

[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 wydalanymi 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].

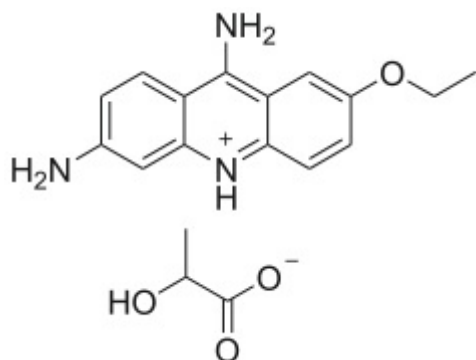
Badanie wpływu azotanów i azotynów na organizm żywy koncentruje się głównie wokół zagadnień toksyczności ostrej. Nadmierne pobieranie z dietą związków azotanów i azotynów bądź też zachodząca redukcja azotanów do azotynów w organizmie człowieka może prowadzić do tzw. **methemoglobinemii**, tj. utlenienia 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 łąknieniem, 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 przyłączeniem etakrydyny do kwasów nukleinowych (DNA), przez co następują letalne mutacje [6].



Zdjęcie: wzór riwanolu (mleczan etakrydyny), C₁₈H₂₁N₃O₄

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

Zasada metody riwanolowej polega na reakcji azotanów (III) z solą etakrydyny. W wyniku reakcji powstaje barwny związek. Zawartość azotanów (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].

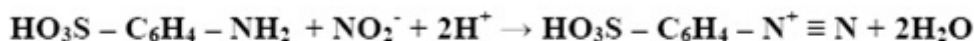
Przygotowanie krzywej wzorcowej do oznaczenia

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).

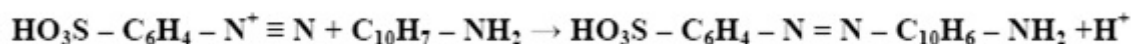
W tym celu do kolbki miarowej o poj. 50 cm³ należy dodać wcześniej wyliczoną ilość wzorca, 1 cm³ 10% roztworu kwasu solnego oraz 5 cm³ 0,1% roztworu etrakrydyny. Całość uzupełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Zmierzyć absorbancję próbek po 5 minutach przy długości fali $\lambda = 580\text{-}600$ 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 absorbancji wykonuje się przy długości fali równej $\lambda = 520$ 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 absorbancji 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 $\lambda = 538$ 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 przy długości fali równej $\lambda = 410$ 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 azotanów (jonów NO₂⁻). W wyniku reakcji z odczynnikiem powstaje barwnik azowy, który nadaje próbce różowy kolor (lub przy większym stężeniu azotanów - 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 azotanów (III)

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

	V _{próbki} [μl]	V _{azot(III)} [μl]	V _{wody} [μl]	V _{Griess I} [μl]	V _{Griess II} [μl]	C _{azot(III)} [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.luskiewnik.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., Błńska 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/MjMsNjcsMzcONSxiaW9jaGVtaWFFyXpvdGFueV9pbN0cnVrY2phLnBkZg%3D%3D+%&cd=1&hl=pl&ct=clnk&gl=pl&client=firefox-a>

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

Informacje dnia: [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

Partnerzy