

NITRIT I FISK OG LAKE

Prinsipp

I saltsur væske diazoterer nitritioner sulfanilamid. Det dannede diazoniums salt gir med koblingsreagenset (N-(1-naftyl) etylendiamindihydroklorid) en intens rød farget azoforbindelse. Maksimum fargestyrke utvikles innen 5-10 minutter og holder seg konstant i minst 2 timer. Fargestyrken måles spektrofotometrisk ved bølgelengden 540 nm.

Reagenser

1. Saltsyre, ca. 6 N. Kons. saltsyre fortynnes med likt volum vann.
2. Sulfanilamidoppløsning. 0,4 g sulfanilamid (p-amino-benzensulfonamid) løses i vann til 100 ml.
3. Koblingsreagens. 0,2 g N-(1-naftyl) etylendiamindihydroklorid løses i vann til 100 ml. Reagenset oppbevares i brun flaske i kjøleskap. Holdbarhet ca. 1 måned.
4. Standard nitrit-løsning I. 1 g p.a. NaNO_2 løses i vann til 1000 ml. Konsentrasjonen = 1 mg NaNO_2 /ml.
5. Standard nitrit-løsning II. 50 ml av standard nitrit-løsning I (4) fortynnes med vann til 500 ml. Konsentrasjonen = 0,1 mg NaNO_2 /ml.
6. Standard nitrit-løsning III. 5 ml av standard nitrit-løsning II (5) fortynnes med vann til 500 ml. Konsentrasjonen = 1 μg NaNO_2 /ml.

Standard nitrit-løsningene I, II og III er holdbare i 1 år, såfremt det tilsettes 6-7 dråper kloroform for konservering.

7. Natriumkarbonat-løsning. 6,0 g vannfri natriumkarbonat (Na_2CO_3) løses i vann til 100 ml.
8. Ferriklorid-løsning. 13,5 g ferriklorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) løses i vann til 100 ml.

Apparatur

- a. Målekolber, 100, 200, 500 og 1000 ml
- b. Spektrofotometer eller kolorimeter til måling ved 540 nm
- c. Byretter, pipetter
- d. Morter
- e. Begerglass, 50 ml

Utførelse

A. Fisk. 10 g av den findelte og homogeniserte prøve innveies i et 50 ml begerglass og utrøres omhyggelig med litt vann av 80°C. Blandingen skylles med vann på 80°C over i en 500 ml målekolbe til et samlet volum av ca. 300 ml, hvorpå kolben hensettes i kokende vannbad under omrøsting hver halve time.

Etter 2 timers forløp avkjøles under rennende vann. Kolben fylles til merket med vann. Det blandes ved kraftig røsting og filtreres gjennom et tørt filter. De første 50 ml kastes.

100 ml filtrat overføres til en 200 ml målekolbe, som tilsettes 10 ml natriumkarbonat-løsning (7) og 5 ml ferriklorid-løsning (8), fylles opp til merket med vann og blandes. Når bunnfallet har samlet seg, filtreres gjennom et tørt filter, og de første 50 ml kastes. Hver ml filtrat svarer til 10 mg prøve. 5 ml filtrat pipetteres over i en 100 ml målekolbe og fortynnes med vann til et volum på ca. 95 ml.

B. Saltlake. 1 ml av prøven pipetteres over i en 500 ml målekolbe og fortynnes med ca. 300 ml vann. Det tilsettes 10 ml natriumkarbonat-løsning (7) og 5 ml ferriklorid-løsning (8), fylles opp til merket med vann og blandes. Når bunnfallet har samlet seg, filtreres gjennom et tørt filter, og de første 50 ml kastes. Hver ml filtrat svarer til 0,002 ml lake. 5 ml av filtratet pipetteres over i en 100 ml målekolbe og fortynnes med vann til et volum på ca. 95 ml.

C. Standard-løsninger. I 100 ml målekolber avpipetteres 5, 10, 20, 25 og 30 ml standard nitrit-løsning III (6), svarende til henholdsvis 5, 10, 15, 20, 25 og 30 µg NaNO₂. Det fortynnes med vann til et volum på ca. 95 ml.

D. Blindprøve. En 100 ml målekolbe tilføres ca. 95 ml vann.

Fargeutvikling og måling. Hver av målekolbene på 100 ml, punktene A, B, C og D, tilsettes 1 ml 6 N saltsyre (1), 2 ml sulfanilamid-løsning (2) og 1 ml koplingsreagens (3). Det fylles til merket med vann og blandes. Etter 10 minutters henstand måles fargestyrken mot den opparbeidete blindprøven ved bølgelengden 540 nm.

Standardkurve fremstilles med natriumnitritkonsentrasjon, µg/100 ml sluttvolum, langs X-akse og absorpsjon langs Y-akse.

Prøveløsningens innhold av natriumnitrit, svarende til dens målte absorpsjon, avleses på standardkurven. Prøvematerialets innhold av natriumnitrit beregnes deretter ut fra de anvendte fortynningsforhold.

Beregning

$$\text{NaNO}_2 \text{ i fisk, g/100g} = \frac{100 a}{1000 b_1} = \frac{a}{10 b_1}$$

$$\text{NaNO}_2 \text{ i lake, g/100ml} = \frac{100 a}{1000 \cdot 1000 b_2} = \frac{a}{10000 b_2}, \text{ der}$$

a = Antall μg NaNO_2 pr. 100 ml sluttvolum av prøveløsning

b_1 = Antall mg prøve pr. 100 ml sluttvolum av prøveløsning

b_2 = Antall ml lake pr. 100 ml sluttvolum av fortynnet lakeprøve

Resultatet angis med 2 desimaler.

Henvisning

Nordisk Metodik-komite for levnedsmidler, nr. 49, 1963.