

5

脂肪の質

5-1 脂肪酸組成

食肉の筋肉内脂肪は、経済性だけでなく、食味の観点からも重要な形質である。脂肪の量だけでなく、その質についても、食味への影響が予想されることから、近年多くの機関で脂肪の質を示す項目の一つである脂肪酸組成の分析に取り組んでいる。

脂肪酸組成の分析手法は様々であるが、ここではFolchらの方法で脂質の抽出を行い、ケン化により脂肪酸とグリセリンとに分離し、最終的に脂肪酸をメチルエステル化したものを、ガスクロマトグラフィーで分析する手法を紹介する。

①分析準備

(1)ウォーターバスに水を張り、95℃に設定する。

(2)真空エバポレーター用ウォーターバスに水を入れ52℃程度に設定する。



写真1 ウォーターバス



写真2 真空エバポレーター

(3)実験器具を準備する。

洗浄用のクロメタ液20mL程度を遠沈管に、0.85%生理食塩水（生食）10mLを分液ロートに入れておく。また、共栓付き試験管を1サンプルにつき3本用意する。



写真3 サンプル調製セット

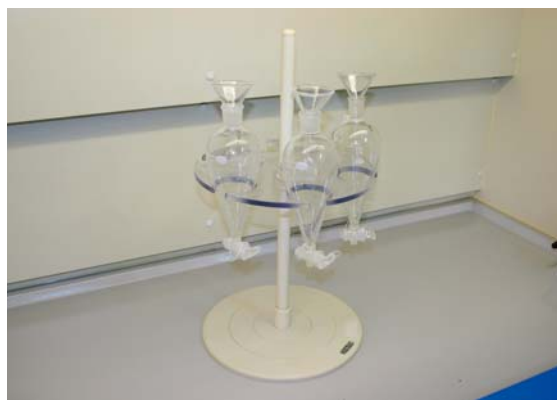


写真4 分液ロートセット



写真5 共栓付き試験管等のセット

④分析手順

(1) 【サンプリング】

分析サンプルは、真空保存していない場合、脂質酸化の可能性の高い外気との接触部分を除いた残りの部分から1g程度（脂肪サンプルについては、0.5g程度）を筋繊維に薄く、2～3枚にカットし、細断する。細断したサンプルを遠沈管に入れる。



写真6 サンプル調製

(2) 【脂質のクロメタ層への抽出】

サンプルの入った遠沈管にクロメタ液を20mL入れ、20秒程度ホモジナイザーを用いてホモジナイズすることで脂質をクロメタ液に抽出し、あらかじめ生理的食塩水が準備された分液ロートに移す。この操作を再度実施する。この操作はサンプルごとに実施する。（異なるサンプルを分析する際には、キッチンペーパーやピンセットを用いて、ホモジナイザー先端に付着した線維等を取り除く。さらに、洗浄用クロメタ液20mLでホモジナイザー先端を洗浄する。）



写真7 ホモジナイズ風景



写真8 分液ロート

(3) 【水溶性物質の生理的食塩水への移行】

ホモジナイズしたサンプル、生理的食塩水10mLおよびメタクロ液20mL×2回分が入った分液ロートの上下の栓をしっかりと押さえながら数回攪拌し、栓を外しガスを抜く（プシュと音がする）操作を数回繰り返す。その後、分液ロートをシェーカーに取り付ける。分液ロート内の液が波立つ程度に、5分程度振とうする。



写真9 分液ロートの攪拌



写真10 シェーカーでの攪拌

(4) 【脂質の抽出】

ドラフト内で分液ロートのガスを抜き、静置し、空気が分液ロートに入るように共栓を空気孔にあわせる。

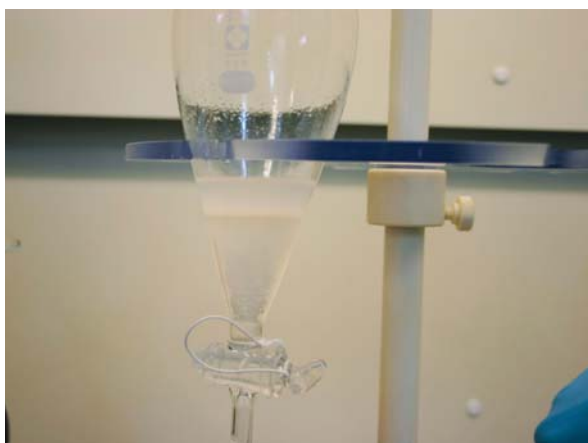


写真11 静置した分液ロート



写真12 分液ロートの空気孔

梨型フラスコにロートをセットし、ろ紙に硫酸ナトリウム（無水）を適量（7分目程度）セットする。分液ロートの液体は2層に分かれており、上層は生理的食塩水とそれにとけ込んだ水溶性物質、下層は脂質が溶けたクロメタ液からなる。脂肪のとけ込んだ下層について、分液ロートの分液口をクロメタ液がポタポタ落ちる程度に調製し、無水硫酸ナトリウムに通しながら、梨型フラスコに移す（写真14）。



写真13 無水硫酸ナトリウムのセット



写真14 分液ロートによる下層の採取

分液により得たクロメタ液を真空エバポレーターを用いて、蒸発させて脂質分のみとする。



写真15 クロメタ液の蒸発

(5) 【ケン化】

脂質だけを抽出した梨型フラスコに1N水酸化カリウムエタノール溶液5mLを入れ、すぐウォーターバスの冷却管に取り付け（約95℃の温湯中で約1時間；多少長いのは良いが短いのは良くない）、反応させる（ケン化）。ただし、この水酸化カリウムエタノール溶液の添加から冷却管への取り付けはサンプルごとの連続操作とする。



写真16 ケン化反応風景

(6) 【不ケン化物の除去】

反応させた梨型フラスコを数十秒間（管壁に白い輪が出来る程度まで）、真空エバポレーターを用いてエタノールを蒸発させる。これに蒸留水5mLを加え、共栓付き試験管（25mL）に移す（色は褐色透明）。同じ作業を2度行い、総量で10mLとする。



写真17 蒸留水の添加



写真18 共栓付き試験管への移行

これにジエチルエーテルを上部の総量と等量程度加えて栓をする。ガス抜きを挟みながら、撹拌する。(不ケン化物の除去)。2層に分かれるまで静置し、上層(エーテル層)をピペット(1本目)で廃液ビンに取り去る。再度エーテルを入れ、同様の操作を行う。(ケン化で作成された脂肪酸カリウムイオン(R-COOK)は水溶性)

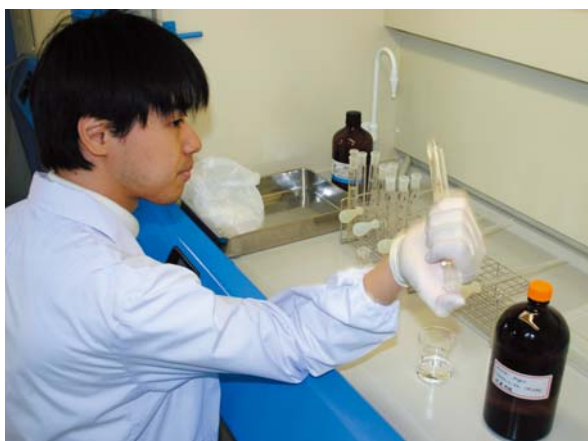


写真19 共栓付き試験管撹拌風景

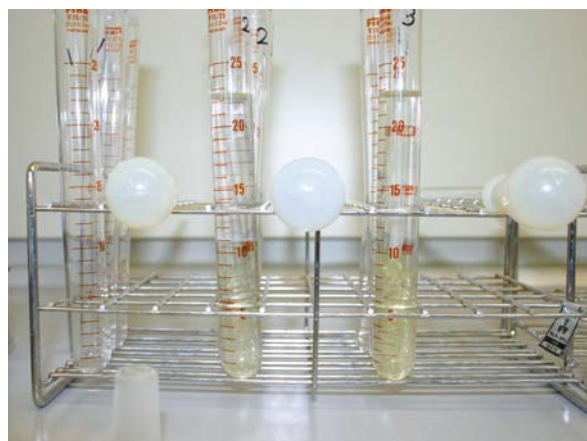


写真20 静置風景

(7)【脂肪酸の生成・抽出】

(6)の操作で共栓付き試験管に残っている脂肪酸カリウムが溶解した蒸留水に6N硫酸1 mLと石油エーテル約10mL(上の総量と等量)加え、新しい栓をする。その後、激しく撹拌し、ガス抜き・撹拌・ガス抜きをする。(この操作は、弱酸の脂肪酸カリウムイオン(R-COOK)と強酸の硫酸(H_2SO_4)を反応させることで、脂肪酸(R-COOH)と硫酸カリウム(K_2SO_4)を作製、それと同時に石油エーテルに脂肪酸を溶解させている。蒸留水にはケン化で生じたグリセリンが残留する。)



写真21 試薬写真

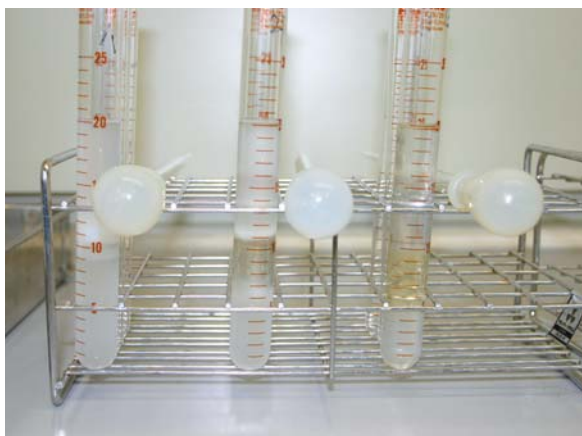


写真22 静置写真(2)

2層に分かれるまで静置し、上層（石油エーテル）をガラス駒込ピペット（2本目）で共栓付き試験管(2本目)に移し替える。再度石油エーテルを入れ、激しく攪拌し同様の操作を行う。余分な硫酸を除去するため、これに蒸留水約3 mLを加え、栓をして激しく攪拌し、2層に分かれるまで静置し、ロートに硫酸ナトリウム（無水）を7分目まで満たしたろ紙に、上層（石油エーテル層）をなす型フラスコに移す。



写真23 蒸留水の添加



写真24 なす型フラスコ

(8) 【脂肪酸メチルエステル化】

なす型フラスコから真空エバポレーターで石油エーテルを取り除く。これに三フッ化ホウ素メタノール1 mLを加え、ウォーターバスの冷却管に取り付け、約95℃の温湯で正確に5分間反応させる（メチルエステル化）。5分後、水道水を流しながら冷却し、飽和食塩水約3 mLを加え、反応を止める。ここまでの作業は、連続して1サンプルずつ行う。



写真25 ミフッ化ホウ素メタノール添加



写真26 メチルエステル化



写真27 なす型フラスコの冷却

(9) 【GC インジェクション用サンプル作成】

メチルエステル化物の入ったなす型フラスコに n -ヘキサン 5 mL 程度加えて、管壁を洗いながら共栓付き試験管（3 本目）に移す。この操作を 2 度行い、総量を約 20 mL とする。新しい栓をして、これを激しく攪拌し、2 層に分かれるまで静置する。

ろ紙に硫酸ナトリウム（無水）を満たしたロートに、上層（ n -ヘキサン）を梨型フラスコへ移す。再度、 n -ヘキサン 約 20 mL を加え、同様の操作を繰り返し、最後に n -ヘキサンをロートの上から軽く加える。



写真28 ヘキサンの添加



写真29 梨型フラスコへのヘキサン移行



写真30 ヘキサンの添加

これをエバポレーターでn-ヘキサンをほぼ全量取り除き、極少量残す。それをパスツールピペットでマイクロチューブに移す。(サンプルの採取量が少ない時は、全量移した後に、少量のn-ヘキサンを梨型フラスコに加え、攪拌しマイクロチューブに追加する。)



写真31 ヘキサンの蒸発

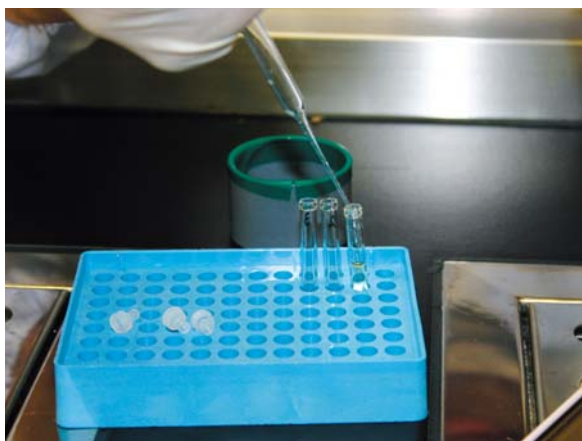


写真32 メチルエステル化物の採取

これを用いてガスクロマトグラフィーで分析する。(−30℃で冷凍保存可能。メチルエステル化物は構造が安定なので長期保存が可能)

【参考：脂肪酸の同定と計算】

脂肪酸の同定には、既知のメチルエステル標準品をガスクロマトグラフィーで分析し、検出されたピークのリテンションタイム（検出された時間）を確認する。このリテンションタイムと未知のサンプルを分析したときに得られる脂肪酸のピークのリテンションタイムと比較し、同定する。組成の算出は、同定した脂肪酸のピーク面積を百分率で表したものである。食肉の脂質に含まれる主要な脂肪酸であるC14:0、C14:1、C16:0、C16:1、C18:0、C18:1、C18:2の7種類は、少なくとも同定しておきたい。

5-2 脂肪融点

脂肪の融点はその脂肪の脂肪酸組成によって決定される。食肉中の脂肪を構成する脂肪酸の主なものとして、飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸や不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸などがあるが、脂肪酸組成の不飽和脂肪酸の割合が多いほど脂肪の融点が低い。

ここでは、皮下脂肪、筋間脂肪および筋肉内脂肪を加熱抽出した後、融点を測定する手法を紹介する。

分析手順

①サンプル約20 gを細切し、ろ紙を敷いたロートにのせ、30ml三角フラスコで受ける。

（筋肉内脂肪融点を測定する場合、脂肪の量が少なくなれば、使用するサンプル量を増やす。）



写真1. サンプル細切風景



写真2. 細切後セットしたサンプル

②105℃の恒温乾燥器で4時間、加熱抽出する。



写真3. 恒温乾燥器

③あらかじめ1 cmのところに印をつけておいた毛細管を、三角フラスコ内に抽出された脂肪につけ、印のところ（1 cm）まで脂肪を毛細管現象により吸い上げる。脂肪を吸い上げた毛細管は約-30℃の冷凍庫に入れる。これを繰り返し、1サンプルあたり7本の毛細管を作る。冷凍庫に入れた毛細管は一晩保存する。

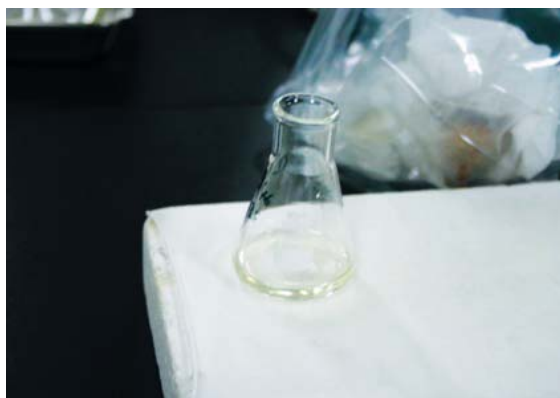


写真4. 加熱抽出された脂肪



写真5. 毛細管による脂肪の吸い上げ

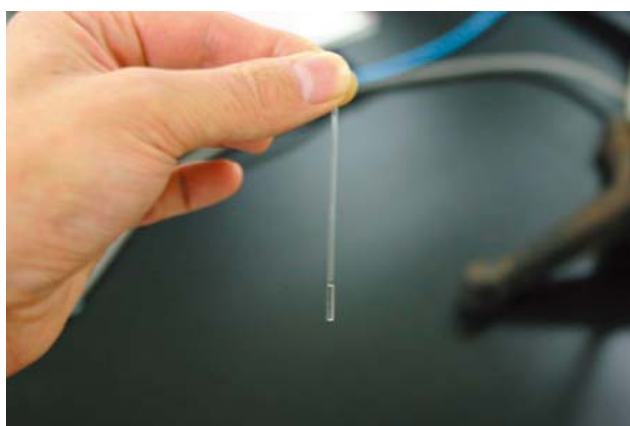


写真6. 毛細管内の脂肪

- ④翌日、ビーカーに水道水を入れ、水温がわかるようにデジタル温度計の先端を水中に入れる。
水中に氷を入れて5℃程度まで水温を下げる。
- ⑤冷凍庫から毛細管を出して、温度計等の棒状のものにセロハンテープ等で取り付け、水中に浸す。
- ⑥ホットスターラーでビーカーの水を加熱する。加熱は2分間に1℃水温が上昇するくらいのペースで行う。
- ⑦毛細管中の脂肪が溶け、毛細管内で1 cm上昇した時のデジタル温度計の温度を融点とする。
1 サンプルあたり7本の融点を測定し、平均値を求めサンプルの融点とする。



写真7. 脂肪融点測定風景

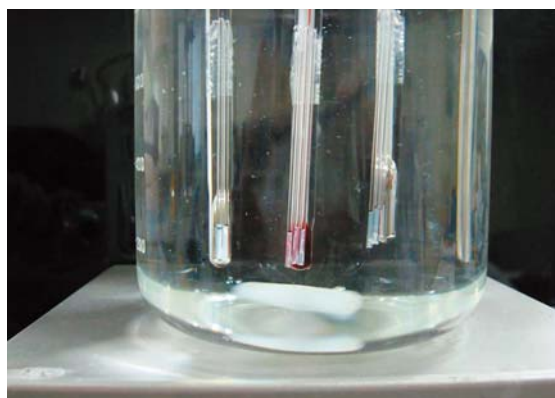


写真8. 融点測定中の脂肪

5-3 TBARS（チオバルピツール酸反応物質）分析

食肉における脂質の酸化は、オフフレーバー（酸化臭、腐敗臭など）の増加に伴う風味の低下、過酸化物質による肉色への悪影響、脂質の酸化物と蛋白質の相互作用による栄養的価値の低下などをもたらすことが明らかになっている。

脂質の過酸化度を測定する分析法として、TBA（チオバルピツール酸）を用いた吸光光度法であるTBA法、ヨードメトリー、蛍光光度法、化学発光法によるリノール酸メチルヒドロペルオキシド測定法などがある。それらの中でも、食肉の過酸化脂質度を測定するために最も良く使用されているのはTBA法である。

TBA法には、酸抽出法や蒸留法など多くの分析手法があるが、酸抽出法は蒸留法に比べて手間が少ない手法である。本稿では、Witteらの方法（Witteら，1970）を基に、畜産草地研究所で実施している酸抽出法（Mitsumotoら，1993）を紹介する。

TBA法について、酸性条件下の試料にTBAを加えると、過酸化脂質が分解されて試料から遊離するTBARS（チオバルピツール酸反応物質）と反応して赤色色素（励起532nm、蛍光553nm）が生じる。この生成された赤色色素の発光量からTBARSの量を算出し脂質の酸化度としている。なお、TBARSとしては、マロンアルデヒド（MA）が主であるが、組織により他のアルデヒド（アルケナールやアルカジエナール等）の関与もあると考えられている。

① 試薬準備

(1) TBA溶液（分析当日に作成・使い切り）

○ 5 × 2 サンプル分析時：半日分析時

TBA試薬（0.005M 2-thiobarbituric acid）を0.0721g 秤量して100ml褐色メスフラスコに入れ、超純水でメスアップする。メスアップ後、回転子を入れて、ホットスターラー上で暖めながら溶解させる。

○ 10 × 2 サンプル分析時：AM, PM の一日分析時

TBA試薬を 0.1442g 秤量して 200ml 褐色メスフラスコに入れ、超純水でメスアップする。メスアップ後、回転子を入れて、ホットスターラー上で暖めながら溶解させる。

注）TBA試薬は、褐色ビンで2週間程度の冷蔵保存は可能。しかし、反応試薬であること、分析後の試薬残量がかかなり少ないことから、保存せずに溶液作成日のうちに使い切りとする。

(2) TCA溶液（褐色ビンで3ヵ月冷蔵保存可能）（取り扱い注意：めがね、手袋着用必須）

TCA試薬（20% trichloroacetic acid）を200g 秤量して1 Lメスフラスコに入れ、超純水でメスアップする。

強酸性でありタンパク質凝固作用が強いため、取り扱いには十分注意すること。

1 L褐色ビンで3ヵ月冷蔵保存可能

(3) TEP溶液

○ 一次溶液（褐色ビンで6ヵ月冷蔵保存可能）（TEP試薬は使い捨て）

TEP試薬（1,1,3,3-tetraethoxypropane）を0.612ml量り取り500mlメスフラスコに入れ、超純水でメスアップする。

500ml褐色ビンで6ヵ月冷蔵保存可能。

一次溶液の保存が利くため、TEP試薬は使い捨てとする。

○二次溶液（褐色ビンで3ヵ月冷蔵保存可能）

一次溶液を5ml量り取り500mlメスフラスコに入れ、超純水でメスアップする。

500ml褐色ビンで3ヵ月冷蔵保存可能。

②分析手順

- (1) サンプル10g（9.95～10.05g）をミンチし、ガラス製50ml遠沈管に入れ、TCA溶液を25ml加える。



＜ミンチ後サンプル＞



＜TCA溶液25mlを加える＞

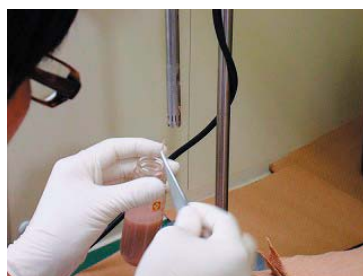
注) TCA 試薬は強力な蛋白質凝固作用を持つため、使用時には眼鏡および手袋を着用するなど、取り扱いには十分注意する。

- (2) サンプルを7,000rpmで約1分間ホモジナイズする。

ホモジナイズ後は、シャフトに絡まっているサンプルも回収し、また、次のサンプルにコンタミしないように、超純水→HPLC用エタノール→超純水の順番でシャフトを洗浄する。



＜ホモジナイズ＞



＜シャフトについたサンプルも回収＞



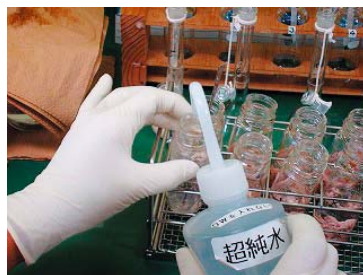
＜シャフト洗浄＞

- (3) ホモジナイズしたサンプルを、漏斗（濾紙は使わない）を用いて50mlメスフラスコに移し、超純水で管壁のサンプルも洗い流しながら、最終的に50mlにメスアップする。

メスアップは、泡状の肉片の上側に合わせる。



＜サンプルをメスフラスコへ＞



＜管壁についたサンプルも回収＞



＜50mlにメスアップ＞

- (4) メスアップ後、ふたを閉めてよく転倒混和（10回）する。メスアップしたサンプルは、翌日まで保存可能。

(5)検量線のために、10ml褐色試験管を用いて下記のとおりスタンダード（STD）を調整する。

STDの組成	STD0 (ブランク)	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
TEP二次溶液(ml)	0.0	0.1	0.1	0.2	0.4	0.8
超純水(ml)	2.5	2.5	2.4	2.3	2.1	1.7
TCA(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
合計(ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

(6)メスアップしたサンプルを攪拌後、濾紙をセットした漏斗を用いて50ml遠沈管に10～20ml程度濾過する。



<遠沈管に濾過する>



<濾過後のサンプル>

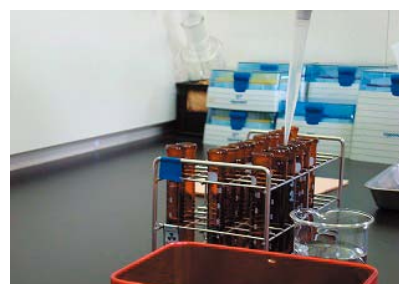
注) 濾過液が濁っている場合、測定値は異常値になってしまうため、もう一方のサンプルデータのみ採用する。

(7)濾過したサンプルを10ml褐色試験管に5ml入れる。



<濾過サンプル5mlを試験管へ>

(8)スタンダードおよびサンプルを入れた10ml褐色試験管それぞれに、TBA溶液を5ml入れよく転倒混和する。



<TBA溶液5mlを加える>

注) TBA 溶液を加えるタイミングについて、2 日目の測定を午前中（8 時頃～12 時頃）に行うには、1 日目の16 時頃に加えるとよい。

(9)TBA溶液を入れたら、室温、暗環境下で16時間以上20時間以下放置して反応させ、分光光度計で532nmの吸光度を測定する。なお、石英セルの洗浄には、超純水を使用する。



＜分光光度計にて測定＞

③データ解析

解析について、6つのSTD（STD0含む）の吸光度を用いて検量線を作成し、サンプルの吸光度から濃度を求め、TBARS値（mg MDA/kg 肉）を算出する。

【参考文献】

Witte, V. C., Krause, G. F. and Bailey, M. E. 1970. A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science*, 35 : 582-585.

Mitsumoto, M., Arnold, R. N., Schaefer, D. M. and Cassens, R. G. 1993. Dietary versus postmortem supplementation of vitamin E on pigment and lipid stability in ground beef. *Journal of Animal Science*, 71 : 1812-1816.