

Ilona Ołędzka, Lucyna Konieczna

OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA ZAWARTOŚCI AZOTANÓW (III) I (V) W PRZETWORACH MIĘSNYCH Z ZASTOSOWANIEM KAPILARNEJ ELEKTROFOREZY STREFOWEJ

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: dr *P. Kowalski*

Opracowano elektroforetyczną metodę oznaczania azotanów (III) i (V) oraz określono stopień ich obecności w wybranych wyrobach wędliniarskich. Opracowaną metodę poddano analizie statystycznej, która obejmowała wyznaczenie liniowości dla obydwu jonów w zakresie od 10 do 200 mg/kg, czułości, specyficzności, dokładności i precyzji. Wydajność procesu ekstrakcji wynosiła odpowiednio dla azotanu (III) 82,7%, a dla azotanu (V) 86,5%. Przedstawiona metoda jest mniej pracochłonna i kosztowna od opisanych w literaturze i nadaje się do oznaczeń seryjnych.

Hasła kluczowe: azotany, azotyny, żywność, elektroforeza kapilarna.

Key words: nitrates, nitrites, food, capillary electrophoresis.

Temat konserwowania żywności przez wielu konsumentów kojarzony jest ze szkodliwymi substancjami chemicznymi stosowanymi współcześnie w żywności. Pomimo obaw, środki konserwujące stały się obecnie nieodzowną częścią spożywaną przez nas żywności. Jednym z powodów, dla których się je stosuje, są rosnące wymagania właśnie ze strony konsumentów dotyczące wysokiego standardu bezpieczeństwa żywności poprzez wyeliminowanie wpływu działania czynników biologicznych. Największym niebezpieczeństwem jest żywność, która uległa zepsuciu na skutek rozwoju mikroorganizmów i wytwarzanych przez nie substancji toksycznych. Bezpieczeństwo ich stosowania w artykułach żywnościowych jest zagwarantowane ścisłymi przepisami krajowymi i międzynarodowymi. Prowadzony jest także systematyczny monitoring występowania tych związków w żywności.

Azotan (V) sodu i potasu (saletra sodowa E251 lub potasowa E252) oraz azotan (III) sodu (nitryt E250) są stosowane jako dodatki w przetwórstwie mięsny i serowarstwie. Azotany (V) nadają przetworom mięsny pożądaną właściwość sensoryczną: charakterystyczną różową barwę, aromat i peklowniczy smak. Azotany (III) działają przeciwutleniająco, zmniejszają oporność cieplną przetwórców bakteryjnych oraz hamują rozwój patogennych drobnoustrojów szczególnie *Clostridium botulinum* i *Clostridium perfringens*, które wytwarzają silnie trującą toksynę – botulinę (tzw. jad kiełbasiany) (1, 2). Azotan (III) sodu E250 jest potencjalnie rakotwórczy, a w połączeniu z innymi związkami chemicznymi w warunkach panujących w żołądku może tworzyć rakotwórcze nitrozoaminy. Zasadniczym toksycznym działa-

niem azotanów (III) jest wywoływanie methemoglobinemii a dzienne spożycie nie powinno przekroczyć 0,06 mg/kg masy ciała. W wielu krajach dodawanie go do żywności jest zabronione. Szczególnie wrażliwe na azotany (V) i azotany (III) pobrane z wodą pitną i żywnością są niemowlęta. Natomiast azotany (V) są związkami mało toksycznymi i nie stanowią bezpośredniego zagrożenia dla zdrowia. Pobrane z żywnością są szybko wchłaniane z przewodu pokarmowego i wydalane z moczem w postaci niezmienionej. Jednak część może być zredukowana w przewodzie pokarmowym przez mikroflorę do azotanów (III), tlenków azotu i amoniaku (3).

Obecność zarówno związków azotowych jak i innych dodatków do żywności może skutkować występowaniem alergii, rozwojem chorób nowotworowych, nieprawidłowym przebiegiem ciąży, kancerogennym i mutagennym wpływem na embriion. Producenci żywności mają obowiązek znakowania substancji dodatkowych dodawanych do żywności co umożliwi konsumentom dokonywanie świadomych wyborów. Dodatki te powinny być wyszczególnione na etykietach środków spożywczych według ich funkcji technologicznych (np. konserwant, barwnik, przeciwutleniacz). Ma to szczególne znaczenie w przypadku występowania alergii. W związku z powyższym celowym wydaje się podjęcie tematyki i opracowanie szybkiej i odpowiednio czułej metody, pozwalającej monitorować poziom zawartości omawianych związków w żywności.

Jak wynika z literatury do oznaczania azotanów (III) i (V) w żywności najczęściej stosowano metody chromatograficzne (2, 4, 5). Często stosowano także technikę elektroforetyczną w dwóch odmianach: kapilarna elektroforeza strefowa (6, 7) i izotachoforeza (8, 9). Jedno z najnowszych opracowań dotyczy oznaczania azotanów w żywności z zastosowaniem woltamperometrycznej techniki pomiaru (10).

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy. Badania obecności azotanów (III) i (V) w przetworach mięsnych wykonano w próbach wyrobów z lokalnych marketów.

Procedura ekstrakcyjna. Pobrane tkanki wyrobów wędliniarskich homogenizowano i odważano po trzy odważki każdej badanej próby w ilości ok. 3 g. Do każdej z prób dodano wzorzec wewnętrzny (50 µg/g tiocyjanianu amonu) oraz 5 ml wody dejonizowanej. Mieszaninę wytrząsano, a następnie ogrzewano na łaźni wodnej w temp. 60°C przez 20 minut. Zawiesinę odwirowano, roztwór z osadu odparowano do sucha na łaźni wodnej w temperaturze 60°C i rozpuszczono w buforze separacyjnym. Próby przechowywano do czasu analizy elektroforetycznej w stanie zamrożenia w temp. -20°C.

W badaniach zastosowano aparat do elektroforezy kapilarnej -P/ACE 2100 firmy Beckman (Fullerton, USA), wyposażony w detektor ze zmienną długością fali oraz system akwizycji danych Gold. W celu zoptymalizowania warunków analizy elektroforetycznej dobrano parametry mające wpływ na separację: stosowano niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową o długości 57 cm i przekroju wewnętrznym 75 µm; długość fali detektora ustawiono na 214 nm, czas nastrzyku 5 sek., do kapilary przyłożono napięcie rzędu 15 kV, a całkowity czas analizy ustawiono na 10 minut. Zastosowano odwróconą polaryzację elektrod z katodą przy wlocie i anodą przy

wylocie z kapilary, aby oznaczane aniony migrowały przed kationami obecnymi w próbach. Jako bufor separacyjny zastosowano 25 mM dwuwodorofosforan sodu doprowadzony do pH 6,8 za pomocą 0,1 M NaOH.

Ocena statystyczna. Dla obydwu oznaczanych anionów stwierdzono doświadczalnie liniową zależność przyrostu wysokości pików oznaczanych związków od ich stężenia w zakresie 10–200 mg/kg na podstawie sześciu serii pomiarowych a następnie przystąpiono do oznaczeń stężenia azotanów (III) i (V) w poszczególnych próbach. Granica wykrywalności dla oznaczanych jonów wynosi 1mg/kg wyrobu. Granica oznaczalności wynosi 10 mg/kg i jest pierwszym punktem zakresu liniowości metody. Zbadano powtarzalność oznaczeń wykonując serię pomiarów analogicznie jak przy krzywej kalibracji. Specyficzność metody oceniono w obrazie elektroferograficznym, w którym wykazano brak interferencji pików składników matrycy z pikami badanych substancji i wzorca wewnętrznego. W tabeli I umieszczono wyniki precyzji oznaczeń serii jednoczesnej (SD) oraz współczynniki zmienności (WZ). Dokładność mierzona stosunkiem stężenia oznaczonego do nominalnego zawiera się w granicach 88,7–105,2% dla azotanu (III) i 98,0–102,4% dla azotanu (V). Średnia wydajność procesu ekstrakcji dla azotanu (III) wynosi 82,7%, a dla azotanu (V) 86,5%.

Tabela I. Ocena statystyczna metody oznaczania azotanów (III) i (V)

Table I. Validation of nitrates and nitrites determination method

Stężenie teoretyczne (mg/kg)	Stężenie oznaczone (n=6) (mg/kg)	SD	WZ (%)	Odzysk (%)
Azotany (III)				
10	8,87	0,65	7,43	88,7
20	18,7	0,82	4,38	93,5
50	52,6	5,12	9,73	105,2
100	103,8	7,48	7,2	103,8
150	147,9	4,17	2,81	98,6
200	199,8	7,63	3,82	99,9
Azotany (V)				
10	10,13	0,87	8,59	101,3
20	19,6	0,78	3,99	98,0
50	51,2	3,96	7,74	102,4
100	98,6	7,07	7,18	98,6
150	150,1	9,82	6,54	100,1
200	200,6	5,17	2,57	100,3

WYNIKI I WNIOSKI

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 19 grudnia 2002 (Dz.U. Nr 21 z 8 lutego 2003, poz. 21) polskie normy dopuszczają stosowanie azotanów (III)

wyłącznie w postaci mieszanki z NaCl zawierającej 0,5–0,6% NaNO_2 oraz azotanów (V) tylko w produkcji kielbas typu salami, w których zawartość azotanów (III) wynosi poniżej 60 mg/kg produktu, a suma zawartości azotanów (III) i (V) nie może przekraczać 600 mg/kg. W pozostałych wędlinach, wyrobach garmażeryjnych i pasteryzowanych konserwach mięsnych łączna zawartość azotanów (III) i (V) nie może być większa od 125 mg/kg wyrobu. Dopuszczalne dzienne pobranie (ang. ADI Acceptable Daily Intake) rekomendowane przez WHO wynosi w przypadku azotanów dla osoby dorosłej 220 mg, dla azotynów 8 mg (11). Jest to wartość ustalana z uwzględnieniem tzw. marginesu bezpieczeństwa i wyraża taką ilość badanej substancji, która pobierana codziennie z żywnością, według aktualnego stanu wiedzy, nie przedstawia zagrożenia dla zdrowia człowieka.

W związku z koniecznością monitorowania obecności substancji konserwujących w żywności wydaje się niezbędne wdrażanie prostych, szybkich i odpowiednio czułych metod ich oznaczania. Opracowana metoda z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej pozwala na oznaczanie zawartości azotanów (III) i (V) w produktach wędliniarskich w zakresie od 10–200 mg/kg. Jednym z ważniejszych parametrów wpływających na rozdział elektroforetyczny jest odpowiednio dobrany bufor separacyjny. W przedstawionej pracy zastosowano 25 mM dwuwodorofosforan sodu o pH 6,8. W wysokim pH obydwa oznaczane jony wykazują podobną ruchliwość elektroforetyczną. W niskim pH azotany przyjmują „słaby” ładunek ujemny, a poniżej pH 2,5 migrują w czasie ponad 25 minut. Wzrost wartości pH buforu powoduje zwiększenie ruchliwości azotynów w stosunku do azotanów (9, 12). Optymalne pH dla obydwu oznaczanych związków wynosi około 6,8. Azotany i azotyny wykazują dobrą absorpcję UV w zakresie 190–225. W związku z tym, iż chlorki i siarczany, które pojawiają się w bezpośrednim sąsiedztwie pików azotanów, wykazują maksymalną absorbancję poniżej 200 nm, dlatego do oznaczeń wybrano długość fali detektora 214 nm. Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano rodanek amonu (NH_4SCN), którego pik nie interferuje z oznaczanymi związkami.

Tabela II. Zawartość związków azotowych w badanych próbach produktów wędliniarskich (mg/kg)

Table II. Content of nitrosamine in cold meat samples (mg/kg)

Gatunek wędliny	Azotany (III)	Azotany (V)
Szynka wiejska	38,5±0,95	43,96±3,58
Szynka z indyka	35,4±2,8	53,7±3,93
Schab peklowany	12,7±2,76	32,9±2,87
Polędwica sopocka	22,96±2,13	40,4±1,92
Szynka delikatesowa drobiowa	29,6±2,08	48,0±5,04
Szynka wieprzowa z czosnkiem	20,8±3,7	52,6±4,25

Opracowaną metodę zastosowano do oznaczenia zawartości azotanów (III) i (V) w wybranych produktach wędliniarskich pochodzących z lokalnych marketów. Przeanalizowano 18 prób reprezentujących 6 gatunków wędlin. Wyniki zaprezentowano w tabeli II. W żadnej z analizowanych prób nie zostały przekroczone dopuszczalne wartości dla obydwu analizowanych jonów. Odnotowano nieco wyższą zawartość

azotanów (V) niż azotanów (III) w analizowanych wędlinach. Dla azotanów (III) wartości te zawierały się w granicach od 12,7 mg/kg wyrobu dla schabu peklowanego do 37,5 mg/kg dla szynki wiejskiej, natomiast dla azotanów (V) od 32,9 mg/kg, także dla schabu peklowanego, do 53,7 mg/kg dla szynki z indyka. Łączna wartość azotanów (III) i (V) nie przekroczyła dopuszczalnej wartości 125 mg/kg w żadnej z analizowanych wędlin.

Prosta procedura ekstrakcyjna i krótki czas analizy pozwalają stwierdzić, że przedstawiona metoda nadaje się do oznaczeń seryjnych i może być z powodzeniem stosowana do monitorowania stężeń azotanów (III) i (V) w wyrobach wędliniarskich.

I. Olędzka, L. Konieczna

DETERMINATION OF NITRATES(III) AND (V) IN MEAT PRODUCTS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Summary

A rapid and simple CE method for the determining of nitrite and nitrate in cold meats has been developed and validated. Nitrate and nitrite ions are widely used as preservatives in meat products. Due to these toxic effects, it is important to develop new analysis methods for the simultaneous determination of two anions. The anions were extracted from samples by mixing and diluting the samples with water at 60°C. All described analyses were performed on a Beckman P/ACE 2100 electrophoresis system, equipped with unmodified silica capillary, UV detector and Gold software for data acquisition. The proposed method are linear in described range (Table I) and have an acceptable precision and accuracy for determination of nitrates and nitrites in food.

PIŚMIENNICTWO

1. Directive 2006/52/CE of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union (2006).
2. *Ferreira I.M.P.L.V.O., Silva S.*: Quantification of residue nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/diode array detector. *Talanta*, 2008; 74: 1598-1602.
3. *Tietze M., Burghardt A., Brągiel P., Mac J.*: Zawartość związków azotowych w produktach spożywczych. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia, Sectio EE*, 2007; 25(1): 71-77.
4. *Jobgen W. S., Jobgen S. C., Meininger H. Li, C. J., Wu G.*: Analysis of nitrite and nitrate in biological Samples Using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 2007; 851: 71-82.
5. *Butt S. B., Riaz M., Iqbal M. Z.*: Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. *Talanta*, 2001; 55: 789-797.
6. *Öztekin N., Nutku M. S., Erim F. B.*: Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 2002; 76: 103-106.
7. *Žunić G., Spasić S., Jelić-Ivanović Z.*: Simple and rapid method for the measurement of nitrite and nitrate in human plasma and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.A.*, 1999; 727: 73-79.
8. *Blatny P., Kvasnička F.*: Application of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples. *J. Chromatogr.A.*, 1999; 834: 419-431.
9. *Szökő E., Tabi T., Halasz A. S., Pálfi M., Magyar K.*: High sensitivity analysis of nitrite and nitrate in biological samples by capillary zone electrophoresis with transient isotachopheretic sample stacking. *J. Chromatogr.A.*, 2004; 1051: 177-183.
10. *Santos W. J. R., Lima P.R., Tanaka A. A., Tanaka S. M. C. N., Kubota L. T.*: Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. *Food Chemistry*, 2009; 113: 1206-1211.
11. *Sadecka J., Polonsky J.*: Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.A.*, 1999; 834: 401-417.
12. *Melanson J. E., Lucy Ch. A.*: Ultra-rapid analysis of nitrate and nitrite by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.A.*, 2000; 884: 311-316