

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[**Laboratoria**](#)
[**.net**](#)
[**Innowacje**](#)
[**Nauka**](#)
[**Technologie**](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Wybrane metody oznaczania azotanów (V) i (III) w wodzie i produktach spożywczych cz.I

Azotany i azotyny w podwyższonych stężeniach wykazują negatywny wpływ na stan zdrowia człowieka. Związki te zmniejszają wartość odżywczą żywności poprzez destrukcję witamin z grupy A i B oraz obniżają przyswajanie białka z pożywienia. Niektóre składniki pożywienia mają zdolność zapobiegania niekorzystnemu działaniu azotynów jako prekursorzy związków N-nitrozowych, a wśród nich wymienia się białka, witaminę C i wapń [1].

Azotany (III) i azotany (V) są solami kwasów azotowych. Ich obecność stwierdza się w znacznych ilościach w środkach spożywczych oraz w wodzie, dlatego też jest to główne źródło narażenia na te

związki dla człowieka. Obecność azotanów (V) w żywności (a szczególnie pochodzenia roślinnego) związane jest ze stosowaniem nawozów mineralnych (obecność w warzywach azotanów (V) jest wynikiem nadmiernego stosowania nawozów). Zawartość azotanów (III) w świeżych warzywach wynosi ok. kilku mg/kg, ale może ona wzrosnąć. Podczas przechowywania warzyw poprzez ograniczenie dostępu tlenu dochodzi do mikrobiologicznej redukcji azotanów (V) do azotanów (III). Ponadto azotany (V) i azotany (III) stosowane są w przetwórstwie mięsnym i serowarstwie, gdzie odpowiadają za nadawanie pożądanych właściwości sensorycznych tym produktom [11].

Obieg azotu w przyrodzie

Wolny azot krążący w atmosferze wiązany jest przez bakterie azotowe (bakterie symbiotyczne lub wolno żyjące). W wyniku ich działalności dochodzi do redukcji azotu do jonu amonowego. W zachodzącym w glebie procesie nitryfikacji jony amonowe ulegają utlenieniu do jonów azotynowych, a dalej azotyny przekształcane są do azotanów. Azotany absorbowane są przez rośliny i wbudowywane w ich białka. Poprzez łańcuchy pokarmowe azot dostaje się na wszystkie poziomy troficzne. Martwa materia organiczna łącznie z wydalانymi produktami przemiany materii rozkładane są w procesie amonifikacji, w wyniku czego powstaje amoniak. Amoniak znajdujący się w wodzie tworzy tzw. sole amonowe, a także jest pobierany przez rośliny i bakterie nitryfikacyjne. Proces przemiany wolnego azotu w azotany zostaje odwrócony w procesie denitryfikacji, dzięki czemu cykl krążenia azotu w przyrodzie zostaje zamknięty [5].

Wpływa azotanów i azotynów na organizm

W wyniku przeprowadzonych badań nad wpływem azotynów i azotanów na organizm ssaków stwierdzono, że toksyczność samych azotanów dla zwierząt jednożołądkowych oraz człowieka jest niewielka. Bardziej niekorzystny wpływ na organizm wywierają azotyny, które w porównaniu do azotanów wykazują od 6-10 razy większą toksyczność [5].

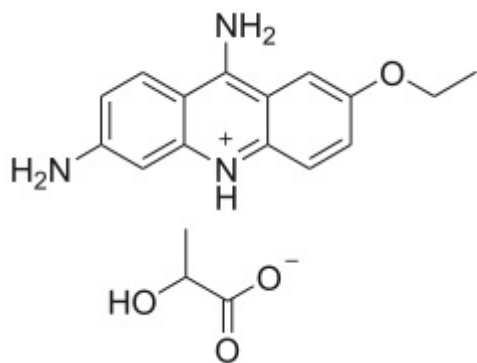
Badanie wpływu azotanów i azotynów na organizm żywy koncentruje się głównie wokół zagadnień toksyczności ostrej. Nadmierne pobieranie z dietą związków azotanów i azotynów bądź też zachodząca redukcja azotanów do azotynów w organizmie człowieka może prowadzić do tzw. **methemoglobinemii**, tj. utlenienia dwuwartościowego żelaza hemoglobiny (Hb) do formy trójwartościowej. Forma ta nie ma zdolności odwracalnego wiązania tlenu. Wśród głównych objawów methemoglobinemii wyróżnia się m.in. sinicę, bóle brzucha, wymioty, biegunki, bóle i zawroty głowy, rozszerzenie obwodowych naczyń tętniczych czy spadek ciśnienia krwi [5],[10].

Toksyczne działanie azotynów i azotanów może również powodować niedokrwistość wywołaną uszkodzającym działaniem tych związków na krwinki czerwone, unieczynnienie witaminy B₆, której niedobór jest pierwotną przyczyną niedokrwistości. Ponadto wśród ich negatywnego wpływu wymienia się też zahamowanie przyrostu masy ciała, które spowodowane jest zmniejszonym łaknieniem, a także wpływ na witaminę A, której obecność w organizmie jest niezbędna do prawidłowej budowy struktur komórkowych oraz syntezy białka. Azotany i azotyny są także prekursorami nitrozoamin, związków wykazujących działanie rakotwórcze i mutagenne [5].

Metoda riwanolowa do oznaczanie małych ilości azotanów (III) i azotanów (V)

Rivanol (Riwanol, 6,9-diamino-2-etoksyakrydyna, *Lactoacridine*) znany również jako mleczan etakrydyny jest organicznym związkiem chemicznym należącym do grupy barwników akrydynowych. Tworzy pomarańczowo-żółte kryształki o charakterystycznym zapachu [8]. Rivanol jest żółtą substancją łatwo rozpuszczalną w wodzie, o pH w zakresie 5,5 – 7,5. Reaguje z mocnymi środkami utleniającymi, a stabilność wykazuje w normalnych warunkach otoczenia [7]. Związek ten wykazuje silne właściwości antyseptyczne, dlatego też w medycynie stosowany jest do niszczenia

paciorkowców, gronkowców, grzybów i pierwotniaków. Ma zastosowanie doustne i zewnętrzne (płukanki, okłady, przemywanie). Przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne działanie riwanolu spowodowane jest przyłączaniem etakrydyny do kwasów nukleinowych (DNA), przez co następują letalne mutacje [6].



Zdjęcie: wzór riwanolu (mleczan etakrydyny), $C_{18}H_{21}N_3O_4$

<http://zwiazki-chemiczne.rolnicy.com/component/content/article/68-zwiazek/3607-rywanol.html>

Zasada metody riwanolowej polega na reakcji azotynów (III) z solą etakrydyny. W wyniku reakcji powstaje barwny związek. Zawartość azotynów (III) w próbce określa się spektrofotometrycznie metodą krzywej wzorcowej. W tym celu mierzy się absorbancję próbki badanej w zakresie długości fali od 580 do 600 nm. Metoda pozwala na oznaczanie zawartości azotanów (III) lub sumy azotanów (III) i azotanów (V) po wcześniejszej redukcji azotanów (V) do azotanów (III) kadmem metalicznym [2], [3], [4].

Wykonanie:

Jako materiał badawczy należy wykorzystać np. próbkę shomogenizowanego mięsa o masie 50 g.

Próbkę badaną należy przenieść do zlewki o poj. 500 cm³, po czym dodać ok. 300 cm³ wody wraz z 3 cm³ 25% roztworu Na₂CO₃. Próbkę inkubować przez 30 minut (często mieszając). Po wymieszaniu zawartości zlewki należy przesączyć przez sączek karbowany, zbierając przesącz do kolby miarowej o pojemności 500 cm³. Otrzymaną próbkę dopełnić wodą destylowaną do kreski, dokładnie wymieszać i przenieść 50 cm³ do suchej zlewki (o poj. 100 cm³). Przeprowadzić redukcję azotanów (V) do azotanów (III) poprzez dodanie kadmu metalicznego (roztwór można również przepuścić przez kolumnę z kadmem). Otrzymany przesącz dokładnie wymieszać i przesączyć. Tak otrzymany roztwór należy przenieść do kolby miarowej (o pojemności 100 cm³) i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. W przypadku oznaczania zawartości azotanów (III) cały etap redukcji próbki kadmem metalicznym można pominąć.

Otrzymany powyższym sposobem przesącz powinien być klarowny i bezbarwny. 20 cm³ przesączu przenieść do kolby miarowej o pojemności 50 cm³, dodać 1 cm³ 10% roztworu kwasu solnego (HCl) oraz 5 cm³ 0,1% roztworu soli etakrydyny. Całość próbki należy uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Ostatnim etapem jest pomiar absorbancji przygotowanego roztworu przy długości fali w zakresie 580 – 600 nm (mierzyć po 5 minutach) [2], [3], [4].

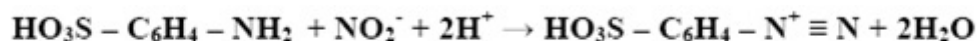
Przygotowanie krzywej wzorcowej do oznaczenia

Korzystając ze wzorca zaw. 100 ppm NO₂⁻ należy sporządzić roztwory wzorcowe, w taki sposób by stężenie końcowe azotanu (III) znajdowało się w zakresie od 0 do 10 ppm (4-5 roztworów wzorcowych wraz z próbą kontrolną- ślepa próba).

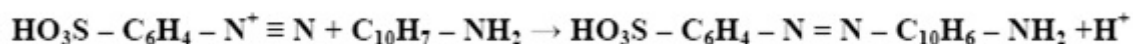
W tym celu do kolbki miarowej o poj. 50 cm³ należy dodać wcześniej wyliczoną ilość wzorca, 1 cm³ 10% roztworu kwasu solnego oraz 5 cm³ 0,1% roztworu etrakrydyny. Całość uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Zmierzyć absorbcję próbek po 5 minutach przy długości fali $\lambda = 580\text{--}600\text{ nm}$ wobec próby ślepej (nie zawierającej jonów NO₂⁻) [2], [3], [4].

Oznaczanie azotynów (V) w środowisku kwaśnym [5].

Azotyny w silnie kwaśnym środowisku (pH= 2.0 - 2.5) wchodzi w reakcję z kwasem sulfanilowym w wyniku czego tworzone są związki azoniowe:



Związki azoniowe ulegają reakcji z 1-naftyloaminą w wyniku czego powstaje dwufazowy fioletowy barwnik. Natężenie barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia azotu azotynowego w próbce. Ograniczeniem zastosowania tej metody jest oznaczanie próbki, w której obecne są czynniki przeszkadzające takie jak: aminy alifatyczne, chlor wolny i chlor związany. Opisana reakcja zachodzi wg zasady:



Pomiar absorbcji wykonuje się przy długości fali równej $\lambda = 520\text{ nm}$. Zawartość azotu azotynowego w próbce odczytuje się z krzywej wzorcowej, a otrzymane dane podstawia się do odpowiedniego wzoru [5].

Metody kolorymetryczne opierają się na zdolności jonów NO₂⁻ oraz NO₃⁻ do tworzenia barwnych związków z różnymi odczynnikami. Zasada wykonywania metod spektrofotometrycznych opiera się na pomiarze absorbcji przy określonej długości fali światła widzialnego w badanym roztworze. W wyniku reakcji z kwasem sulfanilowym i N-(1-naftylo)etylenodiaminą powstaje barwnik diazoniowy. Intensywność powstałej w wyniku reakcji czerwono-różowej barwy mierzy się przy długości fali równej $\lambda = 538\text{ nm}$. Oznaczenie zawartości azotanów(V) przeprowadza się w podobny sposób, jednak wcześniej należy przeprowadzić redukcję metalicznym kadmem jonów NO₃⁻ do NO₂⁻ [11].

Zastosowanie metody kolorymetrycznej do oznaczania azotanów (V) w wodzie z salicylanem sodu

Metoda oparta jest na reakcji azotanów (V) z salicylanem sodu, która zachodzi w środowisku stężonego kwasu siarkowego (VI). W wyniku reakcji nitrowania powstaje kwas nitrosalicylowy, który po zalkalizowaniu przechodzi w postać zdysocjowaną, wykazując intensywne żółte zabarwienie. Zawartość w próbce azotanów(V) określa się spektrofotometrycznie przy długości fali równej $\lambda = 410\text{ nm}$. Metoda ma zastosowanie w oznaczaniu azotanów(V) w wodzie oraz ściekach przy stężeniu większym niż 0,1mg NO₃⁻/dm³ [9].

Wykonanie:

1) Do parownicy należy odmierzyć 10 cm³ badanej wody. Do próbki dodać 2-3 krople 0,5% roztworu NaOH i 1 cm³ 0,5% roztworu salicylanu sodu (C₇H₅O₃Na).

2) Na wrzącej łaźni wodnej należy odparować zawartość parownicy, po czym do suchej pozostałości dodać 1 cm³ stężonego kwasu siarkowego (kwas rozprowadzić po ściankach parownicy z widocznym białym osadem).

3) Po ok. 10 min.inkubacji do próbki dodać 20 cm³ wody destylowanej, całość dokładnie wymieszać i przenieść roztwór ilościowo do cylindra Nesslera.

4) Do próby dodać 7 cm³ alkalicznego roztworu winianu sodowo-potasowego (tj. rozpuścić 400 g wodorotlenku sodu w 500 cm³ wody destylowanej (roztwór a) oraz rozpuścić 60 g winianu sodowo-potasowego NaK(C₄H₄O₆) • 4H₂O w ok. 200 cm³ wody destylowanej (roztwór b), następnie zmieszać oba roztwory (a i b) w kolbie miarowej o pojemności 1 dm³ i uzupełnić wodą destylowaną do kreski).

5) Rozpuścić i uzupełnić wodą destylowaną do objętości 50 cm³.

6)Zmierzyć absorbcję barwnego roztworu przy długości fali $\lambda=410$ nm, stosując roztwór próby zerowej jako odnośnik [9].

Przygotowanie wzorcowego roztworu roboczego i podstawowego azotanu potasu (KNO₃)

a) Roztwór wzorcowy podstawowy

W kolbie miarowej o pojemności 1 dm³ (wysuszonej do stałej masy w temp. 105°C) należy rozpuścić w wodzie destylowanej 0,7216 g azotanu (V) potasu, próbkę uzupełnić wodą destylowaną do kreski . Całość dokładnie wymieszać. 1 cm³ przygotowanego roztworu zawiera 0,1 mg azotu azotanowego [9].

b) Roztwór wzorcowy roboczy

Do parownicy należy odmierzyć 10 cm³ roztworu wzorcowego podstawowego, dodać 2-3 krople 0,5% roztworu wodorotlenku sodu oraz 20 cm³ roztworu salicylanu sodu. Na wrzącej łaźni wodnej odparować zawartość parownicy do sucha, po czym parownicę wystudzić. Do suchej pozostałości dodać 1 cm³ stężonego kwasu siarkowego (kwas rozprowadzić po ściankach parownicy z widocznym białym osadem). Po ok. 10-minutowej inkubacji do próbki dodać 30 cm³ wody destylowanej i dokładnie wymieszać. Przygotowany roztwór przenieść ilościowo do kolby miarowej o poj. 100 cm³, dopełnić wodą do kreski i wymieszać. 1 cm³ przygotowanego w ten sposób roztworu zawiera 0,01 mg azotu azotanowego [9].

Przygotowanie krzywej wzorcowej (krzywa wzorcowa zależności mierzonej wartości absorbcji barwnego kompleksu w funkcji stężenia azotanów w mg NO₃)

Przygotować 7 cylindrów Nesslera o poj.50 cm³, do których kolejno wprowadzić : 0,0 (próba zerowa); 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0 oraz 4,0 cm³ roztworu wzorcowego roboczego azotanu potasu. Do każdego wzorca roboczego dodać po 7cm³ alkalicznego roztworu winianu sodowo-potasowego,po czym uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Przygotowane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio: 0,00; 0,003; 0,005; 0,007; 0,01; 0,02 oraz 0,04 mg azotu azotanowego. Zmierzyć absorbcję barwnego roztworu przy długości fali równej $\lambda=410$ nm, stosując roztwór próby zerowej jako odnośnik [9].

Obliczenie azotu azotanowego (V)

Zawarość azotu azotanowego (V) oblicza się w mg/dm³ wg wzoru:

$$X = (m \cdot 1000) / V$$

Gdzie:

m - zawartość azotu azotanowego (V) w badanej próbce (mg)

V - objętość próbki użyta do oznaczania (cm³) [9].

Oznaczanie zawartości azotanów (V) i azotanów (III) w tkankach mięsa metodą kolorymetryczną z odczynnikiem Griessa

Odczynnik Griessa to roztwór kwasu sulfanilowego i α-naftyloaminy w kwasie octowym. Roztwór ten stosowany jest w kolorymetrycznej analizie azotynów (jonów NO₂⁻). W wyniku reakcji z odczynnikiem powstaje barwnik azowy, który nadaje próbce różowy kolor (lub przy większym stężeniu azotynów - kolor czerwony).

Wykonanie:

Odważyć 12,5 g dobrze zhomogenizowanej próbki badanej (np. próbki mięsa) na wadze analitycznej z dokładnością (±0,01 g). Próbkę przenieść do kolby miarowej o poj. 250 ml, dodać 5 ml nasyconego roztworu tetraboranu sodu (Na₂B₄O₇ · 10 H₂O) i ok. 150 ml gorącej wody destylowanej. Całość dobrze wymieszać, po czym ogrzać na łaźni wodnej (temp. ok. 90-100°C) przez 15 minut. Po zakończeniu ogrzewania do próbki dodać kroplami 1 ml roztworu Carreza II (tj. 300 g siarczanu (VI) cynku w 1 dm³ wody) energicznie mieszając. Ochłodzić zawartość kolby i dodać wody destylowanej do kreski miarowej. Zimny roztwór należy przesączyć do szklanej zlewki, po czym za pomocą pipety przenieść 20 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Na koniec do próbki dodać 25 ml rozcieńczonego roztworu amoniaku (25% NH₃ rozcieńczony w stosunku 1:4 wodą destylowaną) oraz 10 ml roztworu kwasu solnego (0,1 mol/dm³), dopełnić zawartość kolby miarowej do kreski za pomocą wody destylowanej [11].

Oznaczanie azotynów (III)

Należy przygotować roztwory do pomiarów bezpośrednio w kuwetach pomiarowych wg tabeli:

	V _{próbki} [μl]	V _{azot. (II)} [μl]	V _{wody} [μl]	V _{Griess I} [μl]	V _{Griess II} [μl]	C _{azot. (II)} [mg dm ⁻³]	A
Roztwór odniesienia	-	-	500	250	250	-	
Roztwór kalibracyjny 1	-	50	450	250	250	1	
Roztwór kalibracyjny 2	-	100	400	250	250	2	
Roztwór kalibracyjny 3	-	150	350	250	250	3	
Roztwór kalibracyjny 4	-	200	300	250	250	4	
Roztwór kalibracyjny 5	-	250	250	250	250	5	
Roztwór kalibracyjny 6	-	300	200	250	250	6	
Roztwór kalibracyjny 7	-	350	150	250	250	7	
Roztwór kalibracyjny 8	-	400	100	250	250	8	
Roztwór kalibracyjny 9	-	450	50	250	250	9	
Roztwór kalibracyjny 10	-	500	0	250	250	10	
Próbka badana	500	-	-	250	250	-	

Zdjęcie: Kolejność dodawania odczynników do pomiaru absorbancji w oznaczaniu azotanów (III)

metodą kolorymetryczną, [11].

Po dodaniu odczynników do poszczególnych kuwet (roztwór odniesienia- próba kontrolna, kuwety 1-10 oraz próbka badana) należy ich zawartość delikatnie wymieszać pipetą i pozostawić na 15 minut. Po upływie czasu inkubacji zmierzyć absorbancję roztworów przy długości fali $\lambda=538$ nm za pomocą spektrofotometru. Na podstawie uzyskanych wyników należy wykreślić krzywą kalibracyjną przedstawiającą zależność absorbancji od stężenia NaNO_2 . Z wykreślonej krzywej odczytać stężenie jonów azotanowych (III) w próbce i obliczyć zawartość azotanów (III) w wyjściowej próbce produktu mięsnego. Otrzymane wartości porównuje się z obowiązującymi normami [11].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Markowska A., Furmanek W., Gackowska L., Siwek B., 1999. Zawartość azotanów i azotynów w całodziennych racjach pokarmowych ludzi dorosłych. ROCZ.PZH, 1999, 50, NR 3, 299-306.
<http://books.google.pl/books?id=zVuQ3IaxpLEC&pg=PA297&lpg=PA297&dq=azotany+i+azotyny+oznaczanie&source=bl&ots=xuyqGfX6hY&sig=hFkg29B0rlkQyNxRQ2SlvXLFwuY&hl=pl&sa=X&ei=QfhdVPHdE9Xvat-3gbgB&ved=0CEQQ6AEwBjgK#v=onepage&q=azotany%20i%20azotyny%20oznaczanie&f=false>
- [2]. Ćwiczenia z Chemii Leków, Cześć I i II, Wyd. Akademii Medycznej w Krakowie, Kraków 1985
- [3]. Tajner-Czopek A., Kita A., 2005. Analiza żywności - jakość produktów spożywczych, Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
- [4]. www.zcha.pwr.wroc.pl/chc4172l/cw11.doc
- [5]. ununokt.ovh.org/share/APS/spr7.doc
- [6]. <http://www.luskiwnik.eu/antisepticum.htm>
- [7]. http://galfarm.com.pl/files/upload/etakrydyny_mleczan_rivanol_aktualizacja.pdf
- [8]. <http://zwiazki-chemiczne.rolnicy.com/component/content/article/68-zwiazek/3607-rywanol.html>
- [9]. Monitoring i ocena środowiska. Badanie zawartości związków azotu (oznaczanie azotu azotanowego (V) metodą kolorymetryczną).
http://www.chemia.uni.lodz.pl/kchogin/dydaktyka/monitoring_srodowiska/pdf/L2.pdf
- [10]. Markowska A., Kotkowska A., Furmanek W., Gackowska L., Siwek B., Kacprzak-Strzałkowska E., Błonska A., 1995. Badania zawartości azotanów i azotynów w wybranych warzywach surowych oraz poddanych obróbce termicznej. ROCZ.PZH, 1995, XLVI, NR 4.
- [11]. Oznaczanie azotanów (III) i azotanów (V) w produktach mięsnych metodą spektrofotometryczną.
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:LBRjQWAUmbAJ:jniziol.sd.prz.edu.pl/file/MjMsNjcsMzc0NSxiaW9jaGVtaWFfYXpvdGFueV9pbN0cnVrY2phLnBkZg%3D%3D+&cd=1&hl=pl&ct=clnk&gl=pl&client=firefox-a>

<http://laboratoria.net/artukul/22536.html>

Informacje dnia: [2 edycja Targów LABS EXPO za nami! Dbasz o serce? Zadbaj o psychikę! Muszę o siebie dbać, żeby się nie wypalić jako wolontariusz Walczymy z osamotnieniem chorych na raka dróg żółciowych Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Kwasy humusowe z odzysku 2 edycja Targów LABS EXPO za nami! Dbasz o serce? Zadbaj o psychikę! Muszę o siebie dbać, żeby się nie wypalić jako wolontariusz Walczymy z osamotnieniem chorych na raka dróg żółciowych Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Kwasy humusowe z odzysku 2 edycja Targów LABS EXPO za nami! Dbasz o serce? Zadbaj o psychikę! Muszę o siebie dbać, żeby się nie wypalić jako wolontariusz Walczymy z osamotnieniem chorych na raka dróg żółciowych Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Kwasy humusowe z odzysku](#)

Partnerzy