

HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

LECH WARTENBERG, BARBARA TRĘBUSIEWICZ

Metoda z kwasem 2-tiobarbiturowym jako wskaźnik zmian oksydacyjnych w tłuszczach

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynarii WSR we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr L. OGIELSKI

Próba z kwasem 2-tiobarbiturowym (TBA, KTB, TBS) — jeden z mierników w ocenie świeżości tłuszczów i produktów spożywczych zawierających tłuszcz, od szeregu lat coraz częściej znajduje zastosowanie w analizie żywności. Metoda ta jest głównie wykorzystywana w pracowniach naukowych, choć ostatnio bywa wprowadzana do laboratoriów zajmujących się masową kontrolą żywności.

Przydatność próby z kwasem 2-tiobarbiturowym (dalej w skrócie nazywanym KTB), w ocenie świeżości tłuszczów zwierzęcych skłoniła nas do opracowania niniejszego artykułu, gdyż w piśmiennictwie z zakresu higieny produktów zwierzęcych brak jest bliższych danych o niej, a przez to mało rozpowszechniona jest w pracowniach chemicznych laboratoriów weterynaryjnych inspektoratów sanitarnych.

Od czasu gdy Bernheim i wsp. (1) wykazali, że utleniony tłuszcz daje z kwasem 2-tiobarbiturowym czerwone zabarwienie, ukazało się na ten temat wiele prac w których zajmowano się następującymi zagadnieniami:

1. wyjaśnieniem chemizmu reakcji barwnej, zachodzącej między utlenionym tłuszczem a KTB i rozpoznaniem towarzyszących jej zjawisk (1, 11, 12, 14, 19, 23, 24).

2. modyfikacją metody np. przez zmianę warunków reakcji, zmianę odczynników, ich stężenia itd. (6, 15, 19).

3. adaptacją metody w odniesieniu do różnych gatunków tłuszczów, i produktów spożywczych, zawierających tłuszcz (3, 12, 15, 16, 25).

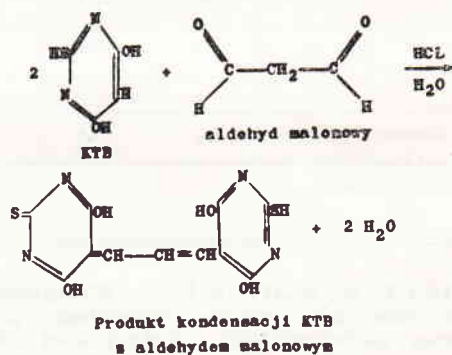
Czytelnik może spotkać się w piśmiennictwie z różnymi skrótami zastępującymi używanie długiej nazwy związku. Przyjęło się stosowanie skrótu angielskiego „TBA” — Thiobarbituric acid, choć nie ma przeszkód by używać skrótu polskie nazwy odczynnika „KTB”. W piśmiennictwie niemieckim używa się skrótu „TBS” (Thiobarbituricsäure) lub „TBZ” — Thiobarbituricsäurezahl.

Zasada próby z KTB polega na wywołaniu czerwonego barwnika, który jest produktem pochodnych związków autooksydacji nienasyconych kwasów tłuszczowych z kwasem 2-tiobarbiturowym, podczas ogrzewania w kwaśnym środowisku. Reakcja z KTB przebiega najlepiej w środowisku o pH od 1,6—2,6.

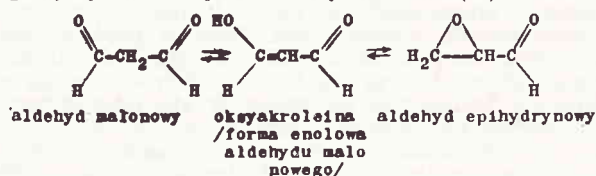
Czerwony barwnik, który przechodzi do fazy wodnej posiada charakterystyczne maksimum adsorpcji przy 535 m μ . Pomiaru stężenia roztworu barwnika dokonuje się w fotokolorymetrze przy użyciu filtra zielonego lub spektrofotometrze przy długości fali 535 m μ . Wartości ekstynkcji są jednocześnie ilościowym wskaźnikiem stopnia zjełczenia tłuszczu. Jak wynika z badań Budzyńskiej (2) i własnych doświadczeń, ta sama próba, w zależności od typu fotometru dać może różniące się między sobą wielkości ekstynkcji, dlatego należy podać warunki w jakich dokonano pomiarów.

Do dziś jeszcze dyskusyjną pozostaje sprawa pełnego wytłumaczenia chemizmu i warunków reakcji oraz wyjaśnienia, jakie związki zawarte w tłuszczu utlenionym reagują z KTB. Sądzone zrazu, że czerwony barwnik powstaje w reakcji KTB ze związkami karbonyłowymi (23), względnie z produktami rozkładu nienasyconych kwasów tłuszczowych, a szczególnie kwasu linolenowego (24), bądź jest też produktem kondensacji KTB i związku o członie trójwęglowym, posiadającym grupę ketonową lub aldehydową (1).

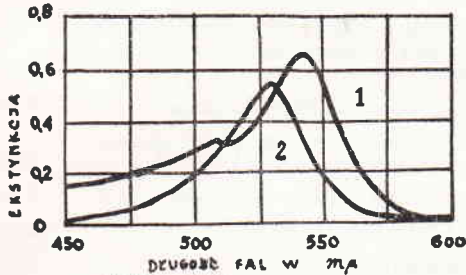
Prace ostatnich lat wskazują, że barwna reakcja jest związana z obecnością w zjełczalym tłuszczu aldehydu malonowego (12, 19, 27). Czerwony barwnik powstaje z kondensacji aldehydu malonowego z dwiema cząsteczkami KTB (cyt. za 8):



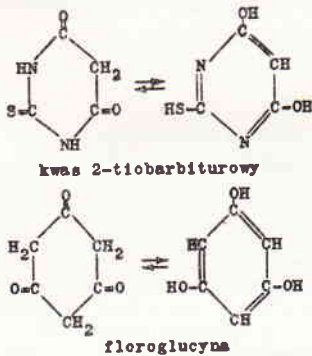
Za udziałem aldehydu malonowego w reakcji przemawia również fakt, że aldehyd malonowy i jego postać enolowa, oksyakroleina jest formą tautomeryczną aldehydu epihydrinowego; jednego z produktów utleniania tłuszczów, który w reakcji z flo-roglucyną także daje czerwony barwnik (19):



Bliski związek między reakcją zachodzącą w próbie na aldehyd epihydrinowy (próba Kreisa), a reakcją w próbie z KTB został wykazany przez Pattona i wsp. (11). W obu reakcjach powstają czerwone barwniki, których maksima adsorpcyjne leżą blisko siebie (maksimum adsorpcyjne barwnika powstałego w próbie z floroglucyną = 542 — 544 mμ, maksimum adsorpcyjne barwnika z próby KTB = 532 mμ (rys. 1). Bliskie związki w zakresie charakterystyki spektralnej wynikają również ze zbliżonej budowy strukturalnej KTB i floroglucyny, co widać przy porównaniu obu ich form tautomerycznych:



Rys.1. Krzywe absorpcyjne barwników powstałych w próbie Kreisa (1) i reakcji KTB z aldehydem malonowym (2) (wg 19)



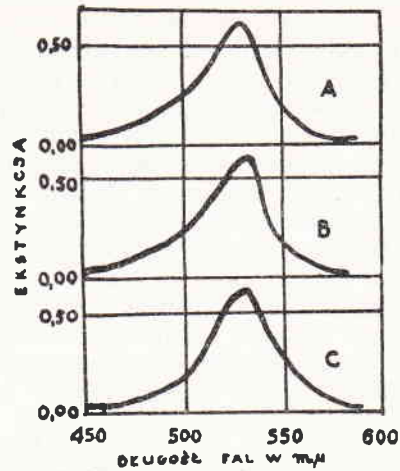
Chemizm przebiegu reakcji z KTB był również przedmiotem badań Jenningsa i wsp. (9), którzy porównywali spektra barwników powstających w reakcji z czystym aldehydem malonowym, zjeżdżałym tłuszczem mlecznym i 2-sulfanilamidopyrymidyną, dającą także odczyn barwny z KTB. Badania te, podobnie jak badania Pattona i wsp. (12) potwierdziły, iż barwniki powstające w reakcji KTB z tymi związkami oraz zjeżdżałym tłuszczem mają zbliżoną ekstynkcję (rys. 2).

Pierwotna metoda była wielokrotnie modyfikowana, głównie w celu przystosowania jej do różnych tłuszczów i produktów spożywczych. Doskonalona była również technika wykonywania próby (19). Modyfikacje te w zależności od sposobu wykonania można podzielić na kilka grup:

1. Zasada wykonania polega na uwolnieniu aldehydu malonowego z tłuszczu przy pomocy kwasu i oddestylowaniu aldehydu z parą wodną. Barwnik powstaje podczas podgrzewania destylatu z KTB w łaźni wodnej o temp. 100°C (15, 20, 21).

2. Modyfikacja polega na podgrzaniu tłuszczu lub produktu bezpośrednio z KTB w łaźni wodnej lub nad płomieniem. Czerwono zabarwioną fazę wodną oddziela się następnie od fazy tłuszczowej (3, 12, 19, 25).

3. Postępowanie wstępne jak w pkt. 2. Powstały barwnik wmywa się dalej jednym z wyższych alkoholi (np. alkoholem amylovym). Pomiar ekstynkcji barwnika wykonuje się w roztworze alkoholu (5, 6).



Rys.2. Porównanie krzywych absorpcyjnych barwników powstałych w reakcji KTB z 2-sulfanilamidopyrymidyną (A), aldehydem malonowym (B) i utlenionym tłuszczem mlecznym (C) (wg 9)

W modyfikacjach należy liczyć się ze stratami w zawartości aldehydu malonowego, gdyż w następstwie destylacji, wirowania lub wytrąsania pewne ilości aldehydu utleniają się do kwasu malonowego, przez co wyniki zostają zaniżone.

Podczas badania niektórych produktów spożywczych powstają przeszkody utrudniające odczyt. Zaburzenia w pomiarach wywołac mogą żółte barwniki, które są produktami reakcji różnych ciał z KTB. Nałożenie się żółtej barwy z czerwoną daje pomarańczowo-łososiowe zabarwienie roztworu. Dodatnią reakcję z KTB wywołać mogą również węglowodany dlatego metoda nie nadaje się do wykonania bezpośrednio na produktach zawierających te związki (4, 24, 25). Niekiedy mogą pojawić się zmeńnienia pochodzące od badanego produktu. Dla niektórych produktów spożywczych zostały opracowane metody usuwania tych przeszkód (4, cyt. za 13).

Wielu autorów podkreśla znaczenie próby z KTB jako dobrego i praktycznego wskaźnika służącego do oznaczania stopnia świeżości szeregu tłuszczów i produktów bogatych w tłuszcz. Wykonane badania na smalcu wieprzowym (15), mrożonej wieprzowinie (23), maśle (16), produktach rybnych (25), tłuszczu drobiowym i koncentraty rosołowych z drobiu (8), olejach jadalnych (2), margarynie i ceriesie (10), ciastach kruchych (18) itd. wykazały zależność korelacyjną między wzrostem stopnia ekstynkcji w próbie z KTB, a postępowaniem jęczenia, kontrolowanym innymi metodami.

Wyniki uzyskane w próbie z KTB posiadają wartość przede wszystkim w rozpoznawaniu zmian oksydacyjnych w fazie początkowej jęczenia tłuszczów. W tym okresie istnieje wyraźna zgodność między wskaźnikiem ekstynkcji a uchwytymi zmianami organoleptycznymi i liczbą nadtlenkową oraz karbonylową (5, 12). Później zgodność ta zaciera się, a wskaźniki ekstynkcji ulegają nawet obniżeniu (19).

Próba z kwasem 2-tiobarbiturowym nie daje zadawalających wyników ze wszystkimi produktami. Dodatni lub ujemny wynik próby warunkuje prawdopodobnie obecność w glicerydach kilkakrotnie nienasyconych kwasów tłuszczowych, przede wszystkim kwasu linolenowego. Uzyskano bowiem w doświadczeniach zbieżne wyniki wzrostu nadtlenków i wzrostu natężenia barwy w próbie z KTB przy śledzeniu postępu zmian oksydacyjnych w kwasie linolenowym. Natomiast kwas linolowy i olejowy, badane w tych samych warunkach nie dały wyników zgodnych. Zbliżone wyniki uzyskano badając estry nienasyconych kwasów tłuszczowych. W przypadku reakcji estrów kwasów linolenowego i linolowego z KTB uzyskano wyniki proporcjonalne do wzrostu innych wskaźników utleniania, podczas gdy w estrach kwasu olejowego zbieżności tych nie stwierdzono (cyt. za 19, 24).

Zmodyfikowana przez Sedlačka i Rybina (15) metoda destylacyjna była stosowana do oznaczania świeżości smalcu świńskiego i olejów roślinnych. Opis i wykonanie w pozycjach piśmiennictwa (2, 15, 26).

Z wielu modyfikacji na uwagę zasługuje metoda bezpośredniego działania KTB na tłuszcz wg Dzikowskiego (6). Polega ona na takim doborze rozpuszczalników, który umożliwia wykonanie reakcji w jednorodnym roztworze o bardzo małej zawartości wody.

Próba z KTB została wprowadzona do normy zakładowej przemysłu chłodniczego jako obowiązująca przy ocenie świeżości tłuszczu potraw mrożonych (Min. Przem. Spoż. i Skupu Zjednoczenie Chłodni Składowych ZN-67-MPSS/ch/44 — Mrożonki. Pobieranie prób i metodyka badań potraw mrożonych (26). Norma ta wprowadza jednocześnie ocenę świeżości potraw mrożonych, której podstawą jest ekstynkcja wyrażona w stopniach zjełczenia.

Sedlaček i Rybin (15) wskazują na przydatność metody z KTB w śledzeniu postępu jełczenia smalcu wieprzowego we wczesnych okresach (tab. 1). Dla smalcu o różnym stopniu świeżości autorzy ci ustalili graniczne wartości ekstynkcji. Proponują oni również zastąpienie wskaźnika ekstynkcji barwnymi wzorcami roztworów safraniny w różnym stężeniu.

Ci sami autorzy badali przydatność metody z KTB do oceny stopnia rozkładu oksydacyjnego masła (16). Wyniki (stopnie ekstynkcji) w zestawieniu ze zmianami organoleptycznymi w maśle zamieszczone są w tab. 2.

Ocenę wartości próby z KTB w zastosowaniu do tłuszczu kurzego i koncentratów rosółowych z drobiu dokonali Grabowski i wsp. (8).

Wyniki analizy tych produktów wskazywały na możliwość uchwycenia zmian w ich jakości mierzonych przy pomocy próby z KTB, ich porównania uzyskanych danych z oceną organoleptyczną (tab. 3).

Tab. 1. Zależność między wartością ekstynkcji w próbie z KTB, a zmianami organoleptycznymi w smalcu

Smalec (organoleptyczna ocena świeżości)	Ekstynkcja
Świeży, odpowiadający jakości I	0,025
Przechowywany 4 tyg., odpowiadający jakości I	0,072
Przechowywany 3 tyg., odpowiadający jakości I	0,091
Przechowywany 3 tyg., odpowiadający jakości I, lecz o słabej zmianie smaku i zapachu	0,125
Smalec o podobnych właściwościach	0,184
Smalec o zapachu i smaku dłużej składowanego, odpowiadający jakości II	0,225
Smalec o słabym smaku olejowym	0,331
Smalec o nikłych cechach zjełczenia	0,480
Smalec zjełczały	0,634

Tab. 2. Zależność między wartością ekstynkcji w próbie z KTB a zmianami organoleptycznymi w maśle (16)

Masło (ocena organoleptyczna świeżości)	Ekstynkcja z KTB
Świeże	0,010
Przechowywane	0,013
Bardzo słabe objawy zjełczenia	0,066
Słabe objawy zjełczenia	0,109
Zjełczałe	0,181
Silnie zjełczałe	0,343

Tab. 3. Zależność między wartością ekstynkcji w próbie z KTB a zmianami organoleptycznymi w tłuszczu kurzym (8)

Topiony tłuszcz kurzy (organoleptyczna ocena świeżości)	Wartość wskaźnika KTB
Świeży	do 0,051
Świeży o lekkim gorzkawym posmaku	0,066—0,219
Lekko zjełczały	0,328—0,459
Zjełczały	0,500—0,810
Silnie zjełczały	do 1,550

Próba z KTB jest również przydatna do oceny stopnia świeżości tłuszczu mrożonej wieprzowiny (23). Zamrożenie i przechowywanie mięsa w temp. znacznie poniżej 0°C nie chroni tłuszczu śródmięśniowego przed utlenieniem, gdyż procesy autooksydacyjne rozwijają się w nim dalej, choć znacznie wolniej (22).

Na podstawie badań Turnera i wsp. (23) okazało się, że metoda z kwasem 2-tiobarbiturowym jest znacznie bardziej czułą w rozpoznawaniu wczesnych stadiów jełczenia w mrożonej wieprzowinie, które ujawniają się typowym „smakiem mrożonym” (freezer taste) w porównaniu z próbami na zawartość nadtlenków. Według badań tych autorów ist-

nieje mała zależność między postępowaniem jęlczenia wykrywaniem organoleptycznie, a zawartością nadtlenuków.

Zawartość nadtlenuków, w miarę upływu czasu przechowywania mięsa mrożonego ulegała znacznym wahaniom, nie odzwierciedlając tym samym postępu zmian oksydacyjnych. Test z KTB wykazywał natomiast korelację między natężeniem barwy, a wzrastającym nasileniem zmian zapachowych w takim mięsie.

Zmiany w zawartości nadtlenuków i wielkości ekstynkcji w próbie z KTB w mrożonej wieprzowinie ilustruje tabela 4.

Tab. 4. Korelacja między wartościami ekstynkcji w próbie z KTB, a zawartością nadtlenuków w mrożonej wieprzowinie (liczba nadtlenukowa wyrażona w milirównoważnikach nadtl./kg tłuszczu (23))

Czas przechowywania próbek w miesiącach	Ekstynkcja z KTB	Liczba nadtl.
4	0,224	0,24
10	0,277	0,37
11	0,274	0,54
13	0,335	0,37
14	0,342	0,86
15	0,350	0,44
16	0,438	0,53
17	0,443	0,57

Fridriksdottir zastosowała test z KTB do oznaczania stopnia zjęlczenia tłuszczu mrożonych śledzi (cyt. za 25). Autorka wskazała na trudności w badaniu świeżości tłuszczu tego produktu, ze względu na pojawiające się jednocześnie podczas analizy barwniki innego pochodzenia, uniemożliwiające pomiar stężenia czerwonego barwnika.

Kolejne prace innych badaczy nad przystosowaniem metody do badań produktów rybnych dały zadowalające rezultaty. Opracowane przez Yu i wsp. (25) modyfikacja jest przydatna do badania zmian oksydacyjnych w tłuszczu ryb mrożonych, konserw rybnych, olejów rybnych i innych przetworów z ryb. Również i ci autorzy podkreślają istnienie wyraźnej zależności między zmianami organoleptycznymi, a wskaźnikiem KTB w tych produktach.

Budzyńska (2) zajmowała się oceną przydatności metody z KTB do badania zmian oksydacyjnych w niektórych olejach jadalnych. Porównanie wartości wskaźnika tiobarbiturowego z wynikami przeprowadzonych równolegle analiz innych wskaźników świeżości wykazało prostą zależność między wartościami liczby nadtlenukowej, a natężeniem stopnia ekstynkcji w próbie. Z porównania tych zależności autorka próbowała wyznaczyć wartości graniczne wskaźnika KTB dla badanych olejów.

Przegląd piśmiennictwa omawianego zagadnienia, a w szczególności dane umożliwiające śledzenie postępu utleniania tłuszczów w oparciu o próbę KTB wskazują, że metoda ta uzupełnia powszechnie stosowane metody służące do oceny stopnia świeżości tłuszczów i produktów spożywczych bogatych w tłuszcz. Było by więc celowe wykorzystywanie jej na szerszą skalę również i dlatego, że metody standardowe obowiązujące w normach (liczba nadtlenukowa, stopień kwasowości, próba Kreisla, próba Täufela-Thalera), mają bądź ograniczony zakres, bądź obciążone są pewnymi błędami.

Piśmiennictwo

- Bernheim F., Bernheim L. I., Wilbur K. M.: J. Biol. Chem. 174, 257, 1948.
- Budzyńska J.: Roczn. PZH, XIII, 525, 1962.
- Cerna E.: Prumysl. Potravin, 7, 182, 1956.
- Caldwell E. F., Gregory B.: Food Technology, 9, 185, 1955.
- Dunkley W. L.: J. Dairy Sci. 34, 1064, 1951.
- Dzikowski J.: Roczniki PZH, T. IX, 461, 1958.
- Fridriksdottir S.: Cornell Univ. Library, Ithaca N. Y. 1953.
- Grabowski T., Weislo H., Niewiarowicz A.: Roczniki Techn. i Chemii Żywności, T. VI, 43, 1960.
- Jennings W. G., Lunkley W. L., Rieber H. G.: Food Res. T. 20, 15, 1955.
- Nikonorow M., Homrowski S., Łuczak A., Niedzielska M.: Roczn. PZH T. XIX, 171, 1968.
- Patton S., Keeney M., Kurtz G. W.: J. Anim. Oil Chem. Soc. 28, 391, 1951.
- Patton S., Kurtz G. W.: J. Dairy Sci. 34, 669, 1951.
- Pietrzyk H.: Metody oceny świeżości i trwałości tłuszczów jadalnych (skrypt), Częstochowa, 1957.
- Sinnhuber R. O., Yu T. C.: Food Technology, 1958, T. 12, 9.
- Sedlaček B., Rybin R.: Prumysl. Potravin 8, 44, 1957.
- Sedlaček B., Rybin R.: Fette, Seifen, Anstrichmittel 2, 134, 1959.
- Struck G. M., Olson F. L.: Food Technology T. 8, 326, 1954.
- Szczepański L., Graczyk J., Marczyk H.: Roczn. PZH T. XIII, 85, 1962.
- Schmidt H.: Fette, Seifen Anstrichmittel, 2, 127, 1959.
- Stidwell S. G., Salvin H., Mitchell J. M.: J. Am. Oil Chem. Soc. 32, 13, 1955.
- Tappel A. L., Knapp F. W.: Food Res. 22, 287, 1957.
- Tappel A. L.: Food Res. 18, 560, 1953.
- Turner E. W., Payntner W. D., Montie E. J., Bessert M. W.: Food Technology, 8, 326, 1954.
- Wilbur K. M., Bernheim F., Shapiro O. W.: Arch. Biochem. 24, 305, 1949.
- Yu T. C., Sinnhuber R. O.: Food Technology, 11, 104, 1957.
- ZN-67-MPSS/ch/44.

Adres autora: doc. dr Lech Wartenberg, Wrocław, ul. Findera 7a.

CHUNG G. Z.: Zakażenie leptospirami u klinicznie zdrowych prosiąt. (Leptospirosis infection of apparently normal pigs). Aust. Vet. J., 44, 315—319, 1968 (7).

283 klinicznie zdrowe prosięta dostarczone do rzeźni w Birsbane badano metodą aglutynacji z surowicą krwi oraz metodą bakteriologiczną posiewów moczu na zakażenie leptospirami. Z moczu 7 sztuk wyizolowano sześć szczepów. L. pomona i jeden szczep L. hyos. Surowica od 36,5% prosiąt zawierała aglutyniny przeciwko 1—22 serotypom leptospir. Większość surowic reagowała w testach aglutynacji z wieloma serotypami w mianach 1:10 tys., co świadczyło o zakażeniu L. pomona w 43 przypadkach. L. bratislava w 21, L. hyos w 8, L. icterohaemorrhagiae w 7, L. autumnalis w 2 i L. ballum w jednym przypadku. Wysokie miano swoistych aglutynin świadczące o zakażeniu kilkoma serotypami obserwowano u 5,7% prosiąt, dwoma serotypami u 10%, a trzema serotypami u jednej sztuki. Miano przeciwciał przeciwko L. pomona wynosiło u dwóch sztuk 1:30 tys.

Z. G.