

第4章 脂質の分析

第1節 脂質化学の基本

1.1 脂質の定義

脂質はタンパク質、糖質（炭水化物）と並んで、生物体に含まれる3大主要成分である。脂質はその種類、構造、性質が多様であるため、簡単に定義することは難しい。多くの研究者によって最も妥当とされている定義は次のようなものである。

- 1) 原則として有機溶媒には溶けるが水には溶けない。
- 2) 分子中に鎖状あるいは環状の炭化水素基を持つ。
- 3) 生物体中に存在するか、生物に由来する、あるいは生物に利用される物質である。

1.2 脂質の役割

生物体の中の細胞は、必ず生体膜によって区切られているが、脂質（主としてリン脂質）は生体膜を構成する主要な成分としての役割を担っている。また、脂質は生命活動を営むためのエネルギー源としても重要である。この場合、エネルギーはトリアシルグリセロールの形で貯えられるが、大量に貯蔵される組織として、動物の場合は脂肪細胞、大豆やトウモロコシ等の油糧植物の種子中にはオイルボディがある。また、脂質は脂溶性ビタミンであるビタミンA、D、E、Kを体内に運び吸収させやすくする働きもしている。さらには、コレステロールから胆汁酸が作られたり、脂肪酸の一つであるアラキドン酸からプロスタグランジンというホルモン様物質が作られたり、というように、脂質それ自身が栄養学的・生理学的に重要な役割を持っている。

1.3 分類と構造

【脂肪酸】 生理学的あるいは栄養学的に重要な脂質の多くは、その分子内に脂肪酸を含んでおり加水分解によって脂肪酸を遊離する。そこで、最初に脂肪酸の種類と構造を把握しておくこととする。脂肪酸は直鎖の炭化水素鎖の末端にカルボキシル基（-COOH）を持つ分子である。脂肪酸は2炭素単位で合成されるため、生体や食品に含まれる脂肪酸のほとんどは炭素数が偶数である。大部分の脂肪酸の鎖長は炭素数22までである。脂肪酸は含まれる二重結合の数によって次の三つに分類される。

a) 飽和脂肪酸：その分子中に二重結合（不飽和結合）を含まない脂肪酸である。代表的なものを表1にまとめる。脂肪酸は表記の仕方がいくつかあるので、飽和脂肪酸を例として説明を加えておく。系統名はIUPACの命名法に従ったものである。例えば、炭素数4の脂肪酸はブタンの誘導体なのでブタン酸、炭素数6のものはヘキサン誘導体でヘキサン酸というように命名されている。通称は長年の習慣で導入されてきたものであり、現在でも系統名に比べてよく使われるものが多い（例えば炭素鎖数18の脂肪酸は、研究者によっても、通常オクタデカン酸ではなく、ステアリン酸と呼ばれる）。略称は炭素鎖数のみを表したものであり、コロンの後の数字は二重結合の数を示す。簡易であるので、論文中の表記等によく使用される。

b) 一価不飽和脂肪酸：分子中に一つの二重結合を持つものである（表1）。図1に示すように、二重結合にはシスとトランスの配位がある。通常生物中に見出されるのはシス体であるが、トランス体は一部のバクテリアによって生産される他、マーガリン製造等に用いられる水素添加の工程中に生じる。表1の系統名の頭についている*c*や*t*は、それぞれシス、トランスを表す。また、その後の数字は二重結合がカルボキシル基から数えて何番目に存在するのかが表す。逆に略称の後の ω 9は、メチル基末端から何番目に二重結合が存在するのかが示す（オレイン酸の場合はどちらの表記でも9である）。二重結合の表示については次の項で詳しく述べる。

表1 脂肪酸の種類と構造

C 数	構造式	系統名	通称	略称
飽和脂肪酸				
4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	ブタン酸	酪酸	4:0
6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	ヘキサン酸	カプロン酸	6:0
8	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	オクタン酸	カプリル酸	8:0
10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	デカン酸	カプリン酸	10:0
12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	ドデカン酸	ラウリン酸	12:0
14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	テトラデカン酸	ミリスチン酸	14:0
16	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	ヘキサデカン酸	パルミチン酸	16:0
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	オクタデカン酸	ステアリン酸	18:0
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	エイコサン酸	アラキジン酸	20:0
22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	ドコサン酸	ベヘン酸	22:0
一価不飽和脂肪酸				
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	c9-オクタデセン酸	オレイン酸	18:1 ω 9
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	t9-オクタデセン酸	エライジン酸	——*
22	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	c13-ドコセン酸	エルカ酸	22:1 ω 9
多価不飽和脂肪酸				
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	c9,c12-オクタデカジエン酸	リノール酸	18:2 ω 6
18	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	c9,c12,c15-オクタデカトリエン酸	α -リノレン酸	18:3 ω 3
18	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	c6,c9,c12-オクタデカトリエン酸	γ -リノレン酸	18:3 ω 6
20	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	c5,c8,c11,c14-エイコサテトラエン酸	アラキドン酸	20:4 ω 6
20	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	c5,c8,c11,c14-エイコサペンタエン酸	EPA	20:5 ω 3
22	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH}$	c4,c7,c10,c13,c16,c19-ドコサヘキサエン酸	DHA	22:6 ω 3

*トランス酸には略称なし

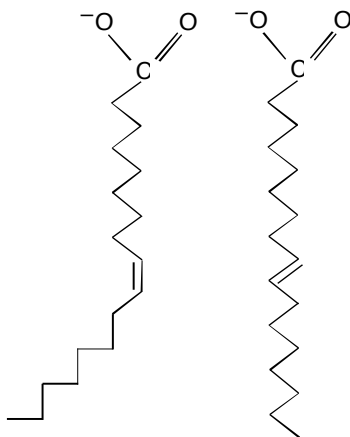
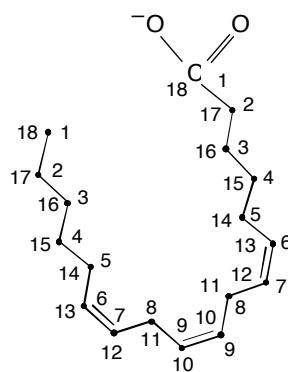


図1 18:1脂肪酸の構造

- (a) オレイン酸, *cis* 配位
 (b) エライジン酸, *trans* 配位



(a) (b)

外側の番号 IUPAC 表示
 内側の番号 ω 表示

図2 γ -リノレン酸における2重結合位置の

IUPAC 表示と ω 表示.

- c) 多価不飽和脂肪酸：分子中に二重結合を二つ以上持つものである（表 1）。二重結合の多く含まれる脂肪酸ほど融点が低くなる。図 2 の γ -リノレン酸を例にして二重結合の表示法について詳しく述べる。この場合、IUPAC 表示ではカルボキシル基から数えて 18:3*cis*-6*cis*-9*cis*12 と表すが、 ω 表示では 18:3 ω -6 と表す。 ω は n と表記されることもある（例えば ω -6 は n -6）。 ω 表記が用いられる理由は、 ω -6 系列のリノール酸やアラキドン酸、 ω -3 系列の α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) では、代謝経路や生理的役割が異なるほか、生物種によって含量も大きく異なるためである。例えば、大豆にはリノール酸が、魚の肝臓には EPA や DHA が多く含まれる。

【ステロール】 図 3(a)のシクロペントノ・ヒドロフェナントレン（ステロイド環）にアルコール性の OH 基が結合したものをステロールという。動物ステロールの代表的なものがコレステロール（図 3(b)）であり、植物ステロールとしてはシトステロール（図 3(c)）がある。微生物ステロール、例えばエルゴステロールの存在も認められている。天然のステロールの OH 基には、しばしば脂肪酸がエステル結合で付加されており、ステロールエステルと呼ばれる。植物性ステロールを摂取することにより、体内のコレステロール値を下げられることが、最近の研究でわかってきた。ステロイド環を持つ他の化合物としては、ステロイドホルモン、胆汁酸等がある。第 4 節においてコレステロールの定量を行う。

【アシルグリセロール】 グリセロールに脂肪酸がエステル結合で付加したものをアシルグリセロールと言う。図 4(a)にグリセロールの分子構造を示すが、分子中に含まれる三つの炭素は不斉炭素ではない。しかし、上と下の炭素のどちらかに脂肪酸が付加したり、その両方の炭素に別々の脂肪酸が付加すると、中央の炭素は不斉炭素となる（つまり分子は光学異性体となる）。そこで、それぞれの異性体を区別するために、グリセロールの炭素を *sn*-1, 2, 3 と表記する（*sn* は *stereospecifically numbered* の意味）。図 4(b)は、グリセロールの OH 基全てに脂肪酸が結合したトリアシルグリセロール (TG) を示している（脂肪酸は R, R', R'' と表記）。食品でいう油、脂肪、油脂などは一般的に TG を指す。また、前に述べたように生物の中でエネルギー貯蔵形態としての役割を果たしているのも TG である。一方、一つだけ脂肪酸が付加したモノアシルグリセロール (MG) や二つ付加したジアシルグリセロール (DG) は、天然物中には大量には存在していない。図 4 (c) には MG の例として 2 位に脂肪酸が付加した 2-アシル-*sn*-グリセロールを示す。TG を摂取すると膵臓リパーゼによって 1 と 3 番目の脂肪酸が切離され、この形の MG が生成されるが、この MG は脂肪酸と共に小腸から吸収される。この他、それぞれ 1, 3 番目の位置に脂肪酸が付加した MG もある。MG は食品用の乳化剤としてよく使用される。図 4 (d) には、DG の一つである 1,3-ジアシル-*sn*-グリセロールを示す。DG にはこの他、1,2 または 2,3 の位置に脂肪酸が付加したものがある。DG を摂取しても通常の油脂 (TG) に比べ脂肪として蓄積しにくいことが最近明らかとなり、DG を多く添加した食用油が市販されている。

【リン脂質】 リン脂質の基本骨格はグリセロールの 1 と 2 の位置に脂肪酸が、そして 3 の位置にリン酸が結合したものである（図 5(a)）。リン酸基に結合する X の官能基の種類によって様々なリン脂質が形成されることになる（表 2）。前にリン脂質は生体膜を構成する成分であることを述べたが、生物種あるいは組織によって含まれるリン脂質の種類、組成は異なる。

【その他の脂質】 グリセロールの 3 の位置に糖が結合したものをグリセロ糖脂質と言い、植物界に広く存在している。図 5 (b) のように単糖が結合する場合と、複数の糖が結合している場合がある。この他、動植物界に広く存在する脂質としてはスフィンゴ脂質があり、アミノアルコールのアミノ基に脂肪酸が結合したものを基本とする（図 5 (c)、セラミドと呼ぶ）。この OH 基にリン酸が結合したスフィンゴリン脂質（スフィンゴミエリン等）、糖が結合したスフィンゴ糖脂質（ガングリオシド等）がある。

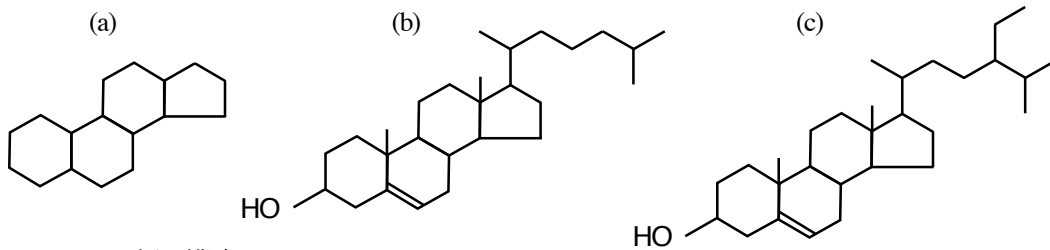


図3 ステロール類の構造

(a), シクロペンタノ・ヒドロフェナントレン(ステロイド環)
 (b), コレステロール(動物性); (c), シトステロール(植物性)

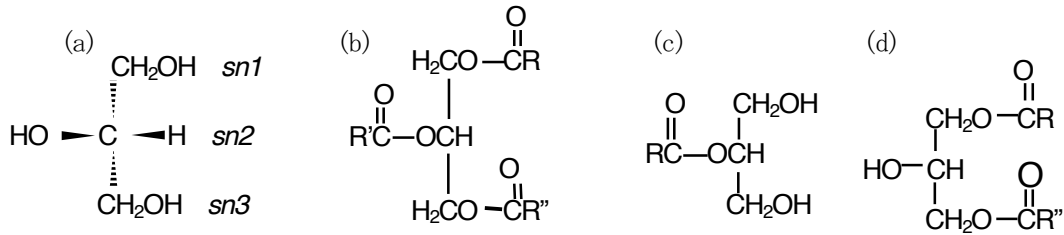


図4 アシルグリセロールの構造

(a), グリセロール; (b), トリアシルグリセロール;
 (c), 2-(モノ)アシル-*sn*-グリセロール; (d), 1,3-ジアシル-*sn*-グリセロール(DG)

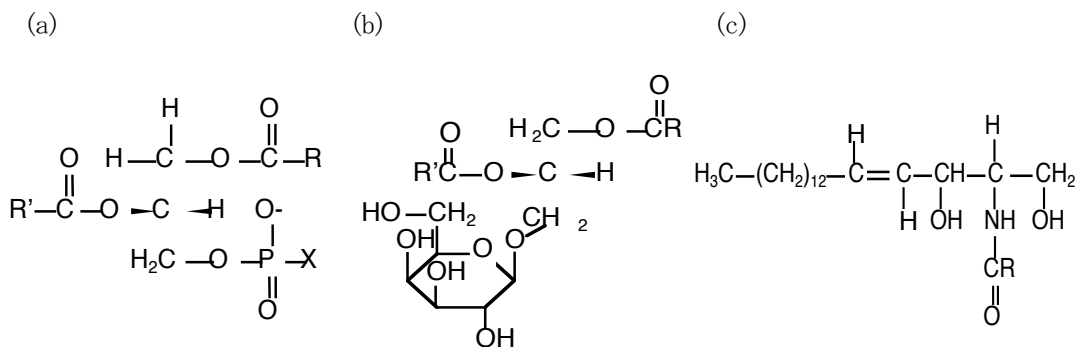


図5 様々な複合脂質の構造

(a), リン脂質の基本骨格; (b), 糖脂質の1つである
 モノガラクトシル-ジアシルグリセロール; (c), セラミド

表2 リン脂質の種類と構造

リン脂質	略号	X*
ホスファチジルコリン	PC	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
ホスファチジルエタノールアミン	PE	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3$
ホスファチジルイノシトール	PI	$-\text{C}_6\text{H}_6-(\text{OH})_5$
ホスファチジルセリン	PS	$-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}^+\text{H}_3-\text{COO}^-$
ホスファチジン酸	PA	$-\text{H}$
ホスファチジルグリセロール	PG	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2(\text{OH})$

* Xは図5(a)のリン脂質の基本骨格中に含まれる官能基

2.2 参考資料

【食品成分表からの抜粋】

食品名	脂質 g/100g	コレステロール mg/100g	食品名	脂質 g/100g	コレステロール mg/100g
うなぎきも	5.3	430	ウシ肝	3.7	240
アンコウ	41.9	560	ブタ肝	3.4	250
マグロ(赤)	1.4	50	鶏肝	3.1	370
マグロ(脂)	27.5	55	全卵(卵黄)	10.3(33.5)	420(1400)
大豆(乾)	19-22.6	-	牛乳	3.8	12
小麦	3.0-3.3	-	ミルクチョコレート	34.0	19
精白米	0.9	-	ポテトチップス	35.2	-
じゃがいも	0.1	-	あんぱん	5.3	-
ごま(乾)	51.9	-	マヨネーズ	72.3	150

【脂質の検出方法】

方法名	検出脂質	検出方法	呈色
硫酸法	非特異的	40～50%硫酸を噴霧後、150～180℃で20-60分間加熱する。	茶～黒
ヨウ素法	非特異的	密閉ガラス容器にヨウ素蒸気を充満させてTLCプレートを入れる。	黄～茶 二重結合を切断するので不飽和脂肪酸を持つものが強く発色する。
プリムリン法	非特異的	最終濃度を0.001～0.005%となるようにプリムリン試薬を水に溶かした後80%アセトン溶液とする。噴霧後、紫外線(365nm)で観察する。	青紫地に青白。感度良好。非破壊性。
アンスロン法	糖脂質	アンスロン試薬を噴霧後、110℃で10-20分間加熱する。	紫～赤紫、紫(セレブロシド)、種々の色(他の脂質)。
塩化鉄法	ステロール	噴霧後100℃で数分加熱するとステロールが発色し、その後他の脂質が発色する。	赤～紫(コレステロール)、紫(コレステロールエステル)、黒(他の脂質)
Dittmer-Lester法	リン脂質	三酸化モリブデン-硫酸-モリブデン混合試薬を噴霧する。	青
Dragendorff法	コリン	硝酸ビスマス-酢酸-ヨウ化カリウム混合試薬を噴霧する。	橙色
ニンヒドリン法	アミノ基	ニンヒドリン試薬を噴霧後100～120℃で数分間加熱する。	赤紫。感度がいいが退色しやすい。
グリコール脂質検出法	グリコール脂質	1%メタ過ヨウ素酸ナトリウム液を噴霧し5～10分間(脂質酸化)後、水を噴霧する。亜硫酸ガスで充満したタンクで過剰の過ヨウ素酸を取り除きヨウ素を消失させた後1%フクシン液を噴霧する。	紫(ホスファチジルグリセロール)、黄(ホスファチジルイノシトール)、青(糖脂質)、紫(1-アシルグリセロール)
ニトロフェニルヒドラジン法	プラズマローゲン	0.4%2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-2M硫酸溶液を噴霧する。	黄～赤黄

第2節 脂質の抽出・分離

【目的】脂質が抽出の過程で分解されることなく、かつ遊離糖やアミノ酸のような非脂質成分が混入することなく定量的に得るのが理想である。本実験では、クロロホルム-メタノール混合溶媒を用いて全脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーを用いて分離・同定を行う。以上の実験を通じ脂質の抽出および分離の基礎技法の習得を目的とする。

2.1 総脂質の抽出

【原理】脂質には極性の低い中性脂質と極性の高いリン脂質と呼ばれる膜脂質がある。そして、脂質相互あるいはタンパク質と水素結合・疎水結合や、タンパク質とイオン結合をしているものがある。水素結合・疎水結合はエーテル、クロロホルム、ベンゼン・ヘキサンなどの非極性溶媒で弱めることができ、イオン結合の場合は、極性の高いメタノール、エタノールなどの極性溶媒で弱めることができるので、これらの溶媒が脂質の抽出に用いられる。よく用いられる Bligh-Dyer 法はクロロホルム:メタノール:水(ホモジネート試料)比が 1:2:0.8 となる均一の溶媒で脂質を抽出し、クロロホルム、水を加えて2層に分離させる方法で、上層には水・メタノールなど水溶性の成分が、下層にはクロロホルム・脂質など脂溶性の成分が含まれる。Folch 法も同様であるがクロロホルム:メタノール:水(ホモジネート試料)比を 40:20:3 として脂質を抽出し水を加えて2層に分離する。

【材料】シャケ・ニワトリの卵黄(イクラ・鶏卵)、天秤、遠心分離機、ボルテックスミキサー、ピペットマン(可変型 200, 1000 μ l)、チップ(黄、青)、クロロホルム、メタノール、メスシリンダー(50 ml)、マイクロチューブ(2ml)、パスツールピペット、KCl、三角フラスコ、共栓つきスピッツ管、はさみ、テープ、マジック

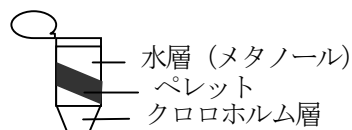
【下準備】

- ・ クロロホルム-メタノール(2:1)を調製する。これは、あらかじめ調製して天秤の横にあるので、試料を量り終わったら、その場で使用する。
- ・ 0.9%KCl 溶液を調製する。これも調製済みで、前の机にあるので、各班ビーカーに 10ml 程とって持っていく。
- ・ 脂質を保存するためのマイクロチューブは、班員数の2倍の本数を秤量する。

【方法】Folch 法の変法

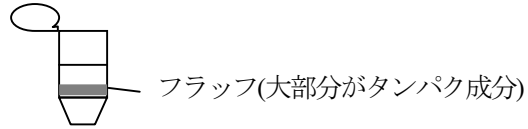
1. 卵黄

1. 鶏卵から卵黄を分離する。
2. 鶏卵の卵黄 0.3-0.5 g をよく混ぜながら 2ml のマイクロチューブにパスツールピペットで取り秤量する。イクラはスパチュラで 2-3 粒ほどを 2ml のマイクロチューブにとり、つぶした後秤量する。イクラは粘度が高いため 0.9%KCl 溶液で約 2 倍に希釈する。
3. クロロホルム-メタノール(2:1)を約 1.5ml 加える。あふれる場合は 1.5ml 以下でよい。
☞ 酵素が活性化され脂質の分解・酸化の危険性がある。これを防ぐため、0.05%ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)を添加し氷上で行うことが通常用いられる。
4. しっかり蓋をして手で 30 秒間激しく攪拌し、その後の 10 分間に 30 秒毎に攪拌して脂質を抽出する。
5. 15,000 回転 5 分遠心する。水層、ペレット層、クロロホルム層に別れるので、パスツールピペットで上澄みを捨てる。
6. ペレットはしっかりしているので崩さないようにしながら、5 で使用したものと別のパスツ



ルピペットを用いて、クロロホルム層を別のマイクロチューブに取る。

7. 0.9%KCl 溶液を 0.5ml 加えてよく攪拌し、遠心する。
8. マイクロチューブの 2ml の線までクロロホルム-メタノール (2 : 1) をパスツールピペットで加えてよく攪拌し、遠心する。
9. 上層とフラップをパスツールピペットで、取り去る。フラップ層がとり難い場合は、無理にとらなくてよい。
10. 下層 (クロロホルム層) をあらかじめ秤量した別のマイクロチューブに移す。うまく取れない場合、ある程度クロロホルム層を別のチューブに移した後、クロロホルムを 0.5ml 加えて攪拌し (ボルテックスミキサーを使うとよい) ,再度 15,000 回転 5 分遠心し、クロロホルム層を 10 で用いたマイクロチューブに取る。
 ♪ここでは、回収を上げようとするよりフラップや水をとらないことが重要。
11. 蓋を開けて空気を吹き付けて溶媒を飛ばす。
 ☞実際は、脂質の酸化を押さえるためにエバポレーターや窒素ガスで酸素をシャットアウトした状態で溶媒を蒸発させ、冷凍庫に保存し、このようなことはしない。
12. 溶媒が蒸発したら秤量し風袋を差し引き、得た脂質の量を計算する。冷凍庫に保存する。



(次の実験日)

13. クロロホルムを 1mg/20 μl(50mg/ml)の濃度になるようにマイクロチューブに入れ脂質を溶解する。
14. 酸化測定用に 20mg 分を栓付ガラス試験管に取り分け冷凍庫に保存し、残りは脂質の分離に使用する。

試料	魚 卵				鶏 卵			
試料の重量(mg)								
風袋+脂質(mg)								
風袋(mg)								
脂質(mg)								

2.3 脂質の分離

2.2.1 薄層クロマトグラフィー (TLC)

【原 理】 脂質の分析を始めるに際して、どの成分がどの程度存在するのかを知るための様々な手法のうち、簡便・高精度・速さ・回収可能な点からよく用いられるのが高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す) である。特に TLC は特別な装置・試料の前処理がいらないので単発的に脂質の分離・同定を行う時に便利である。TLC は、シリカゲルのような吸着剤を固定相として、試料成分のシリカゲルへの吸着とシリカゲルに保持される水と上昇溶媒の分配の差により分離する。

【材 料】 抽出した脂質, 5 x 20cm TLC プレート(254nm の波長で励起されるマンガン活性化ケイ酸亜鉛を含有。 ♪表面には手を触れないこと), ガラスキャピラリー, 展開層, 展開溶媒, 濾紙, 紫外線ランプ, 中性脂質展開用標準試料 (トリアシルグリセロール, 遊離脂肪酸, コレステロール, リン脂質), ビーカー, スターラー, スターラーバー, メスシリンダー, ピペットマン, チップ, 定規, トレース紙

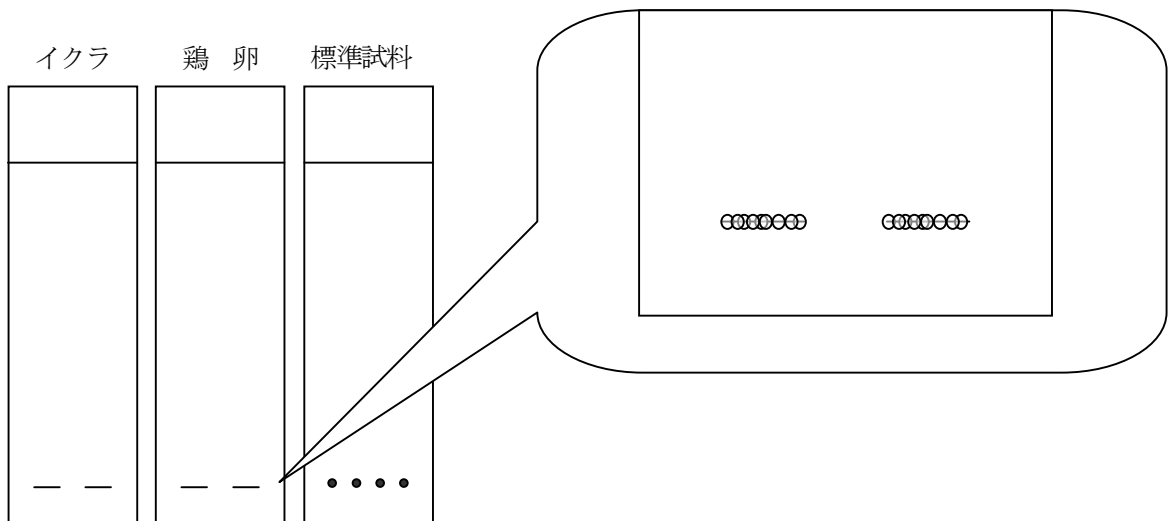
【下準備】 (前日に行う)

展開槽は 2 班で一つ使用する。

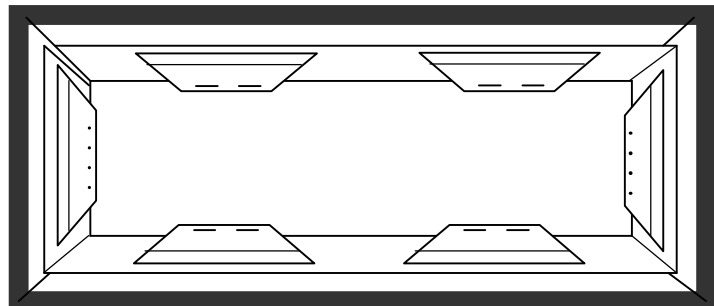
- ・展開溶媒を調製する（調製済み）. 前の机にあるので200ml ずつビーカーで取っていく.
 - ・ 中性脂質の分離
ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸（80 : 20 : 1）
- ☞極性の大きい中性脂質ではヘキサン/ジエチルエーテル比を減らし, 極性の小さい中性脂質では増やして酢酸を除く)
- ・展開溶媒の蒸気圧を飽和にするため, 濾紙を展開層の内部に張り付かせる.
- ・展開溶媒 200ml を入れて濾紙に十分行き渡らせる.
 - ☞ 脂質の移動度に関係するので最初に展開層の用意しておく.
- ・標準試料を調製する（調製済み）.

【方 法】

1. 下から2cm の場所に, 試料をスポットする位置を鉛筆でしるしをつける. 目的試料(イクラ・鶏卵) 別に, 長さ1cm の線を間隔1cm で2本引く. 片方はメチル化用, 片方はヨウド発色用である. 標準試料は1cm 間隔で点で印をつける. 上から3cm のところに線を引く.
2. 目的試料 20 μ l をガラスキャピラリーに取り(毛細管現象であがってくる), 鉛筆でつけた1cm の線の上を押さえるようにしてできるだけ小さなスポットを何度もしていく. 隣の1cm のところにも同様にスポットする. キャピラリーの線は1 μ l をあらわしているのをそれを参考にする.
 - ☞ 強く押しすぎたり引くとシリカゲルがはがれたり, 大きなスポットとなる.
 - ☞ 溶媒が乾燥してから, 少量ずつ上から何度もスポットする.



3. 標準試料4種類も試料毎に10 μ l スポットする(スポットした量を書きとめておく). 各標準試料は2班に1バイアルずつ用意されている.
4. 溶媒を飛ばす.
5. 展開層に静かにまっすぐに入れる. このときに斜めに入ると斜めに展開されることになる. ふたを閉じるときも液面がゆれないようにする. 二班同時に入れる, または, 片方の班が終わってからもう片方が入れる.
 - ☞ 標準試料と試料のプレートは同時に展開する.



6. 上 3cm の印まで溶媒が上がると展開終了とする。ただし、プレート毎に多少のずれがあるので、どこまで溶媒が上がっていたか印をつけておく(重要)。溶媒は蒸発しやすい。迅速に行うこと。
7. 展開後プレートの溶媒を飛ばす。
8. サンプルのプレートをガラスカッターで半分に切る。
9. 切った半分と標準物質のプレートを、ヨウドが入っているチャンバーで発色させて鉛筆で印をつける。
10. 発色したプレートを横に並べて発色していないプレートのトリアシルグリセロールの位置を予測し鉛筆で印をつける。
 ☞ヨウドが 2 重結合を開裂させるので、ヨウド発色させたプレートを発色させてないプレートと密着させないようにする。
11. プレート上で一番大きく見えるスポットの片方にラウリル酸メチル(2.5mg/ml)を $10\mu\text{l}$ ($25\mu\text{g}$) スポットする。
12. 細いスパチュラで薬包紙上に丁寧にかきとり、残りをヨウドで発色させてトリアシルグリセロールのところをかきとっていることを確かめる。
13. ヨウド発色したプレートのパターンは、ヨウドの色は時間とともに薄くなっていくのでコピーして残す。
14. 溶媒の先端の移動距離 L と溶質のスポットの移動距離 (中央) L_s から移動度 $R_f=L_s/L$ を求め、標準試料から各スポットの脂質が何であるか同定する。
 ☞リン脂質を分ける場合は、全てのリン脂質を 1 回で分離するのは困難なので、性質の異なる 2 種類の展開溶媒を用いて 2 次元展開、1 次元多重展開を行うのが一般である。
 ☞TLC プレートは紫外線ランプを用いて脂質のスポットを簡便に行うために蛍光物質を含有するものを用いたが、目的とする脂質の発色に不都合な場合、蛍光物質不含のものもある。
 ☞ R_f 値は少量より多量にスポットした方が大きくなる傾向にある。

片付け(これまでの実験と異なるもの)

- ・ 廃液(展開槽液)を廃液タンクにいれること

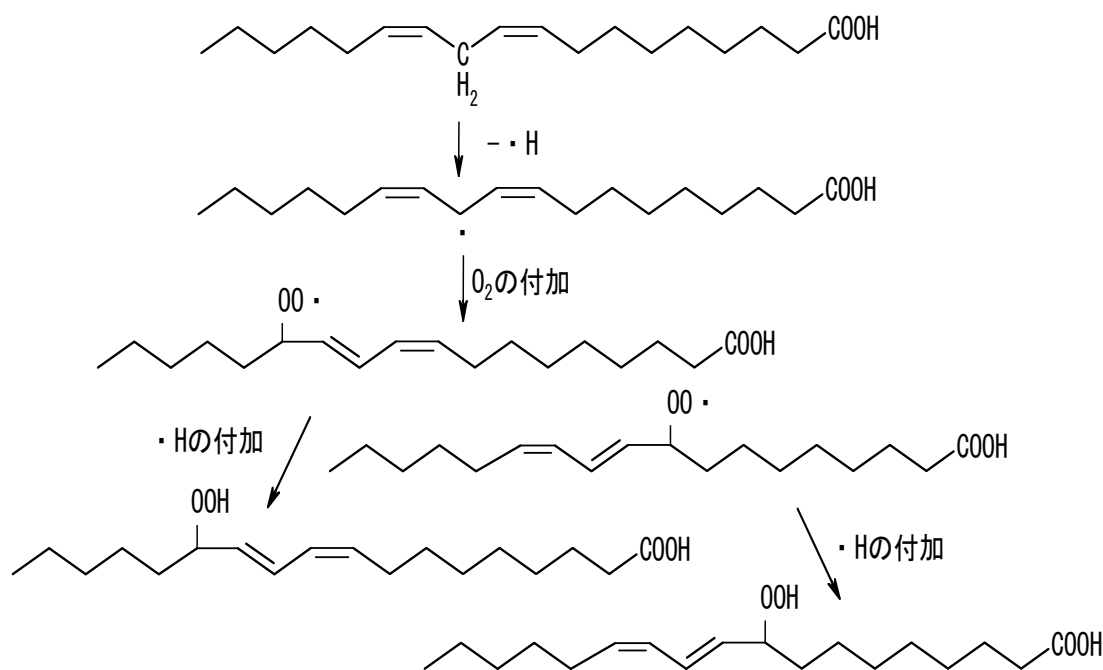
		スポットの移動距離 (cm)	移動度 ($R_f=L_s/L$)
標準試料	溶媒		
	リン脂質		
	コレステロール		
	遊離脂肪酸		
	トリアシルグリセロール		
魚卵	溶媒		
	リン脂質		
	コレステロール		
	遊離脂肪酸		
	トリアシルグリセロール		
鶏卵	溶媒		
	リン脂質		
	コレステロール		
	遊離脂肪酸		
	トリアシルグリセロール		

第3節 脂質酸化

【目的】脂質は生体構成成分として、あるいは食品成分として極めて重要であるが、活性酸素の攻撃を受けて酸化する。酸化により生じる過酸化物質、フリーラジカル、アルデヒドなどは生体にとって有害で、生活習慣病やガンのなどの原因となる。また、酸化食品では風味が著しく損なわれる。脂質の酸化は様々な方法で評価できるが、本実験では、食品脂質の酸化指標として重要な過酸化物質を測定する。

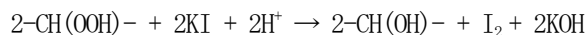
3.1 過酸化物質の測定

【原理】脂質の中でも酸化しやすい不飽和脂質をRHとする。下図のように、二重結合の隣の炭素についている水素は金属や光の作用によって脱離しやすい。特に二重アリル基のなかの水素は脱離しやすく、フリーラジカルR・が容易に生成する。生じたフリーラジカルは酸素分子を付加して過酸化ラジカルROO・になり、これが新たに脂質分子から水素を引き抜き、自らはヒドロペルオキシドROOHになる。水素を引き抜かれた脂質はフリーラジカルになって酸素分子を付加して過酸化ラジカルを再び生じる。このようにして酸化の初期過程ではヒドロペルオキシドが蓄積する。



リノール酸からリノール酸ヒドロペルオキシドの生成

過酸化物質のヒドロペルオキシ基はヨウ化カリウムと反応してヨウ素を遊離する。



遊離したヨウ素の363nmにおける吸光度を測定して過酸化物質の量を知ることができる。

【材 料】第2節 2.1 で抽出し、保存しておいたイクラ及び鶏卵卵黄の脂質を用いる。

【器 具】天秤、遠心分離機、ピペットマン（可変型 1000 μ l, 200 μ l）、チップ、メスシリンダー（50ml）、三角フラスコ、12ml ねじふた付き試験管、エッペンドルフチューブ、分光光度計とプラスチックセル、ガラスパスツールピペット、ニップル

【試 薬】（全て調製済みなので指示された場所に取りに来る）

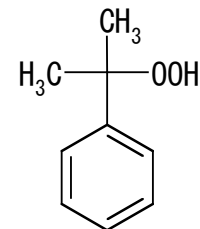
- ・ メタノール-ブタノール混液（2:1）。〔以下、MeOH-BuOH と標記〕
- ・ 25mM HCl in MeOH（1M 塩酸をメタノールで 40 倍に希釈する）。
- ・ 12.5mM 硫酸アンモニウム鉄(II)（4.9 mg $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /ml）
- ・ ヨウ化カリウム飽和水溶液
- ・ クメンヒドロペルオキシド溶液（クメン原液）（43.15 μ M in MeOH-BuOH）

【方 法】Lovaas の方法

I. 標準試料の調製

次の表に従ってクメンヒドロペルオキシドの標準試料を作成する。（微量遠心管に作成）

No	クメン原液 (ml)	MeOH-BuOH (ml)	最終濃度 (μ M)
1	2	0	10
2	1.5	0.5	7.5
3	2	2	5
4	1	1	3.75
5	1	1	2.5
6	1	1	1.25
7	0	2	0



クメンヒドロペルオキシド

* 最終濃度とはIIIの操作で全ての試薬を加えた後の溶液中の濃度を指す。

II. サンプル調製

イクラ、鶏卵卵黄から抽出した脂質 20mg に、2 ml の MeOH-BuOH を加え、均一に溶解する。

III. 予備実験

1. I で調製した No. 7, No. 3, No. 1 および II で調製した標準試料およびサンプルより 700 μ l をとり試験管に入れ、2 ml の MeOH-BuOH を加えて希釈する。（試験管 5 本）
2. 120 μ l 25mM HCl in MeOH を加え、Vortex でよく混ぜる。
3. 120 μ l 12.5mM 硫酸アンモニウム鉄(II)を加え、Vortex でよく混ぜる。
4. 80 μ l ヨウ化カリウム飽和水溶液を加える（下の☞に注意）。Vortex でよく混ぜる。
5. 2000g 3分間遠心分離する。
6. 上澄みをセルに移し 363nm の吸光度を測定する。

IV. 本実験

1. 予備実験の結果から、イクラ、鶏卵の希釈倍率を決定し、MeOH-BuOH で希釈する。（I の標準物質から得られる標準曲線内に入るように考える）
2. 予備実験で行った手順（1-6）を行う。I の表の濃度 7 種とイクラ、鶏卵サンプルの合計 9 種）

☞遊離するヨウ素は反応時間の影響を受けるのでヨウ化カリウム飽和水溶液を加えてから正確に 15 分後に測定する。そのため、全ての標準試料・サンプルに 3. までの試薬を加えたところで、一旦ストップし、4. のヨウ化カリウムは時間を区切って加えてゆく（例えば 1 分毎）。標準試料の濃度の薄いものから入れていくこと。

第4節 脂質の定量

4.1 中性脂質（トリアシルグリセロール）中の脂肪酸の定量

【安全上の注意】

脂質の定量では、抽出・分離操作（第2節）同様有機溶媒を用いる。換気を頻繁に行い、有機溶媒を吸引しないよう十分注意すると同時に火気を避けること。吸引により気分が悪くなった場合は実験を中止し、休息するなどする。また、本実験ではアルカリを用いるので薬品などを皮膚、口、鼻、特に眼球に触れさせないよう十分に注意して行うこと。

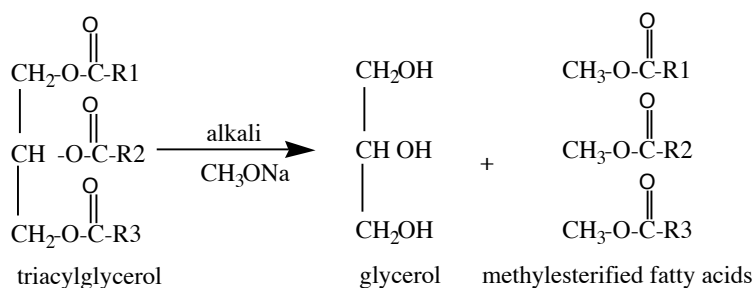
【目的】

ガスクロマトグラフィー（GC）を用いて鶏卵、魚卵から抽出・分離した中性脂質（トリアシルグリセロール）中の脂肪酸の定量を行う。GCは脂質分析では極めて頻用される手法であり、これを通じて脂質量とGCの原理、取扱い、解析手法の取得を目的とする。

【概要と原理】

本実験ではTLCにより分離・同定したトリアシルグリセロールを試料として、ナトリウムメソキサイド法により脂肪酸の遊離とメチルエステル化を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをGCにより定量分析する。

今回用いるのは分配クロマトグラフィーに属するガスクロマトグラフィー（GC）であり、移動相に窒素、ヘリウム、アルゴンなど不活性ガスを用いる点が特徴である。気化した成分はガスとともに移動する際、固定相として用いられる充填剤に対して異なる親和性を示し、その結果、カラムを通過する速度に差が生じることを利用して分離される。分離された成分は水素炎によりイオン化され、イオン電流の測定により検出される（水素イオン炎検出器：flame ionization detector, FID）。FIDの検出感度は1-10 ngである。近年のGCの発達、データの蓄積には目覚ましいものがあり、よほど特別な脂質でない限りGCでの分離、分子種の推定は可能であるとさえいえる。GCの原理について詳しくは第4章第1節を参照するよう。GCで分離、定量分析を行う場合、脂肪酸のカルボキシル基をメチルエステル化して解析に供するのが一般的である。メチルエステル化にはメタノリシス（酸触媒法）、ナトリウムメソキサイド法（アルカリ触媒法）が



あるが、本実験ではナトリウムメソキサイド法を用いる。

その化学は左のとおりである。本実験のように、対象とする脂質がほぼ中性脂質から構成されていることが分かっている場合は、比較的穏和な条件下で反応させら

れるアルカリ触媒下メチルエステル化反応の方が酸触媒下メチルエステル化反応より扱いやすい。メタノリシスについては補足を参照すること。

なお、本手法以外にトリアシルグリセロール中の脂肪酸の定量には以下の手法がある。1) GC-MS（ガスクロマトグラフィー質量分析計） 2) HPLC（高速液体クロマトグラフィー） 3) 酵素法 参考までにそれぞれの概略を補足に記載した。

【器具】

スパテル（小）、薬包紙（大）、ガラスパスツールピペット、ニップル、スクリュウ栓付ガラスバイアル、スクリュウ栓付ガラス試験管、ヒートブロック（50℃で保温可能なもの：恒温槽でも可）、窒素ガスボンベ

【試薬】

0.5N ナトリウムメソキサイド（市販されている5N ナトリウムメソキサイドを無水メタノールで

10 倍希釈する), ベンゼン, 酢酸, ヘキサン, 蒸留水

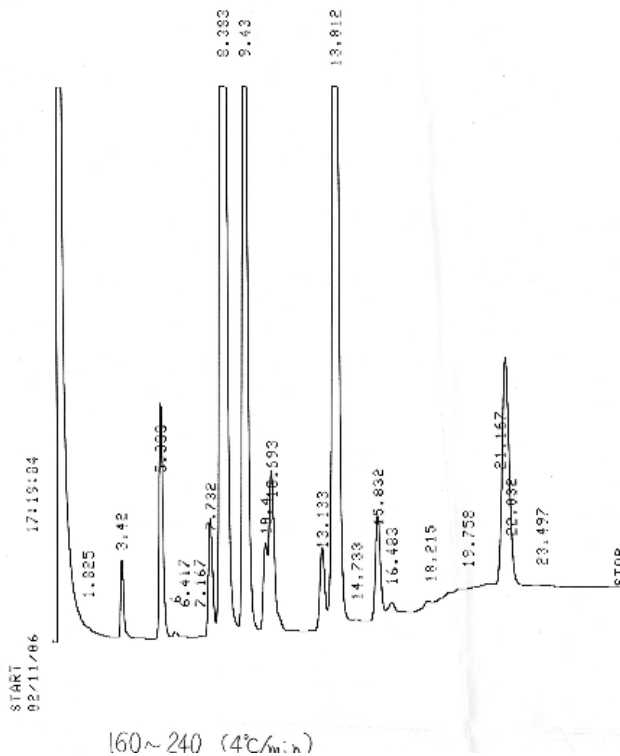
【操作】

I. トリアシルグリセロールのメチルエステル化

TLC 上で検出したトリアシルグリセロール (中性脂質) のスポット上にヘキサンに溶解させた既知量のラウリン酸メチルをスポットする (2.5 μg ラウリン酸メチル/ μL ヘキサンを 10 μL (=25 μg) スポットするとよい)。このラウリン酸メチルはGC定量解析時において内部標準脂肪酸として機能する。ラウリン酸メチルスポットが乾燥したらスポット部分の TLC 樹脂を葉包紙に掻き取り, スクリュー栓付ガラス試験管に移す。試験管にベンゼン 0.25 mL を加える。ベンゼンは樹脂中の脂肪酸を溶出させるためにくわえることから, ベンゼンが樹脂に行き渡っていることを確認すること。行き渡っていることを確かめたのち, 0.5N ナトリウムメソキサイド 0.5 mL を加え, ヒートブロック上で 50°C 30 分間インキュベートする。メチルエステル化反応はこの間進行する。試験管を自然放冷させたのち, 酢酸 50 μL を加え, 十分混和させて中和した後, 蒸留水 1 mL, ヘキサン 2 mL の順で加え, 手で激しく混和させる (抽出操作)。室温, 2000 rpm, 5 分, 遠心すると脂肪酸メチルエステルはヘキサン層に移行するので, 上層 (ヘキサン層) と下層 (水層) に分離したら上層をガラスパスツールで分取する。このとき, 多少のヘキサンは残しても良いので, 水層を取らないよう注意する (水層には親水性物質があり, これらはGC解析時に妨害物質となるから)。ヘキサン層をスクリー栓付ガラスバイアルに移し, 窒素ガスを吹き付けてヘキサンを飛ばし, 脂肪酸メチルエステルを固化させる。GCに供する前に少量のヘキサンに溶かして用いる。脂肪酸メチルエステルを保存する場合は酸化を防ぐためにガラスバイアル内を窒素置換し, 栓をしっかり締めて暗所冷蔵で保存する。

II. GC解析

FID によるGC解析では定量に要する脂肪酸量は 10-500 ng である。GCへの試料注入は 1 μL なので, 注入する 1 μL 中に必要な脂肪酸が含まれるようにヘキサン量を調整する。本実験で用いる充填剤はシリコン系 SILAR-10C Chromosorb W で, 160-240°C (4°C/分) の昇温度条件で溶出する。炭素数 18 が主である大豆由来脂肪酸解析では 10 分, アラキドン酸, エイコサペンタエン酸, ドコサヘキサエン酸 (炭素数 20-22) などの多価不飽和脂肪酸を含む魚卵由来脂肪酸では 20 分で溶出が完了する。



脂肪酸量は検出された目的の脂肪酸ピークの面積を内部標準脂肪酸として用いたラウリン酸メチルピークに対する比で算出する。また, 試料中のトリアシルグリセロール含量 (モル含量) は得られた総脂肪酸含量を 3 で割ることで得られる (トリアシルグリセロール 1 分子当たり 3 分子の脂肪酸が結合しているから)。典型的なGCクロマトグラムを下記に添付した。

左図: 脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

・溶出時間と脂肪酸の対応は以下の通り。3.42 (分), ミリスチン酸; 5.333, パルミチン酸; 7.732, ステアリン酸; 8.383, オレイン酸; 9.43, リノール酸; 10.4, リノレン酸。Start 直後のピークは溶媒として用いたヘキサン

III. 考察

1) ラウリン酸メチルは検出されているか

ラウリン酸メチルは定量のための内部標準脂肪酸のみならず、抽出操作、サンプル取扱い操作をモニターするコントロール試料として使える。ラウリン酸メチルが期待通り、しかも妥当な量検出されることを確認する。

2) 補足資料として代表的試料中の脂肪酸存在比を記載した。GC解析結果がこれらの値と比べ、妥当なものであるか検討・考察する。

4.2 コレステロールの定量

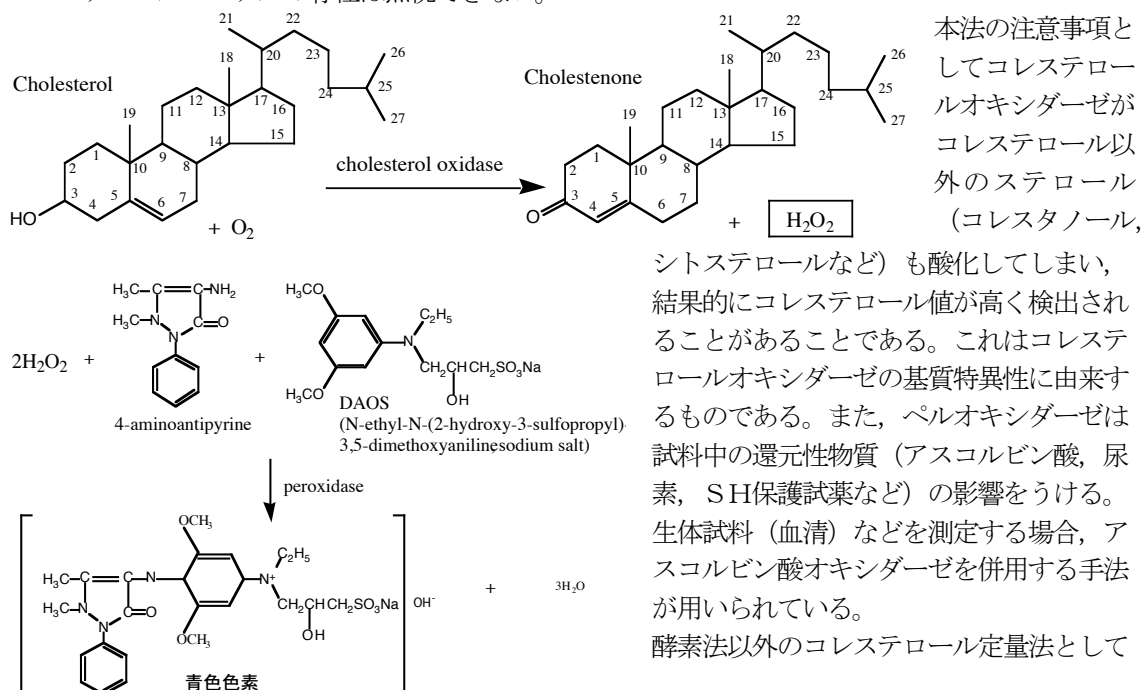
【目的】

コレステロールは生体にとってステロイドホルモン（性ホルモン、副腎皮質ホルモンなど）、ビタミンDや胆汁酸の前駆体、リポタンパク質・細胞膜の構成因子として重要な脂質であり、その血清濃度や生体内量は体内脂質代謝を反映する重要な指標である。本実験では鶏卵黄、魚卵から調製した脂質成分中のコレステロールを酵素法を用いて定量する。その操作を通じて、脂質分析における酵素法の基礎、原理、技術の取得を目的とする。

【概要と原理】

血液中のコレステロール値は重要な臨床項目であり、臨床現場において多数の酵素法によるキットが頻用されている。最終的な検出法にはバリエーションがあるが、酵素法の基本はコレステロールオキシダーゼによるコレステロール3位の酸化（コレステノンの生成）で生じた過酸化水素をペルオキシダーゼやカタラーゼで定量するというものである。ペルオキシダーゼなどによる過酸化水素定量法として1) ホモバリン酸の生成 2) *p*-ヒドロキシフェニル酢酸の生成 3) 4-アミノアンチピリンからキノン色素の生成がある。3) ではキノン色素は呈色測定で定量し、その感度はコレステロール量として1 nmol である。1)および2)では生成産物を蛍光定量する。その感度はキノン色素定量に比べ優れており50 pmol である。

コレステロールエステラーゼをコレステロールオキシダーゼと併用すれば、コレステロールだけでなく、コレステロールエステルとの合算量（総コレステロール値）を求めることができる。血漿リポタンパク質ではコレステロールエステルの比率が高いため（約75%はエステル型）、コレステロールエステルの存在は無視できない。



GC, GC-MS, HPLCを用いた機器分析がある。前二者はピーク面積による定量であり、後一者は紫外吸光による定量である。紫外吸光においては、ステロール分子により分子吸光係数が異なるので発色団、蛍光団を化学的に導入して定量する手法がある。

本実験ではコレステロールエステラーゼ-コレステロールオキシダーゼ併用法を用いて、鶏卵黄、魚卵中の総コレステロールを定量する。検出法として4-アミノアンチピリンから生成したキノン色素の比色定量法を用いる。その化学を前ページに示した。

【器具】

ピペットマン, 恒温槽, 分光光度計, プラスチックセル, 遠心機, 2mL サンプルチューブ

【試薬】

- I. 緩衝液: 0.05M MES 緩衝液 (pH6.1)
- II. 酵素: コレステロールエステラーゼ, コレステロールオキシダーゼ, ペルオキシダーゼ, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ
- III. 標準試料: 10 mg/mL コレステロール-エタノール溶液
- IV. 発色基質: 4-アミノアンチピリン, DAOS (N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline, sodium salt)
- V. 検体: 鶏卵黄, 魚卵

【操作】

- I. 標準試料の調製: 10 mg/mL コレステロール-エタノール溶液をエタノールで順次希釈して、5 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL エタノール溶液を調製する。希釈操作はピペットマンを用いて、2 mL サンプルチューブでおこなう。コレステロールを含まないエタノールをブランク検体とする。
- II. 検体標品の調製: 鶏卵黄、魚卵をつぶし、内容物をピペットマンで適量取る。これに0.9% KClを加え、2倍、5倍希釈液を調製する。卵黄希釈液は油滴などの内容物が容易に沈降するので、手で振るなどして内容物が一樣になるように注意しながら希釈すること。
- III. 酵素・発色溶液: 酵素・発色溶液は教官が提供する。この溶液中には、コレステロールエステラーゼ (1.6 unit/mL), コレステロールオキシダーゼ (0.31 unit/mL), ペルオキシダーゼ (5.2 unit/mL), アスコルビン酸オキシダーゼ (4.4 unit/mL) が括弧内の濃度になるよう0.05M MES 緩衝液 (pH6.1) に溶かされている (アスコルビン酸ペルオキシダーゼは本反応を阻害するアスコルビン酸を不活性化させるために加えている)。同時に、発色剤である 4-アミノアンチピリン, DAOS をそれぞれ0.95 mM, 0.2 mM 含んでいる。
- IV. 酵素反応: 標準試料, 検体標品, 酵素・発色溶液を下の表のように2mL サンプルチューブに混合し, 37°Cで5分間反応させる。
- V. 吸光度測定と検量線作成: 反応液全量をプラスチックセルに移し、分光光度計で600 nmの吸光度を測定する。得られた吸光度からブランク検体(NO.1 サンプル)吸光度を差し引いた値をそのサンプルの吸光度とする。サンプル NO.2-5 の吸光度をもとに表計算プログラム(マイクロソフトエクセルなど)をつかって、検量線を作成し、検体標品中のコレステロール値を求める。

NO	標準試料	検体標品	酵素・発色溶液
1	0mg/mL 10µL	-	1.5mL
2	1mg/mL 10µL	-	1.5mL
3	2mg/mL 10µL	-	1.5mL
4	5mg/mL 10µL	-	1.5mL
5	10mg/mL 10µL	-	1.5mL
6	-	鶏卵黄 x2 希釈液 10µL	1.5mL
7	-	鶏卵黄 x5 希釈液 10µL	1.5mL
8	-	魚卵 x2 希釈液 10µL	1.5mL
9	-	魚卵 x5 希釈液 10µL	1.5mL

ブランク検体(NO.1 サンプル)吸光度を差し引いた値をそのサンプルの吸光度とする。サンプル NO.2-5 の吸光度をもとに表計算プログラム(マイクロソフトエクセルなど)をつかって、検量線を作成し、検体標品中のコレステロール値を求める。

VI. 考察: 以下を検討・考察する。
1) 検量線に直線性はあるか?
標準試料は検量線を描くための

みならず、操作全般をモニターする有用なサンプルである。試薬の調製, 希釈操作, 反応操作が正しく行われていれば検量線は原点を通過する直線を描くはずである (理想的にはその相関

係数=1となるが、本実験では相関係数は算出しない。補足参照)。直線性が認められなければ希釈操作が精確でなかった可能性がある。また、直線性が全く認められない場合は試薬の劣化、調製ミス、操作ミスなどの根本的な要因が考えられる。

2) 各検体標品の吸光度と算出されたコレステロール値は希釈段に対応しているか?

これも操作の精確性を反映している。標準試料が適正に測定されているにも関わらず、検体標品が測定されていない場合は検体試料中に反応阻害因子が含まれている可能性がある。

3) 検体標品からコレステロールは検出されたか? その値は妥当なものか?

第2節補足資料として代表的な食品中のコレステロール値が記載されている。算出されたコレステロール値は資料中の値に比べ妥当であるか検討する。

補足資料

I. トリアシルグリセロール中の脂肪酸の定量

i. **GC-MS法**: GC-FID法(本実験)と基本的に同じであるが、検出器がFIDではなく質量分析器である点が異なっている。質量分析器ではGCから送り出された脂肪酸メチルエステルが電子衝撃によりイオン化し、そのイオンが電磁場を通過するのに要した距離(または時間)から分子量を測定し、分子種を同定する。GC-FID同様イオンピーク面積から定量可能である。分子種の同定と定量を同時に行う場合に使われる。

ii. **HPLC法**: 逆相HPLCにより脂肪酸の分離・定量が可能である。検出には脂肪酸の不飽和結合に基づく紫外吸光が用いられる。したがって不飽和結合を持たない脂肪酸は検出することはできない。この場合は化学修飾により発光団、蛍光団を導入することで解析可能となる。GCでは試料を高温に加熱する必要があるため、熱に弱い脂質の定量に使うことができる。

iii. **酵素法**: 血液検査キットとして数多く市販されており、臨床現場で頻用されている。二つの種類がある。いずれもアシルCoAシンターゼ-アシルCoAオキシダーゼを用いる点は共通だが、一つは両酵素により生成した過酸化水素を比色定量するものであり(ACS-ACO法)、もう一つは両酵素により生成した2'-trans エノイル化CoAをβ酸化酵素群でアセチルCoAまで酸化させ、生じたNADHを定量するものである(ASC-ACO-HDT法)。後者では0.5 nmolまで検出可能であり、前者(5-100 nmol)に比べ感度が優れている。GC法ではメチルエステル化が必要であったが、酵素法では化学修飾させる必要がなく、血清などの試料をそのまま解析に供することができるのも利点である。

なお、本実験ではトリアシルグリセロール中の脂肪酸定量を行なったが、トリアシルグリセロールそのものを定量する手法もある。化学的定量法(Fletcher-松宮法)と酵素法がある。前者はトリアシルグリセロールのけん化、生じたグリセロールのメタ過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化、その結果生成したホルムアルデヒドを定量するものである。後者の基本はリポタンパク質リパーゼによるトリアシルグリセロールのグリセロールと遊離脂肪酸への加水分解であり、生じたグリセロールを定量する。グリセロールを定量するのにいくつかの酵素の組み合わせがある。酵素法は血清など生体試料をそのまま解析することができるため臨床用血液検査キットとして数多くのメーカーから市販されている。

II. メチル化法

本実験で用いたナトリウムメソキサイド法以外に一般的なメチル化法としてメタノリシスがある。これは酸触媒下でのメチルエステル化法であり、トリアシルグリセロールのO-アシルエステル結合以外にN-アシルアミド結合、グリコシド結合なども開裂し、メチルエステル化する。従って、遊離脂肪酸、トリアシルグリセロールなどの他に糖脂質の脂肪酸分析にも使われる。

III. 脂肪酸含量の代表値

これまでに知られている脂肪酸含量のデータを記載した。代表的な脂肪酸のみを挙げている。各脂肪酸の存在比率である。また、コレステロール値については、可食部100gあたりの含量をmgで表

示した。他の食品、成分については食品成分表を参照のこと。

	パルミチン酸 16:0	ステアリン酸 18:0	オレイン酸 18:1	リノール酸 18:2	リノレン酸 18:3	アラキドン酸 20:4	EPA 20:5	DHA 20:6	その他	コレステロール (mg/100g 可食部)
卵黄	25.1	8.6	43.6	13.4	0.3	1.7	-	-	7.3	1400
すじこ (いくら)	11.3	4.1	20.6	1.1	0.9	1.4	16.3	18.4	27.3	510
全大豆	11.6	3.2	21.3	52.0	10.9	-	-	-	0.1	-
あん肝	14.8	3	18	1.3	0.7	0.7	6.6	10.4	44.5	560
鶏肝	22	17.8	21.8	13.5	0.2	6.6	2.1	10.1	5.9	370

EPA:エイコサペンタエン酸, DHA:ドコサヘキサエン酸

IV. コレステロール定量検量線の相関性について

4.2 操作 VI. において、検量線の相関係数について言及している。本実験でも相関係数を算出し、検量線の信頼性を統計的に検討することも可能である。しかし、本実験では相関係数を算出しない。データを計算式に流し込み、相関係数を算出することは技術的に可能であるが、本実験で用いているサンプル数 (n=4) では統計的に有意な処理が期待できないからである。少なくとも、二連 (同じ濃度の検体を2つ用意する) で行なったデータを使うなどの工夫が要る。