

Stofnaam	Nitriet en nitraat
Type methode	Spectrofotometrische methode
Te onderzoeken in	mengvoeders en enkelvoudige diervoeders
Minimum bepaalbaarheids grens	Nitriet: 5,0 mg/kg Nitraat: 10,0 mg/kg
Herhaalbaarheid	Nitriet: 1,0 mg/kg op een niveau van 10 mg/kg Nitraat: 3,0 mg/kg op een niveau van 10 mg/kg
Reproduceerbaarheid (binnen laboratorium)	Nitriet: 1,6 mg/kg op een niveau van 10 mg/kg Nitraat: 4,8 mg/kg op een niveau van 10 mg/kg
Aantoonbaarheid	Nitriet: 2,5 mg/kg Nitraat: 5,0 mg/kg
Categorie	-
Titel	Bepaling van het gehalte aan nitriet en nitraat

1. Definitie

Nitriet: Het gehalte aan bestanddelen, bepaald volgens de beschreven werkwijze.

Nitraat: Het gehalte aan bestanddelen, bepaald volgens de beschreven werkwijze.

2. Toepassingsgebied

Deze methode is van toepassing op het onderzoek van granen, zaden, diervoeders en -grondstoffen en mengvoeders.

3. Principe

Een gewogen hoeveelheid van het monster wordt in warm water gesuspenderd. De suspensie wordt geklaard en gefiltreerd. Het in een deel van het filtraat aanwezige nitraat wordt met behulp van verkoperd cadmium gereduceerd tot nitriet. Het dan aanwezige nitriet wordt met sulfanilzuuramide en N-(1-naftyl)-ethyleendiaminedihydrochloride omgezet in een chromofoor, waarvan de concentratie fotometrisch wordt bepaald.

Van een ander deel van het filtraat wordt, zonder reductieproces, op overeenkomstige wijze het gehalte aan oorspronkelijk aanwezig nitriet bepaald.

Het nitraatgehalte wordt berekend uit het verschil tussen het nitrietgehalte voor en na reductie.

Het reducerend vermogen van het verkoperd cadmium wordt gecontroleerd met een standaardoplossing van kaliumnitraat, die op dezelfde wijze als het filtraat wordt behandeld.

4. Reagentia en chemicaliën

R1 Water, geleidbaarheid < 20 μ S/cm

R2 Carrez I:

Los 10,6 g kaliumhexacyanoferraat(II) (R27) op in water, vul aan tot 100 ml en meng.

R3 Carrez II:

Los 21,9 g zinkacetaat (R26) en 3 g ijsazijn (R28) op in water, vul aan tot 100 ml en meng.

R4 Bufferoplossing: pH 9,6 tot 9,7

Verdun 50 ml geconcentreerd zoutzuur (R11) met 600 ml water en meng. Voeg 100 ml geconcentreerd ammonia (R12) toe, verdun met water tot 1 liter en meng (Stel de pH zo nodig bij).

R5 Zoutzuur ca. 5,5 M/l:

Verdun 450 ml geconcentreerd zoutzuur (R11) met water tot 1 liter en meng.

R6 Sulfanilzuuramide-oplossing:

Los, onder verwarmen op een waterbad, 0,5 gram sulfanilzuuramide (R13) op in een mengsel van 75 ml water en 5 ml geconcentreerd zoutzuur (R11). Koel af en vul aan tot 100 ml. Filtreer indien de oplossing niet helder is.

- R7 N-(1-naftyl)-ethyleendiamine-oplossing:
Los 0,1 gram N-(1-naftyl)-ethyleendiaminedihydrochloride (R14) op in water, vul aan tot 100 ml en meng. Filtreer indien de oplossing niet helder is. Houdbaarheid: Een week goed gesloten in de koelkast.
- R8 Calibratiereeks Nitriet:
Pipetteer achtereenvolgend een zodanige hoeveelheid standaardoplossing (R19) in maatkolffjes van 50 ml dat de volgende concentratiereeks ontstaat: 0; 0,5; 1,0; 2,0 en 3,0 µg per 50 ml.
- R9 Cadmiumkorrels diameter 0,3 tot 0,8 mm.
- R10 Kopersulfaat-oplossing:
Los 20,0 gram kopersulfaat (R25) op in water en vul aan tot 1 liter.
- R11 Zoutzuur geconcentreerd (ρ₂₀ = 1,19 g/ml)
- R12 Ammonia geconcentreerd (ρ₂₀ = 0,88 g/ml)
- R13 Sulfanilzuuramide (NH₂C₆H₄SO₂NH₂)
- R14 N-(1-naftyl)-ethyleendiaminedihydrochloride)
C₁₀H₇NHCH₂CH₂NH₂·2HCl of C₁₀H₇NHCH₂CH₂NH₂·2HCl·CH₃OH)
- R15 Zoutzuur ca. 2M/l:
Verdun 160 ml geconcentreerd zoutzuur (R11) met water tot 1 liter.
- R16 Zoutzuur ca. 0,1M/l:
Verdun 50 ml zoutzuur 2M (R15) met water tot 1 liter.
- R17 EDTA oplossing:
Los 33,5 gram EDTA (R18) op in water, vul aan tot 1 liter en meng.
- R18 Dinatrium-ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA) (Na₂C₁₀H₁₄N₂O₈·2H₂O)
- R19 Standaardoplossing natriumnitriet:
Los 0,15 g natriumnitriet (R20) op in water, vul aan tot 1 liter en meng.
Verdun, dagelijks voor gebruik, 10 ml van deze oplossing met 20 ml bufferoplossing (R4), vul aan met water tot 1 liter en meng. Deze oplossing bevat 1,0 µg/ml nitriet.
- R20 Natriumnitriet (NaNO₂)
Droog de natriumnitriet voor het inwegen bij 110 tot 120°C.
- R21 Standaardoplossing kaliumnitraat:
Los 0,652 gram kaliumnitraat (R22) op in water, vul aan tot 1 liter en meng.
Verdun voor dagelijks gebruik 5 ml van deze oplossing met 20 ml buffer oplossing (R4), vul aan met water tot 1 liter en meng. Deze oplossing bevat 2,0 µg/ml nitraat.

- R22 Kaliumnitraat (KNO₃)
Droog de kaliumnitraat voor het inwegen bij 110 tot 120 °C.
- R23 Borax verzadigd:
Los, onder verwarmen, 50 gram borax (R24) op in 100 ml water en koel af.
- R24 Dinatriumtetraboraat decahydraat (Na₂B₄O₇·10H₂O)
- R25 Kopersulfaat, (CuSO₄·5H₂O)
- R26 Zinkacetaatdihydraat (Zn(CH₃COO)₂·2H₂O)
- R27 Kaliumhexacyanoferraat(II) [K₄Fe(CN)₆·3H₂O]
- R28 IJszijn 97% (CH₃COOH)

5. Toestellen en hulpmiddelen

- T1 Balans, analytisch
- T2 Maatkolf 250 ml
- T3 Schudapparaat
- T4 Pipet 25 ml
- T5 Cadmium-reduceerkolom: Zie bijlage. Het verdient aanbeveling het, voor de chemicaliën en de bereiding van de kolom, benodigde water vlak voor gebruik te koken en af te koelen tot kamertemperatuur ten einde insluiting van kleine luchtbelletjes in de kolom te voorkomen.
- T6 Maatkolfje 100 ml
- T7 Maatkolfje 50 ml
- T8 UV/VIS spectrofotometer, 1 cm cuvet
- T9 Erlenmeyer 250 ml

6. Werkwijze

6.1 Extractie

Weeg 5 gram analysemonster op 1 mg nauwkeurig (T1) in een maatkolf van 250 ml (T2) en voeg 150 ml warm water ($\pm 75^{\circ}\text{C}$) (R1) toe en schud het monster gedurende 1 uur op een schudapparaat (T3). Koel af, voeg 5 ml Carrez I (R2) toe en schud krachtig. Voeg 5 ml Carrez II (R3) toe en schud nogmaals krachtig. Voeg 20 ml bufferoplossing (R4) toe, vul aan tot de streep met water en meng zorgvuldig. Laat de maatkolf ten minste 3 minuten staan en filtreer de suspensie. Een helder filtraat is noodzakelijk.

In geval dat alleen het nitriet moet worden bepaald kan direct de kleurmeting worden

uitgevoerd volgens 6.3.

6.2 Reductie van het nitraat

Pipetteer 25 ml (T4) van het filtraat in het reservoir bovenaan de kolom (T5). Voeg 5 ml bufferoplossing (R4) toe aan de inhoud van het reservoir. Vang het eluaat op in een maatkolf van 100 ml (T6), waarbij de elutiesnelheid maximaal 6 ml/minuut mag bedragen. Spoel, als het reservoir bijna leeg is, de wand met ca. 15 ml water. Spoel hierna met water totdat het maatkolfje bijna vol is. Verwijder de maatkolf, vul aan tot de streep en meng.

Opmerking: zorg er voor dat de kolom nooit droog staat.

6.3 Kleurmeting

Pipetteer 25 ml van het eluaat verkregen bij 6.2 in een maatkolfje van 50 ml (T7). Pipetteer eveneens 25 ml van het oorspronkelijk filtraat dat niet aan reductie onderworpen is in een maatkolfje van 50 ml (T7) en voeg per maatkolfje 3 ml zoutzuur 5,5 M (R5) en 5 ml sulfanilzuuramide-oplossing (R6) toe. Meng goed en laat de mengsels, beschermd tegen direct zonlicht, gedurende 5 minuten staan bij kamertemperatuur. Voeg vervolgens 1 ml N-(1-naftyl)-ethyleendiamine-oplossing (R7) toe. Meng goed en laat de mengsels, beschermd tegen direct zonlicht, gedurende 5 minuten staan bij kamertemperatuur. Vul aan met water tot 50 ml en meng.

Voer ook een blanco kleurmeting uit met 25 ml monster en 25 ml eluaat, maar exclusief het kleurreagens (R7).

Meet, binnen 15 minuten, de extinctie van de verkregen oplossingen bij een golflengte van 538 nm (T8). Voer ook een kleurreactie uit met een Nitriet-calibratiereeks (R8) met uiteindelijk de volgende hoeveelheden nitriet per 50 ml: 0; 0,5; 1,0; 2,0 en 3,0 µg.

7. Berekening

Bereken de netto extinctie voor het nitriet en voor het totaal van nitriet+nitraat (weergegeven als nitriet):

$$E_{(\text{netto})} = E_{(\text{meting})} - E_{(\text{blanco})}$$

$$E_{\text{totaal (netto)}} = E_{\text{totaal (meting)}} - E_{\text{totaal (blanco)}}$$

$E_{(\text{netto})}$ = Netto extinctie van de nitriet-analyse;

$E_{(\text{meting})}$ = Gemeten extinctie voor de reductie;

$E_{(\text{blanco})}$ = Gemeten extinctie van de blanco voor reductie;

$E_{\text{totaal (netto)}}$ = Netto extinctie van de meting na de reductie;

$E_{\text{totaal (meting)}}$ = Gemeten extinctie na de reductie;

$E_{\text{totaal (blanco)}}$ = Gemeten extinctie van de blanco na de reductie.

Bereken de gehalten met behulp van de kalibratielijnen en de gemaakte verdunningen.

Bereken het nitraatgehalte als volgt:

Nitraat mg/kg = {Som NO₂,NO₃ (als Nitriet)-gehalteNO₂} x 1.347

8. Rapportage

De rapportage van de uitslag is als volgt:

Indien een gehalte gevonden wordt lager dan de bepaalbaarheidsgrens:

Nitriet: minder dan 5,0 mg/kg

Nitraat: minder dan 10,0 mg/kg

Indien een gehalte gevonden wordt gelijk aan of hoger dan de bepaalbaarheidsgrens:

Nitriet: x.x mg/kg

Nitraat: x.x mg/kg

9. Kwaliteitscontrole

Voer bij de bepaling een recovery voor nitraat uit door een bekende hoeveelheid nitraat toe te voegen aan een controlemonster. De recovery moet minimaal 95% bedragen.

Er wordt indien aanwezig een standaardmonster geanalyseerd. De resultaten worden bijgehouden op een controlekaart.

10. Literatuur

ISO 3091 Meat and meat products- Determination of the nitrate content 1975

ISO 2918 Meat and meat products- Determination of the nitrite content 1975

NEN 3764 Kaas- Bepaling van het nitriet- en nitraatgehalte 1981

11. Opmerkingen

- De bovenbeschreven methode is niet geringtest.

- De beschrijving is gebaseerd op volledig handmatige uitvoering. Uitvoering kan ook met behulp van automatische apparatuur gebeuren.

Bijlage 1

De Cadmium reduceerkolom

Werkwijze bereiding:

Breng in een erlenmeyer van 250 ml (T9) een hoeveelheid cadmium (R9), voldoende voor het vullen van het gewenste aantal kolommen (40-60 gram per kolom). Voeg aan het cadmium zoveel zoutzuur 2M (R15) toe dat het niveau van de vloeistof hoger is dan dat van het cadmium. Zwenk gedurende enige minuten. Was vervolgens het cadmium met water totdat het chloride vrij is. Voeg per gram cadmium 2,5 ml kopersulfaatoplossing (R10) toe, zwenk gedurende 1 minuut en was het verkoperde cadmium daarna onmiddellijk met water. Zorg ervoor dat het cadmium steeds onder water blijft. Beëindig het wassen wanneer het waswater geen neergeslagen koper meer bevat. Breng een prop glaswol op de bodem van de reduceerkolom of gebruik een kolom met ingesmolten glasfilter. Vul de kolom met water. Breng het verkoperde cadmium over in de kolom, waarbij het blootstellen van het verkoperde cadmium aan de lucht tot een minimum beperkt dient te blijven. De hoogte van de verkoperde cadmiumkolom dient 15 - 20 cm te bedragen.

Bereid een mengsel van 475 ml water, 500 ml standaardoplossing kaliumnitraat (R21), 20 ml buffer oplossing (R4) en 20 ml EDTA-oplossing (R7).

Conditioneer de vers bereide kolom door het mengsel met een volumestroom van maximaal 6 ml/min door te laten stromen. Was de kolom vervolgens met 50 ml water.

Controle van de kolom:

Voer een recovery uit door 25 ml standaardoplossing kaliumnitraat (R21) bovenaan de kolom te pipetteren en de in het WVS beschreven procedure uit te voeren voor de reductie.

De concentratie van het nitriet in het verdunde eluaat moet groter als 0,176 µg/ml (95% recovery) bedragen. Is dit niet het geval dan moet de regeneratie herhaald worden.

Regenereren:

Voeg ca. 5 ml EDTA-oplossing (R17) en 2 ml zoutzuur 0,1M (R16) toe aan 100 ml water. Laat het mengsel met een volumestroom van 10 ml/minuut door de kolom lopen. Was nadat het reservoir is leeg gelopen de kolom met achtereenvolgens water, zoutzuur 0,1M (R16) en nogmaals met water. Controleer het reducerend vermogen.