



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Determinación de nitratos y nitritos en lechuga por HPLC

Apellidos, nombre	Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) García Martínez, Eva (evgarmar@tal.upv.es) Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	ETSIAMN - Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

Los nitratos se encuentran distribuidos en muchos tipos de alimentos. La principal fuente de exposición humana a nitratos es el consumo de verduras y hortalizas, especialmente las de hoja verde, aunque el agua de bebida y otros alimentos también contribuyen a dicha exposición. Se trata de compuestos tóxicos, por lo que su concentración está limitada en algunos alimentos, tales como lechuga y espinacas, alimentos infantiles, aguas, embutidos y otros. Esto obliga a disponer de metodologías analíticas adecuadas para controlar los niveles de nitratos y nitritos en alimentos. Aunque existen distintos métodos, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se perfila como uno de los mejores por su alta sensibilidad, exactitud y precisión.

2 Objetivos

Con este objeto docente se pretende que el alumno sea capaz de:

- Llevar a cabo la determinación analítica de nitratos y nitritos por HPLC.
- Calcular la concentración de los analitos a partir de los datos de los cromatogramas obtenidos.

3 Introducción

Los nitratos se encuentran en distintos tipos de alimentos. Son compuestos muy empleados en agricultura como fertilizantes y, junto con los nitritos, se usan como aditivos en la elaboración de alimentos como productos cárnicos, especialmente en los crudo-curados. Su uso como aditivo está justificado por el potencial que tienen para inhibir el crecimiento de patógenos, tales como el *Clostridium botulinum*.

Algunas especies de vegetales acumulan los nitratos en sus partes verdes. Por ello, los cultivos de hoja como las lechugas y espinacas suelen contener las mayores concentraciones de nitratos.

Las aguas de bebida también pueden contener nitratos procedentes principalmente de los abonos nitrogenados, ya que los nitratos son muy solubles en agua y se acumulan en las capas freáticas.

Los nitratos tienen poco potencial tóxico, pero el problema que plantean es que se pueden transformar fácilmente por reducción bacteriana a nitritos que presentan una toxicidad considerable. Los dos principales efectos tóxicos de los nitritos son:

- a) Efecto metahemoglobinizante: los nitritos en sangre oxidan el Fe^{2+} de la hemoglobina a Fe^{3+} , impidiendo que pueda transportar oxígeno. Este efecto es muy frecuente en bebés expuestos a altas concentraciones de nitratos en alimentos y se llama "síndrome del bebé azul".
- b) Favorecen la formación de nitrosaminas y nitrosamidas que tienen efecto cancerígeno.



Por todo lo expuesto, la Unión Europea establece límites de nitratos en algunos tipos de alimentos. Por ello, los Estados miembros llevan a cabo controles en alimentos para garantizar que los niveles de estos compuestos en alimentos son seguros para la salud humana. Uno de los métodos empleados en el control de estos tóxicos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

4 Desarrollo

4.1 Metodología analítica de determinación de nitratos y nitritos por HPLC

Para la determinación del contenido en nitratos y nitritos por HPLC en una muestra de lechuga, es necesario llevar a cabo 3 pasos: preparación de la muestra, análisis cromatográfico e interpretación de resultados.

4.1.1 Preparación de la muestra

Se pesan en un vaso de precipitados 2,5 g de lechuga, se añaden 10 mL del tampón fosfato KH_2PO_4 0,05 M pH=7,4 y se homogeneizan en ultraturrax. Se precipitan las proteínas adicionando HClO_4 0,02 M en proporción 1:2. Se centrifuga a 4000 rpm durante 5 min. Se reserva el sobrenadante.

Se preparan los siguientes patrones:

Patrón 1: 10 ppm NaNO_3 y 15 ppm de NaNO_2

Patrón 2: 20 ppm NaNO_3 y 25 ppm de NaNO_2

Patrón 3: 30 ppm NaNO_3 y 50 ppm de NaNO_2

Patrón 4: 40 ppm NaNO_3 y 75 ppm de NaNO_2

Se filtran el sobrenadante procedente de la extracción de la muestra y los patrones a través de un filtro de nylon de 0,45 mm. Se recoge el filtrado y se pasan aproximadamente 1,5 mL al vial de inyección.

4.1.2 Análisis cromatográfico

Se introducen los viales en el muestreador automático del equipo.

Condiciones cromatográficas:

- Columna C18 (250 x 4,6 mm y 5 μm)
- Detector: UV-vis a $\lambda=214$ nm
- Fase móvil: Tampón K_2HPO_4 5mM y KH_2PO_4 25mM, pH=3.
- Flujo: 1 mL/min
- Volumen inyección: 20 μL



4.1.3 Interpretación de resultados

Después de realizar el análisis cromatográfico se habrán obtenido 5 cromatogramas (4 de los patrones y el cromatograma de la muestra).

La **identificación de los analitos** en la muestra de lechuga se lleva a cabo por comparación de los tiempos de retención de los patrones de nitratos y nitritos con los de los picos de los cromatogramas de la muestra.

La **cuantificación** se lleva a cabo por el método del patrón externo.

Los resultados se expresan en ppm (mg de NaNO_2 o de NaNO_3 /kg de muestra).

Ejemplo realizado en el laboratorio:

Veamos a continuación un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en un análisis de lechuga siguiendo el protocolo descrito.

Los 5 cromatogramas obtenidos son los siguientes:

PATRÓN 1:

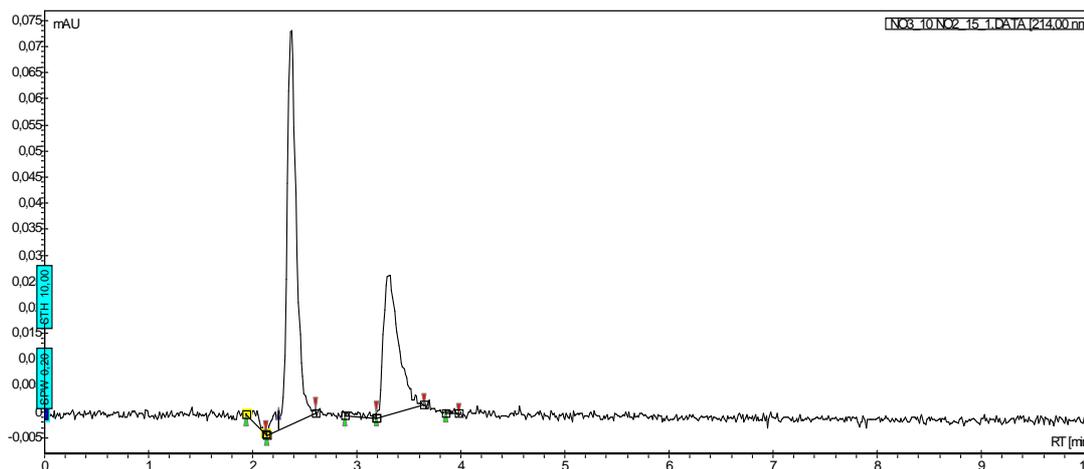


Figura 1. Cromatograma del patrón 1.

Nº de pico	Tiempo de retención (t_R) (min)	Área (mAU min)
1	2,373	0,00791
2	3,307	0,00457

Tabla 1. Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma del patrón 1.



PATRÓN 2:

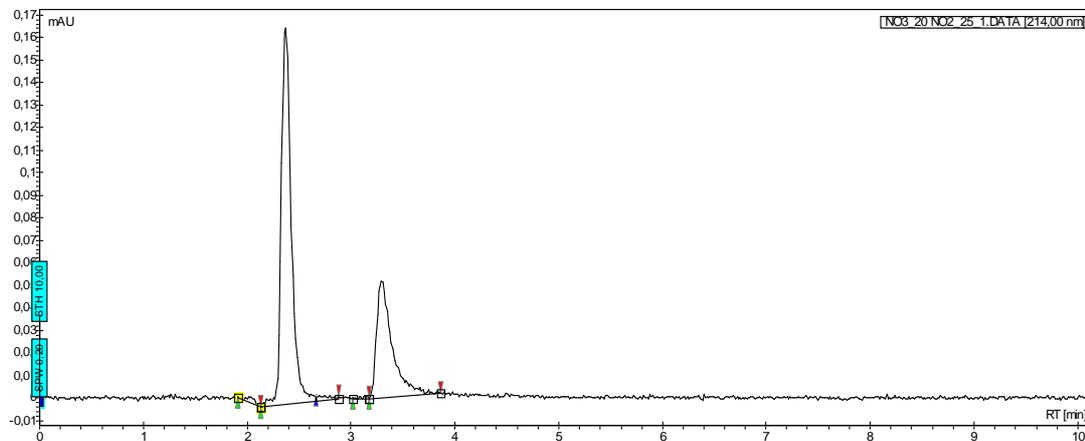


Figura 2. Cromatograma del patrón 2.

Nº de pico	Tiempo de retención (t_R) (min)	Área (mAU min)
1	2,373	0,01564
2	3,293	0,00908

Tabla 2. Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma del patrón 2.

PATRÓN 3:

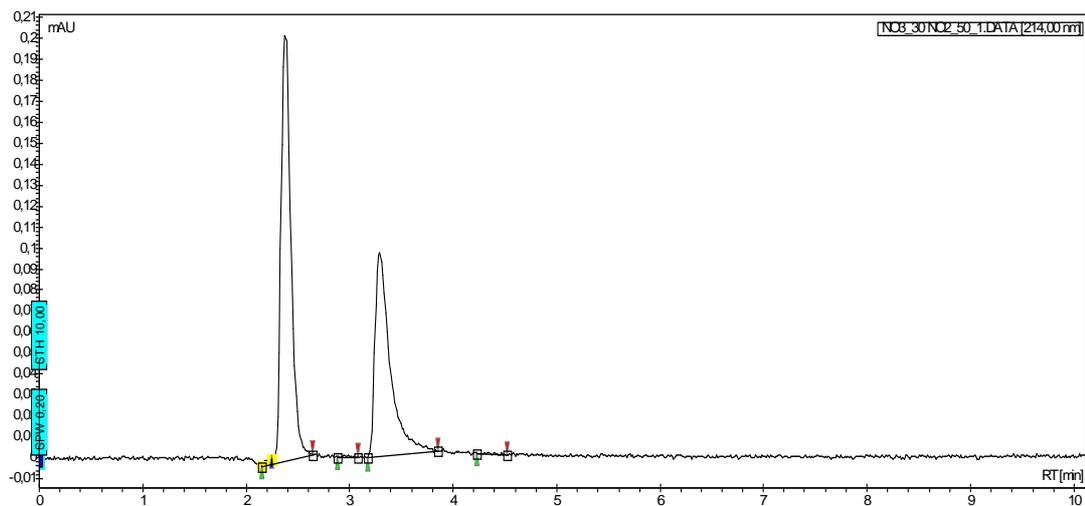


Figura 3. Cromatograma del patrón 3.



Nº de pico	Tiempo de retención (t_R) (min)	Área (mAU min)
1	2,373	0,02238
2	3,293	0,01655

Tabla 3. Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma del patrón 3.

PATRÓN 4:

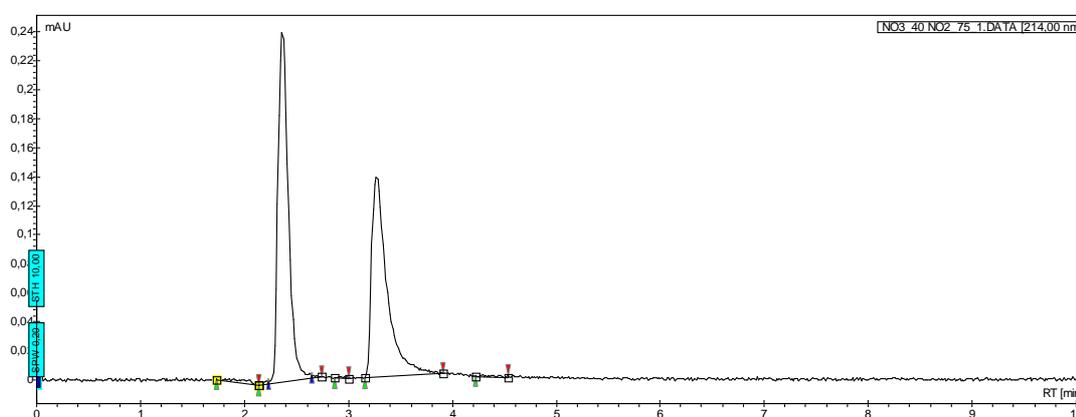


Figura 4. Cromatograma del patrón 3.

Nº de pico	Tiempo de retención (t_R) (min)	Área (mAU min)
1	2,360	0,02776
2	3,267	0,02387

Tabla 4. Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma del patrón 4.

MUESTRA DE LECHUGA:

Nº de pico	Tiempo de retención (t_R) (min)	Área (mAU min)
1	2,360	0,02164

Tabla 5. Tiempo de retención y área de los picos del cromatograma de la muestra.

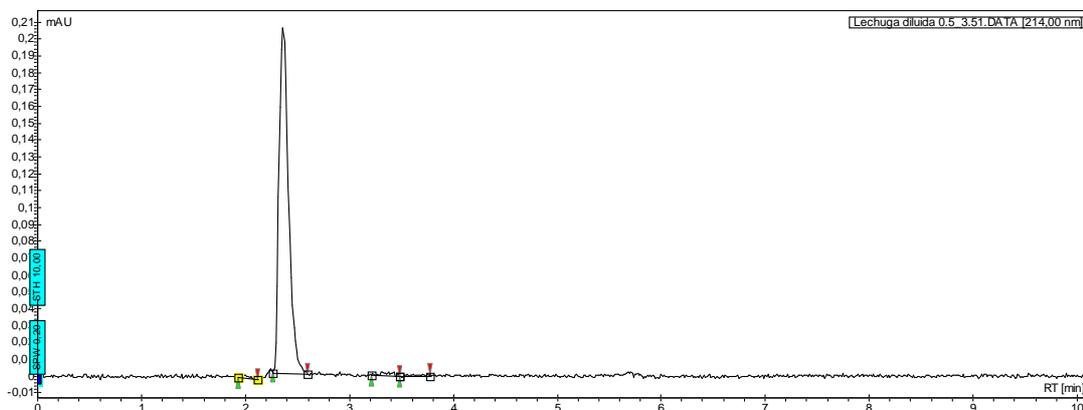


Figura 5. Cromatograma de la muestra de lechuga.

A partir de los cromatogramas obtenidos se procede a la identificación y cuantificación de nitratos y nitritos.

Identificación de nitratos y nitritos en la muestra de lechuga

Como se ha comentado, se lleva a cabo por comparación de los tiempos de retención. Aunque no se ha mostrado en el ejemplo, se hizo una inyección de una disolución que solo contenía nitrato sódico siendo el tiempo de retención del pico obtenido 2,373 min. Se procedió de igual forma con el nitrito sódico obteniendo un tiempo de retención de 3,307 min.

Si observamos en el cromatograma y en la tabla de la muestra de lechuga (figura 5 y tabla 5), solo se obtuvo un pico cuyo tiempo de retención fue de 2,360 min, el cual coincide con el tiempo de retención del patrón de nitrato sódico (2,373 min). Por ello, se puede deducir que la muestra de lechuga solo contenía nitratos. Por tanto, solamente se llevarán a cabo los cálculos de la concentración de nitratos.

Cuantificación de nitratos en la muestra de lechuga

La tabla 6 muestra la concentración de nitrato en los patrones 1 a 4 junto con el área obtenida en los cromatogramas correspondientes. Los datos de las áreas se han cogido de las tablas 1 a 5, y corresponden al pico 1 que es el de nitrato.

	Concentración de nitrato (mg/L)	Área
Patrón 1	10	0,00791
Patrón 2	20	0,01564
Patrón 3	30	0,02238
Patrón 4	40	0,02776
Muestra	¿?	0,02164

Tabla 2. Áreas de los picos del analito obtenidas en los cromatogramas de los patrones y en el de la muestra.



Representando las áreas obtenidas frente a la concentración de los patrones y añadiendo el punto (0,0) se obtiene la recta de calibrado que se muestra en la Figura 6.

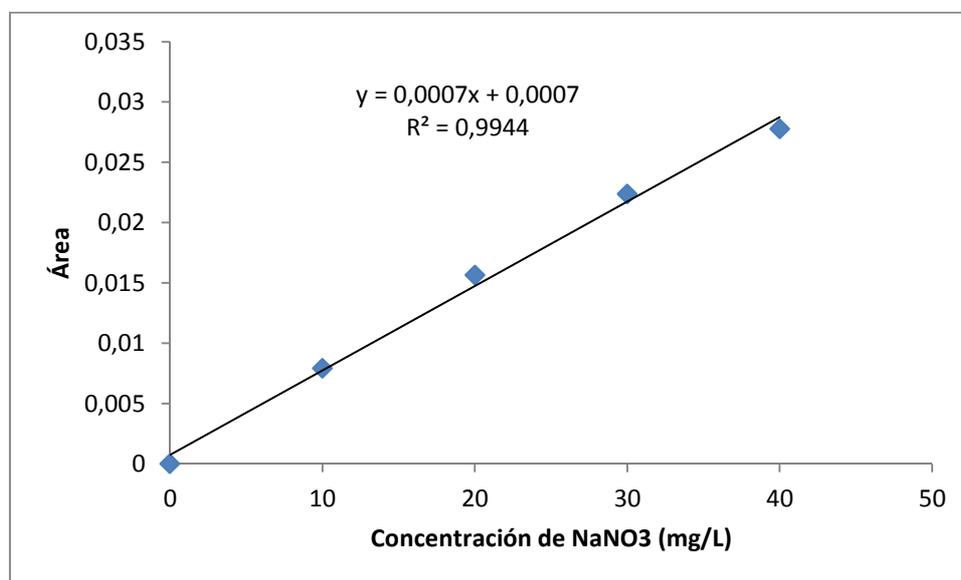


Figura 6. Recta de calibrado obtenida con los datos de la Tabla 6.

Con la ecuación de la recta que aparece en esta figura se puede calcular la concentración del analito en el extracto de la muestra, sustituyendo "y" por el área del pico del analito en el cromatograma de la muestra y despejando "x" que corresponde a la concentración de analito en el extracto de la muestra.

$$x = (0,02164 - 0,0007) / 0,0007 = 29,91 \text{ mg NaNO}_3/\text{L disolución}$$

A continuación es necesario calcular la concentración de nitrato sódico en la muestra de lechuga de partida (mg NaNO₃/kg de lechuga). Para ello, se tendrá en cuenta la preparación de la muestra, descrita en el punto 4.1.1 de este trabajo. Se pesan 2,5 g de muestra y finalmente la tenemos en un volumen de 30 mL. Por tanto, para calcular los mg de analito por kg de muestra, se hará de la siguiente forma:

$$(29,91 \text{ mg NaNO}_3/\text{L disolución}) * (0,03 \text{ L disolución}) / (2,5 \text{ g lechuga}) = 0,35897 \text{ mg NaNO}_3/\text{g lechuga}$$

Para calcularlo en mg NaNO₃/kg lechuga, solo habrá que multiplicar por 1000:

$$(0,35897 \text{ mg NaNO}_3/\text{g lechuga}) * 1000 = \mathbf{358,97 \text{ mg NaNO}_3/\text{g lechuga}}$$

Teniendo en cuenta que la legislación marca contenidos máximos de nitratos entre 2000 y 4500 ppm, dependiendo del tipo de lechuga y época del año, en este caso la lechuga cumple la legislación por tener un contenido mucho menor.

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo se lleva a cabo la preparación de la muestra y patrones para hacer un análisis de nitratos y nitritos



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

por HPLC. Asimismo se han detallado las condiciones cromatográficas que se han de emplear y se ha explicado con un ejemplo la forma de llevar a cabo la identificación y cuantificación de los analitos.

6 Bibliografía

[1] AECOSAN: Asociación Española de Consumo y de Seguridad Alimentaria y Nutrición. "Nitratos". Disponible en: http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subdetalle/nitratos.shtml

[2] Escriche, I.; Fernández-Segovia, I. (2012). "Prácticas de toxicología industrial en los procesos alimentarios". Ed. Universitat Politècnica de València, 2001.

[3] Reglamento (CE) 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.