



Application Note AN-U-080

Nitrite and nitrate in meat products

Robust routine analysis with ion chromatography

Nitrite and nitrate salts are used as preservatives for meat and meat products. They are labeled on foods as E 249–E 252. These so-called curing salts prevent bacteria growth, stabilize the color of the meat, and enhance its flavor. Nitrate salts (E 251, E 252) have a low toxicity. However, long-term exposure is of concern, as the lower gut reduces nitrate to nitrite, which is a precursor of nitrosamines (classified as

carcinogenic) [1]. Nitrite itself is classified as probably carcinogenic to humans. The MPL (maximum permitted levels) after the manufacturing process vary for nitrite (E 249, E 250) between 50–180 mg/kg [2], and for nitrate between 150–300 mg/kg [3], depending on the product. The European Commission limits nitrate and nitrite salts in processed meat to less than 150 mg/kg [4].

Classical HPLC-UV methods often suffer from asymmetric peaks, low reproducibility on retention times, and poor sensitivity. Other analytical methods such as spectrophotometric or automated discrete analysis methods show interferences depending on different meat

matrices, making this kind of analysis difficult for laboratories where a wide variety of food and beverage products need to be analyzed.

Ion chromatography with UV detection offers a robust and universal method for quality control of nitrite and nitrate in different meat matrices.

SAMPLE PREPARATION

Various meat products like pork knuckle, pork shoulder, black blood sausage, and Chistorra sausage were investigated. The same sample preparation worked for all tested meat products. Samples were treated with *Carrez* precipitation to remove fats and proteins. The amount of *Carrez* reagent is adjusted to the fat and protein content of the sample type. For example, a freshly chopped meat sample (5 g) was treated

with *Carrez* solutions (2.5 mL *Carrez* I + 2.5 mL *Carrez* II) and diluted to 100 mL with ultrapure water (UPW). After centrifugation (5000 rpm) and filtration (0.45 μ m), 10 mL of the solution was further diluted with UPW to 50 mL (5-fold dilution). For consistent results, standard solutions were also prepared with *Carrez* reagents.

EXPERIMENTAL

Samples (50 μ L) were injected into the IC system after Inline Ultrafiltration. Two columns with different properties (Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 and Metrosep A Supp 5 - 50/4.0) were used in series to avoid co-elution of nitrite with organic components. Analytes were separated by isocratic anion exchange chromatography with a carbonate/methanol eluent (3.6 mmol/L Na_2CO_3 + 15% methanol) and a flow rate of 0.7

mL/min (Table 1, Figures 1–4). A column temperature of 52 °C further improved the resolution of the nitrite peak. Sequential suppression reduced the background noise to enable sensitive UV/VIS detection (205 nm). Quantification was performed over a range of 0.02–2.00 mg/L for nitrite, and 0.05–5 mg/L for nitrate.

Table 1. Summary of IC method parameters.

| Columns | Metrosep A Supp 7 - 250/4.0 + Metrosep A Supp 5 - 50/4.0 |
|-----------|--|
| Eluent | 3.6 mmol/L Na_2CO_3 + 15% methanol |
| Flow | 0.7 mL/min |
| Temp | 52 ° C |
| Injection | 50 μ L |
| Detection | UV 205 nm |

Sample concentrations were calculated for sodium nitrate and sodium nitrite. In order to keep the system clean from any organic contaminations, the sample flow path was rinsed with methanol/UPW (1:1 v/v) after each

analysis and the suppressor was regenerated with a mixture of sulfuric acid (500 mmol/L), oxalic acid (100 mmol/L), and acetone (20% v/v).

RESULTS

Figures 1–4 show exemplary chromatograms for different tested meat samples. The nitrite concentration varied from not detectable to 54 mg/kg and the nitrate concentration was between 10–50 mg/kg. During these tests, nitrite exceeded the critical limit of 50 mg/kg in only one sample (pork shoulder), whereas nitrate was always measured well within the allowed concentration limit [4]. Long-term studies in quality control laboratories of meat manufacturers have proven that this IC method

is a robust and precise enough for routine analysis of nitrite and nitrate.

This universal analytical method is also suitable for beverage and vegetable samples. A wide variety of food and beverage samples were evaluated, showing symmetric peaks, high reproducibility of the concentration values, and negligible interferences from matrix compounds. Limits of quantification were well below 5 mg/kg for sodium nitrite and sodium nitrate in all tested samples.

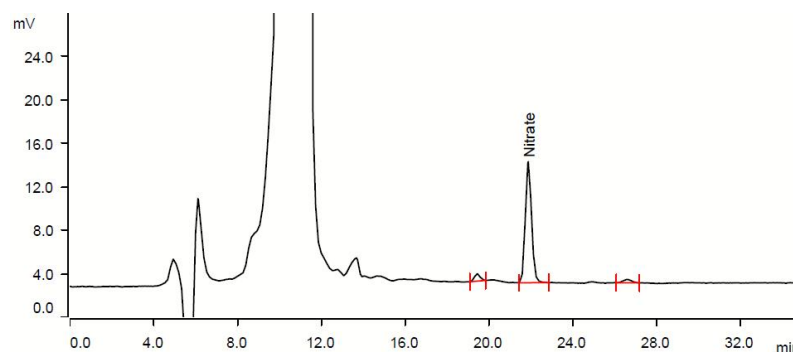


Figure 1. Chromatogram of a black blood sausage sample. Results: sodium nitrite <1.0 mg/kg, and sodium nitrate 22.5 mg/kg.

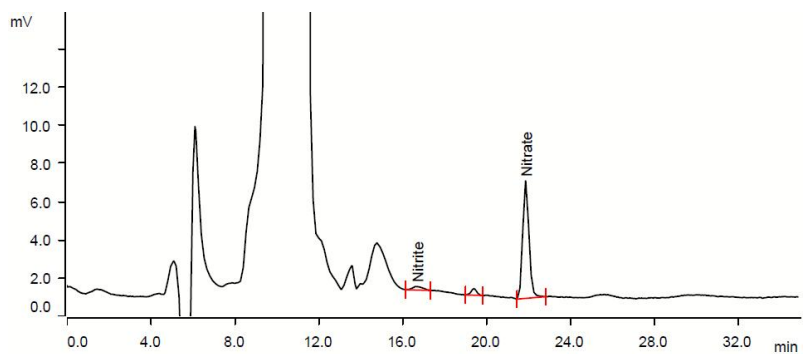


Figure 2. Chromatogram of a pork knuckle sample. Results: sodium nitrite 1.5 mg/kg, and sodium nitrate 9.6 mg/kg.

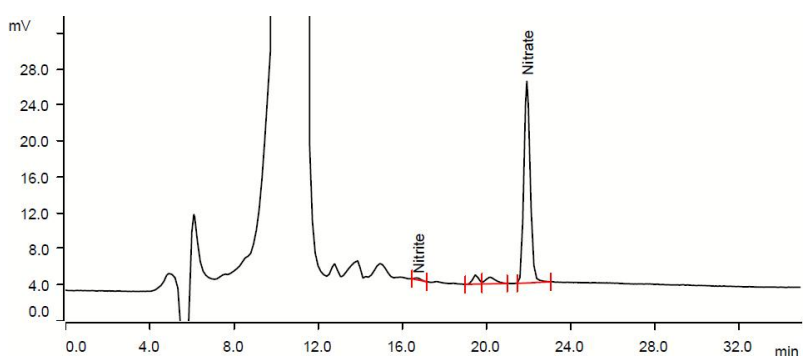


Figure 3. Chromatogram of a Chistorra sausage sample. Results: sodium nitrite <1.3 mg/kg, and sodium nitrate 49.4 mg/kg.

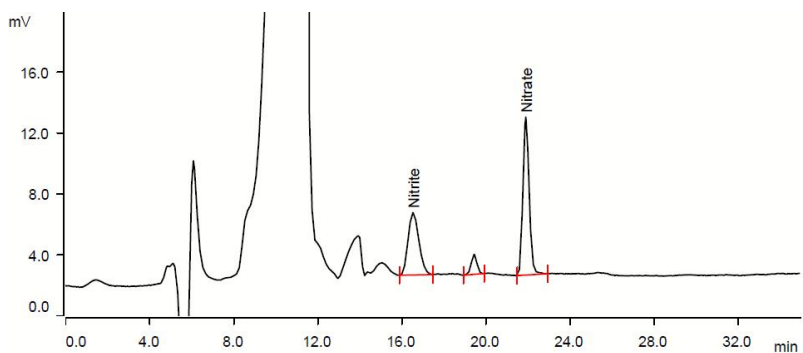


Figure 4. Chromatogram of a pork shoulder sample. Results: sodium nitrite 53.7 mg/kg, and sodium nitrate 20.0 mg/kg.

CONCLUSION

The described sample preparation and the chromatographic method worked for all tested meat products. The presented IC method with two separation columns guarantees optimal resolution of nitrite and nitrate from interfering matrix peaks and thus sensitive analysis for quality control even in complex matrices (LOQ <5 mg/kg for meat products). This method is already established in certain food laboratories as a standard method for quality control, exhibiting high accuracy and reproducibility independent from the food matrix.

Inline Ultrafiltration makes this method even more suitable for fast and time-saving routine

analysis because sample preparation is straightforward and does not require costly sample preparation cartridges as in some traditional methods. As any interfering matrix is either removed by Inline Ultrafiltration or is well resolved on the analytical column, this method shows superior analytical performance for determining nitrite and nitrate in meat samples when compared to classical HPLC-UV.

Nitrite and nitrate are directly quantified, which is an advantage over traditional methods where the sum parameter of total nitrogen is determined (e.g., AOAC Official Method 935.48 or 993.03).

REFERENCES

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.

Internal reference: AW IC ES6-0010-042020

CONTACT

メトロームジャパン株式会社
143-0006 東京都大田区平
和島6-1-1
null 東京流通センター アネ
ックス9階

metrohm.jp@metrohm.jp

CONFIGURATION



930 Compact IC Flex Oven/SeS/Deg

930 コンパクト IC Flex Oven/SeS/Deg はカラムオーブン、連続サフレーション、内蔵式脱気装置を備えたインテリシエントコンパクトIC装置です。サフレッサーの再生には800 トシーノ電動ヒュレットを使用することかてきます。この装置は任意の分離メソッドおよび検出メソッドによって使用することかてきます。

典型的な使用領域:

- 連続サフレーションおよび電気伝導度検出器による陰イオンの測定



947 Professional UV/VIS Detector Vario SW

インテリシエントな単一波長検出器 947 Professional UV/VIS Detector Vario SW は、紫外線や可視光線範囲でアクティブな物質を安全かつ確実に検出することかてきます。波長を一つ選択することかてきます。



Metrosep A Supp 5 - 50/4.0

Metrosep A Supp 5 - 50/4.0は、6分未満で、7つの標準陰イオンを分離します。フッ化物もまたインジェクションヒークによって分離され、問題無く組み込むことかてきます。ホリヒニルアルコール・ホリマーを基礎とするカラムは、A Supp 5シリーズの全てのカラム同様、その理論段数の高さ素晴らしい分離性能により際立っています。Metrosep A Supp 5 - 50/4.0は、非常に低い検出限界を断念することなく、簡単な分離作業を短時間に行わなければならない場合に選択されるカラムです。



Metrosep A Supp 7 - 250/4.0

水処理における副産物(消毒副産物)は、健康を害するだけでなく発がん性も疑われています。そのため、オキシハライトは、多くの調査や規格の対象となっています(例えば EPA 300.1 Part B、EPA 317.0、EPA 326.0 など)。その際、何よりも問題となっているのは、飲料水をオゾン処理する際に臭化物から生成される臭素酸塩です。Metrosep A Supp 7 - 250/4.0は、標準陰イオン、オキシハライトおよびシクロ酢酸の並行測定に高性能を発揮する分離カラムです。このカラムを用いることで、これらのイオンを $\mu\text{g/L}$ の低い範囲まで、確実かつ精密に測定できます。5- μm ホリヒニルアルコール・ホリマーを使用することで、検出感度が高まり、極端に高い理論段数を示し、その結果傑出した分離特性および検出特性を実現することかてきます。さらに、温度変化によって、アプリケーション特有の条件に分離を順応させることかてきます。



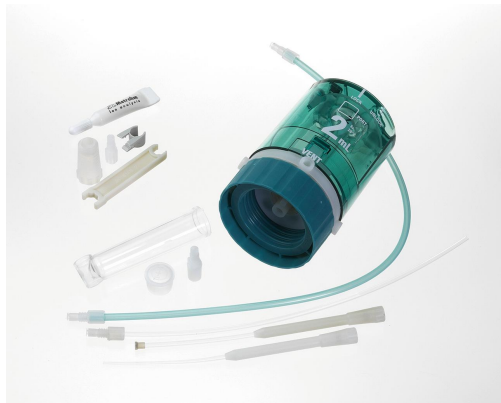
919 IC Autosampler plus

919 ICオートサンフラフラスは、中程度のサンプル量におけるラボの要求を満たします。本製品によってメトローム製品の様々なイオンクロマトグラフを自動化することかてきます。



800 Dosino

高性能電動ヒュレットのトーシンクユニット用書き込み・読み取り用ハートウェア付き駆動部。固定されたケーブル付き(長さ150 cm)。



807 Dosing Unit 2 mL

807 Dosing Unit、2 mL カラスシリンターおよび遮光機能付き統合型テータチップ付き、ISO/DIN カラスネシ規格 GL 45 で試薬ホルルに取り付け可能。FEP チューフ接続部、反拡散チップ。

MagIC Net

MagIC Net 4.0 Professional: 1

すべてのインテリシエントなProfessional ICシステム、コンパクトなIC装置とそれらの周辺機器、すべての検出器と様々なオートサンフラー、800 Dosino、771 Compact InterfaceなどのコントロールのためのプロフェッショナルなPCプログラム。このソフトウェアにより、イオンクロマトグラフィ分析のチェック、テータ記録、評価・モニタリングとレポートの作成が可能となります。

ルーチンオペレーションのためのグラフィックユーザーインターフェース、広範なテータベースプログラム、メソッド開発、コンフィグレーションならびに手動のシステム制御; 非常にフレキシブルなユーザー管理、高性能なテータベースオペレーション、広範なテータエクスポート機能、独自設定可能なレポート作成機能、全システムコンポーネントおよびクロマトグラフィ結果のコントロールおよびモニタリング。

MagIC Net ProfessionalはFDA規定21 CFR Part 11およびGLPに完全に準拠しています。

MagIC Net は16のタイアロク言語で使用可能です: トイツ語、英語、中国語 (繁体、簡体)、フランス語、イタリア語、スヘイン語、ホルトカル語、フルカリリア語、チェコ語、ハンカリー語、日本語、韓国語、ロシア語、スロハキア語、ホーラント語

1ライセンス

インストールファイルと文書は 1 つの USB スティックに保存され、納品されます。