

ANNA CZAJKOWSKA, MAGDALENA GAJEWSKA, BEATA BARTODZIEJSKA

ADAPTACJA METODY IC-DAD Z WŁASNĄ MODYFIKACJĄ PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI AZOTANÓW(III) I AZOTANÓW(V) W PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Streszczenie

Do oznaczenia zawartości azotanów(III) i azotanów(V) w wybranych produktach spożywczych zastosowano metodę chromatografii jonowej (IC) bez tłumienia przewodnictwa, z detekcją fotodiodową (DAD). Materiałem doświadczalnym była woda źródłana przeznaczona do spożycia, świeże warzywa oraz produkty mięsne. Zmodyfikowano metodę przygotowania próbek do analizy poprzez pominięcie etapów ich oczyszczania i odbiałczania oraz dopracowanie procesu ekstrakcji. Równocześnie dobrano optymalne warunki rozdzielania chromatograficznego. Granice wykrywalności azotanu(III) sodu i azotanu(V) sodu metodą IC-DAD wyniosły odpowiednio: 0,02 i 0,05 mg·kg⁻¹. Z kolei granice oznaczalności azotanów (III) i (V) to odpowiednio: 0,06 i 0,15 mg·kg⁻¹. Na podstawie badań własnych oraz wyników badań międzylaboratoryjnych stwierdzono, że metoda opracowana na bazie techniki IC-DAD może mieć zastosowanie do oznaczania zawartości azotanów(III) oraz azotanów(V) w produktach spożywczych. Metoda po adaptacji własnej umożliwia oznaczenie azotanów (III) i (V) z precyzją ≤ 5 % i z odzyskiem 90 – 110 %. Opracowana metoda jest na tyle uniwersalna, że może być stosowana do analizy złożonych matryc żywnościowych, jako alternatywa klasycznych metod spektrofotometrycznych.

Słowa kluczowe: azotany(III), azotany(V), IC-DAD, produkty spożywcze, przygotowanie próbek do badań, warunki rozdzielania chromatograficznego

Wprowadzenie

Azotany(III) i azotany(V) mogą występować w środkach spożywczych oraz w wodzie. Największym źródłem azotanów(V) w żywności są warzywa [15]. Występowanie w roślinach pewnych ilości azotanów jest zjawiskiem normalnym, ponieważ stanowi konsekwencję naturalnego obiegu azotu w przyrodzie, ale może też być wyni-

Mgr A. Czajkowska, mgr inż. M. Gajewska, dr B. Bartodziejska, Zakład Jakości Żywności, Oddział Chłodnictwa i Jakości Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, al. M. J. Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź. Kontakt: anna.czajkowska@och-ibprs.pl

kiem nadmiernego stosowania nawozów [3, 7]. Azotany występują również w surowcach pochodzenia zwierzęcego w wyniku skarmiania zwierząt hodowlanych paszą z dodatkiem związków azotowych i pojenia ich wodą pitną. Mogą być także celowo stosowane w przetwórstwie mięsnym, np. azotany(III) w celu nadania pożądanych właściwości sensorycznych, a także jako związki działające przeciwutleniająco i hamująco na drobnoustroje patogenne [6]. Azotany(V) nie stanowią bezpośredniego zagrożenia dla zdrowia konsumenta [7]. Szkodliwe dla zdrowia są natomiast azotany(III) [1, 2, 16]. Zgodnie z zaleceniami FAO/WHO dopuszczalne dzienne spożycie (ADI – *Acceptable Daily Intake*) azotanów(V), w postaci azotanu(V) sodu, nie powinno przekraczać 5 mg/kg masy ciała, a azotanów(III), w postaci azotanu(III) sodu – 0,2 mg/kg masy ciała [4]. W ustawodawstwie europejskim także ustalono najwyższe dopuszczalne poziomy tych związków w niektórych środkach spożywczych [14].

Do oznaczania zawartości azotanów w wodzie i w żywności stosuje się głównie metody kolorymetryczne oraz chromatograficzne. Metoda kolorymetryczna bazuje na reakcji Griessa. Zasada oznaczenia polega na dwuazowaniu azotanu(III) z sulfanilamidem (odczynnik Griessa I) i połączeniu z N-1-naftylodiaminą (odczynnik Griessa II). W wyniku reakcji powstaje czerwono-fioletowy związek dwuazowy, którego natężenie barwy mierzy się spektrofotometrycznie. Oznaczenie zawartości azotanów(V) przeprowadza się w podobny sposób, po uprzedniej redukcji metalicznym kadmem jonów NO_3^- do NO_2^- . Metoda ta jest zalecana w większości Polskich Norm, w przypadku produktów mięsnych garmazeryjnych, warzyw oraz wody [8, 9, 10]. Stosowanie tej metody wymaga jednak odrębnych norm dla matryc żywnościowych, różniących się m.in. zastosowanymi odczynnikami do wywoływania reakcji barwnej oraz wykonywaniem pomiarów przy różnych długościach fali. Wszystkie oznaczenia polegające na pomiarze barwy związków diazoniowych są bardzo czasochłonne, toksyczne ze względu na stosowane odczynniki oraz mało czułe w stosunku do oznaczanych analitów. Drugą metodą stosowaną do oznaczania azotanów w środkach spożywczych jest pomiar spektrometryczny po enzymatycznej redukcji azotanów(V) do azotanów(III) [12]. W wodnym ekstrakcie próbki mierzy się spektrometrycznie ilość NADPH (dinuekleotydu nikotynoamidoadeninowego) zużytego podczas reakcji, gdzie ilość NADPH jest równoważna ilości azotanów.

Kolejną techniką mającą zastosowanie do analizy zawartości azotanów w żywności jest chromatografia cieczowa. Procedury oznaczania azotanów (III) i (V) metodami chromatograficznymi, opisane w polskich normach, obejmują ekstrakcję azotanów z artykułów spożywczych gorącą wodą i usunięcie substancji interferujących metodą klarowania odczynnikami Carreza lub oczyszczania w kolumnach ekstrakcyjnych z fazą stałą (SPE) [11]. Oznaczenie wykonuje się techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w odwróconym układzie faz z detekcją UV lub metodą jonowymiennej chromatografii cieczowej (IC) z detekcją konduktometryczną [11, 13].

Chromatografia jonowa (IC), jako metoda analityczna, jest przede wszystkim stosowana do badania wód i ścieków. Jej zakres rozszerza się jednak o nowe rodzaje próbek i matryc, takich jak produkty spożywcze [5]. Trudności związane z analizą próbek żywności metodą IC związane są przede wszystkim ze złożoną matrycą tego rodzaju próbek i koniecznością odpowiedniego ich przygotowania. Najczęstszym rodzajem detekcji stosowanym w IC jest detekcja konduktometryczna. Taki rodzaj detekcji wymaga często zastosowania supresji jonów, czyli tłumienia przewodnictwa tła za pomocą supresora. Dodatkowo, często podczas analizy próbek o złożonych matrycach i o dużej zawartości np. jonów Cl^- trudne lub wręcz niemożliwe jest jednoczesne oznaczenie jonów, które występują na niższych poziomach stężeń np. NO_2^- lub Br^- . Innym rodzajem detektora stosowanym w IC jest detektor UV lub z matrycą diodową (DAD). Dzięki absorpcji oznaczanego jonu z zastosowaniem detektora UV możliwe jest bezpośrednie oznaczenie jonów NO_3^- oraz I^- i Br^- [5]. Brak jest jednak metod uniwersalnych, wykorzystujących proste metody przygotowania próbek, bez konieczności prowadzenia etapów dodatkowych.

Celem pracy była adaptacja metody chromatografii jonowej (IC) bez tłumienia przewodnictwa z detekcją fotodiodową (DAD) do oznaczania zawartości azotanów (III) i (V) w wybranych produktach spożywczych, w zakresie opracowania własnej metody przygotowania próbek i doboru optymalnych warunków analizy IC-DAD w stosunku do zalecanych w normie PN-EN 12014-4:2006/Ap1:2007 [13].

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły próbki wody źródlanej przeznaczonej do spożycia, świeże warzywa (marchew, ogórki, sałata) oraz produkty mięsne (mięso mielone z indyka, boczek wędzony, hamburgery, szynka dojrzewająca) zakupione w sieci handlowej. Wiarygodność opracowanej metody sprawdzono przez udział w badaniach międzylaboratoryjnych zorganizowanych przez firmę LGC Standards (Meat and Fish Analysis Scheme (QMAS) round 202). Metodę zastosowano w 23 laboratoriach do oznaczenia zawartości azotanów (III) i (V) w mięsie liofilizowanym.

Przygotowanie próbek i ich analizę wykonywano w ciągu jednego dnia. Wodę źródlaną analizowano bezpośrednio – pobierano jej $1,5 \text{ cm}^3$ i filtrowano przez filtr $0,2 \mu\text{m}$, systemu filtrowania Smplicity (Merck). Próbki warzyw myto, obierano (marchew, ogórki), a następnie homogenizowano. Homogeny materiał roślinny odważano w ilości ok. 2 g do zamykanych naczynek szklanych o poj. 20 cm^3 i uzupełniano wodą ultraczystą (MilliQ). Mieszano w wytrząsarce typu Vortex. Następnie wytrząsano w wytrząsarce z łaźnią wodną w temp. $60 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 30 min. Po ostudzeniu zawiesinę przenoszono ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 ml, dodawano 10 ml acetonitrylu i uzupełniano do kreski wodą ultraczystą (MilliQ). Tak przygotowaną próbkę roślinną energicznie mieszano w wytrząsarce typu Vortex i pozostawiano na 10 min. Próbki

filtrowano w celu usunięcia cząstek białka i tłuszczu przy zastosowaniu systemu filtrowania Smplicity (Merck), bezpośrednio do naczynek autosamplera o poj. 1,5 cm³. Produkty mięsne homogenizowano, a następnie odważano próbki o masie ok. 2 g i przygotowywano do analiz w sposób analogiczny jak próbki roślinne, wydłużając jedynie do 60 min czas ich ekstrakcji w łaźni wodnej. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Analizę próbki międzylaboratoryjnej (mięsa liofilizowanego) wykonano także w trzech powtórzeniach metodą IC-DAD oraz metodą spektrofotometryczną, zgodnie z normą PN-A-82114:1974 [9].

Do pomiarów ilościowych sporządzono krzywe kalibracyjne z zastosowaniem azotanu(III) sodu oraz azotanu(V) potasu, firmy Merck, jako substancji wzorcowych. Poprzez szereg rozcieńczeń wykonano wzorce kalibracyjne na pięciu poziomach stężeń azotanu(III) sodu, w zakresie od 1,1 do 11,5 mg·dm⁻¹ oraz azotanu(V) potasu w przeliczeniu na azotan(V) sodu w zakresie od 2,1 do 21,0 mg·dm⁻¹.

Analizę azotanów (III) i (V) wykonywano przy użyciu chromatografu cieczowego Performance, firmy Shimadzu, w układzie dwukanałowym, wyposażonym w autosampler i detektor DAD pracujący przy długości fali $\lambda = 205$ nm. Do rozdzielania badanych związków stosowano kolumnę jonowymienną Shodex NI-424 o wymiarach 100 × 4,6 mm, 5 μ m z prekolumną NI-424 10 × 4,6 mm, firmy Phenomenex. Fazę ruchomą stanowił roztwór buforowy zawierający 1,7 % boranoglukonianu litu (roztwór wodny zawierający 3,4 % kwasu borowego, 1,96 % kwasu glukonowego, 1,1 % wodorotlenku litu oraz 12,5 % glicerolu) oraz 10 % acetonitrylu – o pH 5,5 i przepływie 0,8 cm³·min⁻¹. Na szczyt kolumny chromatograficznej nastrzykiwano 40 μ l roztworów wzorcowych oraz próbek. Identyfikację azotanów w analizowanych próbkach prowadzono poprzez porównanie czasów retencji sygnałów pochodzących od tych związków, z sygnałami pochodzącymi od substancji wzorcowych. Otrzymane wyniki badań oszacowano statystycznie. Do określenia zależności pomiędzy powierzchnią pików badanych związków a ich zawartością w próbkach zastosowano analizę regresji prostej. W celu zapewnienia wiarygodności oraz standaryzacji wyników uzyskanych w trakcie prowadzonych badań przeprowadzono powszechnie stosowane procedury walidacyjne [17]. Opracowaną metodę poddano walidacji pod względem selektywności, dokładności, powtarzalności, odtwarzalności, liniowości i odzysku przy zastosowaniu substancji wzorcowych azotanów i próbek badanych matryc żywnościowych (mięso mielone, świeża marchew i woda).

Wyniki i dyskusja

Zmodyfikowaną metodę przygotowania próbek do oznaczeń, w której pominięto etapy ich oczyszczania (SPE - *Solid Phase Extraction*, odbiałczanie, sączenie), zastosowano do analiz wybranych produktów spożywczych techniką IC-DAD. Doświadczalnie ustalone warunki chromatograficzne (faza stacjonarna, skład i pH fazy rucho-

mej, szybkość przepływu fazy ruchomej) umożliwiły rozdział badanych związków w ciągu 8 min.

Wyniki analiz związków wzorcowych posłużyły do określenia równań regresji prostoliniowej i współczynników determinacji (r^2) w odniesieniu do azotanów(III): $y = (2,243x - 0,039) \cdot 10^5$, $r^2 = 0,99$ oraz azotanów(V): $y = (3,178x + 0,098) \cdot 10^5$, $r^2 = 0,99$, gdzie: y – pole powierzchni pików, x – stężenie.

Liniowość metody sprawdzono poprzez analizę serii mieszanin azotanów (III) i (V) w całym roboczym zakresie stężeń na 5 poziomach, w trzech powtórzeniach. Wyznaczone zależności pola powierzchni pików od stężenia azotanów mają charakter liniowy, co potwierdziły wysokie wartości współczynników determinacji ($r^2 \geq 0,99$).

Dzięki adaptacji metody IC-DAD i zmodyfikowaniu sposobu przygotowania próbek możliwe było oznaczenie zawartości azotanów (III) i (V) we wszystkich badanych produktach (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość azotanów (III) i (V) w wybranych produktach spożywczych.

Table 1. Content of nitrates (III) and nitrates (V) in selected food products.

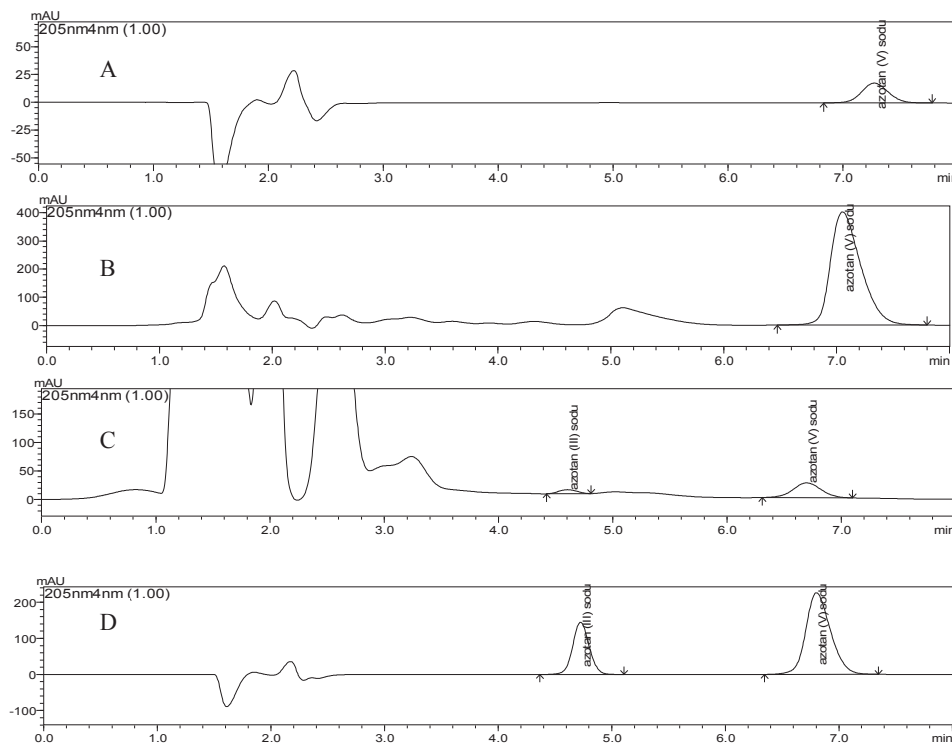
Nazwa produktu Name of product	Zawartość azotanów(III) Content of nitrate(III) [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$] $\bar{x} \pm s / \text{SD}$	Zawartość azotanów(V) Content of nitrate(V) [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$] $\bar{x} \pm s / \text{SD}$
Woda źródlana 1	0,084 \pm 0,001	0,490 \pm 0,006
Woda źródlana 2	nie wykryto*	1,282 \pm 0,001
Woda źródlana 3	nie wykryto*	0,894 \pm 0,003
Świeże ogórki	nie wykryto*	340,35 \pm 2,40
Świeża marchew	2,84 \pm 0,39	44,67 \pm 0,63
Sałata	0,724 \pm 0,040	741,37 \pm 2,90
Boczek wędzony	12,23 \pm 3,18	46,27 \pm 1,41
Mięso mielone z indyka	41,54 \pm 1,92	12,48 \pm 0,74
Hamburgery drobiowe	36,72 \pm 0,21	28,60 \pm 0,06
Szynka dojrzewająca	16,98 \pm 1,09	66,48 \pm 0,08

Objaśnienia: / Explanatory notes:

\bar{x} – wartość średnia / mean value; s – odchylenie standardowe / SD – standard deviation, $n = 3$;

* – granica oznaczalności – 0,06 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ / limit of detection equalling 0.06 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Sprawdzono wpływ składników badanych matryc na wynik oznaczeń. Nie stwierdzono sygnałów mogących spowodować zafałszowanie wyników, ponieważ wszystkie widoczne na chromatogramach niezidentyfikowane piki miały inne czasy retencji niż oznaczane związki (rys. 1).



Rys. 1. Wybrane chromatogramy IC-DAD próbek: A – wody źródlanej do spożycia, B – świeżych ogórków, C – boczku wędzonego, D – wzorca NO_2^- o stężeniu $5,7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ i NO_3^- o stężeniu $10,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Fig. 1. Selected IC-DAD chromatograms of samples of: A – drinking water; B – raw cucumbers, C – smoked bacon; D – standard solution of NO_2^- , its concentration rate being $5.7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ and of NO_3^- , its concentration rate being $10.5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Granice wykrywalności (LOD) azotanów (III) i (V) zostały wyznaczone na podstawie wartości odchylenia standardowego wyrazu wolnego krzywej kalibracyjnej oraz kąta nachylenia krzywej, natomiast granice oznaczalności (LOQ) zostały obliczone jako trzykrotna wartość LOD. Wartości LOD i LOQ poszczególnych związków przedstawiono w tab. 2.

Zastosowana metoda umożliwia oznaczanie zawartości azotanów(III) w zakresie od $0,06$ (LOQ) do $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ w wodzie i do $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ w warzywach i produktach mięsnych. Z kolei oznaczanie zawartości azotanów(V) opracowaną metodą jest możliwe od $0,15$ do $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, zarówno w wodzie, warzywach, jak i w produktach mięsnych.

Tabela 2. Granice wykrywalności i oznaczalności metody IC-DAD.
Table 2. Limits of quantification and limits of detection in IC-DAD method.

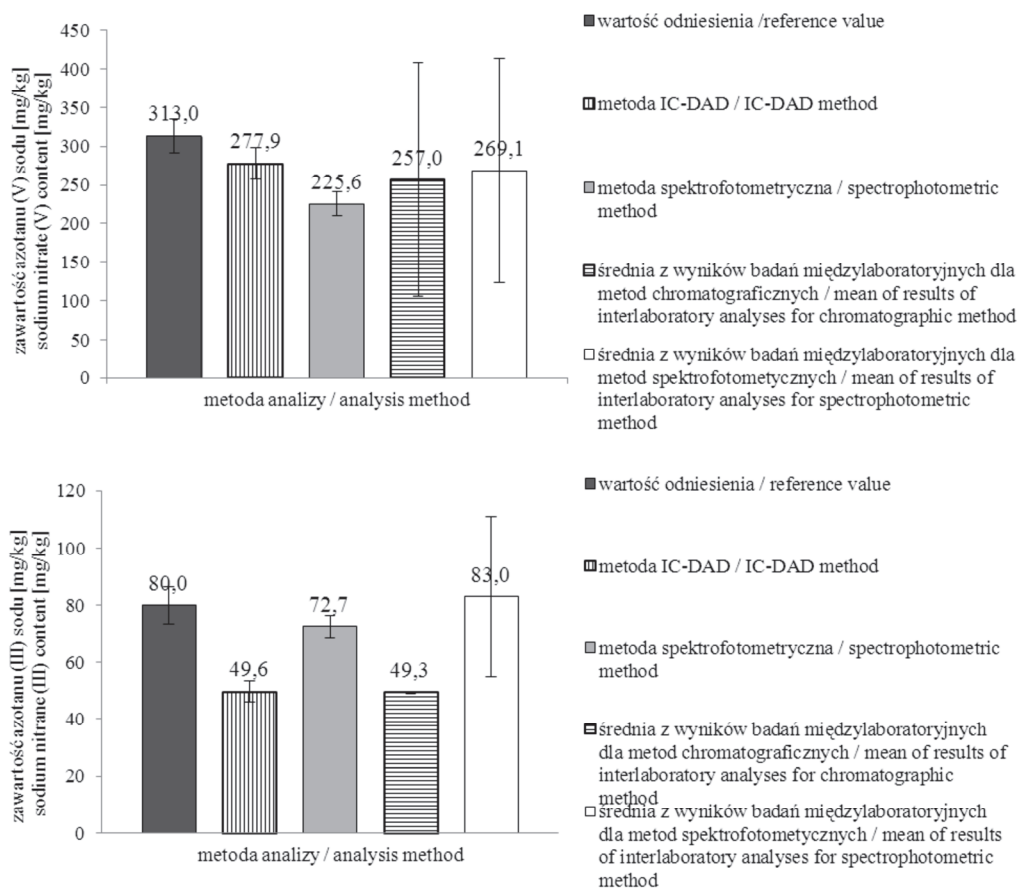
Związek / Compound	Granica wykrywalności Limit of detection (LOD) [mg·kg ⁻¹]	Granica oznaczalności Limit of quantification (LOQ) [mg·kg ⁻¹]
Azotan(III) sodu / Sodium nitrate(III)	0,02	0,06
Azotan(V) sodu / Sodium nitrate(V)	0,05	0,15

Na podstawie wyników badań dodatku wzorca na trzech poziomach stężeń do badanych matryc wyznaczono precyzję pośrednią, co pozwoliło określić długoterminowe odchylenie procesu pomiarowego. Wielkość precyzji pośredniej obliczono jako całkowity współczynnik zmienności (CV) wyników badań na podstawie analiz prowadzonych przez 5 kolejnych dni. Dokładność przedstawiono jako różnicę między oznaczoną a znaną ilością analitu w badanej próbce. Dokładność, jako błąd względny (RE), obliczono zarówno na podstawie wyników otrzymanych z analiz wykonanych w ciągu jednego dnia, jak i w ciągu pięciu kolejnych dni. Otrzymane całkowite współczynniki zmienności dla każdego z trzech stężeń poszczególnych analitów mieszczą się w zakresie od 0,68 do 4,70 %. Opracowana metoda charakteryzuje się także dużą dokładnością ($-5,47\% < RE < 0,69\%$). Odzysk badanych związków został oszacowany na podstawie serii pomiarów ($n = 6$) dodatku wzorca do badanych matryc i mieścił się w zakresie od 90,16 do 110,39 %.

Poprawność metody i wiarygodność uzyskanych wyników sprawdzono poprzez udział w badaniach międzylaboratoryjnych LGC Standards. Analizę mięsa otrzymanego w ramach badań międzylaboratoryjnych wykonano przy użyciu dwóch metod: IC-DAD oraz spektrofotometrycznej według normy PN-A-82114:1974. Wyniki własne porównano z wynikami uzyskanymi przez inne laboratoria uczestniczące w eksperymencie, wykorzystując do oznaczeń zarówno metodę spektrofotometryczną, jak i chromatograficzną (rys. 2).

Na podstawie analizy raportu z badań międzylaboratoryjnych stwierdzono, że ok. 80 % laboratoriów uczestniczących w eksperymencie deklaruje zastosowanie metody spektrofotometrycznej, chociaż metody chromatograficzne są coraz częściej stosowane do oznaczeń zawartości azotanów także w matrycach mięsnych.

Średnia zawartość azotanu(V) sodu w mięsie liofilizowanym, oznaczonego przy użyciu metody IC-DAD, wynosiła $277,9 \pm 20,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a metodą spektrofotometryczną – $225,6 \pm 18,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Największa różnica wyników pomiędzy metodami dotyczyła oznaczania zawartości azotanu(III) sodu w mięsie liofilizowanym. Metodą IC-DAD oznaczono go $49,6 \pm 3,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a metodą spektrofotometryczną – $72,7 \pm 5,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.



Objaśnienia: / Explanatory notes:

1. Zaznaczona niepewność wyników jest niepewnością rozszerzoną przy poziomie ufności ok. 95 % dla współczynnika rozszerzenia $k = 2$ / uncertainty of results as marked is expanded uncertainty at confidence level of approximately 95 % for coverage factor $k = 2$.
2. Zaznaczoną niepewność średnich wyników badań międzylaboratoryjnych obu metod przedstawiono jako odchylenie standardowe / marked uncertainty of mean results of interlaboratory analyses performed using two methods is presented as standard deviation.

Rys. 2. Zawartość azotanów (III) i (V) w mięsie liofilizowanym, oznaczonych metodami spektrofotometryczną i IC-DAD oraz obliczone wartości średnie z obu metod, uzyskane przez laboratoria biorące udział w badaniu międzylaboratoryjnym.

Fig 2. Comparison of the results of nitrates (III) and (V) determination in meat sample obtained by IC-DAD and spectrophotometric methods and the average values for both methods obtained by all laboratories in the interlaboratory study.

Różnica ta wynika przede wszystkim z wpływu pH na ekstrakcję analitów z próbki mięsa. Wykazano, że na wynik analizy azotanów(III) wpływ ma zarówno czas i tempe-

ratura ekstrakcji, jak również pH oraz dodawane reagenty (odbiałczanie metodą Carreza) [6]. W związku z powyższym, to właśnie analiza zawartości azotanów(III) w produktach mięsnych stwarza najwięcej problemów analitycznych. Wyniki badań własnych metodą IC-DAD mieściły się w kryteriach określonych przez organizatora badań w odniesieniu do wskaźnika z (z-score) $-2 \leq z \leq 2$. W przypadku azotanu(III) sodu z-score = -1,44, a azotanu(V) sodu z-score = -0,45 i wskazują na możliwość wykorzystania nowej metody przygotowania próbek do analiz zawartości azotanów w produktach mięsnych metodą IC-DAD.

Wnioski

1. Zaadaptowana metoda IC-DAD i opracowana własna procedura przygotowania próbek umożliwi oznaczanie zawartości azotanów (III) i (V) w wodzie przeznaczonej do spożycia, w warzywach oraz w produktach mięsnych.
2. Zaproponowana procedura przygotowania próbek do analiz jest prosta, uniwersalna i nie wymaga konieczności przeprowadzenia dodatkowych etapów ich przygotowania i oczyszczania.
3. Przedstawiona metoda umożliwi oznaczenie azotanów (III) i (V) z precyzją $\leq 5\%$ i z odzyskiem 90 – 110 %.
4. Na podstawie wyników badań międzylaboratoryjnych potwierdzono możliwość wykorzystania metody IC-DAD do oznaczeń azotanów, jako alternatywę klasycznych metod spektrofotometrycznych.

Literatura

- [1] Gajewska M., Czajkowska A., Bartodziejska B.: Zawartość azotanów (III) i (V) w wybranych warzywach dostępnych w handlu detalicznym regionu łódzkiego. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 2009, **40**, 388-395.
- [2] Gułajski M.: Jak unikać zatrucia organizmu żywnością. *Wiad. Ziel.*, 2002, **6**, 16-18.
- [3] Malinowska E., Gromkowska A., Szefer P.: Zawartość azotanów (V) i azotanów (III) w roślinach strączkowych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007, **XL (3)**, 287-291.
- [4] FAO/WHO. Safety evaluation of certain food additives. *WHO Food Additives Series*, 2003, **50**, 1053-1071.
- [5] Michalski R.: *Podstawy chromatografii jonowej*. Wyd. Śląskiej Wyższej Szkoły Zarządzania im. gen. Józefa Ziętki, Katowice 2011.
- [6] Merino L., Edberg U., Fuchs G.: Liquid chromatographic determination of residual nitrite/nitrate in foods: NMKL collaborative study. *J. AOAC Int.*, 2000, **83 (2)**, 365-376.
- [7] Niewczas J., Kamionowska M., Mitek M.: Zawartość azotanów (III) i (V) w owocach nowych odmian dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **2 (47) Supl.**, 238-245.
- [8] PN-C-04576:1973. Woda i ścieki. Badanie zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu azotynowego metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i 1-naftyloaminą.
- [9] PN-A-82114:1974. Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości azotynów i azotanów.
- [10] PN-A-75112:1992. Owoce, warzywa i ich przetwory. Oznaczanie zawartości azotynów i azotanów.

- [11] PN-EN 12014-2:2001. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości azotanów i/lub azotynów. Część 2: Oznaczanie zawartości azotanów w warzywach i przetworach warzywnych metodą HPLC/IC.
- [12] PN-EN 12014-3:2006/Ap1:2008. Część 3. Spektrometryczne oznaczanie azotanów i azotynów w produktach mięsnych po enzymatycznej redukcji azotanów do azotynów.
- [13] PN-EN 12014-4:2006/Ap1:2007. Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości azotanów i/lub azotynów. Część 4: Oznaczanie zawartości azotanów i azotynów w produktach mięsnych metodą chromatografii jonowymiennej (IC).
- [14] Rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Dz. Urz. UE L364/5, s. 11, z 20.12.2006.
- [15] Santamaria P.: Review. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J. Sci. Food Agric.*, 2006, **86**, 10-17.
- [16] Wojciechowska R.: Akumulacja azotanów a jakość produktów rolniczych. W: *Ochrona środowiska naturalnego w XXI wieku – nowe wyzwania i zagrożenia*. Red. K. Wiech, H. Kołoczek, P. Kaszyci. Wyd. F.W.O., Kraków 2005, ss. 21-27.
- [17] *Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Poradnik dla laboratoriów Państwowej Inspekcji Sanitarnej*. Red. M. Dobecki. Wyd. 3 popr. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 2004.

**ADAPTING IC-DAD METHOD WITH SAMPLE PREPARATION AS MODIFIED BY
AUTHORS TO DETERMINE CONTENT OF NITRATES (III) AND NITRATES (V) IN FOOD
PRODUCTS**

S u m m a r y

A non-suppressor ion chromatography method (IC) with a diode array detection (DAD) was applied to determine the content of nitrates(III) and nitrates(V) in selected food products. An experimental material consisted of potable spring water, fresh vegetables, and meat products. A method of preparing samples for analysis was modified so that the sample purification and deproteinization stages were removed and the extraction process was enhanced. At the same time, optimal conditions for chromatographic separation were selected. The limits of detection for sodium nitrate(III) and sodium nitrate(V) by the IC-DAD method were, respectively: 0.02 and 0.05 mg·kg⁻¹. Then, the limits of detection for nitrates(III) and (V) were, respectively: 0.06 and 0.15 mg·kg⁻¹. Based on the results of the authors' own analyses and on interlaboratory analyses, it was found that the method developed on the basis of IC-DAD technique could be applied to determine the content of nitrates(III) and nitrates(V) in food products. Using the method adapted by the authors, it is possible to determine the nitrates(III) and nitrates(V) with an accuracy level ≤ 5 % and with the recovery level of 90 - 110 %. The method developed is so universal that it can also be used in the analyses of complex food matrices as an alternative for classical spectrophotometric methods.

Key words: nitrates(III), nitrates(V), IC-DAD, food products, preparation of samples for analyses, conditions for chromatographic separation 