CH 2.4 Stanovenie dusičnanov a dusitanov v potravinách, krmivách metódou prietokovej injekčnej analýzy

1. Pôvod metódy

1. Application note Tecator ASN 62-02/83 fa Tecator.
2. International Standard ISO 6635-1984 (E).
3. Príloha č. 12/1984 k Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica.
4. Agrochémia č.4, 28, 1988
5. Davídek J. a kol. Laboratórní príručka analýzy potravín, SNTL, Praha 1978

2. Princíp metódy

Zhomogenizovanú a naváženú vzorku extrahovať teplou vodou a následne deproteinovať. Na analýzu sa použiť číry filtrát. Takto pripravený filtrát dávkovať do prietokového injekčného analyzátora, kde sa na kadmiovej kolónke najprv dusičnany zredukujú na dusitany. Tie potom reagujú so sulfanilamidom za vzniku diazozlúčeniny, ktorá reaguje s N-/1-naftyl/-etyléndiamíndihydrochloridom za vzniku červeného sfarbenia. Výsledné červené sfarbenie zmerať pri 546nm.

2. **Použité prístroje**

FIANAL- prietokový injekčný analyzátor
redukčná kadmiová kolónka
vodná lázeň
homogenizátor

4. Zoznam chemikálií

sulfanilamid (p.a)
N-/1-naftyl/)-etyléndiamíndihydrochlorid (NEED), p.a
kyselina chlorovodíková koncentrovaná
dusičnan sodný p.a
dusitan sodný p.a
chlorid amónny p.a
síran meďnatý p.a
komplexón 3 p.a
hexakyanoželeznatan tetradraselný trihydrát p.a (Carrez I)
síran zinočnatý heptahydrát p.a (Carrez II)

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Pracovné roztoky: 5M NH_4Cl :z neho pripraviť riedením 0,1M NH_4Cl, ktorý je nosným prúdom pre prietokový systém.

R_1:(reakčné činidlo): 5g sulfanilamidu rozpustiť v zmesi 26ml konc. kyseliny chlorovodíkovej a 300ml destilovanej vody, doplniť na objem 500ml destilovanou vodou.

R_2:(reakčné činidlo): 0,5g NEED–u rozpustiť a doplniť destilovanou vodou na objem 500ml.

Všetky pripravené roztoky je potrebné prefiltrovať a uchovávať v tmavých zásobných fľašiach.

Roztoky na úpravu vzorky:

15 % trihydrát hexakyanoželeznatan tetradraselný (Carrez I)

30 % heptahydrát síran zinočnatý (Carrez II)

Štandardné roztoky (dusičnany)

základný zásobný roztok: 10g $NaNO_3$/l , z neho pripraviť zásobný roztok o koncentrácii 200 mg/l.

Zo zásobného roztoku pripraviť pracovné roztoky o koncentrácii 0,1; 1; 5; 10; 15; 20; 25mg $NaNO_3$/l

Štandardné roztoky (dusitany)

základný zásobný roztok: z neho pripraviť pracovné roztoky o koncentrácii 0,1; 0,25; 0,5;2;4;6;8;10 mg $NaNO_2$/l

Štandardné roztoky treba pred každým meraním pripraviť čerstvé.

Je potrebné kontrolovať účinnosť redukcie zmeraním absorbancie dusičnanových a dusitanových roztokov.

6. Príprava vzoriek

Vzorku zhomogenizovať a navážiť 10g. Pridať 60ml destilovanej vody zahriatej na 60°C a nechať 10 minút vo vodnom kúpeli pri 60°C. Premiešať, pridať zrážacie roztoky a inkubovať 10 minút vo vodnom kúpeli. Obsah banky premiešať a schladiť pod tečúcou vodou. Po ochladení doplniť na objem 200ml a prefiltrovať. Číry filtrát použiť na meranie.

7. Podmienky stanovenia

vlnová dĺžka 546nm

reakčný čas: 60s (dusičnany), 25s (dusitany)

injekčný čas : 25s (dusičnany), 10s (dusitany)

predčerpávací čas: 10 s (dusičnany), 5 s (dusitany)

objem vzorky 100 µl

8. Meranie

Číry filtrát injektovať do nosného prúdu a postupne pridávať reakčné činidlá. Počas pohybu zóny vzorky prietokovým systémom dochádza k jej premiešaniu s pridanými činidlami. Výsledkom analýzy sú ostré píky, ktorých výška je mierou koncentrácie dusičnanov.

9. Kalibrácia a vyhodnotenie

Zo štandardných roztokov sa zostrojí kalibračná krivka a hodnota dusitanov a dusičnanov je priamo odčítaná z kalibračnej krivky. Výsledná koncentrácia dusičnanov sa vypočíta ako rozdiel dusičnanov po redukcii a zmeraných dusitanov bez redukcie. Výsledky sú uvádzané ako mg $NaNO_2$/l, resp. ako mg $NaNO_3$/l

CH 2.4. Stanovenie aniónov vo vodách, dusičnanov v zelenine a v ovocí metódou HPLC/IC

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie chloridov, dusitanov, dusičnanov a síranov vo vodách a na stanovenie dusičnanov v zelenine a v ovocí vysokoúčinnou iónovýmennou (IC) kvapalinovou chromatografiou.

2. Princíp metódy

Vzorky vôd sa pred meraním zvyčajne 10 krát nariedia. Anióny sa stanovujú metódou vysokoúčinnej iónovýmeny (IC) s vodivostnou detekciou.

Dusičnany sa extrahujú z potravín horúcou vodou a interferujúce látky sa odstránia čírením Carrezovými roztokmi. Pripravená vzorka sa delí na chromatografickej kolóne. Stanovuje sa metódou vysokoúčinnej iónovýmeny (IC) s vodivostnou detekciou.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- systém na prečistenie destilovanej vody
- IC-HPLC systém
- analytické váhy
- homogenizátor
- vodný kúpeľ
- pipety
- odmerné banky
- kalibrované odmerné sklo
- skladaný filtračný papier
- striekačkový membránový filter na vodné roztoky

3.2 Chemikálie a roztoky

- Dusitan, $NaNO_2$ štandardný roztok
- Dusičnan, $NaNO_3$ štandardný roztok
- deionizovaná voda
- Carrezove roztoky č.1, č.2
- 1 mM Na_2CO_3 , 8 mM $NaHCO_3$
- 1,8 mM Na_2CO_3 , 1,7 mM $NaHCO_3$

Pri analýze sa používajú len chemikálie s čistotou p. a. a HPLC.

4. Pracovný postup

4.1. Príprava vzorky

Anióny (voda)

Vzorka sa prefiltruje cez membránový filter a stabilizuje sa ochladením na teplotu od 4°C do 6°C.

Pred nadávkovaním do analyzátora sa vzorka zriedi 10x a znovu sa prefiltruje cez membránový filter.

Dusičnany(zelenina, ovocie)

Tuhé vzorky (napríklad listová zelenina)

Ak je to možné, v prípade odberu vzoriek čerstvej produkcie sa príprava uskutoční v lehote do 24 hodín po odbere vzoriek. Kompletná vzorka sa homogenizuje.

Na analýzu sa vykoná odber jednej alebo niekoľkých analytických vzoriek z kombinovaných kašovitých zmesí.

Kvapalné vzorky (napríklad zeleninové šťavy)

Reprezentatívna vzorka sa intenzívne trepe, kým sa dôkladne nepremieša.

Extrakcia vzorky

Tuhé vzorky

Do 200 ml kuželovitej banky sa odváži 10 –20 g zhomogenizovanej vzorky, pridá sa približne 100 ml horúcej redestilovanej vody a banka sa prikryje alobalom a umiestni sa na 15 min do vriaceho vodného kúpeľa. Banka sa ochladí na teplotu miestnosti, roztok sa doplní po značku, dôkladne premieša a obsah sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier. Ak je potrebné, filtrát, t.j. roztok vzorky, sa prečistí alebo vyčíri podľa postupu opísaného ďalej.

Kvapalné vzorky

Ak je potrebné, vzorka sa prečistí alebo vyčíri, tým vznikne roztok analytickej vzorky, alebo sa vzorka vopred zriedi redestilovanou vodou, aby sa získal roztok obsahujúci približne 25 mg/l dusičnanov.

Príprava roztoku analytickej vzorky

Do 50 ml odmernej banky sa napipetuje 40 ml roztoku, pridajú sa 2 ml Carrezovho roztoku č.1, zamieša sa, pridajú sa 2 ml Carrezovho roztoku č.2 a doplní sa po značku redestilovanou vodou. Banka sa pretrepe a celý roztok sa prefiltruje cez skladaný filtračný papier. Podiel filtrátu podľa potreby ešte riedime, prefiltrujeme cez membránový filter a nastrekujeme na chromatografickú kolónu.

4.2. Príprava merania

Príprava kalibračnej krivky

Kalibračné roztoky, pripravené nariedením zo štandardného roztoku, sa spracujú rovnakým spôsobom ako roztoky vzorky.

5. Vyhodnotenie nameraných údajov

Anióny

Koncentrácia jednotlivých aniónov v mg/l sa vypočíta podľa vzťahu:

$$x = \frac{c_S \cdot A_{PV}}{A_{PS}} \cdot F \qquad \text{alebo} \qquad x = c \cdot F$$

x - obsah analytu vo vzorke v mg/l
c_s - koncentrácia štandardu v mg/l
c - koncentrácia meraného roztoku v mg/l, odčítaná z kalibračnej krivky
A_{pv} - plocha píku vzorky
A_{ps} - plocha píku štandardu
F - zrieďovací faktor.

Výsledky stanovenia dusičnanov a dusitanov sa môžu vyjadrovať aj ako dusičnanový (NO_3-N) a dusitanový (N-NO_2) dusík.
Tabuľka uvádza prepočítavacie koeficienty na tieto rozdielne spôsoby vyjadrovania výsledkov.

Tabuľka č.2 - Prepočítavacie koeficienty

Pri prepočítavaní sa výsledky násobia		
z NO_3	na N- NO_3	koeficientom 0,2259
z NO_2	na N- NO_2	koeficientom 0,3043

Dusičnany

Množstvo dusičnanov vyjadrených vo vzorke ako NO_3^- „w“ v mg/kg sa vypočíta:

$$\text{W alebo } \rho = \frac{x \cdot F_1 \cdot F_2 \cdot 1000}{m}$$

kde:
x: je koncentrácia dusičnanov v roztoku analytickej vzorky odčítaná z kalibračnej krivky

v mg/kg
F_1: zrieďovací faktor pre použitú číriacu metódu (napríklad F_1 = 1,25 pre čírenie pomocou Carrezových roztokov)
F_2: zrieďovací faktor pre všetky ostatné zrieďovacie kroky
m: množstvo vzorky v kg alebo v l roztoku vzorky (pre neriedené kvapaliny s nízkym množstvom dusičnanov m = 1000) v g alebo ml.

Výsledky pre NO_3^- sa uvádzajú v mg/kg.

6. Literatúra

STN EN ISO 10304-1 Kvalita vody, Stanovenie rozpustených fluoridov, chloridov, dusitanov, ortofosforečnanov, bromidov, dusičnanov a síranov iónovou kvapalinovou chromatografiou. Časť 1: Metóda pre málo znečistené vody

STN EN 12014-2 Stanovenie dusičnanov a dusitanov. Časť 2: Stanovenie množstva dusičnanov v zelenine a zeleninových výrobkoch metódou HPLC/IC.

Analýza potravín – stanovenie dusičnanov v zeleninových výrobkoch L 26.00-1, 1989-12 a Stanovenie dusičnanov v zeleninových výrobkoch pre dojčatá a malé deti S 48.03.05-2, 1992-122.

ISO 5725:1986 Presnosť skúšobných metód – Určenie opakovateľnosti a reprodukovateľnosti štandardnej skúšobnej metódy medzilaboratórnymi skúškami.

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 1882/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analýzy na úradnú kontrolu hladiny dusičnanov v určitých potravinách