[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
[衛生 化学]
39 (2) 114-120 (1993)

食品中のヘム鉄及び非ヘム鉄の簡易分別分析法

大島晴美, 山田貞二, 斎藤 勲, 早川順子

愛知県衛生研究所

A Simple and Rapid Method for Determination of Heme and Non-heme Irons in Food

HARUMI OSHIMA, SADAJI YAMADA, ISAO SAITO and JUNKO HAYAKAWA

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagare 7-6, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya
462, Japan

(Received September 3, 1992)

A speciation of heme and non-heme irons in food was carried out with atomic absorption spectrophotometric detection. Both heme and non-heme iron were extracted from an iron-containing protein with methyl isobutyl ketone (MIBK) under acidic conditions. A non-heme iron in the MIBK layer was transferred into the aqueous layer by washing the MIBK layer with water. Irons in each layer was determined by polarized Zeeman atomic absorption spectrometry using the discrete nebulization technique. The calibration curves were linear between 0.1 and 6.0 $\mu\text{g Fe/ml}$. Recoveries of heme and non-heme irons from confectionaries fortified at the level of 40–50 $\mu\text{g Fe/g}$ were more than 84%. Amounts of heme iron in commercially available foods determined by this method were in good agreement with the indicated values of iron. This method was recommended for the routine analysis of iron in hemoprotein and non-heme protein because of its simplicity and accuracy.

Keywords — heme iron ; non-heme iron ; iron determination ; polarized Zeeman AAS ; discrete nebulization technique ; MIBK extraction

はじめに

食品中の鉄化合物は大別してヘム鉄と非ヘム鉄に二分される。主なヘム鉄として動物性食品由来のヘモグロビン及びミオグロビン等があり、これらはヘムと呼ばれるプロトポルフィリンIXの鉄錯体とタンパク質から構成される。また、非ヘム鉄としては、鉄-硫黄タンパク質のフェレドキシン、鉄貯蔵タンパク質のフェリチンやヘモシデリン等及び有機酸類との錯化合物等がある。¹⁾これらの鉄化合物では鉄の利用率(吸収率)が異なることが知られており、ヘム鉄は20–40%吸収されるのに対して、非ヘム鉄は10%以下である。²⁾したがって、食事に含まれるヘム鉄は非ヘム鉄に比べて少量であるが、重要な役割がある³⁾とされている。

鉄は必須微量元素であり、鉄欠乏は貧血の主な原因として知られている。食生活が豊かになり鉄利用

率の高い食事となってきたわが国では、貧血性疾患はその動向調査によれば減少傾向にあるが、実際には相変わらず貧血が若年層特に女性に多く見られる。⁴⁾このような実態を反映して、最近ヘモグロビンを酵素分解し脱臭精製して鉄含有量を高めた加工ヘモグロビン⁵⁾添加食品が市販されている。

一方、鉄の経口摂取による中毒例は、医療薬としての鉄剤(無機鉄塩類)の誤飲による急性中毒のほかに、稀ではあるが可溶性鉄含有食品の過剰摂取又は長期の鉄剤服用による慢性中毒等がある。²⁾したがって、鉄強化食品の総鉄分とともに化学形態の把握が食品の安全性を考える上で必要である。

従来の食品中の鉄の分析法では、試料を酸分解又は希釈などの前処理後、原子吸光法、⁶⁾誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析法⁷⁾又はキレート化して比色法⁸⁾で測定するため、総鉄分の測定はできるが、化学形態の異なる鉄の測定はできない。

最近、ヘモグロビンのような高分子量の物質の分析法として、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC),⁹⁾ イオン交換クロマトグラフィー,¹⁰⁾ GPC-ICP-質量分析法¹¹⁾ 等によりタンパク質として分析する方法が報告されているが、鉄の分析を目的とした場合必ずしも簡便とはいえない。また、ヘム鉄やヘムタンパク質の生理機能の解明に繁用されている電子スピン共鳴法(ESR)による分析¹²⁾は、高価な機器を必要とするために日常分析には適当ではない。

今回、食品中のヘム鉄と非ヘム鉄を簡便に分別分析するために、溶媒抽出による前処理を施した後、直接ディスクリートネブライゼーション法-原子吸光法¹³⁾に付す迅速な鉄の分別測定法及び吸光スペクトルによるヘム鉄の確認法について検討を行った。さらに本法を市販のヘム鉄添加食品に応用したところ、その有用性を確認したので報告する。

実験方法

1. 装置及び測定条件 原子吸光光度計——日立製作所製偏光ゼーマン原子吸光分光光度計 Z-6000 型(データ処理装置付き), 光源に日立製作所製 Fe ホローカソードランプを使用し, 測定波長 248.3 nm, ランプ電流 15 mA, スリット幅 0.2 nm, 空気 1.60 kg/cm², アセチレン 0.30 kg/cm², バーナー高さ 7.5 mm, 注入量 200 µl の条件で行った。

分光光度計——日本分光工業, Ubest-50.

遠心分離器——久保田商事, KS-8000.

質量分析計——JEOL, JMS-AX 505 W.

酸分解用フラスコ——既報¹⁴⁾と同じものを用いた。

2. 試薬及び標準液 塩酸(35%), 硝酸(61%), 過塩素酸(60%), 硫酸(97%): 有害金属測定用(和光純薬), アンモニア水(25%): 有害金属測定用(関東化学), メチルイソブチルケトン(MIBK): 原子吸光分析用(和光純薬), ヘモグロビン: 試薬特級, 牛血液(和光純薬), フェリチン: 馬脾臓(UNITED STATES BIOCHEMICAL CORP. CLEVELAND, OHIO 44128), 水: 純水製造装置(Yamato, Auto Still WAG-24)を用いて製した脱イオン蒸留水。

1) ヘム鉄標準溶液——ヘミン(C₃₄H₃₂ClFeN₄O₆, 分子量 651.97, 理論鉄含有量 8.57%, 和光純薬)を 116.7 mg 精秤し 5%アンモニア水少量に溶解したのち, 水で 100 ml とした。鉄として 100.0 µg/g. 用時調製。

2) 非ヘム鉄標準溶液——原子吸光分析用鉄標準液(鉄として 1000 µg/ml, 塩化第二鉄の 0.1 N 塩酸溶液, 和光純薬)を 1%塩酸で希釈して用いた。

その他の試薬類は, 試薬特級を用いた。

3. 試料 市販のクッキー, ブルーンエキス及びヘム鉄添加食品 6 件を用いた。

4. 分析法 試料を均一に粉碎し, 脂肪の多い食品の場合はジエチルエーテルを用いて脱脂, 風乾した。均一化しにくい試料の場合は, 1%塩酸に溶解し均一溶液としたのち, 以下の操作を行った。

Chart 1. Analytical Procedure for Heme and Non-heme Irons in Food

1) 試験溶液の調製——試料 1.0–5.0 g (鉄として 60 μg 以下) を 50 ml 容遠心管に秤り取り, 固形試料の場合は 5 % アンモニア水 1 ml を加え潤した。MIBK 10 ml, 濃塩酸 (35%) 5 ml を加え, 超音波水浴中で 10 分間放置した。放置後水層が全量 10 ml となるように水を加え, 3000 回転で 5 分間遠心分離した。MIBK 層の 4.0 ml を 10 ml 容遠心管にとり水 4.0 ml を加え 1 分間振とうした。3000 回転で 1 分間遠心分離し MIBK 層をへム鉄分析用, 水層を非へム鉄分析用試験溶液とした。

2) 定量——へム鉄標準溶液と非へム鉄標準溶液 (鉄として 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 各々 1.0 ml を 50 ml 容遠心管にとり, 4. 1) に従って操作し MIBK 層をへム鉄検量線用, 水層を非へム鉄検量線用標準溶液とした。両分析用試験溶液及び検量線用標準溶液の各 MIBK 層及び水層の 200 μl をディスクリットネブライゼーション法により原子吸光光度計に注入し, ピーク高さから検量線を作成し定量した。

以上の分析法を Chart 1 に示した。

3) へム鉄の確認——MIBK 層の吸光スペクトルを測定し, へム鉄標準溶液のそれと比較した。

5. 従来法による総鉄分の分析^{6a)} 既報¹⁴⁾ に準じて酸分解後, 1 % 塩酸を加えて全量 10 ml とし, 原子吸光法により総鉄分を測定した。

6. 第一鉄 (Fe (II)) 及び第二鉄 (Fe (III)) の定性 従来法のオルトフェナントロリンによる鉄の定量法¹⁵⁾ のスケールを 20 分の 1 にして, 還元剤の添加の有無により両者を判別した。4. 1) で得た水層の適量を試験管にとり, オルトフェナントロリン溶液 0.25 ml, 酢酸緩衝液 (pH 4.2) 1 ml を加えて水で 5 ml とした。直ちに呈色すれば Fe (II), 10% 塩酸ヒドロキシルアミン溶液 0.05 ml を加えた後呈色すれば Fe (III) と判定した。

結果及び考察

1. 標準品の選択

へム鉄及び非へム鉄に関連した化合物の性質及び鉄含有率¹⁾を Table I に示した。

へム鉄の標準品としてへムを分析対象とした。へム自身は不安定な化合物であり市販されていないが, へムの塩酸塩であるへミンは比較的安定な化合物であり市販されている。へミンの鉄含有率は実測値が 8.60% で理論値 8.57% とほぼ一致した。そこで, へミンからへムを定量的に調製して標準品とした。

へミンは水や弱酸には不溶であるがアルカリ条件下では溶解して暗緑色のへマチン溶液となる。この状態では MIBK にほとんど抽出されなかったが, 酸性にすると暗赤色となり MIBK に抽出された。酢酸と塩酸の比較では塩酸のほうが MIBK 層の赤色が鮮やかで 24 時間以内は安定であった。酢酸の場合は 24 時間後には退色したので, 塩酸を用いた。この MIBK 層を FAB-MASS により分析したところ, 617 にプロトン加分子イオンピークを認め, これはへムと一致した。以上の結果から, へムはへミンに少量のアンモニアを加えてへマチン水溶液とした後, 塩酸で強酸性とし, MIBK 抽出することにより調製した。

非へム鉄タンパク質は多種多様であり, 一般に分子量が大きく鉄含有量が一定ではない等から標準品には適さない。しかし, その鉄に着目すると II 価又は III 価の鉄がタンパク質や有機酸類とキレート形成しており, 鉄を遊離しやすい。¹⁶⁾ さらに無機鉄のなかでは第二鉄塩が安定であることから, 塩化第二鉄を標準品として用いた。

2. 原子吸光法による鉄の測定条件

簡易かつ迅速な分析法とするために酸分解を加えず抽出溶媒層について直接測定した。注入量は既

TABLE I. Properties of Iron-Containing Substances

Substance	M.W.	Heme content/mol	Fe, %
Hemoglobin (Hb)	64 500	4	0.3
Processed Hb	4 300–5 585	1	1.0–1.3
Hemin	651.97	1	8.57
Hematin	633.49	1	8.82
Heme	616.48	1	9.06
Ferritin	600 000–700 000	—	20–36
Ferredoxin	6 000–14 000	—	0.8–7.4
FeCl ₃	162.20	—	34.42

Fig. 1. Typical AAS Chart of Fe and AAS Conditions

Standard: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 μg Fe/ml (Heme in MIBK).
Hemoglobin: 800 μg/ml, 3 determinations. Found: 2.0 μg Fe/ml (Heme in MIBK).

報¹³⁾と同様に 200 μl とした。

鉄の感度は水溶液で測定する場合、酸の種類や濃度¹⁶⁾及び共存イオン等により影響されるが、¹⁷⁾本法の前処理では溶媒抽出により妨害物質の影響を最小限に留めることができた。^{18,19a)}また、水溶液(塩化第二鉄の1%塩酸溶液)での鉄の吸光感度に比べて、本法ではヘム鉄が1.25倍、非ヘム鉄が1.10倍とそれぞれ感度よく測定できた。ヘム鉄及び非ヘム鉄の検量線用標準溶液(1.0 μg Fe/ml)について10回の繰り返し測定を行ったところ、いずれも変動係数1.8%以下で安定した測定値が得られた。標準的な原子吸光チャートと測定条件をFig. 1に示した。

3. 前処理法の検討

1) 溶媒抽出 有機溶媒は、MIBK、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、アセトン等を検討したが、それらのうち水層と分離しやすく、かつ原子吸光法で多用される溶媒であるMIBKを用いた。

次に塩酸濃度依存によるヘミンと塩化第二鉄のMIBKへの移行を検討し、その結果をFig. 2に示した。

ヘミンは、中性及び低塩酸濃度で一部不溶化し

Fig. 2. Effect of HCl Concentration on Recovery of Heme and Ferric Chloride (Fe(III)) by Extraction with MIBK

MIBK層と水層の間に薄膜状に析出したが、強塩酸性では析出は見られず、塩酸濃度6%以上でヘムとして95%以上が抽出された。塩化第二鉄は塩酸濃度2%まではほとんど抽出されなかったが、塩酸濃度10%以上では95%以上が抽出された。塩酸濃度が高いほどヘムの抽出率が高くなる傾向が見られたので、MIBK 10 ml、濃塩酸 5 mlを加え混合した後、相を分離するために水を加え塩酸濃度を約17.5%とし、ヘムと塩化第二鉄をMIBKに抽出した。

2) ヘムと塩化第二鉄の分離 3. 1)の条件でヘムと塩化第二鉄をMIBK抽出し、直接原子吸光に注入すると測定値は両者の和とならなかった。その理由は、フレイム中でヘムと鉄の相互作用により難解離性の化合物が生成するため¹⁷⁾と考えられた。そこでヘムと塩化第二鉄を分離するため、後者の逆抽出^{19b)}を検討した。逆抽出ではMIBK層中の塩酸が水層の塩酸濃度に影響して水を用いた場合にも水層は酸性となり、塩化第二鉄のみが水層へ移行した。1%塩酸を用いた場合も同様な結果を得た。したがって、同量の水を用いて逆抽出し両者を分離した。なお、一連の操作においてヘミンは無機鉄まで分解されず、ヘミンからヘムへの変換率は99%以上であった。

3) ヘム鉄及び非ヘム鉄含有タンパクの挙動 標準品において抽出条件は至適化されたが、タンパク質と結合したヘム鉄や非ヘム鉄化合物について同様に使用できるかどうか、ヘモグロビンとフェリチンを用いて検討した。塩酸濃度と両化合物中の鉄のMIBKへの移行についてFig. 2に示した。ヘモグロビンでは標準品の抽出条件でヘムの抽出率は90%

TABLE II. Recoveries of Heme and Non-heme (Fe(III)) Added to Food ($\mu\text{g Fe/g}$)

Food	Added		Found	
	Heme	Fe (III)	Heme (Rec.%)	Fe(III) (Rec.%)
Cookie	—	—	n.d.	3.6
	40.0	—	33.6 (84.0)	3.6
	—	50.0	n.d.	48.9 (90.6)
Prune	—	—	n.d.	71.8
	40.0	—	35.9 (89.8)	70.5
	—	50.0	n.d.	117.5 (91.4)

Each value is the mean of 3 determinations.
n.d. < 0.2 $\mu\text{g Fe/g}$.

以上と良好であった。塩酸濃度 4—14%の範囲で抽出率が低下したが、これは MIBK 層と水層の間にタンパク質の層が形成され鉄の遊離を妨害したためと考えられた。

一方、非ヘム鉄のフェリチン中の鉄は塩酸濃度 14%以上で MIBK により定量的に抽出され、逆抽出により水層に移行した。オルトフェナントロリンを用いた定性では Fe (III) であった。したがって、溶媒抽出操作によりフェリチン中の鉄は塩化第二鉄と同様の挙動を示した。

4. ヘム鉄の吸光スペクトルによる確認

ヘムタンパク質の生理活性研究に吸光スペクトルが繁用されてきたが、食品においてはヘム系色素としてのヘモグロビン及びその誘導体について水溶液中での吸光スペクトルが定性に利用されている。²⁰⁾ 本法と同じ条件での測定例は見られないが、MIBK 抽出されたヘムは特徴的な赤色を呈することから、ヘミン及びヘモグロビンの MIBK 抽出溶液のスペクトルを測定したところ、極大吸収は 638, 540, 510 及び 382 nm で一致した。ヘモグロビンあるいは加工ヘモグロビン等のタンパク質部分が異なっていて

も、それらの MIBK 層の可視部吸収スペクトルに相違が見られなかったことから、吸収スペクトルを比較することによりヘム鉄の確認ができた。

5. 検量線

試験溶液と同一なマトリックスを持つ標準溶液により作成した検量線は、ヘム及び非ヘム鉄ともに 0.1—6.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線関係を示し、両者の定量限界はともに 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

6. 添加回収実験

ヘム鉄不含クッキー及びプルーンエキスをヘミン（鉄として 40.0 $\mu\text{g/g}$ ）又は塩化第二鉄（鉄として 50.0 $\mu\text{g/g}$ ）を添加して、回収率を検討した結果を Table II に示した。

クッキーとプルーンエキスの既存鉄分は、本法により非ヘム鉄に分類され、それぞれ 3.6, 71.8 $\mu\text{g/g}$ であった。添加回収率はヘムが 84%以上、塩化第二鉄は 90%以上と両者ともに良好であった。

7. 市販ヘム鉄添加食品への応用

ヘム鉄添加表示のあるクッキー、キャンディー、ゼリー等 5 検体と、カプセル入りの健康食品 1 検体について本法により分析した。また総鉄分の分析^{6a)}

TABLE III. Determination of Fe in Commercially Available Foods ($\mu\text{g Fe/g}$)

Sample	Proposed method			Conventional method ^{a)}
	Heme	Non-heme	Sum ^{a)} (%) ^{b)}	Total Fe
Cookie-1	171	89	260 (90)	290
Cookie-2	n.d.	6	6 (100)	6
Candy-1	99	21	120 (81)	148
Candy-2	133	10	143 (83)	173
Jelly	32	16	48 (94)	51
Capsule	2 700	220	2 920 (101)	2 890

Each value is the mean of 3 determinations.
n.d. < 0.2 $\mu\text{g Fe/g}$.

a) Sum of heme and non-heme as Fe.

b) Percentage of sum to total Fe.

c) Determination by AAS after acid digestion.

Fig. 3. Typical Absorption Spectra of Hemes from Hemin (A), Hemoglobin (B) and Sample (Candy) (C)

もあわせて実施し、これらの結果を Table III にまとめた。

クッキーのような脂肪を多く含む食品では、ジエチルエーテルを用いて脱脂し、風乾後 5% アンモニア水で潤すことにより抽出が容易となった。ジエチルエーテル抽出物について総鉄分を測定したところ鉄は検出されなかったため、脱脂操作による鉄の損失はほとんど無いと思われた。

ヘム鉄添加量の表示のある 2 検体では、表示量は本法による定量値と一致した。MIBK 抽出時の残渣がヘム鉄の色に着色している場合は、残渣について再度抽出を行った。しかしながら、本法によるヘム鉄と非ヘム鉄の合計は、従来法による総鉄分の分析値と比較して 6—19% 低い検体がみられ、この差に相当する鉄分は MIBK 抽出時の残渣に存在していた。その化学形態については、今後の検討が必要である。

キャンディーの MIBK 層の吸光スペクトルを Fig. 3 に示したが、クッキー 2 を除く 5 検体のスペクトルはヘミン及びヘモグロビン由来のスペクトルパターンと一致した。

食品中铁の化学形態別に定量された報告例が見られないため総鉄分²¹⁾で比較すると、一般食品の菓子類が 2—5 $\mu\text{g/g}$ 、鉄分の多い食品として知られている貝やレバーが 40—130 $\mu\text{g/g}$ であるのに対して、ヘム鉄添加食品では鉄含有量が高いと思われた。しかし、一日摂取量の表示によれば、1.2—2.4 mg Fe/日であり、バランスを考えてヘム鉄添加食品を摂取することが大切と思われた。

ま と め

食品中のヘム鉄及び非ヘム鉄の簡易分析法を検討し、次の結果を得た。1) ヘム鉄と非ヘム鉄を分析対象とし、それらの標準品にヘミンと塩化第二鉄を用いた。2) 前処理に酸分解を行わないで 17.5% 塩酸酸性溶液により MIBK を用いて鉄化合物を抽出し、水を用いた逆抽出操作により、ヘムと塩化第二鉄に分離した。3) 抽出操作により共存する食品の成分を除去できたので、妨害もなく精度よく原子吸光測定ができた。4) 市販ヘム鉄添加食品に応用したところ、簡便かつ迅速に分別分析ができた。分析結果はヘム鉄が nd—2700 $\mu\text{g/g}$ 、非ヘム鉄が 6—220 $\mu\text{g/g}$ であった。

今後、魚介類、肉及びレバーなどの分析に、本法を応用する予定である。

引 用 文 献

- 1) a) Robert W. Hay, “生体無機化学,” 太田次郎, 竹内敬人, 室伏きみ子, オーム社, 1986, pp.97—129; b) 松島美一, 高島良正, “生命の無機化学,” 広川書店, 1990, pp.163—177; c) 中原昭次, 山内修, “入門生物無機化学,” 化学同人, 1979, pp.82—88.
- 2) 和田 攻, “金属とヒト,” 朝倉書店, 1985, pp.73—81.
- 3) 木村修一, 小林修平翻訳監修, “最新栄養学—専門領域の最新情報,” 第 6 版, 健帛社, 1991, pp. 369—383.
- 4) a) 佐々木隆一郎, 青木國雄, 臨床と研究, **67**, 679 (1990); b) 前 吉俊, 松本文雄, 宮崎 保, 臨床と研究, **67**, 696 (1990); c) 中畑龍俊, 赤羽太郎, 臨床と研究, **67**, 758 (1990).
- 5) 石倉俊治, “機能性食品の驚異,” 講談社, 1990, p.129.
- 6) a) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解 1990,” 金原出版, 1990, p.271; b) S.G. Capar, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 320 (1990); c) A.R. Robinson, K.S. Maclean, H.M. Macconnell, *ibid.*, **72**, 674 (1989).
- 7) KENNETH HELRICH (ed.), “Official Methods of Analysis”, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., ARLINGTON, 1990, pp.1160—1170.
- 8) a) KENNETH HELRICH (ed.), “Official Methods of Analysis”, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., ARLINGTON, 1990 p.778, b) *ibid.*, p.743.

- 9) 石井幹太, 梶 敬治, 保母敏行, 鈴木繁喬, 分析化学, 30, 524 (1981).
- 10) J. Shimoni, G. Shimoni, M. Feola and P. Canizaro, *Anal. Chim. Acta*, **249**, 169 (1991).
- 11) K. Takatera, T. Watanaba, *Anal. Sciences*, **7**, 695 (1991).
- 12) 石津和彦, “実用 ESR 入門,” 講談社, 東京, 1989, pp.174—182.
- 13) 大島晴美, 斎藤 勲, 河村典久, 山田益生, 衛生化学, **36**, 219 (1990).
- 14) 斎藤 勲, 河村典久, 荒川正一, 大島晴美, 宇野圭一, 食衛誌, **24**, 295 (1983).
- 15) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解 1990,” 金原出版, 1990, p.991.
- 16) 寺島 滋, *Japan Analyst*, **18**, 1259 (1969).
- 17) 不破敬一郎, 下村 滋, 戸田昭三編, “最新原子吸光分析(II) 元素各論,” 広川書店, 1975, pp.720—793.
- 18) 三井利幸, 藤村義和, 分析化学, **21**, 37 (1972).
- 19) a) 須藤恵美子, 池田祥子, *Japan Analyst*, 1389 (1969); b) 平野四蔵, “無機応用比色分析,” 2, 共立出版, 1974, pp.318—320.
- 20) 谷村顕雄, 片山 修, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司編, “天然着色料ハンドブック,” 光琳, 1979, pp.404—420.
- 21) 化学技術庁資源調査会編, “四訂日本食品標準成分表,” 1983.