

SITRONSYRE I ORGANISK MATERIALE

Innledning

Sitronsyre (2-hydroksey-1,2,3-propantrikarboksylysyre) er tillatt i en rekke matvarer og anvendes som antioksydant og antioksydantforsterker i fett og oljer, og som syrerregulator for konserveringsmidler i fiske- og skalldyrprodukter.

Prinsipp

Sitronsyre oksyderes og bromeres til pentabromaceton, som gir gul farge med tiourinstoff-løsning. Fargemåling foretas i spektrofotometer ved 445 nm.

Reagenser

1. H_2SO_4 , 9 N.
2. Sitronsyre standardløsning: 200 mg vannfri sitronsyre løses i 20 ml 9 N H_2SO_4 og fortynnes til 200 ml med destillert vann. Løsningen inneholder 1000 μg sitronsyre/ml. Lagres i kjøleskap.
3. Sitronsyre arbeidsløsning: 10 ml sitronsyre standardløsning fortynnes til 100 ml med destillert vann. Løsningen inneholder 100 μg sitronsyre/ml.
4. $KMnO_4$ -NaBr-løsning: 5,0 g $KMnO_4$ løses i 85 ml kokt, avkjølt vann. Deretter løses 5,0 g NaBr i blandingen under røring. Det fortynnes til 100 ml med destillert vann. Løsningen er stabil noen uker på mørk, lufttett flaske.
5. Trikloreddiksyre (TCA), 15% (w/v).
6. H_2SO_4 - HPO_3 -løsning: 5,0 g HPO_3 løses i 50 ml 9 N H_2SO_4 . Stabil.
7. H_2O_2 , 3%-ig.
8. Tiourinstoff-løsning: 2,0 g $NaBO_2$ løses i 100 ml 4%-ig (w/v) tiourinstoff-løsning. Stabil.
9. n-Heptan p.a.

Utstyr

- a. Vortex-mixer.
- b. Sentrifugeglass, Sovirel 10 og 20 ml med skrukapsel og teflonpakning.
- c. Spektrofotometer med 1 cm kyvetter.
- d. Pipetter.
- e. Pasteur-pipetter.
- f. Avtrekksskap for arbeid med bromgass.
- g. Måleflasker.
- h. Bamix-håndmixer.
- i. Vannbad.
- j. Reagensglass 200 x 30 mm.

Utførelse

Opparbeidelse av trikloreddiksyreekstrakt. 10 g oppmalt prøve (= farse) homogeniseres med 100 ml 15%-ig trikloreddiksyre. Blandingen filtreres gjennom foldefilter, og sitronsyre bestemmes i ekstraktet, som kan oppbevares i kjøleskap 1 uke.

Opparbeidelse av fett og oljer. 20 g fett (olje) plasseres i reagensglass. 20 ml destillert vann tilsettes, og røret settes i vannbad ved ca. 40°C. Luft ledes gjennom ved hjelp av Pasteur-pipette, og lufthastigheten reguleres slik at en får god blanding av fett og vann. I løpet av 2 timer vil sitronsyren ekstraheres over i vannfasen. Fettet fjernes, og sitronsyren bestemmes i vannfasen.

Pentabrom-aceton dannelses. Avhengig av prøvenes sitronsyreinnhold, pipetteres 1-5 ml trikloreddiksyreekstrakt eller vannekstrakt over i 20 ml sentrifugeglass. Volumet justeres til 5 ml med destillert vann. 1 ml $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HPO}_3^-$ løsning tilsettes, og sentrifugeglassene plasseres i isbad i avtrekksskap. Under rolig omrystning tilsettes 2,0 ml $\text{KMnO}_4\text{-NaBr}$ -løsning. Sentrifugeglassene blir stående i isbad i 10 min., deretter tilsettes 3%-ig H_2O_2 dråpevis ved hjelp av byrette. Når løsningen er gulbrun, avventes 2-3 min. for å se om endepunktet er nådd. Deretter tilsettes H_2O_2 forsiktig inntil løsningen blir fargeløs.

Prøven tilsettes 3 ml n-heptan, og kapslene skrues på. Sentrifugeglassene rystes kraftig 1 min. på Vortex-mixer for å ekstrahere pentabromaceton over i heptanfasen.

Fargeutvikling. Til 10 ml sentrifugeglass overføres først 5 ml tiourinstoff-løsning og deretter 1,0 ml heptan-fase. Blandingen rystes 1 min. på Vortex-mixer. Ved hjelp av Pasteur-pipette overføres den gule vannfasen til glass-kyvette, og absorbansen måles i spektrofotometer ved 445 nm mot blindprøve av destillert vann, opparbeidet som angitt for standard sitronsyre-prøver.

Standardkurve. Henholdsvis 1-2-3-4 og 5 ml sitronsyre arbeidsløsning overføres til 20 ml sentrifugeglass, og volumet justeres til 5 ml med vann. Den videre prosedyren er som angitt foran med tilsetning av H_2SO_4 - HPO_3 -reagens, kjøling, osv. Konsentrasjonene i μg sitronsyre/5 ml tiourinstoff-løsning (x-akse) tegnes av mot de respektive absorbansene (y-akse).

Beregning

$$\frac{\text{mg sitronsyre}}{100 \text{ g prøve}} = \frac{M_A \cdot f_1}{W \cdot f_2} \text{ , der}$$

M_A = Mengde sitronsyre i $\mu g/5$ ml tiourinstoff-løsning som avleses på standardkurve.

W = Innveid mengde prøve, g.

$f_1 = \frac{100}{1000}$ = Omregningsfaktor fra $\mu g/g$ til $mg/100g$.

f_2 (for farse) = $\frac{1 \cdot \text{ml TCA-ekstrakt}}{3 \cdot 108}$ = Fortynningsfaktor (faktoren forutsetter at 10 g prøve inneholder 8 ml vann).

f_2 (for fett og oljer) = $\frac{1 \cdot \text{ml vannekstrakt}}{3 \cdot 20}$

Merknad

Ved analyse vil naturlig forekommende sitronsyre i fisk- og skalldyrprodukter gi resultater opp til ca. 20 $mg/100g$.

Henvisning

Camp, B.J. and Farmer, L.: A Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Citric Acid in Blood. *Clinical Chemistry* 13 (6), 501-505, 1967.