

ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII JONOWEJ W OZNACZENIACH ZAWARTOŚCI AZOTANÓW(III) I AZOTANÓW(V) W OGÓRKACH SZKLARNIOWYCH

Agnieszka Krzyszczak¹, Agnieszka Szmagara¹, Anna Stachniuk², Elżbieta Anna Stefaniak¹

[1] Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Pracownia Materiałów Kompozytowych i Biomimetycznych, Konstantynów 1J, 20 - 708 Lublin, agnieszka9321@kul.Lublin.pl

[2] Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Pracownia Zastosowań Metod Separacji i Spektroskopii, Konstantynów 1J, 20 - 708 Lublin

Konsekwencją ciągłego obiegu azotu w przyrodzie jest występowanie azotanów(III) i azotanów(V) w środowisku. Stwierdzenie to nie powinno niepokoić, gdyż dzięki temu utrzymany jest prawidłowy balans między różnymi związkami azotu. Biorąc pod uwagę fizjologię organizmów żywych azotany(V) spożyte w niewielkich ilościach są bezpieczne dla człowieka. Głównym źródłem tych anionów w pożywieniu są warzywa, w których część jonów NO₃⁻ zamieniona jest w białko [1]. Jednakże, ze względu na wspomaganie i przyspieszanie wzrostu roślin nawozami mineralnymi, organizmy roślinne wchłaniają nadmierne ilości związków azotu, których nie są w stanie przetworzyć w proteiny. Skutkiem tego ich nadmiar kumulowany jest w wegetatywnych i przewodzących organach roślin. Azotany(III) są niebezpieczne dla człowieka [2]. Ich zawartość w warzywach jest niewielka ale wzrasta w czasie przechowywania. Ponadto, azotany(V) mogą ulegać redukcji w organizmie człowieka do azotanów(III) pod wpływem bakterii jelitowych oraz enzymów wydzielanych przez układ pokarmowy. Zredukowana forma jest ok. 6-10 razy bardziej toksyczna niż forma utleniona [3].



ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

Celem podjętych badań było oznaczenie ilościowe azotanów(III) i azotanów(V) w matrycy ogórka metodą chromatografii jonowej. Pomiary wykonano na aparaturze DIONEX ICS-1100 (Thermo Scientific). Układ chromatograficzny zawierał kolumnę separacyjną (4 mm DIONEX™ AERS™ Test Column) wypełnioną żywicą z nieporowatym stałym rdzeniem pokrytym cienką warstwą bardziej porowatego materiału. Fazę ruchomą stanowił odpowiednio rozcieńczony handlowo dostępny eluent DIONEX AS22 ELUENT CONCENTRATION (Thermo Scientific). Prawidłową detekcję analitów umożliwił wybudowany w chromatograf detektor konduktometryczny.

PREPARATYKA MATERIAŁU BADAWCZEGO

Przedmiot badań stanowiły ogórki szklarniowe. Materiał badawczy oczyszczono, osuszono, rozdzielono na skórkę i miąższ, a następnie zhomogenizowano. Otrzymaną pulpę przesączono przez filtr strzykawkowy (0,2 μm), a uzyskany filtrat po odpowiednim rozcieńczeniu bezpośrednio zadozowano na układ chromatograficzny. W celu zapewnienia wiarygodności wyników przeprowadzono walidację metody.

WALIDACJA METODY

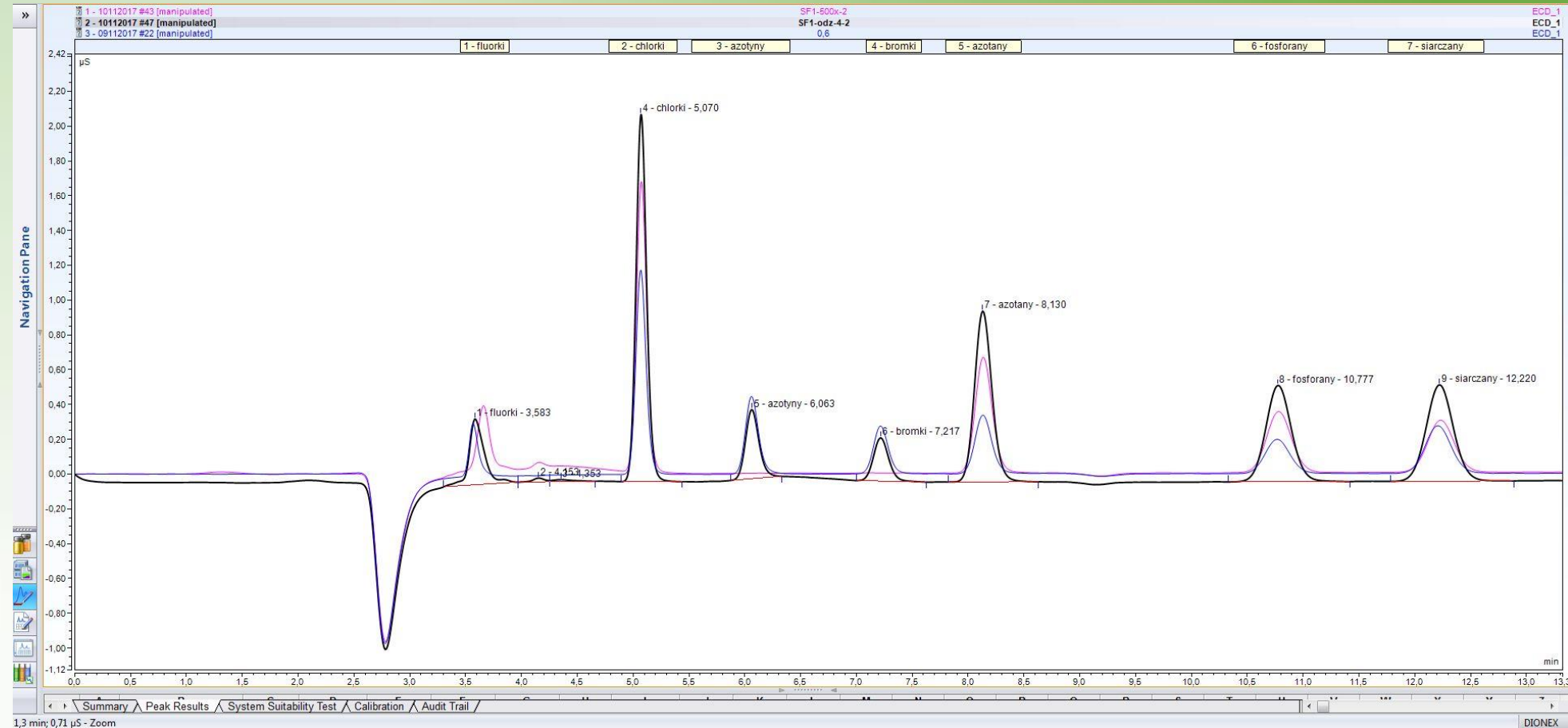
W celu oznaczenia ilościowego azotanów(III) i azotanów(V) w ogórkach szklarniowych, sporządzono krzywe kalibracyjne w zakresie 0,05 - 0,6 mg/L na 7 poziomach stężeń oraz zbadano ich przebieg (liniowość). Roztwory wzorcowe wykonano poprzez odpowiednie rozcieńczenia handlowo dostępnych wzorców (DIONEX Seven Anion Standard II) o stężeniu 100 mg/L. Z równań krzywych kalibracyjnych obliczono granice wykrywalności i oznaczalności. Następnie rozszerzono walidację wyznaczając powtarzalność w ciągu jednego dnia i międzydniową, stabilność po 24 i 48 godzinach, dokładność i odzysk. Zbadane parametry przedstawiono w tabeli 1, 2 i 3.

Tabela 1. Charakterystyka krzywych kalibracyjnych oraz zestawienie zawartości jonów i odzysków.

Parametry walidacyjne	Azotany(III)	Azotany(V)
Krzywa kalibracyjna	y=0,09854x+0,00049	y=0,081687x+0,01419
R ²	0,998	0,997
LOD	0,0168	0,0299
LOQ	0,0508	0,0907
Zawartość jonów - miąższ [mg/kg]	<LOD	105,0
Zawartość jonów – skórka [mg/kg]	<LOD	616,3
Odzysk - miąższ [%]	98,57	102,03
Odzysk - skórka [%]	95,96	92,18

Tabela 2. Stabilność oraz dokładność metody na dwóch poziomach stężeń.

Jon	Poziom stężenie [mg/L]	Stabilność po 24 h (N=12)		Stabilność po 48 h (N=12)		Dokładność (N=12)	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
NO ₂ ⁻	0,05	0,005	6,57	0,003	4,98	0,005	6,57
	0,6	0,0136	2,169	0,0115	1,828	0,0136	2,169
NO ₃ ⁻	0,05	0,006	5,614	0,008	7,566	0,006	5,614
	0,6	0,01	1,935	0,0265	4,953	0,01	1,935



Rys. 1. Zestawienie chromatogramów: wzorca 0,6 mg/L (niebieski), rozcieńzonego filtratu (różowy), filtratu z dodatkiem wzorca 0,6 mg/L (czarny). Czasy retencji: azotany(III) – 6,063 min., azotany(V) – 8,13 min.

Tabela 3. Powtarzalność metody w ciągu dnia i międzydniowa na dwóch poziomach stężeń.

Jon	Poziom stężen [mg/L]	Powtarzalność							
		W ciągu dnia						Międzydniowa (N=18)	
		1 dzień (N=6)		2 dzień (N=6)		3 dzień (N=6)			
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]	SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
NO ₂ ⁻	0,05	0,004	5,978	0,004	5,001	0,001	1,885	0,005	6,61
	0,6	0,003	0,48	0,014	2,158	0,004	0,662	0,013	1,985
NO ₃ ⁻	0,05	0,003	2,911	0,003	2,55	0,003	2,338	0,007	6,307
	0,6	0,012	2,426	0,008	1,639	0,007	1,264	0,024	4,627

WNIOSKI

- Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, iż preparatyka materiału badawczego do zastosowanej metody chromatograficznej jest znacznie prostsza, tańsza, mniej praco- oraz czasochłonna w porównaniu do przygotowania próby wg obowiązującej normy PN-92/A-75112 - Owoce warzywa i ich przetwory. Zastosowanie bezpośredniego dozowania filtratu zmniejsza liczbę etapów przygotowania próbki i eliminuje konieczność stosowania wielu odczynników.
- Zarówno w filtratach skórki, jak i miąższu nie stwierdzono obecności azotanów(III). W przeciwieństwie do azotanów(V), których zawartość w skórce jest około 6 razy większa niż w miąższu.

Literatura:

- [1] Shah I., Petroczi A., James RA., Naughton DP.: *Determination of nitrate and nitrite content in dietary supplements using ion chromatography*, J Anal Bioanal Tech S12:003, 2013.
- [2] Santamaria P.: *Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation*, J Sci Food Agric 86:10-17, 2006.
- [3] Gajewska M., Czajkowska A., Bartodziejska B., *Zawartość azotanów(III) i azotanów(V) w wybranych warzywach dostępnych w handlu detalicznym regionu łódzkiego*, Ochrona środowiska i zasobów naturalnych, 40:388-395, 2009.