

Nitrat (NO₃⁻)

UV-Test

zur Bestimmung von Nitrat (NO₃⁻) in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 10 905 658 035

Test-Combination für 3 × 13 Bestimmungen

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

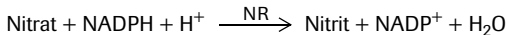
Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

Prinzip (Lit. 1)

Nitrat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) in Gegenwart des Enzyms Nitrat-Reductase (NR) zu Nitrit reduziert.



Die bei dieser Reaktion verbrauchte NADPH-Menge ist der Nitrat-Menge proportional. NADPH ist Messgrösse und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 40 ml Lösung, zusammengesetzt aus:
Imidazol-Puffer, pH ca. 7,8
2. Flasche 2 mit ca. 40 Tabletten, jede Tablette enthält:
NADPH, ca. 0,5 mg, FAD, ca. 0,01 mg
3. Drei Flaschen 3 mit Lyophilisat Nitrat-Reductase, je ca. 4 U

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. In einem Becherglas oder Reagenzglas je nach Anzahl der Bestimmungen für jeden Ansatz (Leerwert und Proben) **eine** Tablette aus Flasche 2 mit **einem** ml Lösung aus Flasche 1 lösen (zur Entnahme der Tabletten aus Flasche 2 beiliegende Pinzette benutzen), ergibt Reaktionsgemisch 2.
3. Inhalt einer Flasche 3 mit 0,8 ml bidest. Wasser lösen, ergibt Lösung 3.

Stabilität der Reagenzien

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 2 und 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch frisch ansetzen.

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Lösung 3 ist bei 2-8°C 2 Wochen haltbar.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,050 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser oder Leerwert³

Probelösung: 0,3-30 µg Nitrat/Testansatz⁴ (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

| In Küvetten pipettieren | Leerwert | Probe |
|-------------------------|----------|----------|
| Reaktionsgemisch 2 | 1,000 ml | 1,000 ml |
| Probelösung* | - | 0,100 ml |
| bidest. Wasser | 2,000 ml | 1,900 ml |

mischen**, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E₁). Reaktion starten durch Zugabe von

| Lösung 3 | 0,050 ml | 0,050 ml |
|----------|----------|----------|
|----------|----------|----------|

mischen**, **genau 40 min nach Messung von E₁** Extinktionen der Lösungen unmittelbar nacheinander messen (E₂). Nach **weiteren genau 20 min** nochmals Extinktionen der Lösungen unmittelbar nacheinander messen (E₃).

* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

** Z. B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z. B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E₁-E₂) bzw. (E₂-E₃) berechnen.

Extinktionsdifferenz des Leerwertes = (E₁-E₂)_{Leerwert} - 2 × (E₂-E₃)_{Leerwert}

Extinktionsdifferenz des Probe = (E₁-E₂)_{Probe} - 2 × (E₂-E₃)_{Probe}

ΔE_{Nitrat} = Extinktionsdifferenz_{Probe} - Extinktionsdifferenz_{Leerwert}

Die gemessenen Extinktionsdifferenzen ΔE_{Nitrat} sollten zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt.4).

Ist die Extinktionsdifferenz der Probe (ΔE_{Probe}) grösser als 1,000 (gemessen bei 340, bzw. Hg 334 nm), bzw. 0,500 (gemessen bei Hg 365 nm), so ist die Konzentration von Nitrat in der Probelösung zu hoch. Die Probelösung ist dann gemäss Verdünnungstabelle zu verdünnen.

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,5 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

Hieraus ergibt sich für Nitrat (NO₃⁻):

$$c = \frac{3,050 \times 62,0}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{1,891}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Nitrat/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analyseergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Nitrat}} = \frac{c_{\text{Nitrat}} \text{ [g/l Probelösung]}}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Nitrat zwischen 0,3 µg und 30 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an Nitrat zwischen 0,03 g/l und 0,30 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

| Geschätzte Menge an Nitrat im Liter | Verdünnung mit Wasser | Verdünnungsfaktor F |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| < 0,3 g | - | 1 |
| 0,3-3,0 g | 1 + 9 | 10 |
| 3,0-30 g | 1 + 99 | 100 |
| > 30 g | 1 + 999 | 1000 |

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) zu klein (z.B. < 0,100), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis zu 2,000 ml zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

1 Das Absorptionsmaximum von NADPH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.

2 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

3 Z. B. bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers

4 S. Hinweise zur Testdurchführung



2. Technische Hinweise

2.1 Bei der Vorbereitung der Probe zur Bestimmung von Nitrat in Obst- und Gemüsesäften sind die "verdünnten Carrez-Reagenzien" ausreichend. Bei der Bestimmung von Nitrat in Fleisch und Fleisch-Erzeugnissen müssen jedoch zur vollständigen Entfernung von Enzymen (aus Muskel oder Starterkulturen) die "konzentrierten Carrez-Lösungen" verwendet werden. Wichtig ist in beiden Fällen, dass nach Zugabe der Natronlauge der pH-Wert der Lösung schwach alkalisch (ca. pH 8) ist.

2.2 **Bei der Bestimmung von Nitrat im unteren Messbereich (Spurenanalytik) sind folgende Punkte besonders zu beachten, damit befriedigende Ergebnisse erhalten werden:**

a) Die verwendeten Papier- oder Membranfilter müssen frei von Nitrat sein.

b) Die für die Vorbereitung der Probe empfohlenen Adsorbentien (Polyvinylpyrrolidon (PVPP), Bentonit, etc.) müssen ebenfalls frei von Nitrat sein.

c) Die Lösungen zur Carrez-Klärung müssen auch frei von Nitrat sein.

Zur Prüfung auf Abwesenheit von Nitrat:

a) Filter mit bidest. Wasser waschen und 2,000 ml Waschwasser zur Nitrat-Bestimmung einsetzen (Leerwert mit bidest. Wasser).

b) Adsorbentien mit bidest. Wasser in den angegebenen Mengen-/Volumen-Verhältnissen versetzen, mischen und filtrieren; Filtrat zur Nitrat-Bestimmung einsetzen (2,000 ml) (Leerwert mit bidest. Wasser).

c) Bidest. Wasser, Carrez-I-Lösung, Carrez-II-Lösung und Natronlauge in den angegebenen Volumen-Verhältnissen mischen und filtrieren. Filtrat zur Nitrat-Bestimmung einsetzen (2,000 ml) (Leerwert mit bidest. Wasser).

Die beim Bestimmungsansatz angegebenen Zeiten (Messung von E_2 genau 40 min nach Messung von E_1 , und Messung von E_3 nach genau weiteren 20 min) sind auch bei geringen Nitrat-Mengen im Testansatz einzuhalten.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1.1)

Die Nitrat-Reductase setzt weitgehend spezifisch Nitrat-Ionen um. Die bei der Nitrat-Reduktion gebildeten Nitrit-Ionen werden nur mit geringer Geschwindigkeit umgesetzt. Mit relativ hoher Geschwindigkeit werden auch Chlorat-Ionen - nicht jedoch Perchlorat- und Jodat-Ionen - umgesetzt.

Bei der Analyse von Reinsubstanz Kaliumnitrat ist mit Ergebnissen von ca. 100 % zu rechnen.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.1)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 2,000$ ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration an Nitrat von 0,1 mg/l (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 2 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,15 mg/l errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 2,000$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,3 μg Nitrat/Ansatz (0,15 mg Nitrat/l Probelösung; Probevolumen $v = 2,000$ ml) bis 30 μg Nitrat/Ansatz (0,3 g Nitrat/l Probelösung; Probevolumen $v = 0,100$ ml).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,015 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,100$ ml einer Konzentration von 1,5-5 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,015-0,05 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

| | | | |
|--------------------------|----------------|-----------------------------|------------|
| 5,8 μg /Test | n = 10 | VK = 2,7 % | |
| 17 μg /Test | n = 10 | VK = 2,8 % | |
| 28 μg /Test | n = 10 | VK = 1,3 % | (Lit. 1.1) |
| Schwarzrettich-Saft: | r = 77,3 mg/l | $s_{(r)}$ = $\pm 27,3$ mg/l | |
| | R = 112,2 mg/l | $s_{(R)}$ = $\pm 39,7$ mg/l | |
| Möhrensaft: | r = 12,2 mg/l | $s_{(r)}$ = $\pm 4,3$ mg/l | |
| | R = 17,7 mg/l | $s_{(R)}$ = $\pm 6,3$ mg/l | |
| Rote-Beete-Saft: | r = 42,8 mg/l | $s_{(r)}$ = $\pm 15,1$ mg/l | |
| | R = 64,1 mg/l | $s_{(R)}$ = $\pm 22,7$ mg/l | |
| Spinat-Säuglingsnahrung: | | | |
| x = 64 mg/kg | r = 15,5 mg/kg | $s_{(r)}$ = $\pm 5,5$ mg/kg | |
| | R = 24,5 mg/kg | $s_{(R)}$ = $\pm 8,7$ mg/kg | |

(Lit. 2.1)

7. Störungen

Durch die Probe in den Test eingebrachte Nitrit-Ionen führen bei einer Konzentration von > 70 μg /Ansatz zu einer Hemmung der Hauptreaktion. Mangan-Ionen (> 5 μg /Ansatz) verzögern die Nitrat-Umsetzung deutlich. Chlorid-Ionen haben einen deutlichen Hemmeinfluss erst ab einer Konzentration von $> 4,3$ mg/Ansatz. Cyanid-Ionen (> 100 μg /Ansatz) und Sulfid-Ionen (> 100 μg /Ansatz) inaktivieren die Nitrat-Reductase vollständig.

8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von Nitrat nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

8.2 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

8.3 Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.

8.4 Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zuge-setztem Standardmaterial vorbereitet und anschliessend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Nitrat sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmassnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

Kohlensäure-haltige Proben (z.B. durch Filtration) entgasen;

saure Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 8 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

stark gefärbte Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) oder Polyamid (z. B. 1 g/100 ml) behandeln;

feste und halbfeste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren; ggf. Trübstoffe und Farbstoffe mit Carrez-Reagenzien (s.u.) entfernen;

Protein-haltige Proben mit Carrez-Reagenzien (s.u.) klären;

Fett-haltige Proben mit heissem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen und filtrieren; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

Hinweis:

Bei manchen Probelösungen (z. B. aus Kaffee, Buntsaft-Konzentraten) wird gelegentlich eine Schleimreaktion schon vor der Messung von E_1 beobachtet. In solchen Fällen wird empfohlen, das Probematerial mit Polyvinylpyrrolidon, PVPP (1 g/100 ml) oder Bentonit (1 g/100 ml) zu versetzen, 2 min zu rühren und anschliessend zu filtrieren.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einem 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml bidest. Wasser enthält, pipettieren. Anschliessend 5 ml Carrez-I-Lösung (Kalium-hexacyanoferrat(II) (Ferrocyanid) 85 mM = 3,60 g $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM = 7,20 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 M; z. B. 10 ml) pH 7,5-8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

Zur Vorbereitung der Probe von Fleisch- und Milch-Erzeugnissen sind die "konzentrierten Carrez-Lösungen" zu verwenden (s. Pkt. 11: Anwendungsbeispiele).

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Nitrat in Wasser, Trink- und Mineralwasser

Klare, farblose Wasserproben unverdünnt oder gemäss Verdünnungstabelle verdünnt zum Test einsetzen. Trübe Wasserproben filtrieren und zum Test einsetzen.

Kohlensäurehaltige Proben filtrieren, ggf. neutralisieren und zum Test einsetzen.

Bestimmung von Nitrat in Bier

Bierproben filtrieren oder – zur Entfernung der Kohlensäure – etwa 1 min quirlen. Zu 10 ml CO_2 -freie Bierprobe 0,1 g Bentonit hinzufügen und ca. 2 min mit dem Glasstab rühren. Filtrieren und 1,000 ml Filtrat zum Test einsetzen.

Bestimmung von Nitrat in Obst- und Gemüsesäften

Ca. 15 g homogenisierte Saftprobe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 20 ml bidest. Wasser hinzufügen und mischen. Dann 5 ml verdünnte Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) zugeben und mischen, anschliessend 5 ml verdünnte Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) hinzufügen und wiederum mischen. Mit Natronlauge (1 M) auf pH 8 einstellen. Mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Klares Filtrat mit einem Volumen von $v = 0,100-0,500$ ml zum Test einsetzen.

Bestimmung von Nitrat in Wein

Weinprobe ggf. neutralisieren. Bei Rotwein zusätzlich 1 g Polyvinylpyrrolidon (PVPP) pro 20 ml Wein hinzufügen und etwa 5 min rühren. Probe filtrieren und zum Test einsetzen.

Bestimmung von Nitrat in Obst und Gemüse

Probe zerkleinern und homogenisieren. Ca. 5 g Probematerial in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen und mit ca. 60 ml heissem bidest. Wasser (ca. 70°C) versetzen. Schütteln und ca. 15 min bei 60-70°C halten. Stark gefärbte Produkte (z. B. Rote Bete) oder Proben mit hohem Stärkegehalt (z. B. Kartoffeln) zusätzlich mit Carrez-Reagenzien (s. unter "Obst- und Gemüsesäfte") behandeln. Mischung auf 20-25°C abkühlen und quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überspülen. Mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen und filtrieren. 0,100-1,000 ml des Filtrats zum Test einsetzen.

Bestimmung von Nitrat in Fleisch und Fleisch-Erzeugnissen

Probe zerkleinern und homogenisieren. Ca. 5 g Probematerial in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen und ca. 50 ml kochendes bidest. Wasser hinzufügen. 15 min beim Sieden halten und auf 20-25°C abkühlen lassen. Je 3 ml konzentrierte Carrez-I-Lösung (15,0 g Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) und konzentrierte Carrez-II-Lösung (30,0 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) nacheinander hinzufügen und nach jeder Zugabe leicht schwenken. Anschliessend mit Natronlauge (1 M) auf pH 8 einstellen. Inhalt des Becherglases quantitativ in einen 100 ml-Messkolben spülen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen. Zur Fettabscheidung 20 min in den Kühlschrank stellen, anschliessend filtrieren. Die ersten ml des Filtrats verwerfen. Klares Filtrat zum Test einsetzen.

Sollte das Filtrat nicht klar sein, so muss erneut eine Probelösung hergestellt werden unter Verwendung von je 4 ml (bis zu maximal 10 ml) konzentrierter Carrez-I-Lösung und konzentrierter Carrez-II-Lösung.

Bestimmung von Nitrat in Milch-Erzeugnissen und Käse

Probe zerkleinern und homogenisieren. Ca. 5 g Probematerial in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen und wie unter "Fleisch und Fleisch-Erzeugnissen" angegeben weiter verfahren.

Bestimmung von Nitrat in Baby-Nahrung

Probe zerkleinern und homogenisieren. Ca. 5 g Probematerial in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen und ca. 50 ml kochendes bidest. Wasser hinzufügen. 15 min beim Sieden halten und auf 20-25° abkühlen lassen. Je 5 ml verdünnte Carrez-I-Lösung und verdünnte Carrez-II-Lösung (Herstellung s. unter "Obst- und Gemüsesäfte") nacheinander hinzufügen, weiterverfahren, wie unter "Fleisch und Fleisch-Erzeugnisse" angegeben.

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Pharmaka, Kosmetika, in der Umweltanalytik und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben.

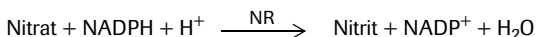
Literatur

- 1.1 Beutler, H.-O., Wurst, B. & Fischer, S. (1986) Eine neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Nitrat in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **82**, 283-289
- 2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Nitrat in Gemüsesäften, 26.26-2 (Juli 2001); Bestimmung von Nitrat in Gemüsebrei für Säuglinge und Kleinkinder, 48.03.05-1 (Juli 2001); Bestimmung des Nitrit- und Nitratgehaltes in Wurstwaren nach enzymatischer Reduktion, 08.00-14 (Juni 2008)
- 2.2 Brautechnische Analysemethoden, Band II, 2. Auflage, S. 139-141 (1988), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 2.3 Deutsche Norm DIN EN 12014-5 (August 1997) Bestimmung des Nitrat und/oder Nitritgehaltes, Teil 5: Enzymatische Bestimmung des Nitratgehaltes in gemüsehaltiger Säuglings- und Kleinkindernahrung
- 2.4 European Standard EN 12014-5 (August 1997) Determination of nitrate and/or nitrite content, Part 5: Enzymatic determination of nitrate content of vegetable containing food for babies and infants
- 3.1 Rohm, H. & Winkler-Macheiner, U. (1987) Eine enzymatische Methode zur Nitratbestimmung in Anwendung auf Molkenpulver und Käse, ERNÄHRUNG/NUTRITION **11**, 9-13
- 3.2 Beutler, H.-O., Wurst, B. & Henniger, G. (1986) Enzymatic Determination of Nitrate, Poster-Präsentation bei Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting, Scottsdale, AZ, USA
- 3.3 Kretzschmar, R. & Kretzschmar, T. (1988) Enzymatische Nitratbestimmung in kommunalem Abwasser, Vom Wasser **70**, 119-128
- 3.4 Brauner-Glaesner, G. & Beutler, H.-O. (1989) Ringversuchsergebnisse zur enzymatischen Nitratbestimmung, Lebensmittelchem. Gerichl. Chem. **43**, 123-126

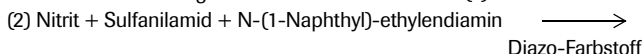
13. Hinweis auf die Verwendung im Farb-Test zur Bestimmung von Nitrat und Nitrit in Wurstwaren/Fleisch-Erzeugnissen nach Arneth (s. Lit. 1.1)*

Prinzip (Ref. 1.1)

Nitrat wird in Gegenwart des Enzyms Nitrat-Reductase (NR) durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) zu Nitrit reduziert (1).



Nitrit reagiert mit Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-ethylendiammoniumdichlorid unter Bildung eines roten Diazo-Farbstoffs (2).



Der Diazo-Farbstoff ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 540 nm (Hg 546 nm) zu bestimmen.

Reagenzien

- I. 0,2 g Bromthymolblau in 100 ml vergälltem Ethanol (96%; m/m) lösen.
- II. Carrez-I-Lösung: 150 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{H}_2\text{O}$ /l bidest. Wasser.
- III. Carrez-II-Lösung: 230 g $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ /l bidest. Wasser.
- IV. Inhalt der Flasche 1 (Imidazol-Puffer, pH 7,8) der Test-Combination Nitrat unverdünnt verwenden.
Die Lösung ist ausreichend für ca. 36 Ansätze.
Die Lösung ist bei 2–8°C stabil (s. Packungsetikett).
- V. Tabletten in der Flasche 2 (NADPH, FAD) der Test-Combination Nitrat unverändert verwenden.
Die Tabletten sind in ausreichender Menge für ca. 36 Ansätze.
Die Tabletten sind bei 2–8°C stabil (s. Packungsetikett).
- VI. Inhalt einer Flasche 3 (Nitrat-Reductase) der Test-Combination Nitrat unverändert verwenden.
Jede Flasche enthält Enzym für ca. 12 Ansätze.
Der Inhalt der Flasche 3 ist bei 2–8°C stabil (s. Packungsetikett).
- VII. Puffer-/Enzymlösung
Inhalt einer Flasche 3 der Test-Combination Nitrat mit 12 ml Imidazol-Pufferlösung (IV) aus Flasche 1 der Test-Combination Nitrat lösen, 50 mg Titriplex III (di-Natrium-ethylen-dinitritotetraacetat-dihydrat) zugeben und mischen.
Die Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch anzusetzen.
- VIII. Farbreagens
Lösung A: 8 g Sulfanilamid in 500 ml bidest. Wasser unter Erwärmen im Wasserbad lösen, auf Raumtemperatur abkühlen und, falls erforderlich, filtrieren. Anschliessend unter ständigem Rühren 330 ml konzentrierte Salzsäure (frei von Nitrat und Nitrit) zugeben und mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.
Die Lösung ist bei 20°C mehrere Wochen haltbar.
Lösung B: 330 mg N-(1-Naphthyl)-ethylendiammoniumdichlorid in 250 ml bidest. Wasser lösen. Die Lösung ist bei 20°C in einer braunen Flasche 1 Woche haltbar.
Arbeitslösung: Täglich für jeden Ansatz 1,5 ml Lösung A und 1,5 ml Lösung B mischen.
- IX. Natriumnitrit-Vergleichslösungen
200 mg Natriumnitrit auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit 500 ml bidest. Wasser lösen. 25 ml Stammlösung in 500 ml-Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen (= 20 mg Natriumnitrit/l).
Jeweils 10, 20, 30 und 40 ml verdünnte Stammlösung in 200 ml Messkolben geben. 0,2 ml Bromthymolblau-Lösung (I) zugeben, mit NaOH (1 M) bis zum Farbumschlag nach blau versetzen. 2 ml Carrez-I-Lösung (II) und 2 ml Carrez-II-Lösung (III) zugeben, nach jeder Zugabe gut mischen, Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Die ersten Anteile des Filtrats werden verworfen.
Die Vergleichslösungen (mit 1 mg, 2 mg, 3 mg und 4 mg Natriumnitrit/l) sind täglich frisch herzustellen.
- X. Nitrat-Standardlösungen
300 mg Kaliumnitrat (z. B. Merck Darmstadt, Kat. Nr. 5065, suprapur) auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit 500 ml bidest. Wasser lösen. 25 ml dieser Stammlösung im 500 ml-Messkolben mit bidest. Wasser verdünnen (= 30 mg Kaliumnitrat/l). Jeweils 10, 20, 30 und 40 ml verdünnte Stammlösung in 200 ml-Messkolben geben. 0,2 ml Bromthymolblau-Lösung (I) zugeben, mit NaOH (1 M) bis zum Farbumschlag nach blau versetzen. 2 ml Carrez-I-Lösung (II) und 2 ml Carrez-II-Lösung (III) zugeben, nach jeder Zugabe gut mischen, Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Die ersten Anteile des Filtrats werden verworfen.
Die Standardlösungen (mit 1,5 mg, 3 mg, 4,5 mg und 6 mg Kaliumnitrat/l) sind täglich frisch herzustellen.

Bestimmungsansatz

| | |
|----------------------------|---|
| Wellenlänge ¹ | 540 nm (Hg 546 nm) |
| Glasküvette ² : | 1,00 cm |
| Inkubationsvolumen: | 6,000 ml |
| Messvolumen: | ca. 3 ml |
| Messung gegen Wasser | |
| Probelösung: | 3–12 µg Kaliumnitrat, bzw. 2–8 µg Natriumnitrit/Ansatz (in 2,000 ml Probelösung) ³ |

a) Bestimmung von Nitrit

| In Reagensgläser geben | Vergleich NaNO ₂ 1 mg/l | Vergleich NaNO ₂ 2 mg/l | Vergleich NaNO ₂ 3 mg/l | Vergleich NaNO ₂ 4 mg/l | Probe |
|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------|
| Probelösung | – | – | – | – | 2,000 ml |
| Vergleichslösungen (IX) | 2,000 ml | 2,000 ml | 2,000 ml | 2,000 ml | – |
| bidest. Wasser | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml |
| Farbreagens(VIII) | 3,000 ml | 3,000 ml | 3,000 ml | 3,000 ml | 3,000 ml |
| mischen, 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen lassen. Extinktionen der Lösungen messen. | | | | | |

b) Bestimmung von Nitrat und Nitrit

| In Reagensgläser geben | Standard KNO ₃ 1, 5 mg/l | Standard KNO ₃ 3 mg/l | Standard KNO ₃ 4, 5 mg/l | Standard-KNO ₃ 6 mg/l | Probe |
|--|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------|
| Tablette (V) | 1 Stück | 1 Stück | 1 Stück | 1 Stück | 1 Stück |
| Probelösung | – | – | – | – | 2,000 ml |
| Standardlösungen (X) | 2,000 ml | 2,000 ml | 2,000 ml | 2,000 ml | – |
| Puffer-Enzymlösung (VII) | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml |
| 60 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Zugabe von | | | | | |
| Farbreagens (VIII) | 3,000 ml | 3,000 ml | 3,000 ml | 3,000 ml | 3,000 ml |
| mischen, 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen lassen. Extinktionen der Lösungen messen. | | | | | |

Hinweis Die Eichkurven müssen nicht bei jeder Versuchsreihe ermittelt werden. Es ist ausreichend, wenn die Eichkurven von Zeit zu Zeit überprüft werden und wenn in jeder Analysenserie zur Testkontrolle jeweils eine Kaliumnitrat-Standard-Lösung und eine Natriumnitrit-Vergleichslösung mitgeführt werden.

* Roche prüft die Funktion der TC Nitrat mittels der auf Seite 1 des Beipackzettels beschriebenen UV-Methode. Bei zusätzlichem Einsatz Anwender-eigener Reagenzien im Farb-Test nach Arneth kann Roche nicht für die Funktion garantieren.

1 Bei Verwendung von Spektralphotometern wird bei 540 nm gemessen, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampfampe wird bei einer Messstrahlung von 546 nm gemessen.
2 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
3 S. Hinweise

Berechnung

Graphische Auswertung

Die Berechnung des Ergebnisses erfolgt über Eichkurven, die mittels Standard- bzw. Vergleichslösungen erstellt werden. Hierzu sind die für die Kaliumnitrat-Standardlösungen und die Natriumnitrit-Vergleichslösungen erhaltenen Extinktionswerte (Ordinate) im Koordinatensystem gegen die jeweiligen Nitrat- bzw. Nitrit-Konzentrationen in mg/l (Abszisse) aufzutragen. Es soll eine lineare Beziehung resultieren.

Man erhält für die Probelösung $E_{\text{Nitrat} + \text{Nitrit}}$ und E_{Nitrit} .

Die Differenz $E_{\text{Nitrat} + \text{Nitrit}} - E_{\text{Nitrit}}$ ergibt E_{Nitrat} .

Aus dem Extinktionswert der Probe mittels der Eichkurven die Konzentrationen an Nitrat und Nitrit in mg/l Probelösung ermitteln.

Bei der Analyse fester oder halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analyseergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Nitrit}} = \frac{c_{\text{Nitrit}} \times 1000}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \quad [\text{mg Nitrit/kg Probe}]$$

$$\text{Gehalt}_{\text{Nitrat}} = \frac{c_{\text{Nitrat}} \times 1000}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \quad [\text{mg Nitrat/kg Probe}]$$

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt als Kaliumnitrat und Natriumnitrit.

Die Umrechnung von KNO_3 in Nitrat (NO_3^-) erfolgt mit dem Faktor $62,005/101,11 = 0,613$, die Umrechnung von NaNO_2 in NO_2^- mit dem Faktor $46,006/68,995 = 0,666$.

13.1 Hinweise zur Testdurchführung

Im Reaktionsansatz soll die Menge an Nitrit bzw. Nitrat 2–8 μg bzw. 3–12 μg betragen. Die Probelösung ist also soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an Nitrit bzw. an Nitrat 1–4 mg/l bzw. 1,5–6 mg/l beträgt.

13.2 Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Etwa 10 g Probe auf 1 mg genau in einen Weithals-Erlenmeyer-Kolben einwiegen, 50 ml bidest. Wasser zugeben und 30 bis 60 s mit einem Ultra-Turrax homogenisieren. Den Schaft des Homogenisators mit 50 ml heissem bidest. Wasser abspülen. 0,2 ml Bromthymolblau-Lösung (I) zugeben, mit NaOH (1 M) bis zum Farbumschlag titrieren (ggf. pH mit Elektrode messen: $\text{pH} < 8,5$; bei höheren pH-Werten besteht die Gefahr, dass nach Carrez-Klärung keine klaren Filtrate erhalten werden) und 15 min in einem siedenden Wasserbad erhitzen.

Kolben auf Raumtemperatur abkühlen und Inhalt quantitativ in einen 200 ml-Messkolben überführen. Anschliessend zugeben (nach jeder Zugabe mischen): 2 ml Carrez-I-Lösung (II) und 2 ml Carrez-II-Lösung (III) (bei bindegewebsreichen Proben jeweils 4 ml verwenden). Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und mit Faltenfilter filtern. Die ersten Anteile des Filtrats verwerfen. Das klare Filtrat zur Bestimmung einsetzen.

13.3 Präzision

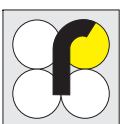
In der Literatur sind für Nitrit folgende Daten veröffentlicht:

Brühwurst:

$$\begin{array}{lll} x = 37 \text{ mg/kg} & r = 6 \text{ mg NO}_2/\text{kg} & s_{(f)} = \pm 2 \text{ mg NO}_2/\text{kg} \\ & R = 8 \text{ mg NO}_2/\text{kg} & s_{(R)} = \pm 3 \text{ mg NO}_2/\text{kg} \end{array} \quad (\text{Ref. 2.1})$$

Literatur

- 1.1 Armeth, W. & Herold, B. (1988) Nitrat/Nitrit-Bestimmung m Wurstwaren nach enzymatischer Reduktion, Fleischwirtschaft **68**, 761–764
- 2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG: Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Nitrit- und Nitrat-Gehaltes in Wurstwaren nach enzymatischer Reduktion, L 08.00-14 (Dezember 1990)
- 2.2 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 22 (Diätetische Lebensmittel und Speziallebensmittel)/12.3 (1990): Provisorische Methode der Subkommission 5



R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0
Fax + 49 61 51/ 81 02-20
www.r-biopharm.com

