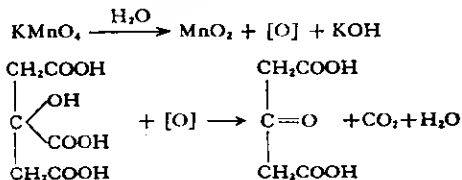


# 发酵液中柠檬酸含量的分光光度法测定

广州食品社 中山大学 105 室

目前,柠檬酸一般采用微生物发酵方法生产。以糖质为原料的柠檬酸发酵液中,除柠檬酸外,尚可能含有草酸、乌头酸、苹果酸和葡萄糖等<sup>[1]</sup>。由于生产菌种和工艺技术的不同,各种酸的含量也不完全一样,用碱滴定测总酸的方法不能反映柠檬酸的真实含量。因此,多以五溴丙酮法进行测定。但是,以糖蜜作原料的柠檬酸发酵中,由于原料所含杂质的干扰,给测定造成很大困难。为寻找一个适于以糖蜜为原料的发酵液中柠檬酸含量的测定方法,我们采用紫外分光光度计法进行测定,结果表明:该法最大相对误差不超过 3.7%。

原理:柠檬酸在碱金属高锰酸盐作用下可转化为丙酮(撑)二羧酸<sup>[1]</sup>。此酸在紫外光谱区有 255 毫微米特征性吸收峰,可借以进行定量测定。



该反应同样适用于柠檬酸钙。草酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸及其盐类对此不发生干扰。

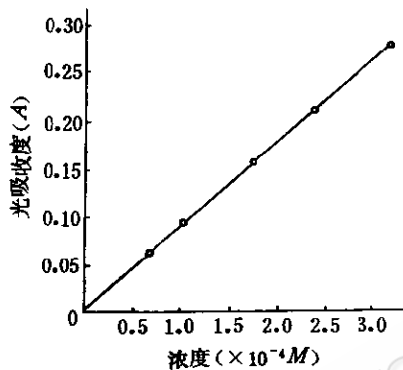
试剂:所用柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )经重结晶提纯后,准确称取 210 毫克置于 1 升容量瓶中,以蒸馏水为溶剂,配成 0.001 M 的溶液。

准确称取 0.316 毫克高锰酸钾( $\text{KMnO}_4$ , M. W. 158.03),定容于 1 升蒸馏水中,配成 0.001 N 溶液(随用随标定)。

标准曲线:取 0.001 M 的柠檬酸溶液于 50 毫升容量瓶中,从滴定管中加 0.001 N 高锰酸钾溶液至反应达终点,稀释至刻度,使浓度分别成为:0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4、2.6、2.8、 $3.0 \times 10^{-4} \text{M}$ 。分别用紫外分光光度计进行测定,在 255 毫微米吸收峰处测定其吸收强度值,用蒸馏水作参比,曲线在  $3.0 \times 10^{-4} \text{M}$  浓度范围内成一直线(见下图)。

测定:取柠檬酸发酵液于 50 毫升容量瓶中(如浓度过高应适当稀释使最终浓度在上述标准曲线的范围内),加入 0.001 N 高锰酸钾溶液,温度控制在  $60^\circ\text{C}$  约 10 分钟左右,溶液颜色由黄色变为深黄色即达到终

点。反应完毕定容,用紫外分光光度计测定。



分光光度法测定柠檬酸的工作曲线

把电源、氢灯接通后,选择狭缝宽度为0.25毫米,扫描速度4毫米/秒,纸速10秒/厘米。用10毫米石英吸收池。选好条件,把参比溶液(没有加入高锰酸钾反应的发酵液)和样品溶液(加入高锰酸钾溶液反应的发酵液)放于光路上,固定波长在295毫微米处把透光率调至100%,然后测定光吸收值(A),根据朗伯—比耳定律 ( $A=KCL=\log 1/T$ ,  $C=A/KL$ ) 由K值计算或从标准曲线上求得其克分子浓度,可换算得出,柠檬酸

百分比浓度。

误差情况:取浅盘柠檬酸发酵液,依上述方法测定柠檬酸含量,再加入已知量的柠檬酸测其混合液的柠檬酸总含量,根据实际含量与测定含量求出相对误差最大为3.7%。又在柠檬酸发酵液中,分别加入10%草酸、琥珀酸、酒石酸、苹果酸、乌头酸,待与高锰酸钾反应后,测定255毫微米光吸收度,其值与不加杂酸时相同,表明有上述酸存在时,不干扰柠檬酸的测定。

注意事项:1. 应注意反应终点的控制,柠檬酸与高锰酸钾反应时,高锰酸钾的加入量必须适当,否则高锰酸钾颜色将影响255毫微米的光吸收值。2. 注意校正杂质干扰,在发酵液中糖蜜及其所含杂质在255毫微米处虽无特征吸收,但也有一定的干扰,因此,我们用未反应的发酵液作参比和反应后发酵液样品放至光路上,在波长295毫微米处[丙酮(撑)二羧酸特征吸收峰的最低点],将T(透光度)调至100%,以保证测量的准确性。

### 参 考 资 料

- [1] 中山大学生物系:生物化学下册,1974年9月。
- [2] Fritz Feigl:有机分析点滴试验263页,燃料化学工业出版社,1972。