



Application Note AN-U-080

Nitrit und Nitrat in Fleischerzeugnissen

Robuste Routineanalyse mit Ionenchromatographie

Nitrit- und Nitratsalze werden als Konservierungsmittel für Fleisch und Fleischerzeugnisse verwendet. Sie sind auf Lebensmitteln als E 249-E 252 gekennzeichnet. Diese so genannten Pökelsalze verhindern das Wachstum von Bakterien, stabilisieren die Farbe des Fleisches und verbessern dessen Geschmack. Nitratsalze (E 251, E 252) haben eine geringe Toxizität. Eine langfristige Exposition ist jedoch bedenklich, da der Dünndarm Nitrat zu Nitrit reduziert, einem Vorläufer von

Nitrosaminen (die als krebserregend eingestuft werden) [1]. Nitrit selbst wird als wahrscheinlich krebserregend für den Menschen eingestuft. Die MPL (zulässige Höchstwerte) nach dem Herstellungsprozess liegen für Nitrit (E 249, E 250) je nach Produkt zwischen 50-180 mg/kg [2] und für Nitrat zwischen 150-300 mg/kg [3]. Die Europäische Kommission begrenzt Nitrit- und Nitratsalze in verarbeitetem Fleisch auf weniger als 150 mg/kg [4]. Klassische HPLC-UV-Methoden leiden häufig unter

asymmetrischen Peaks, geringer Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und geringer Empfindlichkeit. Andere Analysemethoden wie spektrophotometrische oder automatisierte diskrete Analysemethoden zeigen Interferenzen in Abhängigkeit von verschiedenen Fleischmatrices, was diese Art der Analyse für Labore, die eine Vielzahl von

Lebensmitteln und Getränken analysieren müssen, schwierig macht.

Die Ionenchromatographie mit UV-Detektion bietet eine robuste und universelle Methode für die Qualitätskontrolle von Nitrit und Nitrat in verschiedenen Fleischmatrices.

PROBENVORBEREITUNG

Untersucht wurden verschiedene Fleischerzeugnisse wie Schweinshaxe, Schweineschulter, Blutwurst und Chistorra-Wurst. Für alle untersuchten Fleischerzeugnisse wurde die gleiche Probenvorbereitung verwendet.

Die Proben wurden mit *Carrez*-Klärung behandelt, um Fette und Proteine zu entfernen. Die Menge der *Carrez*-Reagens ist auf den Fett- und Proteingehalt der jeweiligen Probe abgestimmt. Zum Beispiel wurde

eine frisch zerkleinerte Fleischprobe (5 g) mit *Carrez*-Reagenzien (2,5 mL *Carrez* I + 2,5 mL *Carrez* II) behandelt und mit Reinstwasser (UPW) auf 100 mL verdünnt. Nach dem Zentrifugieren (5000 rpm) und Filtrieren (0,45 µm) wurden 10 mL der Lösung mit UPW auf 50 mL weiter verdünnt (5-fache Verdünnung). Um einheitliche Ergebnisse zu erzielen, wurden auch Standardlösungen mit *Carrez*-Reagenzien hergestellt.

DURCHFÜHRUNG

Die Proben (50 µL) wurden nach der Inline-Ultrafiltration in das IC-System injiziert. Zwei Säulen mit unterschiedlichen Eigenschaften (Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 und Metrosep A Supp 5 - 50/4.0) wurden in Serie verwendet, um eine Koelution von Nitrit mit organischen Komponenten zu vermeiden. Die Analyten wurden mittels isokratischer Anionenaustausch-Chromatographie mit einem Carbonat/Methanol-Eluenten (3,6 mmol/L Na₂CO₃ +

15 % Methanol) und einer Flussrate von 0,7 mL/min getrennt (**Tabelle 1, Abbildungen 1–4**). Eine Säulentemperatur von 52 °C verbesserte zusätzlich die Auflösung des Nitrit-Peaks. Die sequenzielle Suppression reduzierte das Hintergrundrauschen und ermöglichte eine empfindliche UV/VIS-Detektion (205 nm). Die Quantifizierung erfolgte im Bereich von 0,02–2,00 mg/L für Nitrit und 0,05–5 mg/L für Nitrat.

Tabelle 1. Zusammenfassung der Parameter der IC-Methode.

Säulen	Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 + Metrosep A Supp 5 - 50/4.0
Eluent	3.6 mmol/L Na ₂ CO ₃ + 15% Methanol
Fluss	0.7 mL/min
Temperatur	52 °C
Injektion	50 µL
Detektion	UV 205 nm

Die Probenkonzentrationen wurden für Natriumnitrat und Natriumnitrit berechnet. Um das System von organischen Verunreinigungen sauber zu halten, wurde der Probenflussweg nach jeder Analyse mit

Methanol/UPW (1:1 v/v) gespült und der Suppressor mit einer Mischung aus Schwefelsäure (500 mmol/L), Oxalsäure (100 mmol/L) und Aceton (20% v/v) regeneriert.

ERGEBNISSE

Die **Abbildungen 1-4** zeigen beispielhafte Chromatogramme für verschiedene getestete Fleischproben. Die Nitritkonzentrationen reichten von nicht nachweisbar bis 54 mg/kg und die Nitratkonzentrationen lagen zwischen 10-50 mg/kg. Bei diesen Tests überschritt Nitrit nur in einer Probe (Schweineschulter) den kritischen Grenzwert von 50 mg/kg, während Nitrat immer deutlich innerhalb der zulässigen Konzentrationsgrenze gemessen wurde [4]. Langzeitstudien in Qualitätskontrolllaboren von Fleischherstellern haben gezeigt, dass diese IC-

Methode robust und präzise genug für die Routineanalyse von Nitrit und Nitrat ist.

Diese universelle Analysemethode ist auch für Getränke- und Gemüseproben geeignet. Die Auswertung einer Vielzahl von Lebensmittel- und Getränkeproben ergab symmetrische Peaks, eine hohe Reproduzierbarkeit der Konzentrationswerte und vernachlässigbare Interferenzen durch Matrixverbindungen. Die Bestimmungsgrenzen für Natriumnitrit und Natriumnitrat lagen in allen untersuchten Proben deutlich unter 5 mg/kg.

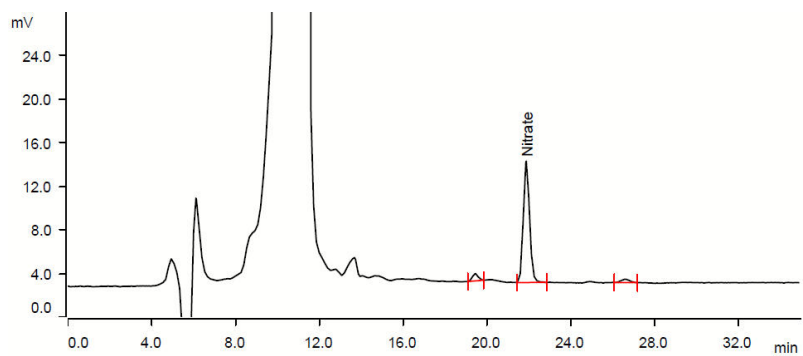


Abbildung 1. Chromatogramm einer Blutwurstprobe. Ergebnisse: Natriumnitrit <1,0 mg/kg, und Natriumnitrat 22,5 mg/kg.

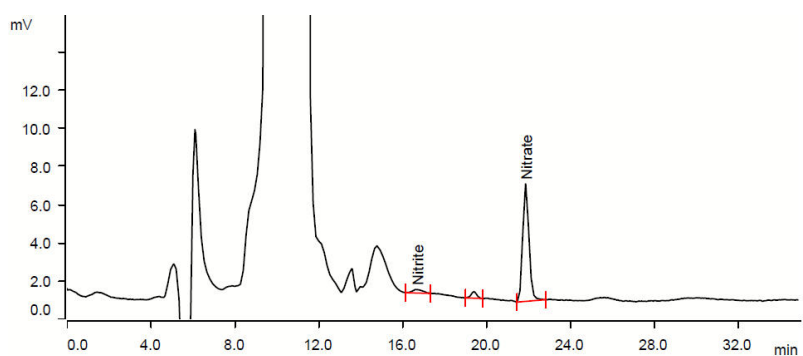


Abbildung 2. Chromatogramm einer Schweinshaxenprobe. Ergebnisse: Natriumnitrit 1,5 mg/kg und Natriumnitrat 9,6 mg/kg.

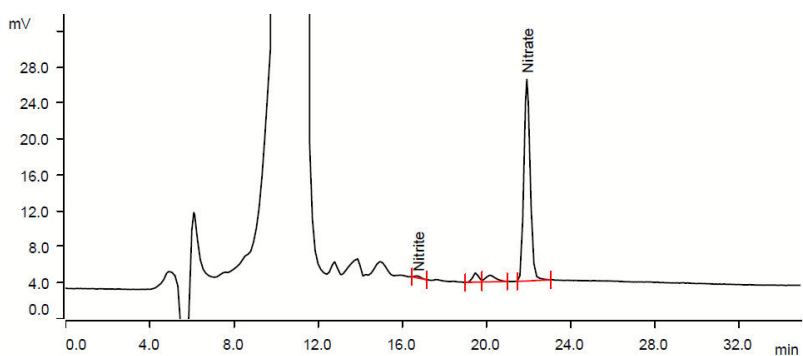


Abbildung 3. Chromatogramm einer Chistorra-Wurstprobe. Ergebnisse: Natriumnitrit <1,3 mg/kg, und Natriumnitrat 49,4 mg/kg.

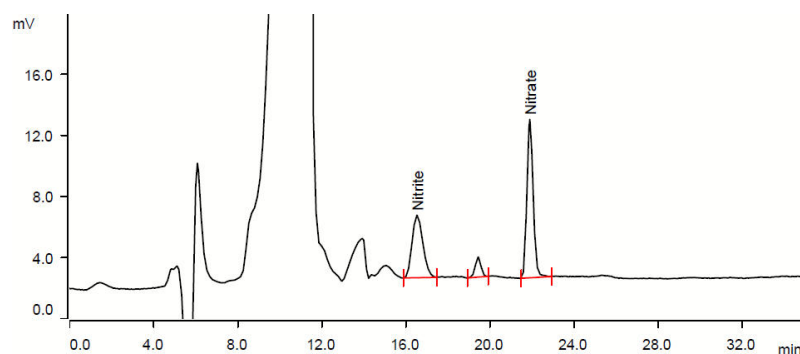


Abbildung 4. Chromatogramm einer Schweineschulterprobe. Ergebnisse: Natriumnitrit 53,7 mg/kg und Natriumnitrat 20,0 mg/kg.

FAZIT

Die beschriebene Probenvorbereitung und die chromatographische Methode funktionierten für alle untersuchten Fleischprodukte. Die vorgestellte IC-Methode mit zwei Trennsäulen garantiert eine optimale Trennung von Nitrit und Nitrat von störenden Matrixpeaks und damit eine empfindliche Analyse für die Qualitätskontrolle selbst in komplexen Matrices (LOQ <5 mg/kg für Fleischprodukte). Diese Methode hat sich bereits in einigen Lebensmittellabors als Standardmethode für die Qualitätskontrolle etabliert und weist eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit, unabhängig von der Lebensmittelmatrix, auf.

Durch die Inline-Ultrafiltration eignet sich diese Methode noch besser für eine schnelle und

zeitsparende Routineanalyse, da die Probenvorbereitung unkompliziert ist und keine kostspieligen Probenvorbereitungskartuschen wie bei einigen traditionellen Methoden erforderlich sind. Da jegliche störende Matrix entweder durch Inline-Ultrafiltration entfernt oder auf der analytischen Säule gut aufgelöst wird, zeigt diese Methode im Vergleich zur klassischen HPLC-UV-Methode eine überlegene analytische Leistung bei der Bestimmung von Nitrit und Nitrat in Fleischproben.

Nitrit und Nitrat werden direkt quantifiziert, was ein Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden ist, bei denen der Summenparameter des Gesamtstickstoffs bestimmt wird (z. B. AOAC Official Method 935.48 oder 993.03).

REFERENZEN

1. Wang, P. et al. (2002), Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications, Chemical Reviews 102 (4): 1091–1134.
2. EFSA (European Food Safety Authority) (2017), Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives, EFSA Journal 15(6):4786.
3. EFSA (European Food Safety Authority) (2017), Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives, EFSA Journal 15(6):4787.
4. European Commission (2011) Decision No 1129/2011/EC of 11 November 2011, amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. Off J Eur Union L295 1-177.

CONTACT

Metrohm Deutschland
In den Birken 3
70794 Filderstadt

info@metrohm.de

KONFIGURATION



930 Compact IC Flex Oven/SeS/Deg

Der 930 Compact IC Flex Oven/SeS/Deg ist das intelligente Compact-IC-Gerät mit **Säulenofen**, **sequenzieller Suppression** und eingebautem **Degasser**. Zur Regeneration des Suppressors kann ein 800 Dosino eingesetzt werden. Das Gerät kann mit beliebigen Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden.

Typische Anwendungsgebiete:

- Anionen- oder Kationenbestimmungen mit sequenzieller Suppression und Leitfähigkeitsdetektion



947 Professional UV/VIS Detector Vario SW

Der intelligente Ein-Wellenlängen-Detektor, 947 Professional UV/VIS Detector Vario SW, ermöglicht die sichere und zuverlässige Quantifizierung von Substanzen, die im ultravioletten oder sichtbaren Bereich aktiv sind. Es kann eine Wellenlänge ausgewählt werden.



Metrosep A Supp 5 - 50/4.0

In weniger als 6 Minuten trennt die Metrosep A Supp 5 - 50/4.0 die sieben Standardanionen. Selbst Fluorid ist noch vom Injektionspeak getrennt und kann einwandfrei integriert werden. Die auf einem Polyvinylalkohol-Polymer basierende Säule zeichnet sich wie alle Säulen der A-Supp-5-Familie durch hohe Bodenzahlen und damit ausgezeichnete Trennleistung aus. Die Metrosep A Supp 5 - 50/4.0 ist die Säule der Wahl, wenn einfache Trennaufgaben in kurzer Zeit gelöst werden müssen – und zwar ohne Verzicht auf sehr niedrige Nachweisgrenzen.



Metrosep A Supp 7 - 250/4.0

Nebenprodukte aus der Wasseraufbereitung (disinfection by-products) stehen im Verdacht, nicht nur gesundheitsschädlich sondern sogar krebserregend zu sein. Deshalb sind die Oxohalogenide Gegenstand vieler Untersuchungen und Standards geworden (z. B. EPA 300.1 Part B, EPA 317.0, EPA 326.0). In erster Linie geht es dabei um Bromat, welches bei der Ozonisierung von Trinkwasser aus Bromid entsteht. Die Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 stellt eine Hochleistungstrennsäule für die parallele Bestimmung der Standardanionen, der Oxohalogenide und der Dichloressigsäure dar. Mit dieser Säule werden diese Ionen bis in den unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich hinein sicher und präzise bestimmt. Die hohe Nachweisempfindlichkeit wird durch den Einsatz des 5- μm -Polyvinylalkohol-Polymers erreicht, mit dem extrem hohe Bodenzahlen und damit ausgezeichnete Trenn- und Nachweiseigenschaften erzielt werden. Zusätzlich kann die Trennung durch Veränderung der Temperatur an die spezifischen Erfordernisse der Applikation angepasst werden.



919 IC Autosampler plus

Der 919 IC Autosampler plus erfüllt die Anforderungen von Laboren mit mittlerem Probenaufkommen. Mit ihm lassen sich die verschiedensten Ionenchromatographen des Metrohm-Sortiments automatisieren.



800 Dosino

Der 800 Dosino ist ein Antrieb mit Schreib-/Lesehardware für intelligente Dosiereinheiten. Mit fest montiertem Kabel (Länge 150 cm).



807 Dosing Unit 2 mL

807 Dosing Unit mit integriertem Datenchip mit 2 mL Glaszylinder und Lichtschutz, montierbar auf Reagenzflasche mit ISO/DIN-Glasgewinde GL 45. FEP-Schlauchverbindung, Antidiffusionsspitze.