrosiers and W.L. McLaughlin, "Examination of gamma-irradiated fruits and vegetables by electron spin resonance spectroscopy," *Radiat. Phys. Chem.* vol. 34, pp. 895-898, 1989.
- [8] J. Raffi, "ESR identification of irradiated foodstuffs: LARQUA research," in *Detection methods for irradiated foods*, Royal Chemical Society Printing House, Cambridge pp. 93-97, 1996.
- [9] G.C. Yang et al, "An EPR study of free radical generated by gamma-radiation of dried spices and spray-dried food powders," *J. Food Qual.* vol. 10, pp. 287-294, 1987.
- [10] N.D. Yordanov and V. Gancheva, "A new approach for extension of the identification period of irradiated cellulose-containing foodstuffs by EPR spectroscopy," *App. Radiat. Isotop.* vol. 52, pp. 195-198, 2000.
- [11] C.J. Flores et al, "ESR and optical absorption studies of gamma- and electron-irradiated sugar crystals," *App. Radiat. Isotop.* vol. 52, pp. 1229-1234, 2000.
- [12] Z.M. Da Costa et al, "A comparative study based on dosimetric properties of different sugars," *App. Radiat. Isotop.* vol. 62, pp. 331-336, 2005.

#### 6. ZAHVALNICA

Ovo istraživanje je finansirano od strane Ministarstva za Nauku i Zaštitu Životne Sredine Republike Srbije; projekat broj 1928.

**Abstract** – In the presented research, EU protocols for detection of irradiated food containing cellulose or crystalline sugar using EPR spectroscopy, were applied on food that is frequently irradiated with  $\gamma$ -radiation. It was determined that EPR analysis can be used for discrimination between irradiated and non-irradiated foodstuff. Also, EPR analysis showed to be useful even after longer period of time after irradiation.

#### DETECTION OF IRRADIATED FOOD USING EPR SPECTROSCOPY. APPLICATION OF EU PROTOCOLS

Ivan Spasojević, Aleksandar Ignjatović, Miloš Mojović