**Ćw. 5. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI AZOTYNÓW W PRODUKTACH**

**SPOŻYWCZYCH**

Stosowanie w uprawie roślin dużych dawek nawozów azotowych powoduje kumulowanie w częściach jadalnych roślin znacznych ilości azotanów. Narażenie na azotany ma charakter egzogenny, podczas gdy narażenie na azotyny ma głównie charakter endogenny poprzez metabolizm azotanów. Przyjmuje się, że współczynnik konwersji spożytego azotanu do azotynu wynosi 7%. Według JECFA dopuszczalne dzienne spożycie azotynów wynosi 0–0,07 mg azotynów na kg m.c., co odpowiada 4,2 mg na dzień dla osoby o masie ciała 60 kg. Większość badań koncentruje się na stężeniach azotanów, ponieważ są one głównymi źródłami azotynów. Jednak azotyny, które są potencjalnie znacznie bardziej szkodliwe, w warzywach nie podlegają żadnym ograniczeniom regulacyjnym.

**Zasada metody**

Metoda polega na wywołaniu reakcji barwnej obecnych w produktach spożywczych azotynów z odczynnikami Griessa. Odczynnik Griessa I ([roztwór](https://pl.wikipedia.org/wiki/Roztw%C3%B3r) [kwasu sulfanilowego](https://pl.wikipedia.org/wiki/Kwas_sulfanilowy) i [α-naftyloaminy](https://pl.wikipedia.org/wiki/1-Naftyloamina) w [kwasie octowym](https://pl.wikipedia.org/wiki/Kwas_octowy)) jest stosowany w [kolorymetrycznej](https://pl.wikipedia.org/wiki/Kolorymetria_(chemia)) [analizie](https://pl.wikipedia.org/wiki/Analiza_chemiczna) [azotynów](https://pl.wikipedia.org/wiki/Azotyny) (jonów NO2−), z którymi daje [barwnik azowy](https://pl.wikipedia.org/wiki/Barwniki_azowe) zabarwiający roztwór na kolor różowy lub przy większych stężeniach azotynów czerwony.

Przebieg  [reakcji diazowania](https://pl.wikipedia.org/wiki/Diazowanie) z 1-naftyloaminą:



**Odczynniki**

* 10,6% heksocyjanożelazian potasu [K4Fe(CN)6] (odczynnik odbiałczający)
* 22% octan cynku, Zn(CH3COO)2 z CH3COOH (odczynnik odbiałczający)
* 5% tetraboran disodu (boraks) [Na2B4O7]
* standard azotynu sodu 69 µg/ml [NaNO2]
* kwas octowy lodowaty [CH3COOH]
* węgiel aktywny (do odbarwienia przesączu)
* odczynnik Griessa I (kwas sulfanilowy, 0,1% α-naftyloamina w 30% kwasie octowym)
* odczynnik Griessa II (kwas sulfanilowy w kwasie octowym)

Odczynniki Griessa należy przechowywać w ciemnej butelce w lodówce.

**Przygotowanie krzywej wzorcowej**

Do probówek szklanych o objętości 10 ml odpipetować roztwór wzorcowy azotynu sodu i wody w odpowiednich ilościach przedstawionych w poniższej tabelce.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **stężenie NO2- [μg/ml]** | **0,138** | **0,276** | **0,552** | **0,690** | **0,828** | **1,035** |
| **objętość standardu [μl]** | 5 | 10 | 20 | 25 | 30 | 37,0 |
| **woda MQ [ml]** | 2,495 | 2,490 | 2,480 | 2,475 | 2,470 | 2,463 |

Z przygotowanych wzorców odpipetować do czystych probówek szklanych (o objętości 10 ml) po 300 μl wzorca i dodać 2,6 ml wody destylowanej oraz 100 μl mieszaniny odczynników Griessa I i Griessa II (1:1), wymieszać i pozostawić bez dostępu do światła przez 30 min. Po inkubacji dokonać pomiaru absorbancji roztworów przy długości fali 538 nm wobec próby kontrolnej (2,9 ml wody destylowanej + 100 µl mieszaniny odczynników Griessa (1:1).

Po wykonaniu pomiaru wykreślić krzywa wzorcową odznaczając na osi odciętych (X) masę jonów azotu (III) w roztworze wzorcowym w μg/ml, a na osi rzędnych (Y) odpowiadające im wartości absorbancji.

**Przygotowanie prób badanych**

1. Z otrzymanej próbki warzyw (rukola, szpinak świeży, szpinak mrożony, sałata) odważyć 5 g (z dokładnością do 0,01 g) i rozetrzeć w moździerzu.
2. Przenieść próbkę za pomocą około 25 ml wody w temperaturze 70-800C (podgrzanej uprzednio na mieszadle magnetycznym) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, dodać 0,5g węgla aktywnego i wymieszać, dodać 1,25 ml boraksu i kilka razy mocno wstrząsnąć.
3. Kolbę ogrzewać w łaźni wodnej przez 30 min w temperaturze 1000C, po 15 min próbę zamieszać (pracować w rękawicach ochronnych!).
4. Po upływie 30 min próbę ochłodzić (w zimnej wodzie) i dodawać kolejno 0,5 ml K4Fe(CN)6 i 0,5 ml Zn(CH3COO)2, wstrząsając po dodaniu każdej porcji odczynników.

Próbę uzupełnić wodą do kreski (50 ml), wymieszać i filtrować przez watę filtracyjną

(w przypadku uzyskania przesączu barwnego filtrację powtórzyć !).

1. Przefiltrować dwukrotnie przez filtry próżniowe z sączkiem membranowym przy użyciu próżni. W razie zmętnienia filtrację próżniową powtórzyć.
2. Z klarownego przesączu pobierać odpowiednie ilości do oznaczenia azotynów.

**Oznaczenie zawartości azotynów**

Do szklanych probówek o pojemności 10 ml odpipetować 1,5 ml przesączu, dodać 1,4 ml wody destylowanej oraz 100 μl mieszaniny Griessa (1:1), następnie wymieszać i pozostawić bez dostępu światła na 30 minut. Po upływie 30 minut wykonać pomiar absorbancji roztworu na spektrofotometrze przy długości fali 538 nm wobec próby kontrolnej. Z wykresu wzorcowego odczytać stężenie jonów azotynu wyrażone w μg/ml.

**Obliczanie wyników oznaczenia**

Zawartość azotynu (X) wyrażoną jako jon azotynu (NO2-) w mg/kg produktu obliczyć ze wzoru:

**X[mg/kg]= m1 [mg/ml]*•*50[ml]**

**V1[ml]*•* m0[kg]**

w którym:

*m0* – masa próbki pobrana do oznaczenia (5g= 0,005kg),

*V1* – objętość przesączu pobrana do oznaczenia spektrofotometrycznego (1,5 ml),

*m1* – masa jonów (NO2-) zawarta w V1 objętości przesączu odczytana z wykresu kalibracyjnego (odczyt z krzywej wzorcowej w μg/ml należy przeliczyć na mg/ml !)

*50* – całkowita objętość przesączu (ml).