

# pH が全ヘム色素量測定値に及ぼす影響

稲田 有美子

## Effects of pH on Measured Total Heme Pigment Quantities

Yumiko Inada

Various heme pigments, including myoglobin (Mb), hemoglobin, and cytochromes, are present in meat. These heme pigments can be used to evaluate meat color. An acetone-hydrochloric acid mixture (75:0.7) was used to extract and quantify heme pigments from a meat sample in the form of hematin. To evaluate color changes due to differences in meat pH, heme pigments were extracted from a variety of meat samples to determine whether the hydrochloric acid content could be adapted. A calibration curve was prepared based on the total amount of heme pigment extracted from Mb dissolved in a buffer solution (pH 4.1-11). No adverse effects, including reduced extraction efficiency or heme pigment decomposition, were observed at different pH values. The salt produced from the neutralization reaction during the extraction did not affect extraction efficiency. No differences in yield were observed between extraction solvents with varying proportions of hydrochloric acid (0.4-1.6 mL, 0.7-2.8%) for meat samples adjusted to pH 4.4 and unadjusted samples (pH 5.6-5.7). At pH 10.5, it tend to much the heme pigments were extracted with 1.4% hydrochloric acid, however with no significant differences in extraction yield from 0.7-1.4%. Therefore, 0.7% hydrochloric acid is suitable for extracting and quantifying all heme pigments in a meat sample.

**Keywords:** heme pigments, myoglobin, pH, extract, hydrochloric acid, salt

### 1. 諸言

食肉中にはミオグロビン (Mb)、ヘモグロビン、シトクロム等様々なヘム色素が存在する。それらヘム色素は食肉の色調に大きくかかわっており、食肉の色調を評価する上で全ヘム色素量を評価することは重要である。全ヘム色素を抽出するためにアセトン-塩酸混合溶液が用いられている (小島 & 安井 1993)。これは抽出溶媒の pH を 1 以下となるよう 75% アセトン- 0.7% 塩酸を用いて試料中のヘム色素を全てヘマチンの形にして抽出・定量を行う方法である。

食肉の赤味は酸性で弱くなりアルカリ性で強まることから食肉の色調について検討する場合、様々な pH の肉試料のヘム色素量を測定する必要性が生じる。Ahn & Maurer (1990) は pH 5.0 ~ 8.0 のヘム色素溶液を試料として用い、ヘム色素の色調変化機構について pH と鉄の価数およびヘム錯体反応の面から報告しているが、溶液中のヘム色素量の変化については述べていない。

岡山 & 永田 (1979) はヘム色素の定量について代表的な Hornsey (1956) の方法の追試を行い報告している。しかし、試料の pH は 5.5 のみであり、試料がアルカリ性を示す場合についての記載はない。さらに、岡山 & 永田 (1978) は発色度を測定するためのヘム色素の抽出に関し

て pH 5.5 の試料を用い、ホモジネートの際に用いるアセトン濃度および抽出時の pH 等の検討を行っているが、抽出する前の食肉の pH と抽出液の関係は述べられていない。

本報では肉の pH の違いによる色調の変化を評価するため幅広い pH となるよう調整した加熱処理後の肉の試料からヘム色素を抽出する場合にも塩酸濃度 0.7% が適用できるかを調査した結果を報告する。

### 2. サンプル調製と評価方法

#### 2-1. 原材料

食肉は食肉専門店より入手した豚モモ肉を用いた。また、挽肉として使用する際に肉の結着性を高めるため塩化ナトリウムを、pH 調製のために塩酸および水酸化ナトリウムを使用した。これらは全て和光純薬工業 (株) 製を用い、塩酸は精密分析用試薬、それ以外は特級試薬を用いた。

#### 2-2. 試薬

実験用試薬は主に和光純薬工業 (株) 製を用い、塩酸は精密分析用、それ以外は特級試薬を使用した。ミオグロビン (馬の筋肉由来) はナカライテスク (株) 製を用いた。

### 2-3. 試料調製

pH調整した試料は、豚のモモ肉を挽肉にし（NEWキッチンミンサーBK-220、ボニー製、標準穴径3.2mmを装着、1度挽き）、挽肉50gに対して1%重量の塩化ナトリウムを添加後、塩酸または水酸化ナトリウム溶液を用いて、生肉が目的のpHとなるよう調製した。pH調整用試薬は合計1mLとなるよう不足分は加水して水分量を調整し、無添加区は超純水1mL添加した。それらをフードプロセッサ（National製、MK-78型、20秒）で混和後、再度pHを確認し、袋（ナイロンポリ、内寸50×100mm、福助工業（株））に均一な厚みとなるよう充填した。75℃の湯浴中で20分間加熱後、氷上で冷却し試料を調製した。

中和反応により生成する塩濃度が抽出効率に及ぼす影響を調べる際は、上記の方法で挽肉に1%重量の塩化ナトリウムを添加後、フードプロセッサで混和し、25gの球状に成形した。それを98℃以上の沸騰水中で10分間加熱後、水中で冷却し試料とした。

### 2-4. 実験方法

小島 & 安井 (1993)、岡山 & 永田 (1979)、坂田 (1999) を参考に行った。抽出溶媒中の塩酸添加量を変えることにより適正な塩酸濃度を求めた。細刻後、乳鉢ですりつぶした肉試料を遠沈管に2g秤量し、超純水を0.4～3.2mL添加後、ボルテックスで攪拌した。そこへ良く冷えたアセトン15mLと塩酸0.4～3.2mLの混合溶液を添加し（塩酸濃度：0.7～5.6%）、ボルテックスで攪拌した。ポリトロンホモジナイザーを用い、10秒間攪拌、10秒間休止を3回繰り返して（合計30秒間）攪拌後、水で冷やしながらか60分間静置し、ヘム色素を抽出した。No.6ろ紙で濾過後、ろ液の吸光度をスキャン測定した。測定は分光光度計を用い、340～700nmの範囲とし、383nmの吸光度を測定した。超純水と塩酸は合計3.6mLとなるよう添加し、特に記載のない場合は塩酸量を0.8mLとして実験を行った。

Mb溶液のpHの違いによる安定性を評価するためおよび定量のための検量線を作成する場合は、Mb標品も同様に処理した。すなわち、標品50mgを緩衝液に溶解し、5mLに定容し（1%）、同緩衝液で多段階希釈し、0.5、0.25、0.125、0%の溶液を調製した。良く冷えたアセトン7.5mL、塩酸0.4mL、同緩衝液1.7mLにMb溶液0.4mLを添加し、ボルテックスで攪拌後、60分間静置した。その後、肉サンプルに準じた。異なるpHの緩衝液を調整するため、pH4および5.5は0.1M酢酸緩衝液、pH9、10は0.1MTris-HCl緩衝液、pH11は0.1Mホウ酸緩衝液を用いた。

これら操作は全て褐色器具を用い、赤色ランプを使用した暗室下で氷上作業とした。

### 2-5. 統計処理

全て3回の繰り返し実験を行った。検量線傾きの有意差についてはOne-wayANOVAで、また異なるpHの試料における塩酸量の抽出効率への影響をTwo-wayRepeated MeasuresANOVAで評価した。また、中和反応により生じる塩濃度の抽出効率への影響はt-testにより評価した。

## 3. 結果および考察

試料中のpHの違いによりMbの抽出および分解等の安定性に差が出る可能性が考えられたので、異なるpHの緩衝液に溶解したMb標品を用いて検量線を作成し、その傾きを評価した。結果、傾きに有意な差は認められず（Fig. 1）、試料のpHの違いはヘム色素の分解等の安定性に影響を与えないこと、また、pH4.1～11間において同一の検量線を使用できること確認した。

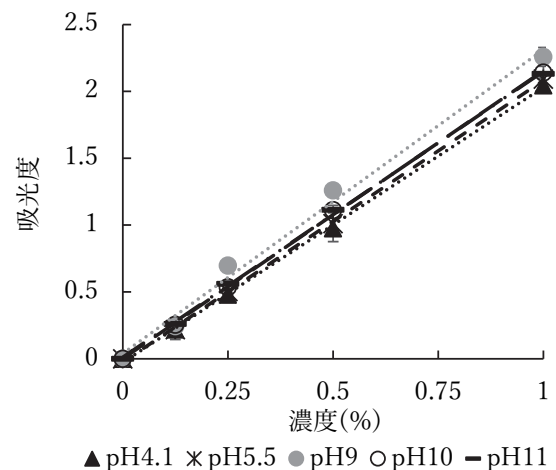


Fig. 1 緩衝液のpHと全ヘム色素  
pH 4.1, 5.5, 9, 11 : n=3 ; pH 10 : n=1

肉2gをpH10.5に調整するためには水酸化ナトリウムを0.48mmol添加することになる。そのため塩酸と反応後0.48mmolの塩化ナトリウムすなわち0.028gが生じる計算となる。塩濃度の違いと抽出効率の関係性を把握するため抽出溶媒に0.028gの塩化ナトリウムを添加した場合と、添加しない場合で比較した。その結果、ミオグロビンに換算したヘム色素の定量結果は両者で同程度となり、抽出効率には影響しなかった（Fig. 2）。

ヘム色素は塩酸でpH1以下に調整した75～80%アセトン溶液で効率よく抽出されると言われている（小島 & 安井 (1993)、Hornsey (1956, 1959)）。抽出液のpHは本実験においても全て1以下であった（Table）。また、pH調整を行っていない肉において、0.4mLの塩酸を添加した場合（75%アセトン－0.7%塩酸抽出）吸光度が最も安定しているとされており（岡山 & 永田

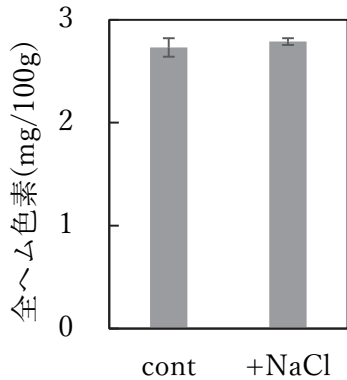


Fig. 2 中和により生成する塩濃度が抽出効率に及ぼす影響  
全ヘム色素量：ミオグロビン換算

Table 抽出液のpH

| サンプルの pH | 塩酸添加量(mL) |           |      |      |
|----------|-----------|-----------|------|------|
|          | 0.4       | 0.8       | 1.6  | 3.2  |
| pH4.5    | 0.48±0.07 | 0.09±0.08 | pH≦0 | pH≦0 |
| 無調整      | 0.47±0.05 | 0.09±0.06 | pH≦0 | pH≦0 |
| pH10.5   | 0.52±0.08 | 0.10±0.08 | pH≦0 | pH≦0 |

1978、1979；小島 & 安井 1993)、実際、小島 & 安井 (1993)、岡山 & 永田 (1979)、Hornsey (1956、1959)、坂田 (1999) では pH 調整を行っていない肉もしくは pH 5.5 に調整した試料の場合、抽出溶媒に 0.4 mL の塩酸を添加している (75% アセトン- 0.7% 塩酸抽出)。岡山 & 永田 (1979) はヘム色素の定量について pH 5.5 の試料で抽出温度が 0℃ の時、溶媒中の塩酸濃度が 0.5 ~ 1.4% (0.3 ~ 0.8 mL) では最大吸収波長および吸光度の値も安定しており 1.8% では吸光度が増加することから Hornsey (1956) の方法を採用し 0.7% としている。われわれの結果においても塩酸 0.4 ~ 1.6 mL (0.7 ~ 2.8%) においてほぼ安定に抽出でき、先行研究では検討されていなかった pH 10.5 の試料においては 0.8 mL (塩酸 1.4%)

添加した場合、有意な違いはないものの多くのヘム色素が抽出される傾向にあった (Fig. 3)。加えて、pH 4.5 および無調整 (pH 5.6 ~ 5.7) の場合、0.4 (塩酸 0.7%) ~ 1.6 mL (塩酸 2.8%) で大差はなかったため、総合的に判断して塩酸 0.4 ~ 0.8 mL (0.7 ~ 1.4%) で適用できると推察された。結論として、全ヘム色素を抽出する時、従来法の塩酸 0.7% は pH 4.5 ~ 10.5 の試料に対して適用できることが示唆された。

#### 4. 参考文献

Ahn, D. U.; Maurer, A. J., 1990, Poultry meat color: pH and the heme-complex forming reaction., *Poultry Sci.*, **69**(11), p.2040-2050. DOI: 10.3382/ps.0692040.

Hornsey, H. C., 1956, The colour of cooked cured pork. I. —Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments., *J. Sci. Food Agric.*, **7**(8), p.534-540. DOI: 10.1002/jsfa.2740070804.

Hornsey, H. C., 1959, The colour of cooked cured pork III. —Distribution and relationship of pigments, pH and cysteine—., *J. Sci. Food Agric.*, **10**(2), p.114-124. DOI: 10.1002/jsfa.2740100208.

小島 一良; 安井 明美, 1993, 動物性食品中のヘム鉄および非ヘム鉄の分別定量法, *日食工誌*, **40**(1), p.35-41. DOI: 10.3136/nskkk1962.40.35.

岡山 高秀; 永田 致治, 1978, 肉製品の発色度測定法の改良, *日畜会報*, **49**(12), p.866-871. DOI: 10.2508/chikusan.49.866.

岡山 高秀; 永田 致治, 1979, 肉製品中のヘム色素定量法, *日畜会報*, **50**(1), p.15-21. DOI: 10.2508/chikusan.50.15.

坂田 亮一, 1999, “2-2) 吸収スペクトル法”, 食肉・食肉製品の分析技術 第4回, *食肉の科学*, **40**(2), p.221-224.

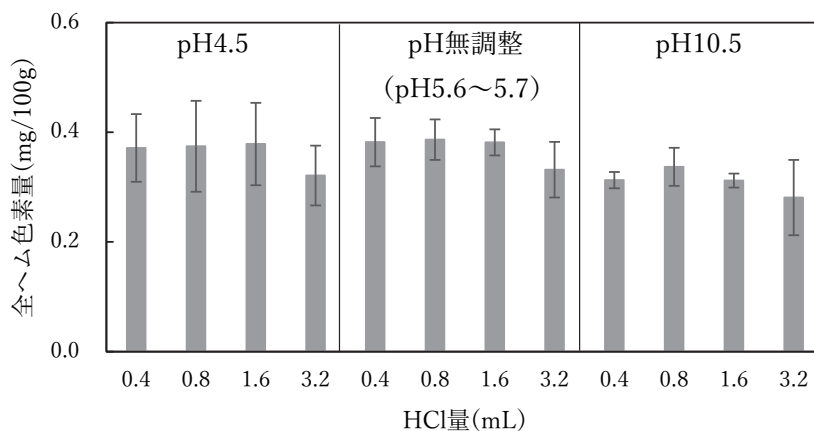


Fig. 3 塩酸添加量の検討

全ヘム色素量：ミオグロビン換算