

심포지움 초록

1

철분의 bioavailability 연구 방법론

박태선 (연세대학교 식품영양학과)

'Bioavailability (생체이용률)' 이라는 용어는 학문의 영역에 따라 약간씩 다르게 정의되고 있다. 인체영양학자들에게 있어서 bioavailability란 개념은 체내에서 '영양소가 이용되는 효율'로 정의내려지고, 동물영양학에서는 이와 비슷한 개념이기는 하지만, 주로 '특정 동물의 성장과 유지를 위한 사료의 영양가'로 표현하고 있다. 한편, 약리학에서는 bioavailability라는 개념을 '경구투여후 혈액에 도달되는 약물의 용량'으로 정의내린다. 영양학적 bioavailability는 소화율(digestibility), 소장에서의 흡수율(assorbability), 세포 또는 조직으로의 운반(transport), 그리고 대사적 기능을 위해 영양소가 이용되는 능력(the ability to use a nutrition for metabolic function)을 포함하고 있다.

철분의 bioavailability는 크게 세 단계로 나누어 볼 수 있다. 첫번째 단계는 소화율, 식품성분 또는 장내용물에서 철분의 용해도이고, 두번째 단계는 소장상피벽을 통해 철분이 흡수되어 혈액으로 합류하는 과정이고, 세번째 단계는 일단 혈액으로 들어온 철분이 processing 과정을 거쳐 생리기능을 나타내는 물질(예, hemoglobin)에 포함되는 과정이다.

1. 철분의 용해도(solubility) 연구

헴철은 소장상피세포내로 쉽게 흡수된 후 분해되므로 소장내 환경 및 식이요소에 의해 흡수율이 영향을 받지 않는다. 따라서 철분의 용해도를 다루는 연구들은 모두 비헴철을 대상으로 하고 있다. 용해성 철분은 ferric(3가) 또는 ferrous(2가)형태로 존재하며, ferric iron(3가철)은 pH>1 이상에서 쉽게 가수분해되는 반면, ferrous iron(2가철)은 pH 7.0 이하에서 가수분해되지 않는다. 장내에서 2가철은 3가철로 쉽게 산화될 수 있으며, 철분의 가수분해물(i.e. iron hydroxide)이 형성되면 철분이 불용성으로 변화된다. 따라서 장내 철분의 용해도에 관하여 다음의 두 가지 요인이 중요하다.

- i) 철분이 ferrous 형태로 존재해야 하며,
- ii) 철분을 용해성으로 유지하기 위해 충분한 양의 ligand가 존재해야 한다.

1-1. In vitro 용해도 연구

1-1-1. 식품에 함유된 철분의 용해도

Shackleton(1936)은 최초로 ferrous chromogen인 α - α 'dipyridyl을 이용하여 식품의 수용성추출물에서 용해성 철분(ionizable iron)의 함량을 측정하였으며, 그 이후 소화관과 비슷한 환경을 조성하기 위해 식품추출물을 pepsin-HCl으로 처리하고, 상층액에서 ionizable

iron을 측정하였다.

총 soluble 철분 = ironizable Fe + heme Fe + ferritin Fe + 기타 용해성화합물에 결합된 Fe

1-1-2. 투석 가능한 철분(Iron dialysability)

Miller 등(1981)은 투석막을 이용하여 철분용해도를 측정하였다. 식품시료를 pepsin과 HCl을 이용하여 소화시킨 후 NaHCO₃를 함유한 투석 bag을 첨가시켰다. In vitro 소화물에 pancreatin-bile을 첨가하고 다시 투석시킨 후 투석액의 철분농도를 측정하므로써 투석막의 molecular wt 한계치보다 분자량이 더 작은 용해성 철분의 양을 측정하였다.

1-2. In vivo 용해도 연구

연구하고자 하는 식이를 쥐에게 먹이고 2-3시간이 경과한 후 쥐의 소화관을 적출하고, 장내용물을 원심분리하여 상층액의 철분농도를 측정하므로써 철분의 bioavailability를 측정하는 방법이다.

1-3. 철분용해도 연구의 장단점

철분용해도를 근거로 철분의 bioavailability를 측정하는데 있어서 가장 중요한 제한점은 용해된 이후 실제로 흡수되고 이용되는 철분을 측정할 수 없다는 점이다. 철분용해도 연구는 거의 대부분이 in vitro model에서 시행되었다.

In vitro model의 장점:

- ① 실험조건을 정확히 최적의 조건으로 조절할 수 있다.
- ② 가능한 방해인자(예, 체내 철분영양상태의 개인 차이)가 없어서 in vivo 방법에 비해 표준편차가 적고 철분용해도에 영향을 미치는 요인을 보다 깊이있게 연구할 수 있다.
- ③ 동물실험에 비해 손쉽고, 빠르고 값이 싸다.

In vitro model의 제한점:

현재 사용되는 방법들은 연구를 거듭한 끝에 생리적 상황과 유사하도록 pepsin 및 pancreatin 소화, dialyzability등을 고려하고 있으나, 여전히 in vivo 효과들(transit time, 효소, pH, diffusion barrier 등)이 완전히 반영된 것은 아니다.

2. 철분흡수율 연구

2-1. 자연적인 철분을 이용하는 방법

2-1-1. Chemical balance 연구

신체에 의해 흡수 또는 보유되는 식품내 철분의 양을 간접적으로 측정한다.

겉보기 철분흡수율(apparent Fe absorption, mg/d)
= Fe intake(mg/d) - fecal Fe(mg/d)

겉보기 철분보유량(apparent Fe retention)

$$= \text{Fe intake(mg/d)} - \text{fecal Fe(mg/d)} - \text{urinary Fe(mg/d)}$$

※ 철분의 경우 소변내 배설되는 철분의 양이 극히 미미하므로 apparent Fe absorption은 실제로 apparent Fe retention과 거의 같게 된다.

2-1-2. 흡수후 혈장의 철분농도 변화의 측정

흡수 후 혈장 철분농도의 변화곡선을 이용한 대부분의 연구들은 철분제제의 bioavailability를 측정하거나, 제산제, pancrelipase와 같은 약물이 철분의 bioavailability에 미치는 효과를 평가하는 것과 같은 약리학적 목적으로 실시되었고, 식이철분이 혈장 철분농도에 미치는 영향을 측정할 목적으로 실시된 연구는 극히 소수이다.

2-2. 방사성동위원소를 이용한 철분흡수 연구

2-2-1. 혈액, 대변 및 소변의 radioiron 함량

i) 혈액으로 흡수된 radioiron의 양을 측정하는 방법

ii) 배설물에서 radioactivity를 측정하는 방법으로 radioiron을 경구투여 후 대변과 소변을 수집하고, 섭취된 radioiron의 양과 배설된 양의 차이를 근거로 apparent absorption을 측정하는 방법이다. 내인성 철분 손실량이 고려되지 않았다는 점을 제외하고는 chemical balance방법과 거의 유사하다.

2-2-2. 장내용물에 함유된 radioiron

일정량의 ^{59}Fe 를 쥐에게 섭취시킨 후 대변으로 ^{59}Fe 가 배설되기 전에 쥐를 희생시켜 위장관을 제거하고 장내용물의 ^{59}Fe 함량을 측정하여 ^{59}Fe 흡수율을 계산하는 방법이다. 이 때 섭취된 동위원소의 양에서 위장관 내용물의 동위원소양을 제하여 겉보기 철분흡수율을 계산한다.

2-2-3. Whole-body counting

철분제 또는 식품에 함유된 ^{59}Fe 를 경구투여하고 1시간 이내에 whole-body counting을 실시하여 얻은 수치를 100%로 간주한다. 대변배설이 진행되면서 체내의 ^{59}Fe 함량은 그 이후 점차적으로 감소할 것이고, 충분한 시간이 경과한 후 (쥐의 경우 5-7일, 사람의 경우 10-14일) 평형상태에 도달하게 된다. 측정된 ^{59}Fe count 수치를 100%수치로 나누어 주고, 동위원소의 붕괴율을 보정해 주면 체내에 보유된 ^{59}Fe 함량이 계산되어 진다.

인체를 대상으로 하는 경우 체내의 ^{59}Fe 함량을 직접 측정할 수 있고 대변을 완벽히 모두 수거해야 하는 부담을 덜 수 있어서 whole-body counting이 많이 이용되고 있다.

2-2-4. True iron absorption

Apparent ^{59}Fe 흡수율은 내인성 철분손실량을 고려한 것이 아니므로 실제 철분흡수율을 과소평가할 가능성이 크다. Heth 등(1965)은 ^{65}Zn 의 true absorption을 연구하였으며, 이 방법은 ^{59}Fe 에서도 동일하게 적용 가능하다. 두군의 쥐를 대상으로 한군에는 동위원소를 경구

투여하고, 다른 군에는 정맥으로 주사한 후 whole-body counting에 의해 동위원소의 체내 보유량을 측정하는 방법이다. 두가지 동위원소의 retention curve를 zero time으로 연장시켜 얻게 되는 y절편값의 비가 바로 true absorption을 나타내 주게 된다.

2-3. Stable iron isotope을 이용한 흡수율 측정

자연에는 54(5.8%), 56(92%), 57(2.2%)과 58(0.3%)의 질량을 지니는 4가지 철분 동위원소가 일정 비율(괄호 안의 숫자대로)로 섞여져 있다. 상대적으로 양이 적은 ^{54}Fe , ^{57}Fe 과 ^{50}Fe 의 비율을 증가시키는 것이 가능하고, 이렇게 하여 생성된 것이 철분의 stable isotope이다. Stable isotope은 radiation을 발생하지 않기 때문에 질량의 차이에 의해 정량 가능하고, 따라서 whole-body counting이 불가능하다.

Stable isotope의 분석을 위해서는 중성자 활성화분석(neutron-activation analysis, NAA)에 의해 방사성 동위원소로 전환시킨 후 분석하거나, mass spectrometry에 의해 직접적으로 측정하는 방법, 그리고 최근에는 TIMS(thermal-ionization mass spectrometry)와 ICP-MS(inductively coupled plasma mass spectrometry)가 흔히 이용되고 있다.

철분흡수율 연구를 위해 stable isotope을 이용하는 가장 주된 장점은 방사성오염 위험이 없다는 것이며, 따라서 영아나 임산부를 대상으로 한 실험에서 특히 유용하게 사용될 수 있다.

2-4. In situ와 in vitro system에서 철분흡수율의 측정

2-4-1. Intestinal loops in situ

1962년 Manis 등은 실로 묶은 소장 loop에 혈액 공급이 원활히 이루어지는 상태에서 일정한 양의 radioiron을 투여한 후 gut loop, 장 내용물과 나머지 carcass 부위에 남아 있는 radioactivity를 측정하여 철분흡수율을 평가하였다. Intestinal loop를 이용하는 방법들은 주로 쥐를 대상으로 실시되었고, mice, chicks, dog등에서도 보고되었다. 이 방법을 이용하는 경우 소장내 분비와 같은 오차요인이 제거될 수 있고, 아울러 luminal pH와 같이 철분흡수에 영향을 미치는 기타 요인들을 조절할 수 있다는 장점이 있다.

2-4-2. Isolated intestinal loops, sheets or sacs

분리된 intestinal loop를 buffer 용액으로 perfuse시키는 방법, 분리된 소장 loop를 횡적으로 잘라서 intestinal sheet를 형성시키고, Ussing chamber라 불리는 two compartment model에 고정시켜 사용하는 방법, 그리고 분리된 소장단편을 뒤집어 serosal side가 안으로 위치하게 하는 방법 등이 가능하다.

2-4-3. 소장상피세포재조합용모막(BBMV)

소장상피조직에서 재조합용모막을 만들어 철분흡수기전 연구에 이용하고 있다. 이 방법은 철분 uptake의 기전 및 다른 이온들이 철분 uptake에 미치는 영향 등을 연구하기 위해 주로 이용되었고, 식품내 철분의 bioavailability를 평가하는 연구에 이용하기에는 제한점이 많다.

2-4-4. 소장 상피세포주모델에서 철분의 uptake 및 transport

철분의 uptake와 transport를 연구하는데 있어서 세포주모델의 이용이 급증하는 추세에 있으며, 인체결장암세포주인 Caco-2 세포는 가장 널리 이용되는 세포주이다. Caco-2 세포주는 분화가 되면서 polarization, 미소용모의 형성, 용모막효소의 생성등과 같은 소장상피세포의 특성을 나타내는 것으로 알려져 있고, 따라서 다양한 영양소 및 약물이 소장으로부터 흡수되는 기전 및 bioavailability를 연구하는데 있어서 유용한 in vitro model이 되고 있다. 실제로 1990년 이후 이러한 세포주를 이용하여 glutathione, 타우린 등의 아미노산, 비타민, 칼슘, 철분 및 아연 등의 영양소가 소장으로부터 흡수되는 기전을 규명하는데 큰 성과를 거두었다. 이들 상피세포는 microporous membrane상에서 배양이 가능하고, two-compartment model이 형성되어 brush border membrane을 통한 uptake, basolateral membrane을 통한 efflux, net transport로 구분 지어 영양소의 이동기전을 측정할 수 있다는 큰 이점을 가지고 있다.

2-5. 철분흡수 연구의 장단점

Chemical balance연구의 장단점

장점: ① 전체식사내용에서 철분의 흡수율을 연구할 수 있다.

② 장기간 동안의 효과를 연구할 수 있다.

③ 방사능에 노출될 위험이 없다.

④ 여러 영양소를 동시에 분석 가능하다.

단점: ① 연구비가 많이 들고 노동집약적(식사의 수거 및 분석, 배설물의 정량적 수거)이므로 대상자의 수가 극히 제한적이다.

② 체내 철분보유량은 섭취량과 배설량의 극히 일부분이므로 오차범위가 크다.

③ 내인성 철분손실량에 대한 보정이 이루어지지 않았다.

흡수 후 혈장의 철분농도 변화 곡선의 문제점:

실험하고자 하는 철분제에 따라 철분흡수 kinetics가 다르게 나타날 수 있고, 결과를 잘못 해석할 수 있다. 천천히 흡수되는 철분제는 측정하는 time course가 짧을 경우 혈장 철분농도의 증가속도가 실제보다 더 낮게 나타나게 된다. 고용량의 철분섭취는 혈장 transferrin을 포화시키고, 간에 저장되므로 매우 제한된 범위의 철분용량내에서만 이용이 가능하다. 반면, 철분 용량이 너무 낮은 경우 혈장 철분농도의 증가폭이 혈장 철분농도의 기본 오차범위 이상으로 나타나지 않는다는 문제점이 있다.

Caco-2 세포주 이용시의 장단점

장점: ① 인체실험 결과와 매우 높은 유사성을 보인다.

② Caco-2 세포주를 이용하는 경우 식이요인이 상피세포내에서 철분 transport에 미치는 효과를 평가할 수 있다.

③ Caco-2 세포주는 heme oxygenase 활성을 지니므로 헴철대사를 연구할 수 있는 도구가 된다. 하지만 Caco-2 세포에 heme-iron receptor가 존재하는지의 여부는 알려져 있지 않다.

- 단점: ① transformed된 세포에서 어느 정도까지 정상대사 기능이 그대로 남아 있을 지는 의문시된다.
- ② 소장에서의 철분흡수에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 mucin층이 존재하지 않는다.
- ③ transepithelial 저항이 인체소장에서보다 훨씬 더 커서 오히려 인체 대장에 가깝다.
- ④ 운반체 발현율이 낮아서 Caco-2 세포주를 이용하는 경우 운반속도가 매우 낮고, 때로 scaling factor를 곱해주어야 한다. 이 점은 철분흡수에 있어서도 마찬가지로 적용되어 Caco-2 세포를 통한 철분운반이 낮게 나타나고 있다.

3. Endpoint 측정

3-1. The hemoglobin-repletion bioassay

쥐를 이용한 Hb-repletion bioassay는 AOAC에 제시된 방법으로 철분보강급원을 연구하기 위한 목적으로 개발되었다. 즉, 어린 수컷 쥐에게 철분결핍 식이를 섭취시켜 체내 철분을 고갈시키고 빈혈을 유발시킨다. 철분 결핍된 쥐를 대상으로 연구중인 철분제를 세 가지 농도로 각기 식이에 첨가시켜 2주간 사육시킨다. 각군의 쥐에서 Hb repletion을 측정하고 표준 철분물질(i.e. 세 가지 농도의 ferrous sulfate)을 섭취시킨 쥐의 Hb repletion과 비교하여 제시한다. 식이철분 농도에 따른 Hb농도 증가량을 그래프로 그리면, 실험중인 철분제와 ferrous sulfate에 대한 두개의 curve가 얻어지고, 이 두 curve의 기울기 비율이 곧 연구중인 철분제의 bioavailability를 정량적으로 나타내는 것이다.

3-2. 한가지 동위원소를 이용하는 방법

⁵⁹Fe를 섭취시키고 몸안에서의 ⁵⁹Fe 분포를 평가하는 방법이다. ⁵⁹Fe를 이용한 최초의 연구에서 Hahn등(1939)은 빈혈 상태인 dog에게 ⁵⁹Fe(III)sulfate를 섭취시키고, 혈액 및 내장에서의 ⁵⁹Fe함량을 측정하였다. 인체를 대상으로 식품의 철분흡수율을 평가하는 연구(Moore 등, 1951)에서는 ⁵⁹Fe을 사용하여 식품의 intrinsic labeling을 시도하였다. 즉, 시금치등과 같은 채소를 ⁵⁹Fe이 함유된 물에서 키우고, 육류, 달걀등의 동물성식품은 동물에게 ⁵⁹Fe를 주사하므로써 intrinsic labeling을 실시하였으며, 이들 식품을 섭취케 한 후 2주간 혈액의 ⁵⁹Fe 함량을 평가하는 방법이다.

3-3. 두가지 동위원소를 이용하는 방법

3-3-1. 경구 또는 정맥투여

$$^{55}\text{Fe absorption}(\%) = \frac{^{55}\text{Fe activity in blood} \times ^{59}\text{Fe dose injected}}{^{55}\text{Fe dose orally administered} \times ^{59}\text{Fe activity in blood}} \times 100$$

3-3-2. 두가지 동위원소를 경구투여하는 방법: The double-isotope method

연구하고자 하는 식품 또는 식품성분을 ^{55}Fe 와 ^{59}Fe 로 intrinsic tagging을 한다. 대상자는 day 0에 한가지 동위원소로 tag된 식품을 섭취하고, day 1에는 다른 동위원소로 tag된 다른 식품을 섭취케 한 후 day 5에 혈액을 채취하고, 혈액내 동위원소의 비율을 계산하는 방법이다. ^{55}Fe 와 ^{59}Fe 를 이용하는 double-isotope 방법은 인체를 대상으로 다른 종류의 식품에 함유된 철분 흡수율을 평가하기 위해 널리 이용되어 온 방법이다.

3-4. Stable isotope을 이용하는 방법

Whittker 등(1991)은 4명의 건강한 여성을 대상으로 두가지 stable isotope(^{54}Fe 는 경구투여하고, ^{57}Fe 은 정맥주사 하였음)을 사용하여 혈액내 isotope 농도변화의 curve 면적을 측정하므로써 fractional absorption을 계산하였다.

$$\text{oral absorption}(\%) = (\text{AUC}_{\text{oral}} / \text{AUC}_{\text{iv}}) \times (\text{dose}_{\text{iv}} / \text{dose}_{\text{oral}}) \times 100$$

3-5. 철분 영양상태의 parameters

대부분의 endpoint 측정연구는 radioiron 또는 stable isotope이 RBC에 포함된 정도를 다루고 있다. 그 외에도 Hb, Ht, serum ferritin, serum iron, TIBC, transferrin saturation, MCV, free erythrocyte protoporphyrin등과 같은 hematological 지표들이 철분의 bioavailability를 평가하기 위해 이용될 수 있다.

3-6. Endpoint 측정치의 장단점

(1) Hb repletion bioassay의 장단점

취모델 이용의 장점:

- ① 실험이 용이하다
- ② 다량의 시료를 스크리닝할 수 있다
- ③ treatment에 따른 반응이 비교적 일정하게 나타난다
- ④ 빈혈취모델이 이용되는 경우 Hb repletion 대신 HRE를 계산하는 것이 더 선호되고 있다.

단점:

- ① Repletion bioassay에 의해 철분 bioavailability를 향상시키는 식품 또는 식품성분을 연구하는 것이 어렵다. 즉, 철분결핍 쥐의 경우 철분흡수율이 이미 매우 높아져 있는 상태이므로 철분의 bioavailability를 향상시키는 식이성분의 효과를 나타내기가 어렵게 된다.
- ② 쥐에서 얻은 결과를 사람에게 적용시키는 문제가 남아 있다.

(2) Double-isotope 연구의 장단점

장점:

- ① 인체를 대상으로 한다.

② 비교적 간단하다.

단점:

- ① Single meal을 기준으로 한 것으로서 whole diet을 섭취할 때와 다른 결과를 초래할 수 있다.
- ② 방사능에 노출되어야 한다.
- ③ 철분제에 따라서 extrinsic 철분과 intrinsic 철분의 체내 분포가 다르게 나타날 수 있다. 따라서 double-isotope 방법을 이용하는 경우 extrinsic tagging의 이용 가능성을 타진하고 연구를 시작해야 할 것이다.

(3) Stable isotope 이용시의 단점

- ① Stable isotope은 방사능을 내지 않으므로 whole-body counter를 이용할 수 없고, 따라서 iron retention을 정량화하기 위해 double-isotope 방법을 적용할 수 없다.
- ② isotope 및 측정장비가 고가이다.
- ③ 연구하고자 하는 식품에 충분한 양의 철분을 강화하고자 하는 경우 상대적으로 다량의 stable isotope이 필요하다. 이것은 식품시료의 철분함량을 유의적으로 증가시키게 되고, 결과적으로 철분의 흡수율을 저하시키게 될 것이다.

4. 수학적 모델을 이용한 철분 bioavailability의 예측

4-1. 두가지 수학적 모델

(1) Mosen등(1978)의 모델

Whole meal의 철분 bioavailability를 식이에 함유된 철분과 enhancing factor의 함량을 근거로 계산한 것이다(식이내 총철분, 헴철, 비헴철, 비타민 C, 육류+가금류+생선류의 함량).

(2) Wolters등(1993)의 모델

식이내 enhancing 또는 inhibiting factor가 식품내 철분의 bioavailability에 미치는 영향을 예측하기 위해 in vitro 자료들로부터 얻어진 수학적 모델이다. 단일 enhancing 또는 inhibiting factor, 또는 이들 factor가 복합적으로 철분의 bioavailability에 미치는 효과를 예측할 수 있다. 곡류제품, 과일류, 채소류, 견과류의 철분 bioavailability는 비타민 C를 enhancer로, 그리고 arabinose와 phytate을 inhibitor로 간주할 때 이 모델에 의해 가장 잘 예측된다.

장점:

철분흡수에 영향을 미치는 enhancing 및 inhibiting factor와 철분과의 상호관계에 관한 정보를 제공해 준다.

제한점:

- ① In vitro 용해도 및 투석을 실험결과들을 이용하여 공식이 만들어졌고, 따라서 철분의 bioavailability에 부분적으로 영향을 미치는 생리적 조건이 고려되지 않았다.

② 서로 경쟁관계에 있는 미량원소의 상호작용이 고려되지 않았다.

5. 결론

철분의 bioavailability를 정량화하기 위해서는 여러 가지 방법이 가능하고, 이들은 나름대로 장단점을 지니고 있다. 따라서 각 방법들의 가능성 및 제한점을 충분히 이해한 후 총체적으로 자신의 목적에 가장 적합한 방법을 선택해야 할 것이다. 대량의 스크리닝을 원할 경우 in vitro 용해도 연구가 적합할 것이며, 세포주모델을 이용하는 경우 비록 in vitro 연구이기는 하지만 소장수준에서 나타나는 효과를 좀 더 잘 반영해 줄 수 있을 것이다. 실험동물이 in vitro 연구와 병행하여 사용되는 경우 더 유용한 결과를 얻을 수 있다. 예를 들어 철분강화 연구를 위한 in vitro 용해도연구는 Hb-repletion bioassay와 일치되는 결과를 나타내 준다. 미량영양소의 첨가가 bioavailability에 미치는 효과를 연구하기 위해서는 Hb-repletion bioassay가 적합하고, Caco-2 세포주모델도 유용한 모델이 될 수 있다. 한편, Hb-repletion assay는 whole food에서 철분의 bioavailability를 평가하기 위하여 적절한 선택이 아니다. In vitro와 동물실험결과는 철분의 bioavailability를 예측할 뿐이고, 궁극적으로는 인체를 대상으로 한 균형연구가 이루어져야 하겠다.

참고문헌

- Hahn PF, Bale WF, Lawrence EO, Whipple GH (1939) Radioactive iron and its metabolism in anemia. Its absorption, transportation, and utilization. *J Exp Med* 69:739-753
- Heth DA, Hoekstra WG (1965) Zinc-65 absorption and turnover in rats. I. A procedure to determine zinc-65 absorption and antagonistic effect of calcium in a practical diet. *J Nutr* 85:367-374
- Jacobs A, Greenman DA (1969) Availability of food iron. *Br Med J* 1:673-676
- King JC, Reynolds WL, Margen S (1978) Absorption of stable isotopes of iron, copper, and zinc during oral contraceptive use. *Am J Clin Nutr* 31:1198-1203
- Manis JG, Schachter D (1962) Active transport of iron by intestine: features of the two-step mechanism. *Am J Physiol* 203:73-80
- Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen DR (1981) An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 34: 2248-2256
- Monsen ER (1974) Validation of an extrinsic iron label in monitoring absorption of nonheme food iron in normal and iron-deficient rats. *J Nutr* 104:1490-1495
- Moore CV, Dubach R (1951) Observations on the absorption of iron from foods tagged with radioiron. *Trans Assoc Am Physicians* 64:245-256
- Shackleton L, McCance RA(1936) The ionisable iron in foods. *Biochem J* 30:582-591
- Whittaker PG, Lind T, Williams JG (1991) Iron absorption during normal human pregnancy: a study using stable isotopes. *Br J Nutr* 65:457-463
- Wolters MGE, Diepenmaat HB, Hermus RJJ, Voragen AGJ (1993) Relation between in vitro availability of minerals and food composition: a mathematical model. *J Food Sci* 58:1349-1355