報　文

牛肉における9-シス，11-トランス オクタデカジエン酸含有量の測定方法の検討と焼き加熱による変化について

長田早苗[*1]　殿塚婦美子[*1]　荒木英爾[*2]

A Methodological Study of the Quantitative Determination of 9-*cis*, 11-*trans* Octadecadienoic Acid and the Changes of This Fatty Acid in Beef Cooked with Heat Treatment

Sanae OSADA[*1], Fumiko TONOZUKA[*1] and Eiji ARAKI[*2]

Conjugated linoleic acids (CLA) are naturally occurring isomers of linoleic acid in which the double bonds are in a conjugated formation. Numerous physiological effects including anticarcinogenesis, body fat reduction and immune enhancement have been attributed, in animal models, to CLA and based on those evidence CLA has been studied by many researchers as one of the bioactive substances in food. In recent years, CLA has been proved to be a labile fatty acid and may be easily isomerized or formed from endogenous precursors during various kinds of physicochemical treatments. Remarkable increase in the CLA concentration has been reported in grilled beef as compared to uncooked ground beef. However, most reports on the evaluation of CLA concentration in cooked beef fail to describe the cooking procedure in detail. The objective of the present study was to evaluate the cooking method of beef with heat treatment for the concentration of 9-*cis*, 11-*trans* octadecadienoic acid, the major isomer of CLA in beef, stipulating the cooking procedure under the established instrumental conditions. For the quantitative determination of CLA in raw and cooked beef, lipid extraction from specimens following vacuum freezing dehydration and the method of methylation of fatty acids including CLA were evaluated.

Vacuum freezing dehydration of the specimens gave a higher yield of lipid extracted. In comparison to the methylation methods for quantity of CLA, the 14% BF_3/MeOH method gave higher levels of CLA compared with those obtained from the 4% HCl/MeOH method. When the beef was baked for 1 minute after reaching a central temperature of 75°C, no substantial difference between the concentrations (mg CLA/g lipid) of 9-*cis*, 11-*trans* octadecadienoic acid in baked beef and uncooked beef was demonstrated. However, a relatively small but significant increase of CLA was observed following 2% overloading of linoleic acid to the beef specimens (w/w) before baking.

In conclusion, the endogenous CLA concentration due to baking of beef in this experiment produced no significant changes, however, a small but significant increase of CLA concentration occurred following the supplement of linoleic acid to beef before cooking.

1. 緒　言

共役リノール酸（conjugated linoleic acid，以下CLAと略記する）は，n-6系の必須脂肪酸であるリノール酸(9-シス，12-シス オクタデカジエン酸）の共役ジエン構造を持つ位置異性体および幾何異性体の総称である。CLAは化学的にも合成されるが，天然には主として反芻動物の第一胃に存在している嫌気性菌の *Butyrivibrio fibrisolvens* のリノール酸イソメラーゼにより，リノール酸あるいはα-リノレン酸への水素添加反応の中間代謝

[*1] 給食管理研究室，女子栄養大学短期大学部：Laboratory of Food Service Management, Junior College of Kagawa Nutrition University.
[*2] 生理学研究室，女子栄養大学短期大学部：Laboratory of Physiology, Junior College of Kagawa Nutrition University.

物として生成され，反芻動物の筋肉，乳汁などに含まれている[1,2]。これまでに天然物から見出された十数種類のCLAのうち，9-シス，11-トランス オクタデカジエン酸（9*c*,11*t*-octadecadienoic acid, 以下9*c*,11*t*-CLAと略記する）と10*t*,12*c*-CLAなどについては，動物実験において発がん抑制，体脂肪減少，免疫調節など多彩な生理活性をもつこと，それらの活性は従来食品中に見出された生理活性物質と比較して極めて強力であることなどが報告され[3-8]，機能性脂質として各領域での研究が進められている。

牛肉に含有されるCLAが加熱調理のある条件下では脂質単位重量あたり約4倍にも増量することが報告され[2]注目されたが，その調理条件の詳細は明記されていない。その後の研究で，牛肉の加熱温度，加熱方法を変えてもこのような大幅なCLA増量をもたらす調理条件は見出されないとも報告[9]されている。他方，物質としてのCLAの不安定な特性が明らかにされるに伴い，初期のCLA研究で用いられた分析法では正しくCLAが測定されていないことも指摘されている[10]。食品中に含有されるCLAの意義は，現在明らかにされている生物活性から考えても，極めて大きなものであるので，著者らは牛肉の加熱調理に伴うCLA含有量の変化を明らかにすることを目的として本研究を行なった。その中で3つの検討を行なった。すなわち第1は，試料の加熱調理などの諸条件がCLAを含む脂質抽出に及ぼす影響を可能な限り回避する方策として，試料を真空凍結乾燥する検討，第2は異性体化を防ぎながら高い効率でCLAをメチルエステル化する方法の検討である。これらは分析試料の調製条件についての基礎的検討である。この基礎的検討に基づき第3として，これまでの何れの報告でも不明確であった加熱調理条件を詳細に設定して，牛肉の加熱調理に伴うCLA含有量の変化を研究した。

2．実験材料および方法

(1) 試薬および試料

1) 脂肪酸標準物質：CLA標準品は（株）リノール油脂（東京）から提供された。アラキドン酸はSigma社（MO, USA），その他各種脂肪酸はSupelco社（PA, USA）の製品を使用した。

2) 試薬：脂肪酸のメチルエステル化に使用した塩酸メタノール（HCl/MeOHと略記）は，関東化学（株）の10％HCl/MeOH溶液（ガスクロマトグラフィー用）を4％に調製し用いた。

三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液（BF_3/MeOHと略記）は，和光純薬工業（株）の14％BF_3/MeOH溶液（ガスクロマトグラフィー用）を用いた。その他の試薬は和光純薬工業（株）（大阪）および関東化学（株）（東京）の純度特級のものを使用した。

3) 試料：市販の牛もも肉（オーストラリア産）を用いた。均質化[11]をはかるためにフードプロセッサーにかけ（無負荷時回転数1,500～1,800回/分，肉100gあたり10秒間）挽肉状にし，可能な限り均一になるように混和した。挽肉は30gを秤量し，直径4cm，厚さ2cmの円盤状になるよう抜型を用い成型し各実験試料とした。

(2) 牛肉の加熱

牛肉の加熱にはフジマック社（東京）製のスチームコンベクションオーブン（ガス式FCCP-G）を用い，通常の調理条件の範囲で焼き加熱を実施した。すなわち，オーブン設定温度250°Cとし，中心温度が75°Cになってから1分間加熱した[12]。温度は試料の中心温度をデータコレクターAM-7002（安立計器（株），東京）により測定した。

(3) 牛肉の真空凍結乾燥

真空凍結乾燥機は日本フリーザー（株）社（東京）のBFD-2型を用いた。

(4) 脂肪酸組成の定量分析

1) 脂質の抽出および測定

各試料は超高速ホモジナイザー（ポリトロンホモジナイザーPT36/2K型，KINEMATICA社，スイス）で摩砕し（21,000rpm，1分間），Folchら[13]の方法により総脂質を抽出した。総脂質量は重量法により求めた。脂肪酸メチルエステルの調製はIgarashiら[10]の方法により実施した。

2) 脂肪酸メチルエステルの同定と測定

脂肪酸はキャピラリーカラムSupelco wax-10（Supelco社，PA, USA，カラム内径0.32mm×長さ60m，液相膜厚df=0.25μm）を使用するガスクロマトグラフ（GC-18A型，島津製作所，京都）で，トリコサン酸（C23：0）を内部標準とするガスクロマトグラフィーで分析を行なった。その他，GLC分析条件は，検出器；FID（250°C），キャリアーガス；ヘリウムガス，注入口温度；200°C，カラム温度；195°C・10分間→220°C・20分間→240°C・10分間（昇温；1°C／分）で行なった。各脂肪酸の同定は標準品の保持時間との比較で行ない，測定はデータ処理装置（島津クロマトパックC-R6A，島津製作所，京都）を用いてピーク面積により求めた。

(5) 脂肪酸のメチルエステル化法の検討

酸触媒法の14％三ふっ化ほう素－メタノール法と4％塩酸－メタノール法（以下，各々14％BF_3/MeOH法，4％HCl/MeOH法と記す）を行ない，比較検討を行なった。

試料はCLA標準品および牛もも肉の2種類を用いた。14％BF_3/MeOH法では，0.2mol/l水酸化カリウム－エタノール溶液で40°C・90分間けん化を行なった後，14％BF_3/MeOH溶液により，30分間室温にてメチルエス

テル化反応を行なった[10]。一方4％HCl/MeOH法では，10％塩酸メタノールを4％に調製したものを用い，60°C・20分間反応を行なった[1]。なお，CLA標準品を試料とした検討では，4回の繰り返し実験を行なった。牛肉の場合は5回の繰り返し実験を行ない，各検体は試料を同一店から日にちを変えて2回購入し，調製して得たものである。

(6) 真空凍結乾燥の有無による牛肉中脂肪酸抽出の検討

脂質の抽出効率と精度をあげるために真空凍結乾燥を試み，未加熱試料および加熱済試料を各々真空凍結乾燥処理を行なった場合と行なわなかった場合とに分け，脂質1gあたりの 9*c*,11*t*-CLA及び各種脂肪酸の抽出量・組成を調べた。

試料は牛もも肉を用いた。未加熱および中心温度75°C・1分間焼き加熱を行なったものを各々2対ずつ作成し，1対は－40°Cで昼夜冷凍した後に3日間，真空凍結乾燥を実施した。凍結乾燥後は乳鉢でよくすりつぶし，混和したものを試料として用いた。もう一対は凍結乾燥処理をせず，試料作成後すぐに測定を行なった。試料は5回の繰り返し実験を行ない，各検体は試料を同一店から日にちを変えて2回購入し，調製して得たものである。

(7) 焼き加熱およびリノール酸添加による牛肉中CLA含有量の変化

試料は牛もも肉を使用し，未加熱群と焼き加熱群の二群に分け，脂質1g中におけるCLAおよび他の脂肪酸含有量と脂肪酸組成を比較した。試料は5回の繰り返しを行ない，各検体は，試料を同一店から日にちを変えて2回購入し，調製して得たものである。

また，よく挽き混和した牛もも肉に，リノール酸標準品を肉重量の2％添加し，未加熱試料と焼加熱試料の2群に分け，9*c*,11*t*-CLAおよびリノール酸含有量の変化について検討した。試料は7回の繰り返しを行ない，各検体は，試料を同一店から日にちを変えて2回購入し，調製して得たものである。

(8) 統計処理

本研究で得られた実験データは，平均値±標準偏差で表示した。14％BF_3/MeOH法および4％HCl/MeOH法によるメチルエステル化の違い，真空凍結乾燥の有無，加熱の有無による各種脂肪酸量の比較はt-検定を用い，危険率が5％未満のとき有意とみなした。

3．結　果

(1) 脂肪酸メチルエステル化の検討

CLA標準品のメチルエステル化を行なった場合，各

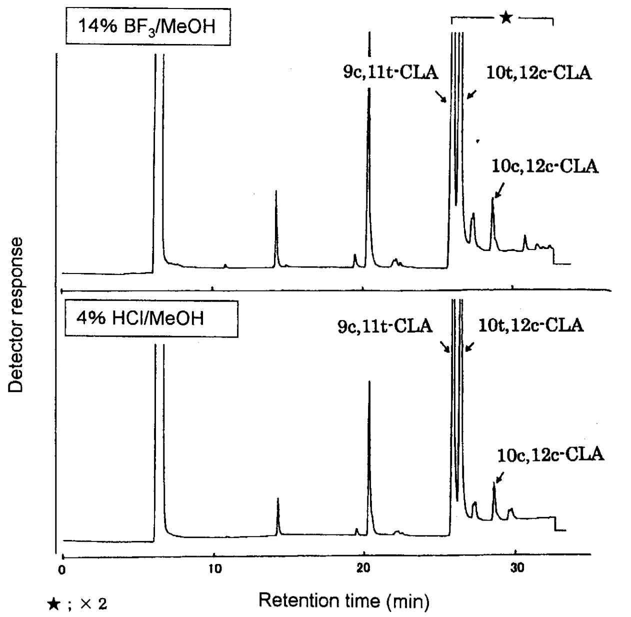

Fig. 1. GC chromatograms of quality control standard of CLAs mixture methylesters each preparated with the 14% BF_3/MeOH (30min, room temp.) method and the 4% HCl/MeOH (20min, 60°C) method.

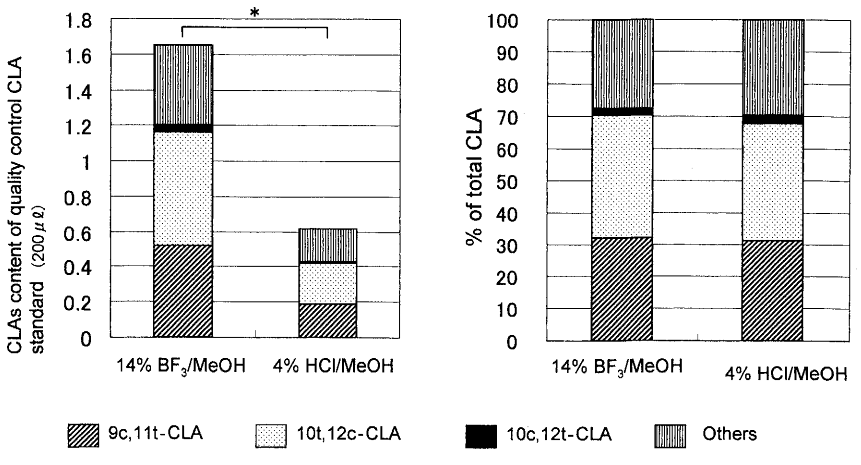

Fig. 2. Comparison with quantity and composition of quality control standard of CLAs mixture methylesters each prepared with the 14% BF_3/MeOH (30min, room temp.) method and the 4% HCl/MeOH (20min, 60°C) method. Values are presented as mean for 4 samples in each group.

* Significantly deferent from the 14% BF_3/MeOH method at $p<0.05$.

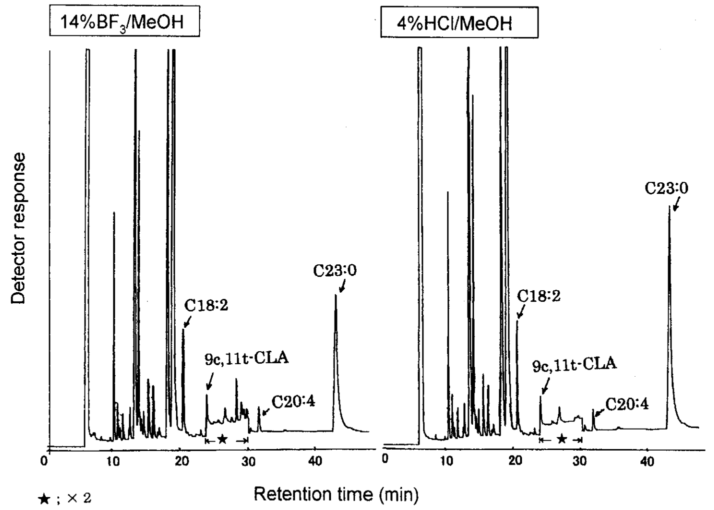

Fig. 3. GC chromatograms of fatty acid methylesters in beef each prepared with the 14% BF_3/MeOH method and the 4 % HCl/MeOH method.

Abbreviations; C18:2, Linoleic acid; C20:4, Arachidonic acid; C23:0, Tricosanoic acid (internal standard).

Table 1. Fatty acid content in beef lipid esterified with the 14% BF_3/MeOH method and the 4 % HCl/MeOH method, and % of total fatty acid

	Fatty acid content of beef lipid (mg/g of lipid)		t-test	% of total fatty acid		t-test
	14% BF_3/MeOH	4 % HCl/MeOH		14% BF_3/MeOH	4 % HCl/MeOH	
C14 : 0	30.17± 4.89	23.75± 3	ns	2.3±0.4	2.4±0.4	ns
C16 : 0	263.3 ± 8.35	221.27± 36.86	ns	23.2±4.1	23.9±3.8	ns
C16 : 1	48.2 ± 4.89	40.21± 6.5	ns	5.3±1.1	5.2±0.6	ns
C18 : 0	111.75± 7.12	96.35± 16.73	ns	9.1±3.2	9.7±2.9	ns
C18 : 1	471.18±34.22	393.29± 62.21	ns	51.8±7.3	49.7±5.2	ns
C18 : 2	19.98± 1.79	15.66± 2.91	*	2.2±0.3	2 ±0.2	ns
9*c*,11*t*-CLA	3.7 ± 0.2	2.39± 0.47	**	0.4±0.1	0.3±0.1	ns
C20 : 4	6.33± 2.18	3.89± 0.98	ns	0.7±0.2	0.5±0	ns
Others	48.52±12.91	40.74± 12.08	ns	5.2±0.9	5.5±0.5	ns
Total	918.86±94.11	781.84±172.89	ns	100	100	

Values are mean±SD of 5 samples in each group.

*, ** are significantly different (*$p<0.05$, **$p<0.01$ t-test). ns in not significance.

Abbrevistions; C14:0, Myristic acid; C16:0, Palmitic acid; C16:1, Palmitoleic acid; C18:0, Stearic acid; C18:1, Oleic acid; C18:2, Linoleic acid; C20:4, Arachidonic acid.

種CLA異性体の分離は14%BF_3/MeOH法，4%HCl/MeOH法いずれの方法とも9*c*,11*t*-CLAの保持時間（分）が31.305，10*t*,12*c*-CLAは31.935，10*t*,12*t*-CLAは34.435と良好な分離が記録された（Fig. 1）。各CLA異性体の百分率をみると，両方法の間に差は認められなかったが，標準品200 μl 中の脂肪酸量は3種類の異性体を合計すると，14%BF_3/MeOH法でメチルエステル化を行なった方が有意に多く測定された（Fig. 2）。牛もも肉を試料としたときの両法によるガスクロマトグラムをFig. 3に示した。牛もも肉中のCLA異性体では9*c*,11*t*-CLAのみ検出された。両法によるクロマトグラムのピークに，とくに差異は見られなかった。両法による脂質1g中に含まれる9*c*,11*t*-CLAを含む各種脂肪酸量および組成の結果をTable 1に示した。脂質1g中の9*c*,11*t*-CLA量は14%BF_3/MeOH法では3.7±0.2mg，4%HCl/MeOH法では2.39±0.47mgであり有意差が認められた。またリノール酸（C18 : 2）についても同様に14%BF_3/MeOH法による方法で高値が得られた。しかし，脂肪酸組成については両者に違いは認められなかった。

(2) 真空凍結乾燥の効果についての検討

焼き加熱を行なった試料の重量は，未加熱試料を100%とするとその65.3%にまで減少した。また真空凍結乾燥を行なった試料は加熱および未加熱試料ともその重量は真空凍結乾燥前の未加熱試料の28.8%まで減少し，加熱の有無による減少差は認められなかった。

Table 2. Effect of vacuum freezing dehydration (uncooked beef)

	Fatty acid content of beef lipid (mg/g of lipid)		t-test	% of total fatty acid		t-test
	done	non-done		done	non-done	
C14 : 0	17.66± 1.23	12.28± 0.49	***	2.1±0.2	1.9±0.2	ns
C16 : 0	257.01± 9.84	172.67± 5.8	***	27.8±1.7	26.5±3.2	ns
C16 : 1	29.84± 0.67	20.65± 0.94	***	3.6±0.4	4 ±0.8	ns
C18 : 0	100.91± 2.08	67.77± 2.32	***	10.5±1.2	10.1±1.5	ns
C18 : 1	387.83±12.81	262.7 ±11.02	***	42.3±1.8	42.3±1.7	ns
C18 : 2	27.29± 0.83	18.45± 1.43	**	3.1±0.1	3.1±0.1	ns
9*c*,11*t*-CLA	1.51± 0.25	1.07± 0.07	**	0.2±0	0.2±0	ns
C20 : 4	6.16± 0.57	4.84± 0.45	**	0.7±0.1	0.8±0.1	ns
Others	60.61± 1.58	41.47± 2.34	***	9.8±4.1	11.2±8	ns
Total	893.1 ±23.95	608.69±24.01	***	100	100	

Values are mean±SD of 5 samples in each group.

*, **, *** are significantly different (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ t-test). ns in not significance.

Table 3. Effect of vacuum freezing dehydration (baked beef)

	Fatty acid content of beef lipid (mg/g of lipid)		t-test	% of total fatty acid		t-test
	done	non-done		done	non-done	
C14 : 0	13.14± 1.3	11.49± 2.26	ns	1.9±0.2	1.9±0.2	ns
C16 : 0	212.82±15.92	161.53± 33.75	*	27.1±2.0	26.8±3.4	ns
C16 : 1	25.69± 1.86	18.71± 5.52	*	3.6±0.3	3.7±0.6	ns
C18 : 0	81.33± 4.87	64.61± 14.86	*	10.3±0.9	10.7±1.3	ns
C18 : 1	321.86±23.41	243.95± 52.58	*	42.5±3.1	42.2±2.9	ns
C18 : 2	19.8 ± 1.49	16.03± 6.03	***	2.7±0.3	2.9±0.4	ns
9*c*,11*t*-CLA	1.26± 0.17	0.9 ± 0.24	*	0.2±0.0	0.2±0.0	ns
C20 : 4	4.47± 0.49	3.69± 1.61	ns	0.6±0.1	0.7±0.2	ns
Others	67.26±27.25	35.08± 13.69	*	11.2±4.6	10.9±6.9	ns
Total	745.71±44.81	555.1 ±143.42	*	100	100	

Values are mean±SD of 5 samples in each group.

*, *** are significantly different (*$p<0.05$, ***$p<0.001$ t-test). ns in not significance.

未加熱試料について，真空凍結乾燥実施の有無による各種脂肪酸含有量をTable 2に示した。脂質1g中に含まれる脂肪酸量はいずれも真空凍結乾燥を行なったものの方が有意に多くなった。9*c*,11*t*-CLAの場合，真空凍結乾燥実施試料では脂質1gあたり1.51±0.25mg，真空凍結乾燥非実施試料では1.07±0.07mgであり，有意差が認められた。しかし，脂肪酸組成に関しては両者に有意差は認められず，9*c*,11*t*-CLAの含有率は両者とも総脂肪酸の0.2%であった。

焼き加熱を行なった試料についても，ほぼ同様な結果であった（Table 3）。真空凍結乾燥実施試料では脂質1gあたりの9*c*,11*t*-CLAは1.26±0.17mg，真空凍結乾燥非実施試料では0.9±0.24mgであり，有意差が認められた。しかし，脂肪酸組成に関しては両者に有意差は認められず，9*c*,11*t*-CLAの総脂肪酸に対する含有率は未加熱試料と同値であった。

(3) 焼き加熱による牛肉中9*c*,11*t*-CLA量の変化

オーブン設定温度250°Cで75°C・1分間焼き加熱を行なった試料中心部の加熱最終温度は82.8±3.6°Cであった。

焼き加熱の有無による牛肉中の各種脂肪酸量とその組成をTable 4に示した。脂質1g中に含まれる9*c*,11*t*-CLA量は，未加熱試料の場合は2.24±0.17mg，加熱試料の場合では2.25±0.15mgとなり，両試料に有意差は認められなかった。9*c*,11*t*-CLAの組成は両試料とも0.3%であり，有意差は認められなかった。他の脂肪酸についても9*c*,11*t*-CLAと同様に，脂質1g中に含まれる量・組成とも変化は認められなかった。

リノール酸添加牛肉の焼き加熱によるリノール酸および9*c*,11*t*-CLAの変化をFig. 4に示した。リノール酸は，未加熱試料からは脂質1gあたり114.47±27.38mg，加熱試料からは115.54±31.16mg定量され，有意な変化は認められなかった。しかし，9*c*,11*t*-CLAについては，未加熱試料は1.47±0.21mg，加熱試料は1.90±0.54mgであり，焼き加熱を行なうことによって，微量ながら有意

Table 4. Change in fatty acid content in beef using uncooked and baked

	Fatty acid content of beef lipid (mg/g of lipid)		t-test	% of total fatty acid		t-test
	uncooked	baked		uncooked	baked	
C14 : 0	17.25± 1.4	17.34± 1.64	ns	2.2±0.1	2.3±0.1	ns
C16 : 0	210.58±15.2	206.59±14.38	ns	27.5±0.4	27.2±0.3	ns
C16 : 1	29.83± 2.22	29.82± 2.32	ns	3.9±0.1	4.0±0.1	ns
C18 : 0	99.89± 7.45	96.52± 5.67	ns	13.0±0.3	13.0±0.2	ns
C18 : 1	347.62±23.94	344.57±24.19	ns	45.4±0.6	45.5±0.6	ns
C18 : 2	12.44± 0.89	12.15± 2.1	ns	1.6±0.1	1.7±0.3	ns
9*c*,11*t*-CLA	2.24± 0.17	2.25± 0.15	ns	0.3±0.0	0.3±0.0	ns
C20 : 4	2.82± 0.2	2.94± 0.59	ns	0.4±0.0	0.4±0.1	ns
Others	44.02± 5.43	45.1 ± 3.58	ns	5.7±0.4	6.0±0.3	ns
Total	766.68± 5.27	757.08±51.34	ns	100	100	

Values are mean±SD of 5 samples in each group.

ns in not significance.

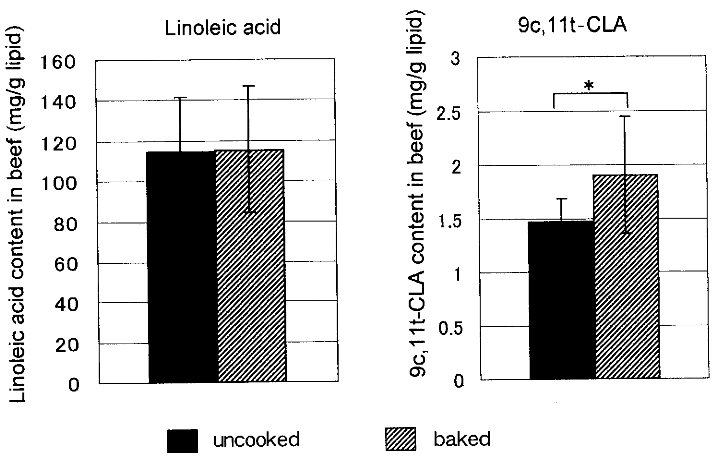

Fig. 4. Change in linoleic acid and 9*c*,11*t*-CLA content in beef, in which addition to 2% quality control standard of linoleic acid, using uncooked and baked (for 1 minute after reaching a central temperature of 75℃).

Values are presented as mean±SD of 7 samples in each group.

* Significantly deferent from the corresponding value in uncooked at $p<0.05$.

な増加が認められた。75°C・1分間焼き加熱を行なった試料中心部の加熱最終温度は83.0±3.7°Cであった。

4. 考　察

(1) メチルエステル化の検討

天然物中のCLAは，大部分が脂質分子の中でエステル結合，ごく少量が酸アミド結合により結合したかたちで存在し，さらに，僅かに遊離脂肪酸の状態でもCLAは存在する[8]。

試料から脂質を抽出した後にこれらの結合を切断し，ガスクロマトグラフィーの脂肪酸試料とするためにはメチルエステル化反応の実施が必要となる。これまでのCLAに関する物理化学的研究から，CLAは不飽和度の高いアラキドン酸やドコサヘキサエン酸などの脂肪酸と同程度の不安定性をもつこと[14, 15]，*cis/trans* 構造が *trans/trans* 構造に異性化しやすいこと[16-18]，あるいは抽出操作やメチルエステル化反応の過程において酸触媒により分子の構造が崩壊し易くなること[18, 19]，あるいはまたメチルエステル化反応で新たに人工産物が生成されることなどが指摘されてきた[20]。

本研究で対象とした9*c*,11*t*-CLAに関しては，CLAの中では最も早く研究が開始されたが，組織，体液中では微量であり，また通常の脂肪酸メチルエステル調製法では分解や異性化されやすく，その正確な定量が困難であるといわれている[1]。一般にナトリウムメトキシド法，テトラメチルグアジニン法，トリメチルシリルジアゾメタン法などの塩基触媒法では，温和な条件下でメチルエステル化ができるので異性化されにくい。しかしそれぞれの方法でメチルエステル化できる脂質に限りがあるため多用されていない。一方，酸触媒法は高温で長時間の反応であるため，異性化を起こす可能性があるが，温度や時間など反応条件を変え，CLA測定に多く用いられて

いる。Parizaら[1]は4％HCl/MeOH溶液を用いて60°C・20分間の処理でCLAの異性化が起こりにくいと報告した。最近，Igarashiら[10]は14％BF_3/MeOHで100°C・5分間の反応を行なうAOCS法の反応温度・時間は*cis/trans*構造が*trans/trans*構造に異性化しやすく9*c*,11*t*-CLA，10*t*,12*c*-CLAが低く見積もられ，新たな人工産物が生成される恐れがあるため，室温・30分間に変えた方法が良いと論じている。

本研究ではCLA測定のためのメチルエステル化法として用いられている，酸触媒法である上記2種の4％HCl/MeOH法（60°C・20分間）と14％BF_3/MeOH法（室温・30分間）を用いて，異性化や副産物の生成について比較検討した。

その結果，両法間にクロマトグラムや脂肪酸組成に差は認められなかった。しかし，4％HCl/MeOH法の方が脂肪酸メチルエステルの収率が低かった。Takenoyamaら[21]もCLA分析のために脂肪酸メチルエステルの調製法を比較検討しており，4％HCl/MeOH溶液による直接メチルエステル化法（60°C・20分間）は0.5MKOH/MeOHで100°C・5分間のけん化後HCl/MeOH（1：1，v/v）で100°C・5分間メチルエステル化する方法よりも，脂肪酸メチルエステル化の収率が低いことを報告している。また0.5MKOH/MeOHで100°C・5分間のけん化後HCl/MeOHで100°C・5分間メチルエステル化する方法は，8％BF_3/MeOH法による直接メチルエステル化（100°C・25分）と比較して，脂肪酸組成ではほとんど差異が認められないが，総脂肪酸量は低値を示したと報告している。

メチルエステル化時に起こり得る異性化について4％HCl/MeOH法（60°C・20分間）と14％BF_3/MeOH法（室温・30分間）両法間に差はなく，副産物についても認められなかったが，総脂肪酸量および9*c*,11*t*-CLA量の測定値は4％HCl/MeOH法の方が低値であるため，定量分析の目的では14％BF_3/MeOH法を用いる方が良いと判断した。

(2) 真空凍結乾燥の効果についての検討

加熱した肉はたんぱく質の凝固がおこり，筋肉の膜構造の崩壊により，未加熱のものと比較して経時的酸化が起こりやすい。また加熱肉と未加熱肉の両者で含有水分量が異なることで，抽出される脂質の量・質に何らかの影響が及ぼされ，脂質1gあたりの脂肪酸量を同条件で比較できないのではないかと危惧された。真空凍結乾燥機は試料の酸化を抑制するとともに組織から水分が除かれ，脂質は抽出されやすくなる[22]。著者らの得た結果では未加熱試料の場合では全ての脂肪酸が，また加熱試料ではミリスチン酸（C14：0），アラキドン酸（C20：4）を除いた全ての脂肪酸が，真空凍結乾燥実施試料で脂肪酸抽出率が高かった。しかし脂肪酸組成については，真空凍結乾燥実施試料と非実施試料の間に有意差は認められなかった。したがって，脂肪酸の質に対する影響は認められないが，各試料の脂肪酸定量分析の精度を高めるためには真空凍結乾燥試料を用いる方が良いことが確認された。

(3) 焼加熱による牛肉中CLA量の変化

Haら[23]によって発がん抑制物質としてCLAが単離精製されたのは，加熱調理した肉からであり，未加熱と比較して9*c*,11*t*-CLAが4倍に増加したと報告している[2]。しかしHaらの結果は牛肉パテの加熱に基づく歩留まりを考慮していなかったため，厳密な意味で定量的な結果とは言い難いとする見解も提出されている[9]。本研究では牛もも肉の加熱条件を大量調理の衛生管理マニュアル[12]に基づき，中心温度75°C・1分間の焼き加熱を行ない，最終中心温度が82.8±3.6°Cとなった。その結果，未加熱と比較して脂質1gあたりの9*c*,11*t*-CLA量の有意な増加は認められなかった。Shanthaら[24]は，中心温度が60および80°Cとなった肉中におけるCLA増加について検討しており，加熱肉100gあたりにおけるCLA含有量について，80°Cの場合は60°Cと比較して高値であるが，脂質1gあたりに換算すると，CLA含有量に有意な差は認めなかったと報告している。大量調理の衛生管理マニュアルに基づく通常の調理条件で肉を加熱した場合の最終中心温度は約80°C位であり，この条件では脂質1gあたりのCLA含有量は変化しないことが示唆された。

食品加工中に増加するCLAの由来については不明な点も多いが，加熱，エージング，共存するたんぱく質の影響によるリノール酸のフリー・ラジカル型の酸化によるものと推定されている[2]。しかし肉内在性のリノール酸は変化を受けてもわずかであり，変化の程度を見出すことは難しいと考え，そこで外からリノール酸を添加し，同一条件下での9*c*,11*t*-CLA生成の有無を増幅して観察した。その結果，焼き加熱により9*c*,11*t*-CLA増加が認められた。トリグリセリドおよびリン脂質中のリノール酸の酸化は，嫌気的条件下でアリルラジカルにより開始され，このラジカルはその共鳴型を形成することにより安定化され，この共鳴型は共役リノール酸を形成すると考えられている[2]。添加したリノール酸は他と結合しない遊離の状態であるが，今回見られた9*c*,11*t*-CLAの増加は何かの機序で，この添加したリノール酸からの変化したものであると推定される。

本研究では，実際に行なわれている牛肉の加熱調理のモデル実験としては最も単純な様式を選んだが，今後共存する他成分－例えば鉄化合物，あるいは酸・塩基などについても，温度条件の変化と共に観察したいと考える。

5．要　約

(1) 牛肉試料中のCLAのメチルエステル化については14％BF_3/MeOH法（室温・30分間）によるほうが，4％HCl/MeOH法と比較して脂質1gあたりの脂肪酸量の定量をより適切に行なえることが示された。

(2) 真空凍結乾燥実施試料は非実施試料と比較して，単位脂質量あたりの脂肪酸抽出量が多く，より適切な定量分析を行なえることが明らかとなった。

(3) 機器により焼き加熱条件を設定した調理方法による牛肉中の 9*c*,11*t*-CLA 含量の変化を調べた結果，牛脂質 1 g あたりの量に変化は認められなかった。しかし，リノール酸を添加した牛肉試料については，焼き加熱条件下の試料について 9*c*,11*t*-CLA の有意な増加が認められた。

6．謝　辞

本研究を行なうにあたり，CLAを含む脂肪酸測定などに関するご助言，ご指導をいただいた東北大学大学院農学研究科の宮澤陽夫教授に深謝いたします。

本研究は女子栄養大学栄養科学研究所の研究助成をうけたものである。

文　　献

1) Chin, S.F., Liu, W., Storkson, j.M., Y.L. and Pariza, M.W.: Dietary sourced of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.*, **5** 185-197 (1992)

2) Ha, Y.L., Grimm, N.K. and Pariza, M.W.: Newly recognized anticarcinogenic fatty acids identification and quantification in natural and processd cheeses. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 75-81 (1989)

3) Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y. and Pariza, M.W.: Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci.*, **72**, 1301-1305 (1993)

4) Lee, K.N., Kritchevsky, D. and Pariza, M.W.: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, **108**, 19-25 (1994)

5) Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E. and Pariza, M.W.: Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, **32**, 853-858 (1997)

6) Pariza, M.W., Park, Y. and Cook, M.E.: Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **223**, 8-13 (2000)

7) 荒木英爾：オクタデカジエン酸とがん，女子栄養大学紀要，**34**, 13-23 (2003)

8) Yurawecz, M.P., Kramer, J.K.G. and Ku, Y.: Methylation procedures for conjugated linoleic acid. Adv. in Conjugated Linoleic Acid Research, Vol. 1 (ed. Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W. and Nelson, G.J.) p.64-82, AOCS Press, Champaign, IL. (1999).

9) 河原　聡，田丸静香，窄野昌信，福田亘博，池田郁男：共役リノール酸の食品中の含量と生理機能. 栄養学雑誌，**62** (1), 1-7 (2004)

10) Igarashi, M., Tsuzuki, T., Kambe, T. and Miyazawa, T.: Recommended methods of fatty acid methylester preparation for conjugated dienes and trienes in food and biological samples. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 121-128 (2004)

11) 堤　忠一，安井明美，氏家　隆：試料の調整と調製「新・食品分析法（日本食品科学工学会，新・食品分析法編集委員会編）」光琳，東京，p1-4 (1996)

12) 厚生労働省生活衛生局食品保健課：大量調理施設衛生管理マニュアル (1998)

13) Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957)

14) van den Berg, J.J.M., Cook, N.E. and Tribble, D.L.: Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid, *Lipids*, **30**, 599-605 (1995)

15) Zhang, A. and Chen, Z.Y.: Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1611-1613 (1997)

16) Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J. and Tove, S.B.: Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *butyrivibrio fibrisolvens*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 1350-1354 (1966)

17) Shantha, N.C., Decker, E.A. and Hennig, B.: Comparison of methylation methods for the quantitation of conjugated linoleic acid isomers, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **76**, 644-649 (1993)

18) Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M. and Yurawecz, M.P.: Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids, *Lipids*, **32**, 1219-1228 (1997)

19) Yurawecz, M.P., Sehat, N., Mossoba, M.M., Roach, J.A.G. and Ku, Y.: Oxisation products of conjugated linoleic acid and furan fatty acids, in New Techniques and Applications in Lipid Analysis, (McDonald, R.E., and Mossoba, M.M., eds.) p.183-215, AOCS Press, Champaign, IL. (1997)

20) Yurawecz, M.P., Hood, J.K., Roach, J.A.G., Mossoba, M.M., Daniels, D.H., Ku, Y., Pariza, M.W. and Chin, S.F.: Conversion of allylic hydroxyl oleate to conjugated linoleic acid and methoxy oleate by acid-catalyzed methylation procedures, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 1149-1155 (1994)

21) Takenoyama, T., Kawahara, S., Murata, H. and Yamauchi, K.: Investigation of some preparation procedures of fatty acid methyl esters for capillary gas-liquid chromatographic analysis of conjugated linoleic acid in meat. *Anim. Sci. J.*, **70** (5), 336-342 (1999)

22) 宮澤陽夫，藤野泰郎：生物化学実験法 9　脂質・酸化脂質分析法入門，p44，学会出版センター，東京 (2000)

23) Ha, Y.L., Grimm, N.K. and Pariza, M.W.: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, **8**, 1881-1887 (1987)

24) Shantha, N.C., Crum, A.D. and Decker, E.A.: Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1757-1760 (1994)