

動物性食品中のヘム鉄及び非ヘム鉄の分別定量法

小島一良*・安井明美**

Selective Determination of Heme and Nonheme Iron in Animal Foods by Column Separation and Atomic Absorption Spectrophotometry

Kazuyoshi KOJIMA* and Akemi YASUI**

* Tokyo Center for Quality Control and Consumer Service, Ministry of
Agriculture, Forestry and Fisheries, Konan
4-4-7, Minato-ku, Tokyo 108

** National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries, Kannondai 2-1-2, Tsukuba-shi, Ibaraki 305

A new method for selective determination of heme and nonheme iron has been developed. Heme iron in animal foods was extracted with 80% acetone (acidified with hydrochloric acid below pH 1.0). Nonheme iron in animal foods was extracted with 1% hydrochloric acid at 80°C. After adjusting acetone concentration of extracts to 40%, solutions were passed through Sep-Pak C18 cartridge column. Heme was adsorbed on the column, while nonheme iron was passed through the column. Heme was eluted out from the column with acidified 80% acetone. Eluates containing heme iron or filtrates containing nonheme iron were evaporated, then wet digested with nitric acid and perchloric acid. Residues after wet digestion were solubilized in 1% hydrochloric acid and iron in solutions was determined by AAS. This method showed that the sum of heme and nonheme iron content of various animal foods was the same to as total iron content determined by the wet digestion-AAS method. The ratio of heme iron to total in processed animal foods were almost same rate in the raw material meat.

(Received Apr. 22, 1992)

食品中の金属元素は様々な化学形態で存在しており、生体に対する影響力はそれぞれ大きく異なっていることが多い。鉄は摂取量が不足しがちな金属元素の一つであり、ヘモグロビンやミオグロビンに由来するヘム鉄とフェリチン等に由来する非ヘム鉄とに大別できる。ヘム鉄は非ヘム鉄の約5倍吸収率がよいと言われているが^{1)~4)}、非ヘム鉄においても共存物質によって生体への吸収率が極端に変わることが報告されている²⁾⁵⁾。したがって鉄の吸収量を検討するためには全鉄量はもちろん、形態別の分別定量が極めて重要となる。分別定量の方法として

は、湿式分解後定量した全鉄量から、トリクロル酢酸で抽出した非ヘム鉄量を差し引いてヘム鉄量を求める方法⁶⁾⁷⁾、有機溶媒でヘムを抽出し、吸光度からヘム量を求める方法⁸⁾、光の反射率からヘム量を測定する方法⁹⁾、ゲルクロマトによる方法¹⁰⁾等がある。しかしながら、ある形態の鉄量を全鉄量から差し引いて別の形態の鉄量を算出した方法が多いため、正確に分別定量が行われたかどうか不明であった。

今回は希塩酸を用いた加温抽出による非ヘム鉄の定量と有機溶媒抽出によるヘム鉄の定量とを行い、湿式分解

* 農林水産省東京農林水産消費技術センター(〒108 東京都港区港南4-4-7)

** 農林水産省食品総合研究所(〒305 茨城県つくば市観音台2-1-2)

で得た全鉄量の値と比較したところ、良好な結果を得た。また本法を用いて市販の各種食肉及び加工品の鉄の分別定量を行ったので報告する。

実験方法

1. 装置及び器具

原子吸光分光光度計：日本ジャーレルアッシュ社製 AA-781 型を用いた。バーナーは水冷式 10 cm スリットバーナー (SA-62) を用いた。アセチレンと空気の流量については、1.5 l/min (アセチレン)-8.5 l/min (空気) とした。光源は浜松テレビ社製鉄用ホローカソードランプを 248.3 nm の波長で用いた。

分光光度計：島津製 UV-210 A

2. 試薬及び標準溶液

塩酸：20% 塩酸 (精密分析用) を用い、必要に応じて水で希釈した。

アセトン：試薬特級を用いた。

硝酸：原子吸光分析用試薬を用いた。

過塩素酸：原子吸光分析用試薬を用いた。

ヘモグロビン：和光純薬製 (牛血液製) を用いた。

フェリチン：和光純薬製を用いた。

前処理用カラム：Waters 社製 Sep-Pak C18 をあらかじめ 1 N 塩酸 5 ml で洗浄して用いた。

限外濾過膜：日本ミリポア社製 モルカット II (分画分子量 10 000) の限外濾過用ユニットを用いた。

3. 試料

市販の食肉及び食肉加工品を購入して実験に共した。

4. 試料溶液の調製

(1) 試料の前処理

従来の報告では³⁾、試料肉の均一化及び 80% アセトンによるヘムの抽出はホモジナイザーを用いて 2 回行っている。しかしながらホモジナイザーからの鉄の溶出が見られたので、セラミックの包丁による均一化を行った。また抽出は 1 回目の抽出で 93~95% の抽出がなされるとの報告があることから³⁾、1 回にとどめた。

(2) 全鉄の定量

セラミック製の包丁で細切りした試料をよく混合し、約 2 g をコンカルビーカーに取った。硝酸約 10 ml を加え家庭用ホットプレート上で加熱し、初期の激しい反応がおさまったら過塩素酸約 2 ml を加えて更に加熱分解を行った。分解終了後 1% 塩酸で定容して原子吸光分析用試料溶液とした。

(3) ヘム鉄の定量

ヘムの抽出方法は後述のヘム鉄の抽出方法の検討結果

に基づき、Fig. 1 のように定めた。この抽出液を家庭用ホットプレート上でアセトンを蒸発させ、硝酸約 3 ml と過塩素酸約 0.5 ml とを用いて湿式分解を行い、1% 塩酸で 25 ml に定容して原子吸光分析用試料溶液とした。

(4) 非ヘム鉄の定量

非ヘム鉄の抽出方法は後述の非ヘム鉄の抽出方法の検討結果に基づき、Fig. 2 のように定めた。濾過液全量をホットプレート上で加熱してアセトンを蒸発させた後、硝酸約 3 ml と過塩素酸約 0.5 ml で湿式分解を行った後 1% 塩酸で定容し、原子吸光分析用試料溶液とした。

5. 原子吸光法による測定

鉄の定量は鉄の標準溶液により作成した検量線を用いてピークの高さから求めた。

実験結果及び考察

1. ヘム鉄の抽出方法の検討

(1) Sep-Pak C18 によるクリーンアップ

動物の組織におけるヘム鉄はヘモグロビン、ミオグロビン由来のものがほとんどである。文献によればこれらのヘムは、塩酸で pH を 1 以下に調整 (アセトン：水、75~80 : 25~20 V/V%) した、アセトンで効率良く抽出されるとされている^{3,8)}。酸性条件下では非ヘム鉄の抽出もある程度行われていると考えられるが、文献ではヘム量を吸光度から求めているため、試料溶液中の非ヘ

Cut sample and mix well with ceramic knife



Take 10 g of sample in to 100 ml volumetric flask



Add 10 ml H₂O and shake



Add 1 ml of 20% HCl and add Acetone to make 100 ml



Leave it at 0°C for 1h.



Take 10 ml of Supernatant and add 10 ml of H₂O, then pass through Sep-Pak C18



Wash Sep-Pak C18 with 5 ml of 40% Acetone (pH<1) and then 5 ml of 1% HCl



Extract heme with 5% of 80% Acetone (pH<1)

Fig. 1 Determination method of heme iron in animal foods

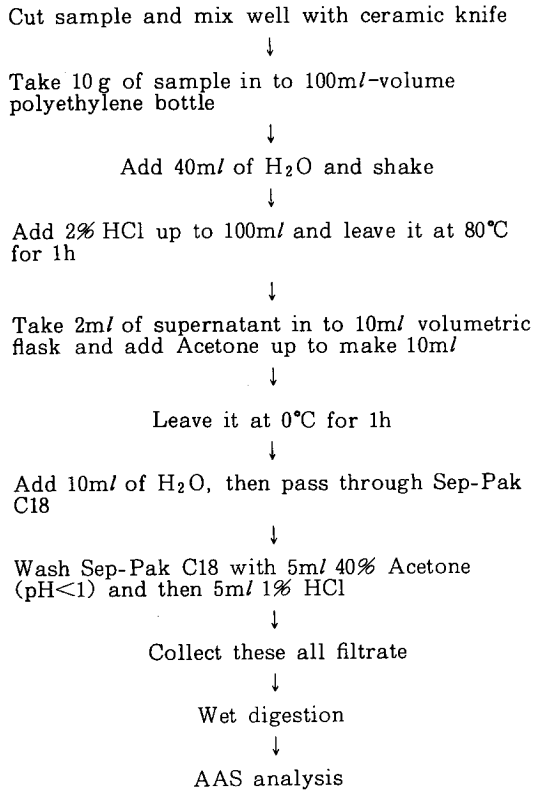


Fig. 2 Determination method of nonheme iron in animal foods

ム鉄量については不明である。今回、ヘムの抽出を行った試料液を Sep-Pak C18 処理することでヘムのクリーンアップを試みた。文献では、塩酸濃度 0.7% の 75～80% アセトンによる抽出液が最も吸光度が安定していたとされているので³⁾⁸⁾、塩酸を約 0.7% 含有するアセトンを調製し（以下塩酸性アセトンと記す）、ヘムの抽出に当たっては、アセトン濃度が試料中の水分と合わせておよそ 80% となるように調製して用いた。

まず 0.2 g のヘモグロビンを 50 ml 容量のメスフラスコに量り取り、水で定容した。この 2 ml をとり、塩酸性アセトンを加え 80% 溶液とした後、0°C で 1 時間放置してヘムの抽出を行った。次に Sep-Pak C18 にヘムを吸着させるための条件検討を行った。上記のヘモグロビンの 80% アセトン溶液 1 ml に水を 0～4 ml 加えて Sep-Pak C18 を通してヘムを Sep-Pak C18 に吸着させた。次にアセトン濃度が 80%、40%、33%、25%、20% の塩酸性アセトン 5 ml で Sep-Pak C

18 を洗ってヘムを溶出させて濾過液を集め、10 ml とした。ヘムはポルフィリン環に起因するソーレ帯と呼ばれる極大吸収波長域を 400 nm 付近に持ち、この吸収帯は pH が低くなるにつれて短波長側に移動して来ることが知られている³⁾¹¹⁾。得られた試料液の吸光度を測定したところ、80% アセトン溶液の通過液では 390 nm 付近に若干の吸収がみられ、Sep-Pak C18 にヘムが全量は吸着していなかったが、アセトン濃度が 40% 以下の試料では、ヘムに起因する吸収は見られなくなり、ヘムはすべて Sep-Pak に吸着することがわかった。そこでヘムを抽出した 80% アセトン溶液及び同量の水を Sep-Pak C18 に通し、その後 40% の塩酸性アセトン 5 ml と 1% HCl 5 ml の順に Sep-Pak C18 を洗うこととした。なお Sep-Pak C18 に吸着したヘムを溶出させるためには 80% の塩酸性アセトン 5 ml を用いた。また、Sep-Pak C18 及びシリジから無機鉄の溶出が見られたため、これらの器具はあらかじめ 1 N HCl で洗浄したものを用いた。

(2) ヘモグロビン標準品の純度検定及びヘム鉄の非ヘム鉄化の有無の確認

実験に用いるヘモグロビン標準品の純度を確認するために、ヘモグロビン標準液のゲルクロマトグラフィーを行って鉄量の測定を行ったところ、Fig. 3 の様に約 15% の鉄が void の位置に出現した。次にこの標準液中のヘムを Fig. 1 の方法にしたがって抽出し、定量を行ったところ、総鉄量の 85.3% がヘム鉄であり、14.7% が非ヘム鉄であった。ゲルクロマトグラフィーで得られたヘモグロビン以外の分画の鉄量と Sep-Pak C18 を用いた分別定量の結果得られた非ヘム鉄の比率は一致した。また、分別定量で得られたヘム鉄と非ヘム鉄との合計値は湿式分解によって得られた総鉄量と一致した。

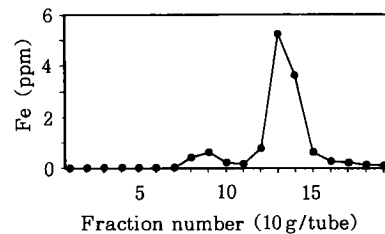


Fig. 3 Chromatogram of standard Hemoglobin solution

TOYOPEARL HW-55 ϕ 2.6 cm $\times$ 37 cm
0.4 M Boric acid-Phosphoric acid-Acetic acid buffer: pH 4.5.

次に Sep-Pak C 18 にヘムを吸着させた後 1% 塩酸で Sep-Pak C 18 を洗い、洗液中の鉄を測定したが、鉄は検出されなかった。以上のことから、実験に用いたヘモグロビン中のヘム鉄は総鉄量の 85.3% として扱った。また、ポルフィリン環中の鉄は塩酸性アセトンを用いた抽出方法では非ヘム鉄化せず、また 1% 塩酸では非ヘム鉄化しないことが確認された。

2. 非ヘム鉄の抽出方法の検討

(1) Sep-Pak C 18 によるクリーンアップ

動物組織では、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンを最も多くの非ヘム鉄が含有されている。フェリチンを形成するアポフェリチンと鉄との結合方式の詳細は不明であるが、 $[(\text{Fe}^{3+}\cdot\text{O}\cdot\text{OH})_8\cdot(\text{Fe}^{3+}\cdot\text{O}\cdot\text{PO}_3\text{H}_2)]$ の形で強く結び付いていると考えられている¹²⁾。フェリチンから鉄を遊離してアポフェリチンを精製するためには、亜二チオン酸ナトリウムによる方法があるが¹²⁾、今回は鉄の抽出のみを目的とし、塩酸抽出法による簡便な方法について検討した。

まず pH の変化とフェリチンからの鉄の溶出との関係を見るために、フェリチン原液 0.10 g を、水及び pH 2~6 の 0.04 M のホウ酸・リン酸・酢酸緩衝液で 25 ml として試験溶液とした。またフェリチン 0.10 g を 0.1 M の NaCl で 20 ml としてフェリチン標準原液とし、この 1 ml を 0.1 M の NaCl で 25 ml としてフェリチン標準液とした。

フェリチンの分子量は 400 000 以上と非常に大きいため、遊離した鉄は分画分子量 10 000 の限外濾過用ユニットで濾過してこの分画の鉄を定量した。その結果、Fig. 4 に示したように pH 2 及び 3 で若干の鉄の溶出が見られたのみであった。このことはフェリチン自体が

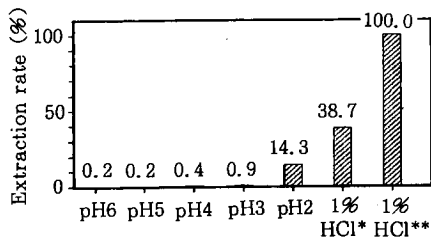


Fig. 4 Iron (molecular weight: not more than 10 000) extraction rate from Ferritin

* At room temperature

** At 80°C

pH 4~10 で安定であるとしている従来の記載と一致した¹²⁾。

次にフェリチン標準原液 1 ml を 1% 及び 3% 塩酸で 25 ml とし、室温及び 80°C で 1 時間の抽出を行った。Fig. 4 に示したように、室温抽出では 1% 塩酸で 39% の鉄が分子量 10 000 以下となったのに対して、80°C の加温抽出では 100% の抽出ができた。そこで実際の試料から非ヘム鉄を抽出する条件は 1% 塩酸、80°C 1 時間とした。ヘムタンパクは水溶性であるため、一部分が塩酸溶液中に移行した。そこで Fig. 1 の操作を行って抽出液中のヘムを分離し除去した。

(2) フェリチン標準品の純度検定

フェリチン標準液に、塩酸性アセトンを加えて 0°C、1 時間の抽出を行った。その結果アセトン濃度が 80% 以上で大部分のフェリチンが沈殿した。上澄み液にはソーレ帯は見られず、ヘムの存在は認められなかった。ただし上澄み液も、フェリチン標準液と同様に 450 nm 以下の波長で急激に増大する吸収域をもつためアセトン抽出したヘムの定量を吸光度のみで行う従来の方法では、場合によってはヘムの値が高く求められる危険性が考えられた。

3. フェリチン及びヘモグロビンの混合溶液からの分別定量

(1) 抽出時間の検討

Sep-Pak C 18 へのヘムの吸着と溶出の方法を用いてフェリチン標準液を処理したところ大部分のフェリチンは Sep-Pak C 18 に吸着したままであり、およそ 1% 程度の鉄の溶出が見られたに過ぎなかったが、調製直後に Sep-Pak C 18 による処理を行うと、80% の塩酸性アセトンで溶出する際に、約 30% の鉄が Sep-Pak C 18 に保持されずに溶出した。文献では³⁾、ヘムの抽出時間を 30 分間としているが、フェリチンの凝固を完全なものとするために、抽出時間は 1 時間とした。

両者の混合溶液からの分別定量の結果は、Table 1 に示したように良好であった。

(2) 添加回収試験

ヘム鉄の多い試料として牛肉を、また非ヘム鉄の多い試料として豚レバーを用いて添加回収試験を行った。ヘム鉄としてはヘモグロビンを、非ヘム鉄としてはフェリチン及び原子吸光分析用の鉄標準溶液を用いた。非ヘム鉄の回収率の計算には、ヘモグロビン標準品に含まれる不純物由来の非ヘム鉄を含めた数値を用いた。Table 1 に示したように、結果は良好であった。

Table 1 Results of recovery test

	Nonheme iron						Heme iron		
	AAS Standard sol. (FeCl ₃)			Ferritin			Hemoglobin		
	Added*	Found*	Recovery**	Added*	Found*	Recovery**	Added*	Found*	Recovery**
Beef Meat	—	—	—	—	4.8	—	—	13.5	—
	2.7	2.4	88.9	—	—	—	3.8	4.1	107.9
	5.2	4.9	94.2	—	—	—	1.8	2.1	111.1
Pork Liver	—	—	—	—	182.7	—	—	31.4	—
	129.0	129.2	99.8	267.1	291.5	109.0	23.4	23.1	98.7
	129.7	129.2	99.61	267.1	271.5	101.6	44.2	37.0	83.7

* $\mu\text{g Fe/g}$

** %

Table 2 Heme iron and nonheme iron in some fresh meat (on wet basis)

	Heme iron (a) (mg/100 g)	Nonheme iron (b) (mg/100 g)	(a) + (b) (c) (mg/100 g)	(a) / (c) $\times$ 100 (d) (%)	Total Fe* (mg/100 g)
Beef I	0.79	0.38	1.17	67.35	1.00
Beef II	1.24	0.28	1.52	81.82	1.63
Beef III	2.35	0.98	3.33	70.67	3.31
Pork I	0.31	0.16	0.47	65.32	0.41
Pork II	0.50	0.40	0.90	55.65	0.97
Pork III	0.73	0.19	0.92	78.89	1.01
Pork liver I	2.41	13.96	16.37	14.72	16.03
Pork liver II	3.96	17.13	21.09	18.78	21.18
Chicken leg I	0.63	0.62	1.25	50.16	1.35
Chicken leg II	0.33	0.46	0.79	41.96	0.80
Chicken sasami	0.13	0.24	0.37	34.76	0.40
Tuna red meat	0.29	0.14	0.43	66.06	0.47
Flounder meat	0.06	0.18	0.24	24.90	0.20

* Wet digestion

4. 獣鳥魚肉試料を用いた鉄の形態別の分別定量

(1) 食肉の鉄の分別定量

前述の方法にしたがって市販試料の鉄の分別定量を行い、結果を Table 2 に示した。食肉中の鉄量は部位や年齢、餌料等で著しく異なり、牛肉で 1.2~3 mg/100 g、豚肉で 0.8~1.8 mg/100 g、豚レバーで 13 mg/100 g と報告され⁸⁾、ヘム鉄量では牛肉で 0.3~0.8 mg/100 g、豚肉で 0.7~2.4 mg/100 g という文献値がある¹³⁾。魚類では多くの種類についてミオグロビン量が報告され、それからヘム鉄量を計算すると赤身魚のキハダマグロで

0.11~0.5 mg/100 g、白身魚のマダイで 0.02 mg/100 g 程度となり、種類によってかなりの差があることが知られている^{14)~16)}。しかしながら、いずれも総鉄量を測定した試料とヘム鉄量を測定した試料が同一のものではないため、総鉄量に対するヘム鉄量の比率は不明である。今回の分析結果は Table 2 に示したように、これらの文献値とほぼ同様な値であった。

総鉄量に対するヘム鉄量の比率については、獣肉、肝臓、鳥肉、魚肉のいずれも 40% 程度であるとしている例や²⁾、牛肉で 40.7%、七面鳥で 39.3%、マグロで 33.3

Table 3 Heme iron and nonheme iron in some processed food (on wet basis)

	Heme iron (a) (mg/100 g)	Nonheme iron (b) (mg/100 g)	(a) + (b) (c) (mg/100 g)	(a)/(c) × 100 (d) (%)	Total Fe* (mg/100 g)
Roast ham I	0.44	0.33	0.77	57.14	0.79
Roast ham II	0.41	0.48	0.89	46.07	0.71
Roast ham III	0.40	0.48	0.88	45.45	0.89
Vienna sausage	0.64	0.66	1.30	49.23	1.20
Bologna sausage	0.52	0.84	1.36	38.24	1.54
Corned beef I	2.41	1.34	3.75	64.27	4.07
Corned beef II	1.60	1.55	3.15	50.79	2.97
Beef yamatoni	0.33	1.25	1.58	20.89	3.13

* Wet digestion

%の例がある¹⁷⁾が報告例は少ない。今回の分析では、筋肉部分は牛肉で67.4~81.8%, 豚肉で55.7~78.9%, 鶏モモ肉で34.8~50.2%, マグロで66.1%と赤身肉がいずれも高い比率を示し、逆に白身の肉は鶏ササ身肉で34.8%, カレイ肉で24.9%と低い比率であった。豚レバーは14.7及び18.8%と低い比率であった。これは、特に赤身の筋肉はミオグロビンの含有率が高く、残留する血液の存在も考えられることから、ヘム鉄が多いのに対し、レバーでは貯蔵鉄が高い比率を占めるためと考えられた。

また、分別定量で得られたヘム鉄量と非ヘム鉄量との合計値は湿式分解による全鉄量と一致した。このことから、本報による鉄の形態別の分別定量方法は両形態の鉄を損失なく定量したものと考えられた。

(2) 食肉加工品の鉄の分別定量

Table 3 に市販の食肉加工品の鉄の分別定量結果を示した。総鉄量に対するヘム鉄量の比率は、豚肉を主原料とし、また製造時に比較的低温で加熱される、ロースハムやウインナーソーセージ、ボロニアンソーセージでは、いずれも38.1~57.2%であり、豚肉における比率とほぼ等しい結果が得られた。牛肉を主原料とした製品では、コーンビーフが38.1%及び64.4%, 大和点は21.1%であった。後者の試料では、両形態の鉄量の合計値は湿式分解で得られた値の約50%と低く、ヘムの抽出率の低さが示唆された。その原因が製造時の加熱温度によるものか、使用されている調味液その他によるものかは不明である。これ以外の試料では、ヘム鉄と非ヘム鉄との合計値は湿式分解による全鉄の値と良く一致した。

以上のことから一部の加工食品を除き、多くの動物性

食品につき、鉄の形態別の正確な分別定量が可能であった。

要 約

1. 動物性食品中のヘム鉄は、塩酸酸性の80%アセトン抽出で、また、非ヘム鉄は1%塩酸80℃加温抽出の後、それぞれSep-Pak C18によるクリーンアップを併用し、原子吸光分析法で測定する分別定量法を確立した。

2. ヘム鉄の総鉄量に対する比率は、各種食肉の筋肉部分では、鶏肉やカレイで50%以下と低かったが、豚肉や牛肉は55~82%と高かった。また豚レバーでは15~19%と低い比率であった。本法で求めた形態別の鉄量の合計値は、湿式分解による全鉄量と一致し、損失なく分別定量できることが確認された。

3. 食肉加工品では一部の製品を除き、形態別の分別定量ができ、総鉄量に対するヘム鉄の比率は原料肉とほぼ同じ値であった。

本研究は日本食品工業学会第38回大会(平成3年3月, 広島)において発表した。

文 献

- 1) BJORN, E. HALLBERG, R.L. ISAKSSON, B. and ARVIDSSON, B.: *J. Clin. Invest.*, **53**, 247 (1974).
- 2) COOK J.D.: *Americ. J. Clin. Nutr.*, **29**, 85 (1976).
- 3) 岡山高秀・永田致治: 日畜会報, **50**, 15 (1979).
- 4) 田村幸永・松村伸康・清水俊雄: 日本栄養・食糧学会誌, **41**, 490 (1988).

-
- 5) COOK, J.D. MINNICH, V. C.V. MOORE *et al.* : *Am. J. Clin. Nutr.*, **26**, 861 (1973).
 - 6) SCHRICKER B.R. and MILLER, D.D. : *J. Food Sci.*, **48**, 1340 (1983).
 - 7) IGENE, J.O., KING, J.A. PEARSON, A.M. and GRAY J, I. : *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 838 (1979).
 - 8) HORNSEY H.C. : *J. Sci. Food. Agric.*, **10**, 114 (1959).
 - 9) 泉本勝利：農化, **50**, 55 (1976).
 - 10) LAYRISSE, C.M.M. : *Am. J. Clin. Nutr.*, **24**, 531 (1971).
 - 11) TARLADGIS, B.G. : *J. Sci. Food. Agric.*, **13**, 481 (1962).
 - 12) 化学大辞典（共立出版，東京），**7**, p. 741 (1961).
 - 13) 山内文男：食品タンパク質の科学，食品資材研究会編 p. 17 (1984).
 - 14) 松浦文夫・橋本周久：日水誌, **20**, 308 (1954).
 - 15) 松浦文夫・橋本周久：日水誌, **24**, 809 (1959).
 - 16) 日本水産学会編：“白身の魚と赤身の魚”，p. 28
 - 17) MONSEN, E.R. HALLBERG L. *et al.* : *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 134 (1978).
- (平成4年4月22日受理)
-