

# Vliv hemoglobinu na oxidaci vepřového sádla.

## I. Sledování průběhu oxidace

P. KOČOVÁ, M. PAZLAR, Z. JORDÁKOVÁ, J. POKORNÝ

U živočišných tuků je velké nebezpečí žluknutí, protože tyto tuky neobsahují přirozené antioxidanty. Naopak oxidace těchto tuků může být urychlována přítomností katalyzátorů, z nichž nejvýznamnější jsou deriváty hematitu, hlavně hemoglobin a myoglobin. Tyto látky obsahují jako účinnou prooxidační složku komplexně vázané železo.

Např. podle Tapela (1) se v tukové tkáni vepřů katalyzuje oxidace hematitovými deriváty, takže probíhá mnohem rychleji, než ve vytaveném sádle, které tyto látky neobsahuje. V dehydratovaných emulzích sojového oleje hemoglobin a myoglobin prokázal prudký prooxidační účinek, který se projevil ve vzestupu hodnot peroxidového čísla (2).

V koloidním roztoku linoleátu byla rychlost oxidace úměrná druhé odmocnině koncentrace hematitového katalyzátoru. Hemoglobin, myoglobin, cytochrom C a hematin mají zhruba stejné účinky (3, 4). V uvedených systémech, obsahujících větší množství nelipidických složek je katalytický účinek hematinových derivátů výraznější než v čistém tuku (2), jak jsme dokázali pro sádlo v jiné práci (5).

Katalytické působení hematinových derivátů si můžeme vysvětlit na základě radikálového mechanismu oxidace tuků. Přítomné radikály vyvolávají řetězovou reakci, při níž vznikají z nenasycených mastných kyselin hydroperoxidy. Hematinové deriváty štěpí tyto hydroperoxidy (7) za tvorby radikálů jak je vidět ze schématu 1.

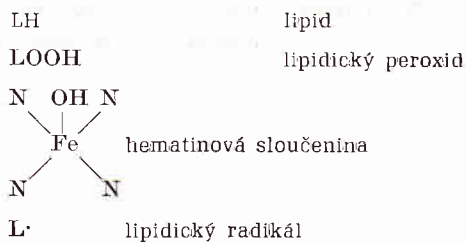
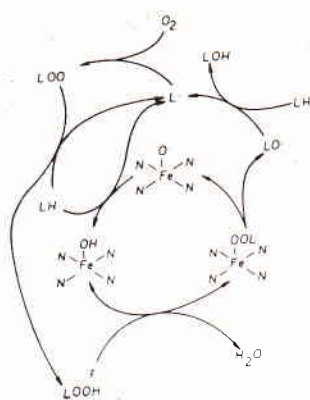
Není vyloučeno, že další radikály v oxidovaném tuku mohou vznikat při přechodu železa z trojmocného na dvojmocné (8).

Protože při rozkladu hydroperoxidu hematinovými látkami ubývá konjugovaných dvojných vazeb, předpokládá se reakce:



Následovnými reakcemi mohou vznikat karbonylové deriváty.

V přítomnosti hematinových derivátů vzniká mnoho polyměrů, pravděpodobně kombinací radikálů, vznikajících rozkladem peroxidů nebo adicí radikálů na dvojně vazby. Nálezy dokazují, že přítomnost hemoglobinu a dalších hematinových derivátů může značně ovlivnit průběh oxidační reakce a poměr obsahu různých reakčních produktů. Z tohoto důvodu jsme studovali působení různých koncentrací hemoglobinu na různé druhy vepřového sádla.



Schema 1. Schema předpokladaného mechanismu iniciace oxidace lipidů hematinovými sloučeninami

### Materiál a metodiky

Pro analýzy byly vybrány 4 vzorky vepřového sádla. Dva vzorky (A a D) bylo sádlo provozně vytavené, dva vzorky (B a C) byly laboratorně připraveny. Výchozí hodnoty jednotlivých analýz pro tyto vzorky jsou uvedeny v tab. 1.

Suspenze sádla s odváženým množstvím hemoglobinu byly skladovány v 1 cm vrstvě při 60 °C za volného přístupu kyslíku pouze difuzí a v pravidelných intervalech byly odebírány vzorky.

Použitý hemoglobin byl preparát sublimačně sušený podle Ansona [9].

### Analytické metody

Peroxidové číslo bylo stanoveno jodometricky [10], hodnoty jsou uvedeny v mval/1 kg.

Číslo kyselosti bylo stanoveno ve směsi chloroformu a ethanolu a je vyjádřeno v mg KOH na 1 g vzorku.

Jodové číslo bylo stanoveno podle Hanuše [11].

Obsah kyseliny linolové byl stanoven po alkalické isomeraci UV—spektrofotometrií [12].

Benzidinové číslo bylo stanoveno v prostředí chloroformu a kyseliny octové po reakční době 40 min. při 60° a proměřením při 430 nm [13]. Výsledky jsou vyjádřeny v extinkcích 1 %ního roztoku. Benzidin byl k analýze přečištěn trojnásobnou rekrystalizací z horké vody; kyselina octová byla zbavena karbonylových derivátů 2 hodinovým převařením s benzidinem a destilací. Benzidinové činidlo je nutno připravovat každý den.

Thiobarbiturové číslo bylo stanoveno v prostředí chloroformu, isopropanolu a n-butanolu po 24 hodinové reakční době při 60 °C bez předchozí destilace a proměřením při 540 nm. Výsledky jsou vyjádřeny v extinkcích 1 %ního roztoku [14].

Chloroform byl pro stanovení přečištěn několikanásobným vytřepáním vodou, odstraněním chloridů dusičnanem stříbrným a těsně před stanovením byl předestilován.

Podmínky spektrálního měření jsou uvedeny v tabulce č. 2. Použitý n-heptan byl výrobek fy Apolda—NDR, přečištěný vytřepáním se směsí kyseliny sírové a manganistanu draselného a destilací na koloně.

Tab. 2.

Vzorek č.	A	D	B	C
Číslo kyselosti mg KOH	0,71	1,25	0,71	1,02
Jodové číslo %	54,7	56,0	53,6	52,9
Obsah kys. linolové %	5,3	6,0	4,1	4,4
Obsah monoenových kyselín %	49,8	50,3	51,6	51,0
Obsah nenasycených kyselin %	44,6	43,0	43,2	44,0
Peroxidové číslo mval/kg	7,5	1,2	0,7	1,0
Benzidinové číslo $E_{1\%}^{1\text{cm}}$	0,027	0,003	0,005	0,013
Thiobarbiturové číslo $E_{1\%}^{1\text{cm}}$	0,054	0,044	0,031	0,025

Tab. 2.

Přístroj		
UNICAM SP. 700		
Detektor Fotonásobič	Citlivost 4	Tlumení 3
Rychlost snímání 2,2 cm $^{-1}$ /min.	Posun papíru 762 mm/hod.	Vlnočet 48 až 30 cm $^{-1}$
Štěrbina auto	Lampa deuterium	Rozsah měření extinkce 0—1,1 0,9—2
Optika hranol	Kyvety křemen 10 mm	Rozpouštědlo n-heptan

Podmínky spektrálního měření

### V ý s l e d k y

Vliv hemoglobinu jsme sledovali u 4 vzorků sádla. Vedle sádla nekatalyzovaného jsme oxidovali sádlo za přídavku 1, 10 a 100 mg hemoglobinu do 100 g sádla.

Výsledky jsou uvedeny v grafech 1—8.

**Vzorek A** (provozní sádlo I. jakost) byl skladován delší dobu (56 dní), abychom mohli posoudit i pozdější stadia oxidace. U ostatních vzorků jsme sledovali oxidaci jen krátkodobě protože pro praktické účely mají význam jenom počáteční stadia oxidace.

První etapa, tzv. indukční perioda, trvala u vzorku A 10,6 až 11, 6 dní, u vzorku B 5,2 až 8,4 dní, u vzorku C 6,8 až 9,9 a u vzorku D 1,5 až

2,0 dnů koncentrace hemoglobinu. Během indukční periody docházelo jen k pomalé oxidaci, takže výsledky chemických i spektrálních metod se měnily jen v nepatrné míře.

Po skončení indukční periody probíhá stadium rychlé oxidace, v kterém rychle přibývá oxidačních produktů a rychle sa zvětšuje extinkční koeficient a dosahuje maxima. Růst různých analytických hodnot postupuje souběžně, takže existují průkazné korelační vztahy mezi jednotlivými hodnotami.

U vzorku B, C a D jsme v tomto stadiu pokus přerušili, protože v potravinářské praxi se hlouběji oxidované tuky vyskytují zřídka. U vzorku A, který byl sledován delší dobu, jsme pozorovali u všech koncentrací hemoglobinu zajímavý úkaz, že řada hodnot po dosažení maxima mírně poklesla a při dalším skladování za zvýšené teploty došlo k dalšímu růstu u všech chemických hodnot. Podobný průběh změn analytických hodnot při oxidaci byl pozorován při našich pokusech u celé řady rostlinných olejů a čistých látek, např. methyloleátu. U spektrálních dat byl další průběh značně komplikovaný. Všeobecně lze říci, že v tomto posledním stadiu oxidace, hodnoty extinkčních koeficientů při kratších vlnových délkách 220–240 nm klesají, zatímco při delších vlnových délkách 260–280 nm stále rovnoměrně rostou. Na extinkci v první oblasti se podílejí konjugované dienové vazby, které vznikají oxidací kyseliny linolové a jejichž množství se v průběhu dalšího skladování zmenšuje s dalšími oxidačními reakcemi. Maximu ve druhé oblasti odpovídají karbonylové deriváty, hlavně substituované aldehydy a ketony, které vznikají rozkladem peroxidů a v hluboce oxidovaných tucích se hromadí.

Z dosažených výsledků plyne, že hemoglobin nejeví významný vliv na rychlost oxidace, ale neovlivnil ani charakter průběhu oxidačních změn.

Na obrázcích 1–8 je graficky znázorněn průběh změn zjišťovaných analytických hodnot.

Jednotlivé vzorky sádla jsou označeny A–D, indexy značí množství přidaného hemoglobinu 0–100 mg/100 g.

Na horních obrázcích jsou zachyceny výsledky spektrálních měření:

———— 220 nm  
 - - - - - 226 nm  
 - . - . - . 232 nm  
 - . . - . - . 266 nm

Hodnoty jsou uvedeny v extinkcích roztoků o obsahu 100 mg ve 100 ml.

Na dolních obrázcích jsou zachyceny výsledky chemických metod:

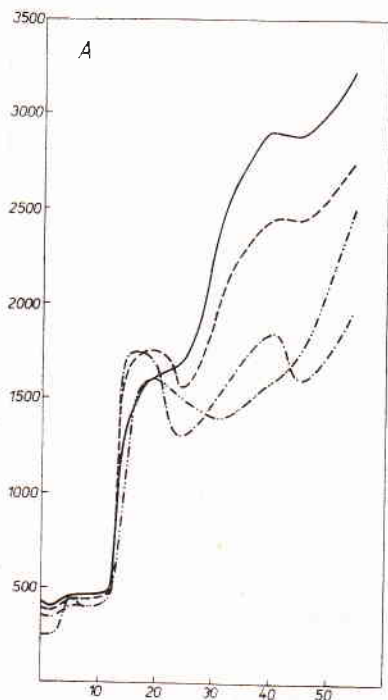
———— PC mval/1 kg  
 - . - . - . BČE<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>  
 - - - - - TBAE<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>  
 - . . - . - . ČK mg KOH na 1 g vzorku

V obou případech na ose pořadnic je zachycen časový průběh ve dnech.

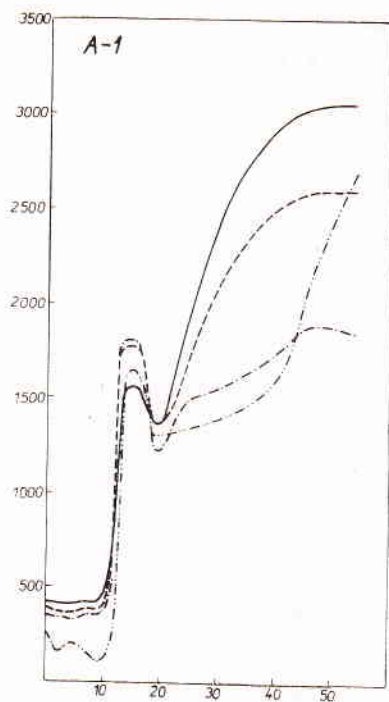
Použité moduly analytických hodnot:

Vzorky

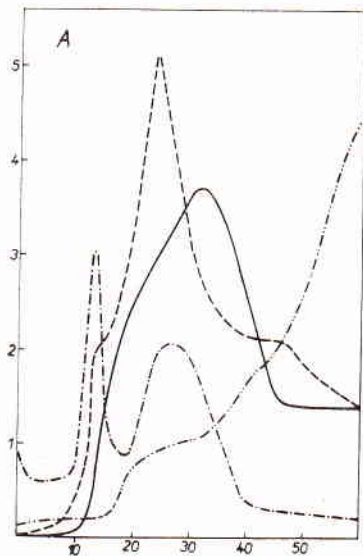
A	PC	: 100	1 . 10 <sup>-2</sup>
	B	: 20	5 . 10 <sup>-2</sup>
	TBA	: 5	2 . 10 <sup>-1</sup>
	ČK	: 10	1 . 10 <sup>-1</sup>
B	PC	: 100	1 . 10 <sup>-2</sup>
	B	: 10	1 . 10 <sup>-1</sup>
	TBA	: 5	2 . 10 <sup>-1</sup>
	ČK	: 2	5 . 10 <sup>-1</sup>



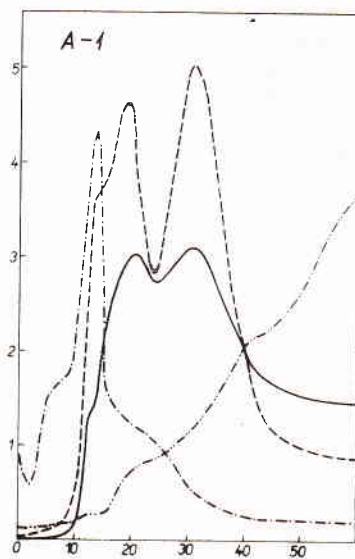
Graf 1a.



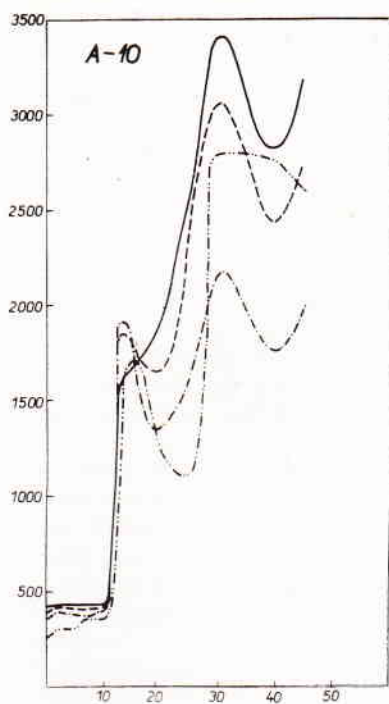
Graf 1b.



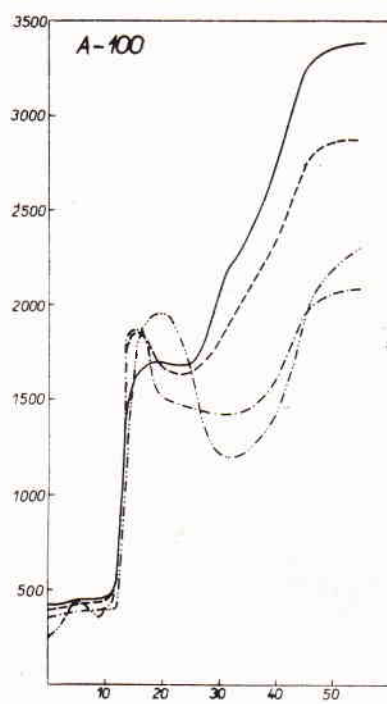
Graf 1c.



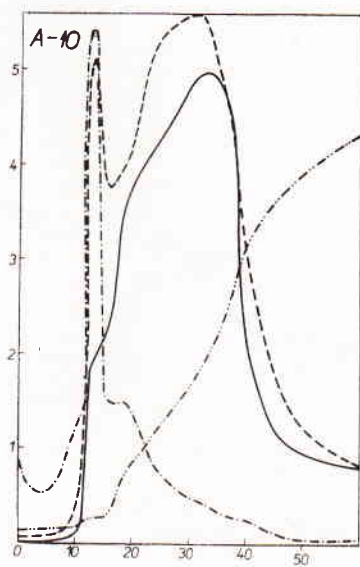
Graf 1d.



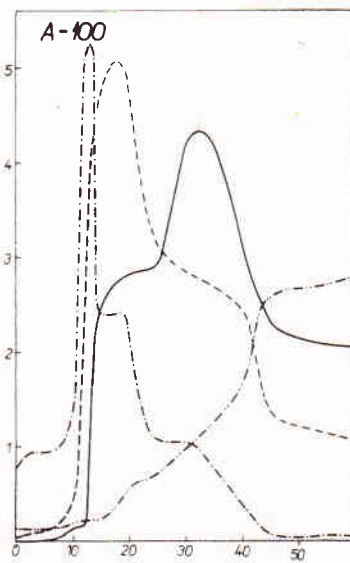
Graf 2a.



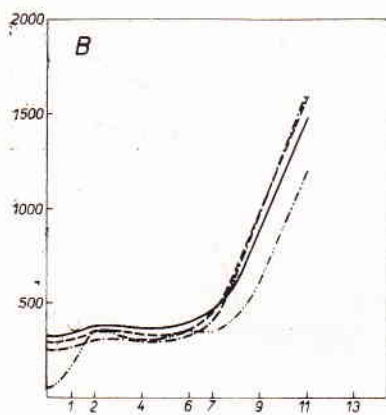
Graf 2b.



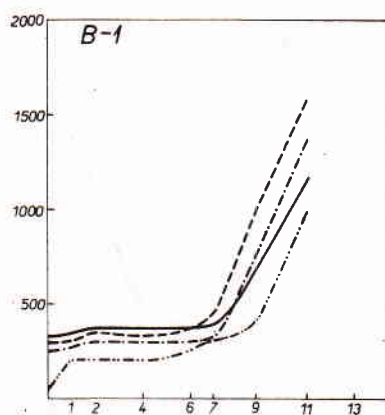
Graf 2c.



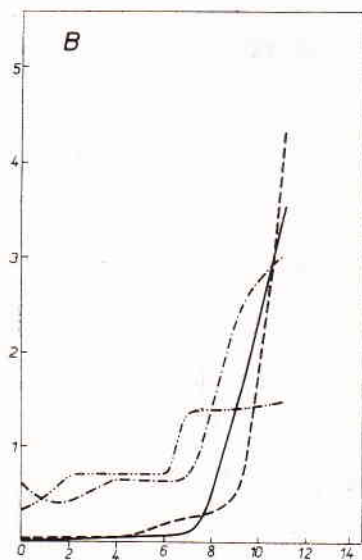
Graf 2d.



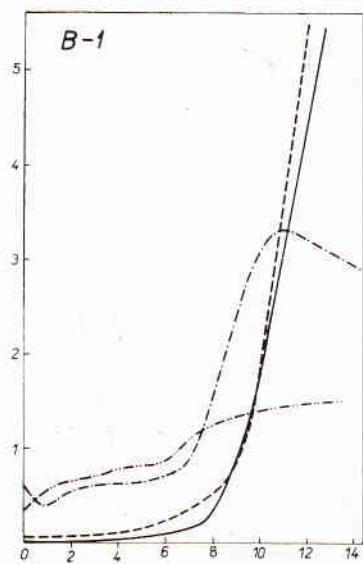
Graf 3a.



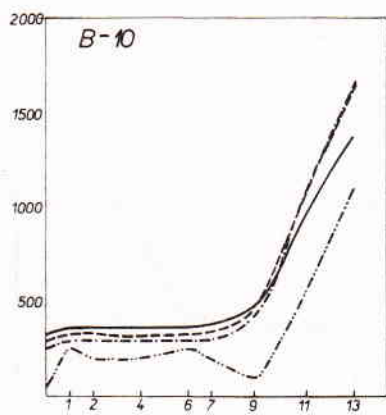
Graf 3d.



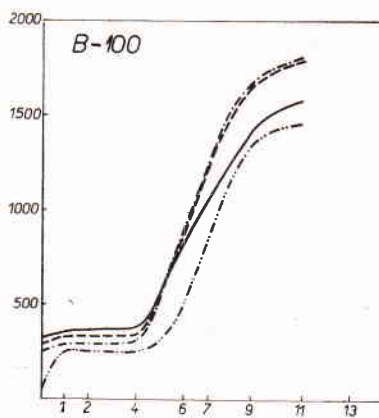
Graf 3c.



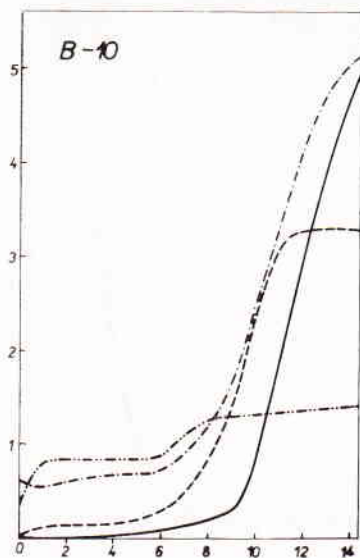
Graf 3b.



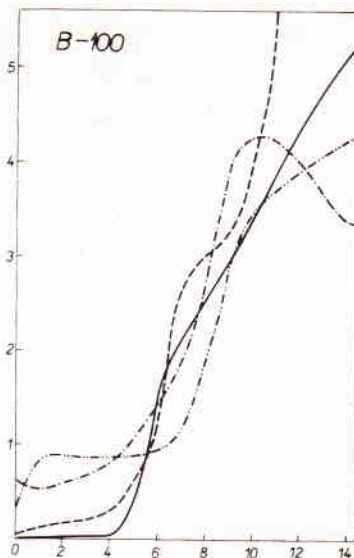
Graf 4a.



Graf 4b.

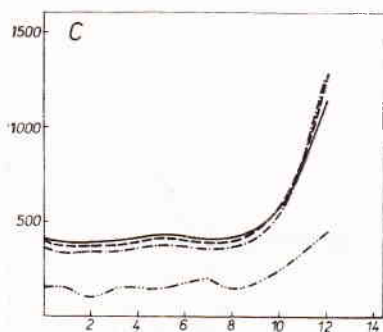


Graf 4c.

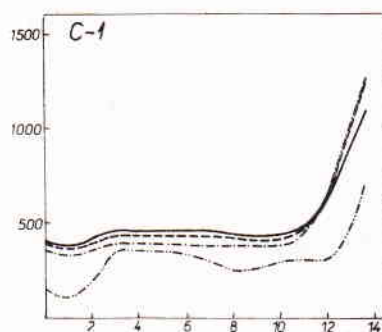


Graf 4d.

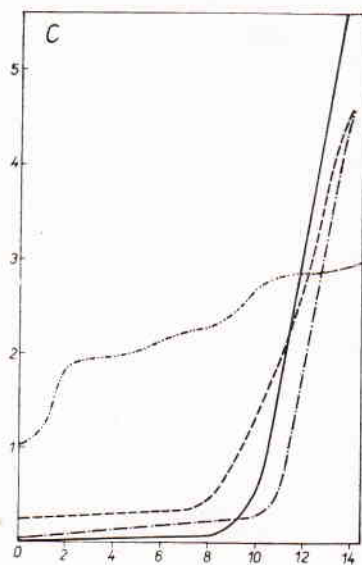




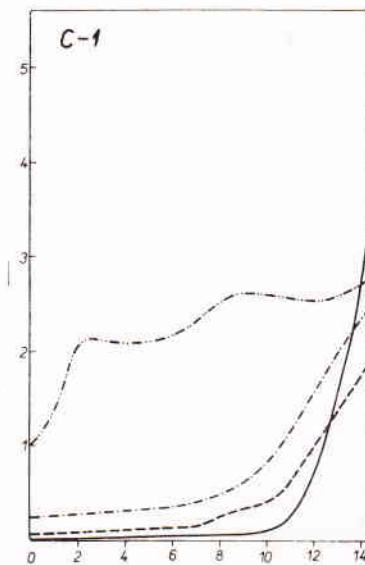
Graf 5a.



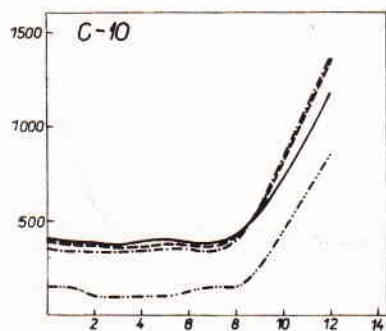
Graf 5b.



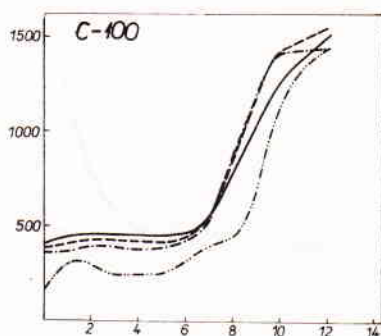
Graf 5c.



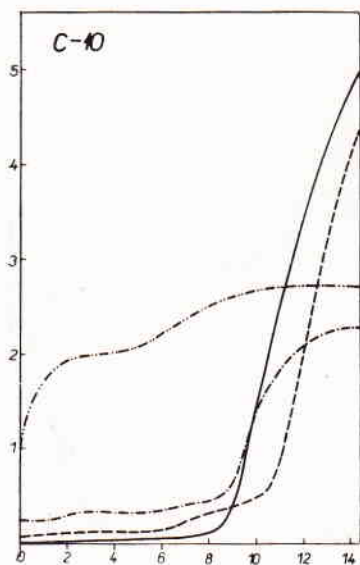
Graf 5d.



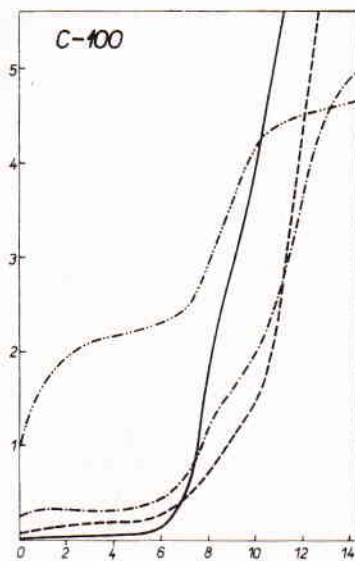
Graf 6b.



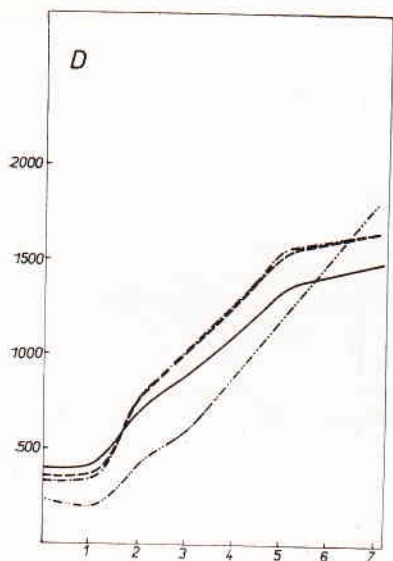
Graf 6a.



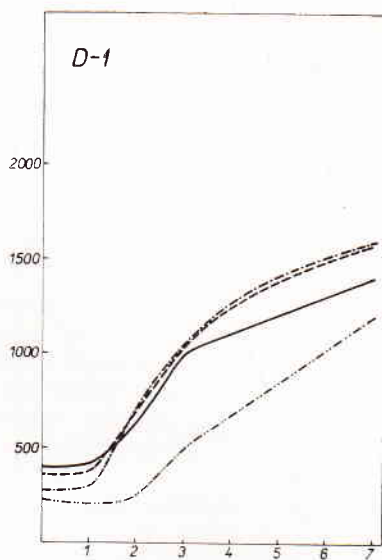
Graf 6c.



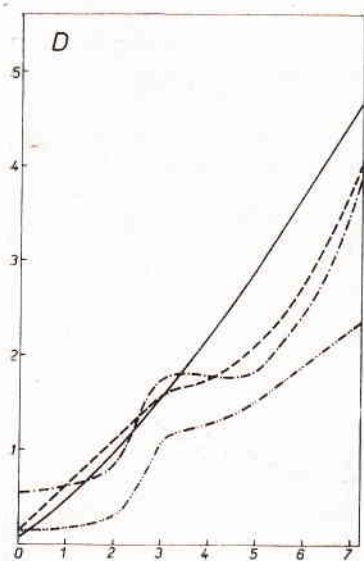
Graf 6d.



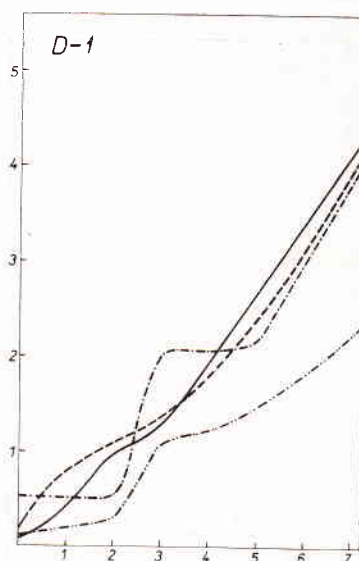
Graf 7a.



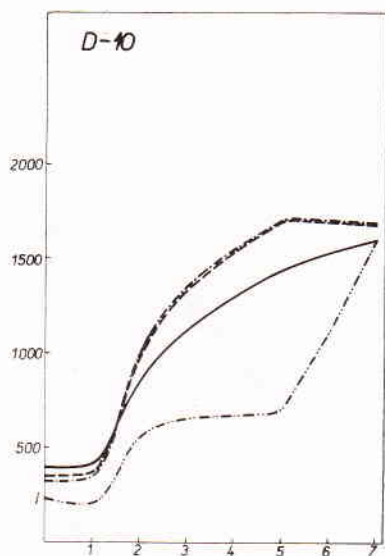
Graf 7b.



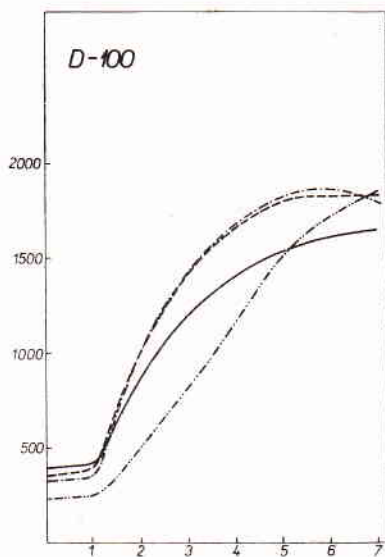
Graf 7c.



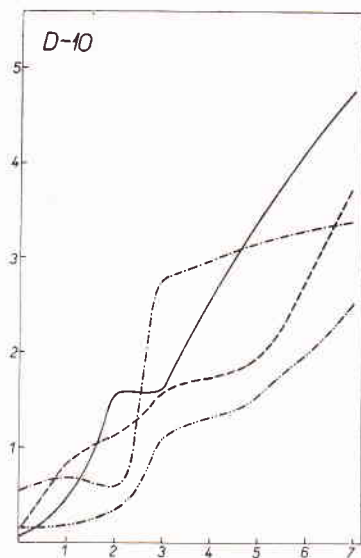
Graf 7d.



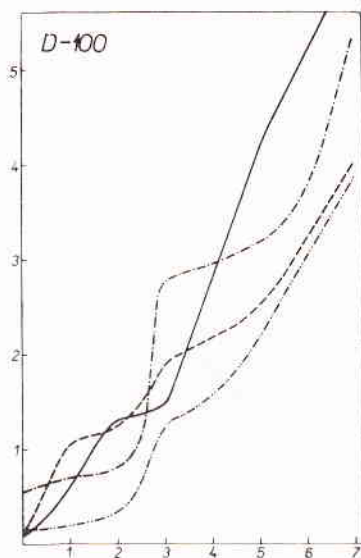
Graf 8a.



Graf 8b.



Graf 8c.



Graf 8d.

## Diskuse

Našimi výsledky jsme potvrdili údaje literatury [6] o obecném charakteru oxidace tuků. Za našich experimentálních podmínek jsme mohli rozlišit tři stadia oxidace sádra: 1. indukční perioda, kdy nedocházelo k podstatným změnám sledovaných hodnot; 2. stadium rychlé oxidace, kdy rychle rostla extinkce v oblasti 220—280 nm, obsah peroxidů a karbonylových derivátů reagujících s benzidinem a 2—thiobarbiturovou kyselinou; 3. třetí stadium, charakterizované poklesem obsahu látek reagujících s 2-thiobarbiturovou kyselinou a benzidinem a obsahu peroxidů; zároveň rostl obsah volných karboxylových skupin a extinkce ve sledované oblasti stoupala pomaleji.

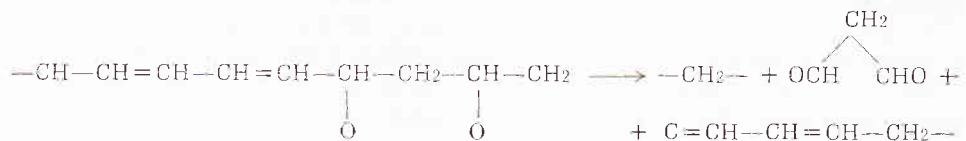
Protože tvorba peroxidů je podle Farmerovy teorie [15] autokatalytická reakce, narůstá jejich množství během indukční periody pomalu a rychlost exponenciálně vzroste teprve na začátku stadia rychlé oxidace; ke konci tohoto stadia klesne obsah reaktivních nenasyčených systémů natolik, že proces tvorby peroxidů se zpomalí a nabývá převahy jejich rozklad, takže celkový obsah peroxidů dosáhne maxima a začíná klesat.

U benzidinového čísla rozhodují o výsledné hodnotě extinkce nenasyčené aldehydy [16], které se tvoří rozkladem hydroperoxidů [6] podle rovnice:



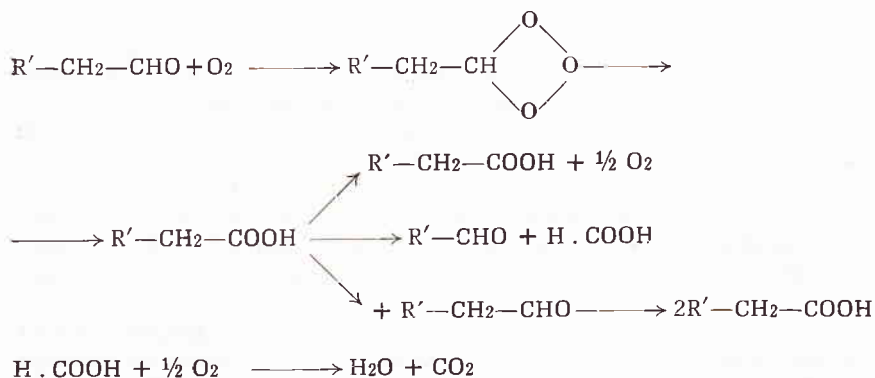
Z toho důvodu v etapě rychlé oxidace roste benzidinové číslo souběžně s růstem peroxidového čísla. Při další reakci dochází k oxidaci dienových systémů dvojných vazeb, takže vznikají převážně nasycené aldehydy a benzidinové číslo klesá. K poklesu přispívá snadná další oxidace nenasyčených aldehydů na nasycené karbonylové a na karboxylové deriváty.

Podobná situace je u thiobarbiturového čísla, které je ještě v tomto směru daleko citlivější. Podle Tarladgise a Wattsové [17] je intenzita reakce tím větší, čím více dvojných vazeb obsahuje oxidovaný systém. Dále a spolupracovníci [18] předpokládají, že se reakce mohou zúčastnit převážně systémy s třemi a více dvojnými vazbami.

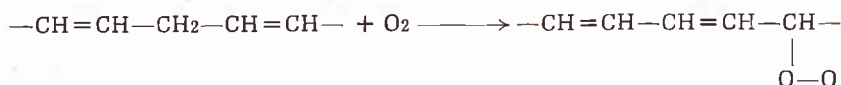


S tímto předpokladem souhlasí naše pozorování, že rychlý růst thiobarbiturového čísla dosahuje maxima nejdříve ze všech sledovaných hodnot a dochází k poklesu, který odpovídá oxidaci vysoce nenasyčených systémů dvojných vazeb.

K podstatnému růstu obsahu volných karboxylů dochází až ve stadiu autooxidativní degradace. Toto pozorování je ve shodě s předpokladem Louryho [19—20], že volné kyseliny vznikají oxidací aldehydů podle rovnice:



Na absorpci tuku v ultrafialové oblasti se především podílí konjugované dienové systémy (21). Při oxidaci vznikají např. z kyseliny linolové při tvorbě hydroperoxidů:



Ve shodě s tímto předpokladem jsme zjistili (22) statisticky významnou korelaci mezi obsahem peroxidů a extinkcí v oblasti konjugovaných dienů (232–234 nm). Absorpci konjugovaných dienů jeví také nenasyčené aldehydy:



V souhlase s tím jsme našli statisticky významnou korelaci mezi extinkcí při 232 nm a benzidinovým číslem (23).

Uvedeným předpokladům odpovídá rychlý růst extinkce v oblasti konjugovaných dienů ve stadiu rychlé oxidace. Ve stadiu degradační autoxidace se konjugované systémy oxidují a dochází k přechodnému zastavení růstu nebo poklesu extinkce. Při další oxidaci vznikají polyketony a jiné absorbující produkty, které extinkci opět zvyšují.

Ve shodě s literaturou (1, 2) jsme našli, že hemoglobin, suspendovaný v čistém tuku, ovlivňuje jen nepatrně jeho oxidaci. Tento závěr se dá očekávat vzhledem k jeho nepatrné rozpustnosti, takže k reakci dochází prakticky pouze na rozhraní fází. Vzhledem k této malé rozpustnosti se neovlivnil ani tvar spektrálních křivek sledovaných vzorků.

### S o u h r n

Při oxidaci vzorků vepřového sádla za teploty 60 °C byla pozorována tři charakteristická stadia oxidace (indukční perioda, stadium rychlé oxidace a stadium degradační oxidace). Změny jednotlivých hodnot odpovídají předpokladům moderní teorie autooxidace. Hemoglobin suspendovaný v tuku v bezvodém stavu neměl podstatný vliv na rychlost a průběh oxidace.

## Literatura

1. Tappel, A. L., Lipids and their oxidation. Avi Publ. Co., Westport 1962.
2. Bishov, S. J., A. S. Henick, R. B. Koch, Food Research **25**, 174 (1960).
3. Tappel, A. L., Arch. Biochem. Biophys. **44**, 378 (1953).
4. Tappel, A. L., J. Biol. Chem. **217**, 721 (1955).
5. Pokorný, J., M. Pazlar, Nahrung. V tisku.
6. Lundberg, W. O., Autoxidation and Antioxidants. 1. Interscience Publ., New York 1960.
7. Maier V. P., A. L. Tappel, J. Am. Oil Chemists' Soc. **36**, 8, 12 (1959).
8. Tariadgis B. G., J. Am. Oil Chemists' Soc. **38**, 479 (1961).
9. Anson M. L., Northrop J. H., J. Gen. Physiol. **20**, 575 (1937).
10. Pokorný J., J. Davídek, M. Karvánek, J. Karvanková, Návodý ke cvičení z všeobecné analýzy potravin, 2. vyd. SNTL, Praha 1965.
11. Jednotné analytické metody, 11. Tuky. MPPV, Praha 1956.
12. I. U. P. A. C., Section of Fats, Standard Methods of Fat Analysis, 5 vyd. Butterworth, London 1964.
13. Pokorný J., G. Janíček, Sborník VŠChT v Praze, E 9, (1966).
14. Pokorný J., H. Zwain, G. Janíček, Fette, Seifen, Anstrichmittel, **67**, 477 (1965).
15. Farmer E. H., G. F. Bloomfield, A. Sundralingam, D. A. Sutton, Trans Faraday Soc. **38**, 348 (1942).
16. Holm A., K. Ekblom, G. Wode, J. Am. Oil Chemists Soc. **34**, 606 (1957).
17. Tariadgis B. G., Bethy M. Watts, J. Am. Oil Chemists Soc. **37**, 403 (1960).
18. Dahle L. K., E. G. Hill, R. T. Holman, Arch. Biochem. Biophys. **98**, 253 (1962).
19. Loury M., Lechartier G., Rev. Franc. Corps, Gras **10**, 273 (1963).
20. Loury M., Compt. Rend. **256**, 2870 (1963).
21. Brice B. A., M. L. Swain, S. F. Herb, P. L. Nichols, R. M. Reiman—Schneider, J. Am. Oil Chemists' Soc. **29**, 279 (1952).
22. Pazlar M., E. Kočová, J. Pokorný, Sborník Lékařské fakulty v Plzni, 1965.
23. Pazlar M., Kočová P., J. Pokorný, Z. Lebensmittel. Untersuch. u. Forschung (v tisku).

## Влияние гемоглобина на окисление смалца.

### I. Исследование хода окисления.

#### Выводы

При окислении образцов смалца при температуре 60 °C были обнаружены три характеристические стадии окисления (периоды индукции, быстрого окисления и деградационного окисления). Изменения отдельных величин совпадают с предположениями современной теории автоокисаации. Гемоглобин суспендированный в жире в безводном состоянии не показал существенного влияния на скорость и ход окисления.

## Haemoglobin influence on the oxidation of pork lard

### I. Observation of the oxidation

#### Summary

Oxidizing of pork lard at the temperature of 60 °C three characteristic phases of the oxidation have been observed (induction period, the phase of rapid oxidation and the phase of degradational oxidation). The changes of individual values correspond with the assumptions of the modern theory of autooxidation. Haemoglobin suspended in the fat in the waterless state had no substantial influence on the rate and the course of the oxidation.