

WALIDACJA METODY ANALITYCZNEJ DO OZNACZANIA AZOTANÓW (V) I (III) W ŻYWNOŚCI TECHNIKĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII JONOWEJ

**VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR
THE DETERMINATION OF NITRATES (V) AND (III) IN FOOD
BY HIGH-PERFORMANCE ION CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE**

Wioletta Popińska-Gil, Teresa Stępień

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Wioletta.Popinska@inhort.pl

Abstract

A simple and selective method was validated for the determination of nitrates (V) and (III) by ion chromatography technique. Efficient ion separation was achieved on a column IonPac™ AG-9HC, (4 × 50 mm). A conductometric detector was used for the detection of the analyte. The mobile phase consisted of 9.0 mM sodium carbonate (Na₂CO₃) and was delivered in a isocratic mode at a flow rate of 1.0 ml·min⁻¹ at 30 °C. The method was validated for linearity, selectivity, precision, limit of detection LOD, limit of quantitation LOQ and uncertainty. The method demonstrates good linearity, with $r = 0.998$. The uncertainty is 29.0% and 35.0% for nitrates (V) and (III), respectively. The limit of detection (LOD) values are 0.080 mg·dm⁻³ and 0.040 mg·dm⁻³ for nitrates (V) for nitrates (III), respectively. Limit of quantitation (LOQ) values are 0.240 mg·dm⁻³ and 0.120 mg·dm⁻³ for nitrates (V) and (III), respectively. The low limit of detection and limit of quantitation of nitrate and nitrite ions enables the detection and quantitation of these ions at low concentrations. This method is characterized by high selectivity.

Key words: validation parameters, ion chromatography, nitrate (V), nitrate (III)

WSTĘP

Chromatografia jonowa – IC (ang. Ion Chromatography) jest metodą wysokospawnej chromatografii cieczowej, wykorzystywaną do rozdzielania roztworów i oznaczania anionów, kationów oraz innych związków po uprzednim przeprowadzeniu ich w formę jonową (Small i in. 1975, Small i Bowman 1998). Wśród zalet tej metody wymienić można: możliwość jednoczesnego oznaczania kilku anionów oraz kilku kationów, oznaczenie jonów pierwiastka na różnym stopniu utlenienia, wysoką czułość

oraz selektywność, a także krótki czas analizy (Witkiewicz 2000; Michalski 2011). W metodzie tej najczęściej wykorzystywany jest detektor konduktometryczny, działający na zasadzie przewodnictwa jonowego. Zdolność przewodnictwa jonowego wykazują elektrolity umieszczone w polu elektrycznym powstającym między dwoma elektrodami naczynka konduktometrycznego. Metoda oznaczania azotanów (V) i (III) techniką wysoko-sprawnej chromatografii jonowej opiera się na ekstrakcji gorącą wodą azotanów z próbki i usunięciu substancji interferujących poprzez filtrację.

Przy wyborze parametrów walidacyjnych metody kierować się należy przede wszystkim charakterem prowadzonych badań oraz stawianym im wymaganiami. Odpowiedni dobór i optymalizacja warunków analitycznych ma wpływ na jakość rozdzielania. Dobierając odpowiednie warunki analityczne, takie jak: rodzaj kolumny analitycznej (wypełnienie), rodzaj eluentu i jego stężenie, szybkość przepływu, parametry pracy supresora i detektora, a także sposób przygotowania próbki do analizy, w próbkach o różnych matrycach można rozdzielić i oznaczyć wszystkie jony, zarówno nieorganiczne, jak i organiczne (Michalski 2005; Jackson 2000). Największymi zaletami chromatografii jonowej są krótki czas analizy oraz mała ilość próbki potrzebna do analizy i prosty sposób jej przygotowania. Etap przygotowania próbki ma ogromne znaczenie w analizie. Od chwili pobrania próbki może zachodzić w niej szereg procesów, np. utlenianie, redukcja, wytrącanie, procesy fotochemiczne i biochemiczne, mających wpływ na wynik końcowy badania (Kostka i in. 2008). Dlatego tak ważny jest pierwszy etap prac. Wytyczne pobierania i przygotowania próbek do kontroli poziomu azotanów w niektórych produktach spożywczych określone zostały w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1882/2006.

Występowanie w roślinach azotanów (V) jest zjawiskiem normalnym, gdyż stanowi element naturalnego obiegu azotu w przyrodzie. Warzywa stanowią niezbędny element diety człowieka, są jednocześnie jednym z większych źródeł azotanów w spożywanej żywności. Według badań 50-80% azotanów dostarczają spożywane warzywa (Rutkowska 1996; Wojciechowska 2005). Zawartość azotanów (V) i (III) jest istotnym kryterium jakości produktu (Sadowska 1988; Smoczyński i Skibniewska 1996; Santamaria 2006). Najwyższe dopuszczalne poziomy azotanów (V) w produktach spożywczych określone są w Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 1258/2011. Ustalone graniczne zawartości azotanów w żywności wynoszą: $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ w przetworzonej żywności na bazie ziół oraz żywności dla niemowląt i małych dzieci; $7000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ w rokiecie siewnej (rukola).

Celem pracy była optymalizacja metody oznaczania azotanów (V) i (III) oraz jej walidacja z uwzględnieniem wymagań stawianym badaniom bezpieczeństwa żywności. W pracy wzięto pod uwagę wymagania normy PN-EN 12014-2:2001 oraz rekomendację Guide CG 4 (QUAM 2000), ISO Guide 99:2010, ISO 8466-1 oraz ISO 5725-1-6:2002 (Polska Norma 2002).

MATERIAŁY I METODY

Techniczne warunki analizy

W badaniach wykorzystano chromatograf jonowy firmy Dionex. Aparat wyposażony jest między innymi w elektrochemiczny generator eluentu, elektrochemiczny moduł tłumienia przewodności, detektor konduktometryczny.

Stosowane odczynniki: węglan sodu Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich), materiał referencyjny (standard II seven anion: F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} – Dionex), metanol (J.T. Baker).

Roztwory wzorcowe przygotowano z materiału referencyjnego o stężeniu wyjściowym $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztwory do kalibracji przygotowano tuż przed użyciem przez rozcieńczenie do odpowiednich stężeń. Stosowano roztwory w pięciu stężeniach: 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Woda stosowana do przygotowania eluentów, wzorców i we wszystkich operacjach rozcieńczania miała przewodnictwo elektryczne właściwe na poziomie poniżej $0.05 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Wyższe przewodnictwo może wskazywać na obecność pewnych ilości jonów, które mogą niekorzystnie wpływać na jakość uzyskanych wyników. Szczególnie dotyczy to analiz na niskich poziomach stężeń (Michalski 2005, 2010).

Parametry prowadzenia analiz: kolumna chromatograficzna IonPac™ AG9-HC, $4 \times 50 \text{ mm}$, prekolumna IonPac™ AG9-HC, RFIC™ Guard, $4 \times 50 \text{ mm}$, temperatura pracy kolumny $30 \text{ }^\circ\text{C}$, faza ruchoma, węglan sodu o stężeniu $9,0 \text{ mM}$, szybkość przepływu fazy ruchomej (pompa gradientowa) $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, objętość nastrzyku $120 \mu\text{l}$, detektor konduktometryczny 45 mA , supresor ASRS®300 4 mm (P/N 064554), czas analizy 25 min .

Przygotowanie próbek

Do przeprowadzenia walidacji wykorzystano świeże próbki owoców (jabłka, truskawki) i warzyw (koper włoski, marchew) dostarczonych do laboratorium. Przed ekstrakcją, próbki były rozdrobnione i homogenizowane (Szymczak 1999; Dz.U. nr 37 2003). Azotany ekstrahowano gorącą wodą destylowaną przez 15 min w łaźni wodnej w temperaturze wrzenia (Sowa i in. 2011; Ubyszewska i in. 2010). Następnie ekstrakt schłodzi-

dzono. Przesącz oczyszczono przy użyciu filtrów z odwróconą fazą On-Guard II RP oraz przez filtry membranowe $0.45\ \mu\text{m}$ (Jones i in. 1989; Haddad 1999; Michalski 2010). Tak przygotowany roztwór był gotowy do oznaczenia zawartości azotanów (V) i (III) w owocach, warzywach i przetworach owocowo-warzywnych. Walidację metody oznaczania zawartości azotanów w warzywach i przetworach warzywnych metodą HPLC/IC przeprowadzono wg normy PN-EN 12014-2:2001 oraz dokonano modyfikacji tej metody, podyktowanej specyfiką badanych prób (Jones i in. 1989).

Podczas ilościowego oznaczania zawartości azotanów stosowano metodę dodatku wzorca (standard wewnętrzny) i metodę wzorca zewnętrznego, wykorzystując krzywą kalibracyjną.

W celu wyznaczenia granicy wykrywalności LOD (ang. limit of detection), granicy oznaczalności LOQ (ang. limit of quantification) i współczynnika korelacji (r) metody, przygotowano 9 równoległych próbek roztworów wzorcowych o rosnących stężeniach oraz 9 równoległych próbek roztworów próbki matrycowej z dodatkiem wzorca.

Kolejne elementy w procesie walidacji wyznaczono wykorzystując wyniki badań próbek matrycowych z dodatkiem wzorca na trzech różnych poziomach stężeń przy $n = 10$. Analizowano odzysk, obliczono poprawność i precyzję. Scharakteryzowano składowe niepewności, na podstawie których określono niepewność rozszerzoną metody.

Granice wykrywalności LOD i granice oznaczalności LOQ wyznaczono metodą najniższych stężeń. Granica LOD została wyznaczona na podstawie odchylenia standardowego i wyrazu wolnego krzywej kalibracyjnej oraz kąta nachylenia krzywej.

Liniowość metody i parametry zależności liniowej zostały określone jako zdolność metody do otrzymywania wyników proporcjonalnych do stężenia analitu. W zakresie roboczym metody została zachowana liniowość, tzn. odpowiedź aparatu wyrażona jako pole powierzchni pod pikiem ($\mu\text{S}\cdot\text{min}^{-1}$) i była proporcjonalna do stężenia analitu. Wyznaczenie zakresu roboczego i liniowości metody przydatne jest przy określaniu poziomu stężeń wykorzystywanych do kalibracji aparatu. Wyznaczając liniowość metody posłużono się przygotowanymi próbkami matrycowymi z dodatkiem wzorca, w zakresie stężeń $0,50\text{--}50,0\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Uzyskane wyniki były podstawą do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej dla oznaczenia azotanów (V) i (III) w żywności pochodzenia roślinnego.

Poprawność (dokładność) metody jest to stopień zgodności pomiędzy wynikiem oznaczonym lub średnią wyników z n oznaczeń a prawdziwą

zawartością analitu w badanej próbce. Określono ją przez oznaczenie próbek matrycowych z dodatkiem referencyjnego materiału odniesienia jako wzorca. W przypadku azotanów (V) dodano roztwory wzorcowe o stężeniach 0,5; 1,0; 2,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, dla azotanów (III) były to stężenia 0,5; 5,0; 10,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Oznaczenia wzbogaconych próbek wykonano w 10 powtórzeniach.

Precyzja (V_z) metody to stopień zgodności między wynikami badań otrzymanymi w określonych warunkach z wielokrotnych pomiarów tej samej wielkości. Wielkość precyzji obliczono jako całkowity współczynnik zmienności wyników uzyskanych na podstawie serii analiz prowadzonych przy $n = 10$, przez trzy kolejne dni.

Zakres roboczy metody wyznaczono jako zakres stężeń, w których dana metoda może być stosowana. Ustala się go przez potwierdzenie, że metoda analityczna zapewnia możliwy do przyjęcia stopień liniowości, dokładności i precyzji, będących składową niepewności metody. Stosowany jest do próbek zawierających ilości badanej substancji mieszczące się pomiędzy skrajnymi wartościami zakresu. Przyjęto, iż dolna granica zakresu roboczego powinna być równa lub większa od granicy oznaczalności metody.

Odzysk – do obliczenia odzysku wykorzystano próbki matrycowe (o nieznannej zawartości azotanów) i próbki matrycowe z dodatkiem wzorca na trzech różnych poziomach stężeń. Analizę wykonano w 10 powtórzeniach. Badane próbki matrycowe z dodatkiem wzorca poddano takiej samej procedurze analitycznej jak próbki matrycowe.

Niepewność wyniku to parametr związany z wynikiem pomiaru, charakteryzujący rozrzut wartości, które można przypisać wielkości mierzonej. Takim parametrem może być na przykład odchylenie standardowe lub szerokość przedziału odpowiadającego określonemu poziomowi ufności, a także wynik pomiaru po uwzględnieniu wszystkich składników niepewności. Wynik badania przedstawia się jako wartość wraz z niepewnością rozszerzoną, zgodnie z wytycznymi Rozporządzenia Komisji Europejskiej (WE) nr 1882/2006, wg schematu:

prezentowany wynik $A = \text{wynik końcowy} \pm \text{niepewność rozszerzona (U)}$ (jednostka)

Niepewność złożona (całkowita) $u_{c(y)}$ określana jako niepewność wyniku pomiaru, gdy wynik otrzymuje się na podstawie wartości szeregu wielkości mierzonych (np. niepewność wagi, niepewność użytych naczyń miarowych). Jest to całkowita niepewność oszacowana na podstawie przebiegu procedury analitycznej.

Dopuszcza się uproszczony sposób postępowania przy obliczaniu niepewności złożonej (całkowitej) $u_{c(y)}$, wykorzystując arkusz kalkulacyjny, np. Excel (przewodnik Eurachem/Citac). Po dokonaniu procesu walidacji, na podstawie oszacowanej poprawności B_w oraz precyzji V_z metody, możliwe jest określenie niepewności całkowitej wyrażonej wzorem:

$$u_c(y) = \sqrt{B_w^2 + 2V_z^2}$$

Niepewność rozszerzona (U) definiowana jako wielkość określająca przedział, w którym znajduje się wynik oraz w którym można oczekiwać, że znajdzie się znaczna część rozrzutu naszej wartości mierzonej. Jest to wartość, którą można przypisać do wielkości mierzonej, obliczona według wzoru:

$$U = k \cdot u_{c(y)}$$

gdzie: U – niepewność rozszerzona, $u_{c(y)}$ – niepewność złożona,
k – współczynnik rozszerzenia.

Współczynnik rozszerzenia najczęściej równy jest 2. Wielkość współczynnika rozszerzenia zależy od liczby powtórzeń dla wartości mierzonych, użytych do szacowania niepewności złożonej. Przy rozkładzie normalnym i liczbie wyników powyżej sześciu oraz poziomie ufności 95% $k = 2$ (Konieczka i in. 2007).

Selektywność (specyficzność) określa się jako właściwość metody do oznaczania danego analitu w obecności innych składników matrycy próbki, w danych warunkach badania. Metoda idealnie selektywna dla oznaczanej substancji jest metodą specyficzną (Michalski i Kurzyca 2006).

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 przedstawiono wyniki walidacji przeprowadzonej dla metody oznaczania azotanów (V) i (III) w materiale roślinnym i żywności pochodzenia roślinnego, techniką wysokosprawnej chromatografii jonowej.

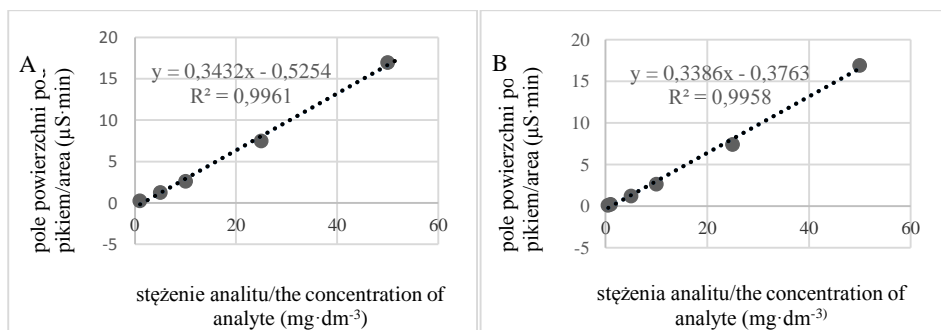
Oznaczona granica wykrywalności LOD dla azotanów (V) wynosiła $0,080 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, dla azotanów (III) – $0,040 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Granica oznaczalności LOQ została obliczona jako trzykrotna wartość LOD i wynosiła dla azotanów (V) $0,240 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i azotanów (III) $0,120 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Liniowość określono na podstawie otrzymanych wykresów opisanych równaniem $y = ax - b$ (rys. 1A i 1B). Dla azotanów (V) równanie prostej przyjęło postać $y = 0,3432 x - 0,5254$, dla azotanów (III) $y = 0,3386 x - 0,3763$. Współczynniki kierunkowe (a) krzywych kalibracji określają czułość metody. Wyznaczone współczynniki korelacji liniowej (r) wynosiły 0,998 dla azotanów (V) i (III), co potwierdza zależność liniową

w badanym zakresie. Wyniki mieszczą się w przyjętym kryterium ($r \geq 0,995$) (Eurachem Guide 2000).

Tabela 1. Zestawienie parametrów walidacji i uzyskanych w tym procesie wyników
Table 1. Summary of parameters obtained in the validation and the results of this process

Parametry walidacji Validation parameters	Azotany (V) Nitrate (V)	Azotany (III) Nitrate (III)
Granica wykrywalności LOD ; limit of detection	0,080	0,040
Granica oznaczalności LOQ ; limit of quantification	0,240	0,120
Liniowość r ; linearity	0,998	0,998
Poprawność B_w ; the correctness of the method	7,60%	17,2%
Precyzja V_z ; precision	8,64%	2,28%
Zakres roboczy; working range	0,50-50,0 mg·dm ⁻³	0,50-50,0 mg·dm ⁻³
Odzysk W ; recovery	92,4%	84,1%
Niepewność złożona u_c (y); combined uncertainty	14,4%	17,5%
Niepewność rozszerzona U ; expanded uncertainty	29,0%	35,0%



Rys. 1. Wykres zależności liniowej pomiędzy wartościami zliczeń pola pod powierzchnią pikietm do stężenia jonów azotanowych V (A), jonów azotanowych III (B) w roztworze

Fig. 1. Graph of the linear relationship between the count values of the area under the peak surface concentration of nitrate ions V (A), nitrate ions III (B) in the solution

Określona poprawność metody (B_w) dla azotanów (V) wynosiła 7,60%, dla azotanów (III) 17,2%. Wartość precyzji dla azotanów (V) wyznaczono na poziomie 8,64%, natomiast dla azotanów (III) 2,28%. Uzyskane wartości są akceptowalne dla metod analitycznych.

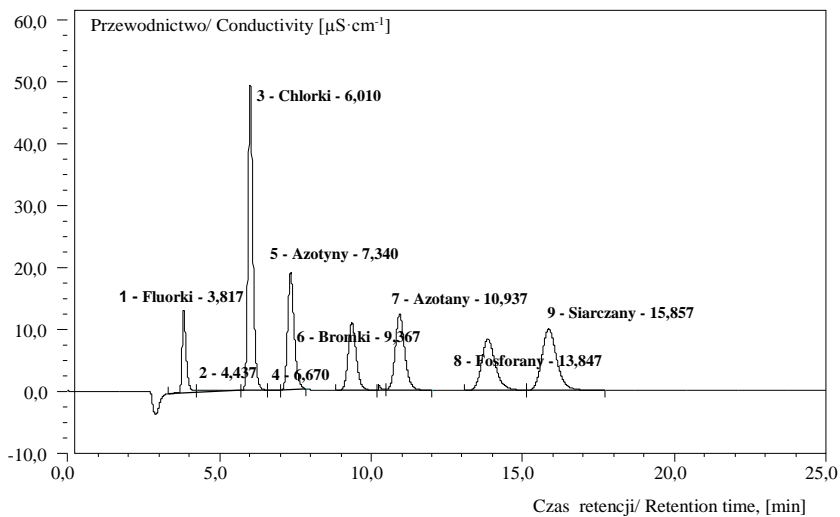
Zakres roboczy stężeń wyznaczono w granicach $0,50\text{-}50,0\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ dla azotanów (V) i (III). Określony zakres roboczy uwzględnia specyfikę badanych próbek, to znaczy próbki o zawartości azotanów (V) i (III) – małej (jabłka, wiśnie, pomidory) i wysokiej (sałata, szpinak, koper).

Obliczono odzysk, który dla azotanów (V) wynosił 92,4%, a dla azotanów (III) 84,1%. Akceptowany poziom odzysku zawiera się w granicach 70-110%. Niepewność złożoną $u_{c(y)}$ ustalono na poziomie: dla azotanów (V) 14,4%, natomiast dla azotanów (III) 17,5% (tab. 1). Dla określenia selektywności metody oznaczania azotanów (V) i (III) przeprowadzono analizę przygotowanych roztworów wzorcowych oraz próbek matrycowych (warzywa, owoce). Na rysunkach 2 i 3 przedstawiono przykładowe chromatogramy dla roztworu wzorcowego o stężeniu $10\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz dla próbki kopru.

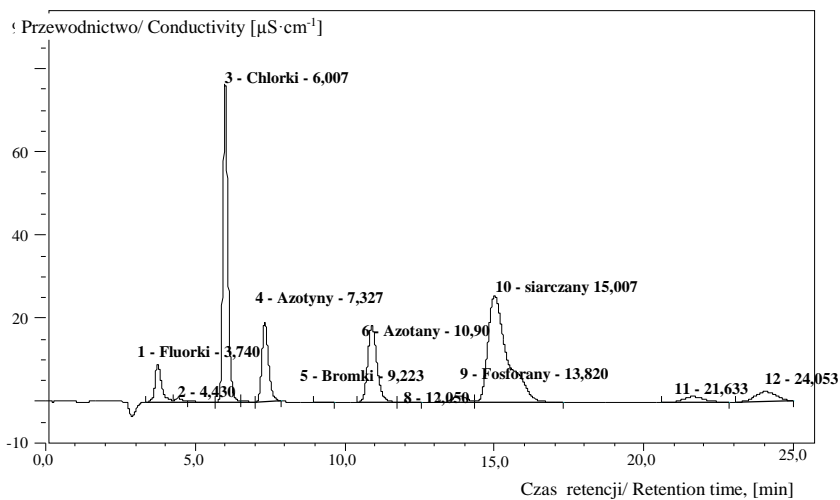
Na podstawie uzyskanych chromatogramów podczas analizy roztworu wzorcowego stwierdzono, że piki odpowiadające azotanom (V) i (III) są bardzo dobrze rozdzielone od sąsiadujących z nimi pików reprezentujących chlorki, bromki i fosforany. Analiza roztworu wzorcowego pozwoliła określić czas retencji jonu azotanowego (V) $10,937 \pm 0,005$ min i jonu azotanowego (III) $7,340 \pm 0,005$ min. Uzyskano także dobry rozdział pików jonów F^- , Cl^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} . Analiza matrycy prowadzona była w takich samych warunkach jak roztworu wzorcowego.

Wymienione wyżej parametry spełniają kryteria skuteczności stawiane dla metod analitycznych stosowanych do kontroli azotanów (V) w żywności pochodzenia roślinnego (Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1882/2006 r. z 19 grudnia 2006 r.).

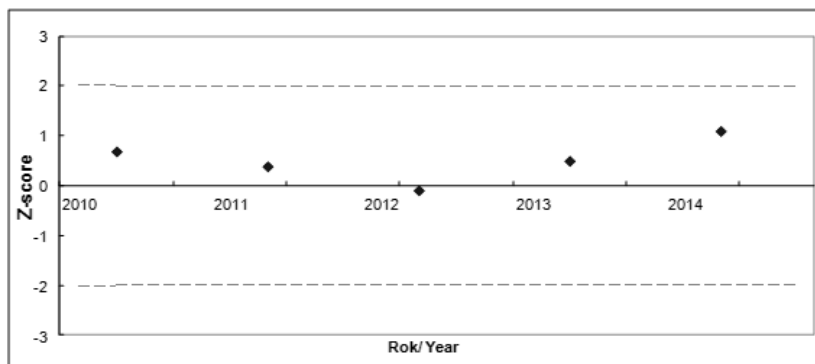
W latach 2010-2014 metoda została sprawdzona w badaniach biegłości organizowanych przez Wageningen University, Holandia (IPE – International Plant-Analytical Exchange). Na wykresie przedstawiono parametr z-score, obliczony na podstawie uzyskanych wyników.



Rys. 2. Chromatogram zarejestrowany dla roztworu wzorcowego o stężeniu $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$
 Fig. 2. The chromatogram recorded for the standard solution with a concentration of $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$



Rys. 3. Chromatogram zarejestrowany dla próbki kopru włoskiego
 Fig. 3. The chromatogram recorded for a sample of fennel



Rys. 4. Parametr z-score na podstawie wyników badań biegłości w latach 2010-2014
 Fig. 4. The parameter z-scores for the results obtained in proficiency testing over years 2010- 2014

Analiza wyników uzyskanych w badaniach biegłości wskazuje, że metoda ta cechuje się wysoką dokładnością i poprawnością. Otrzymane wyniki mieściły się w granicach 2 z-score. Wszystkie uzyskane wyniki w latach 2010-2014 były zadowalające. Za kryterium poprawności wyniku przyjmuje się: $|z| < 2$ wynik zadowalający, $2 < |z| < 3$ wynik wątpliwy, $|z| > 3$ wynik niezadowalający (ISO 17043, 2011). Potwierdza to wysoką jakość analiz wykonywanych na zawartość azotanów (V) i (III) techniką wysokosprawnej chromatografii jonowej.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników z walidacji metody oznaczania azotanów (V) i (III) można stwierdzić, że metoda ta spełniła kryteria stawiane metodom analitycznym stosowanym w ramach kontroli jakości badanych produktów, zgodnie z obowiązującymi przepisami Rozporządzenia Komisji (WE) nr 882/2004 pkt. 1 i 2 załącznika III, jak również z wytycznymi Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1882/2006.

Stwierdzono, że analiza chromatograficzna odznacza się wysoką selektywnością dla jonów azotanowych (V) i (III), co pozwala na uniknięcie interferencji związanych z obecnością innych jonów. Norma PN-EN 12014-2:2001 zaleca stosowanie wysokosprawnej chromatografii jonowej do oznaczania zawartości azotanów w warzywach.

Opisany schemat postępowania podczas walidacji metody analitycznej z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii jonowej może być przydatny podczas opracowywania metod oznaczania innych analitów obdarzonych ładunkiem elektrycznym.

Literatura

- Balcerzak M., Janiszewska J. 2011. Wieloanionowa analiza materiałów środowiskowych techniką chromatografii jonowej. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 50: 78-87.
- Eurachem/Citac Guide CG 4 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition.
- Haddad P.R., Doble P., Macka M. 1999. Developments in sample preparation and separation techniques for the determination of inorganic ions by ion chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 856(1-2): 145-177. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00431-8.
- IPE (International Plant – Analytical Exchange Programme) Wageningen International Evaluating Programs for Analytical Laboratories, Wageningen University: Quarterly Raport 2010.3; 2011.2; 2012.3; 2013.3; 2014.2.
- Jones W.R., Jandik P. 1989. Elimination of matrix interferences in ion chromatographic analysis of difficult aqueous samples. *Journal of Chromatographic Science* 27(8): 449-455. DOI: 10.1093/chromsci/27.8.449.
- Jackson P.E. 2000. Ion chromatography in environmental analysis. W: Meyers R.A. (red.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley & Sons Ltd, s. 2779-2801.
- Konieczka P., Namieśnik J., Bulska E. i in. 2007. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. WNT, Warszawa.
- Kostka B., Bebek M., Mitko K. 2008. Zastosowanie chromatografii jonowej do oznaczania jonów nieorganicznych w wodach naturalnych o zróżnicowanej mineralizacji. *Przemysł Chemiczny* 87(5): 489-493.
- Michalski R. 2005. Zastosowania chromatografii jonowej w badaniach próbek medycznych, przemysłowych i spożywczych. *Laboratorium* 5: 28-32.
- Michalski R. 2010. Sample preparation for ion chromatography. W: Cazes J. (red.), *Encyclopedia of chromatography*. Third Edition, s. 2106-2110. DOI: 10.1201/NOE1420084597.ch418.
- Michalski R. 2011. *Chromatografia jonowa. Podstawy i zastosowania*. SWSZ Katowice.
- Michalski R., Kurzyca I. 2006. Determination of nitrogen species (nitrate, nitrite and ammonia ions) in environmental samples by ion chromatography. (Review). *Polish Journal of Environmental Studies* 15(1): 5-18.
- Polska Norma PN-EN ISO/IEC 17043:2011. Ocena zgodności – Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości.
- Polska Norma PKN-ISO/IEC Guide 99:2010. Międzynarodowy słownik metrologii – Pojęcia podstawowe i ogólne oraz terminy z nimi związane.
- Polska Norma PN-ISO 8466-1:2003. Jakość wody. Kalibracja i ocena metod analitycznych oraz szacowanie ich charakterystyk.
- Polska Norma PN-ISO 5725-1-2-3-4,6:2002. Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów.

- Polska Norma PN-EN 12014-2, kwiecień 2001. Artykuły żywnościowe. Oznaczenie zawartości azotanów i/lub azotynów,
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003. Dz.U. Nr 37, POZ 325 I 326, w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności.
- Rozporządzenie (WE) NR 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulacjami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt.
- Rozporządzenia Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustanawiające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych.
- Rozporządzenia Komisji (WE) NR 1882/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów azotanów w niektórych środkach spożywczych.
- Rozporządzenia Komisji (UE) NR 1258/2011 z dnia 2 grudnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów azotanów w środkach spożywczych.
- Rutkowska G. 1996. Jeszcze o azotanach. *Chłodnictwo* 31(12): 38-40.
- Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(1): 10-17. DOI: 10.1002/jsfa.2351.
- Small H., Bowman B. 1998. Ion chromatography: a historical perspective. *American Laboratory* 10: 1-8.
- Small H., Stevens T.S., Bauman W.C. 1975. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Analytical Chemistry* 47(11): 1801-1809. DOI: 10.1021/ac60361a017.
- Sadowska H. 1988. Bezpieczna żywność i żywienie. LSW. Warszawa.
- Smoczyński S.S., Skibniewska K.A. 1996. Azotany i azotyny jako higieniczny problem jakości żywności. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 440: 361-364.
- Sowa A., Janiszewska J., Balcerzak M. 2011. Ziemniaki chemicznie, nieorganicznie i jonowo. W: Michalski R. (red.), *Chromatografia jonowa*. Wyd. Śląskiej Wyższej Szkoły Zarządzania im. Gen. J. Ziętka, s. 90-101.
- Ubyszewska M., Janiszewska J., Balcerzak M. 2010. Oznaczanie nieorganicznych anionów w próbkach warzyw techniką chromatografii jonowej. W: Michalski R. (red.), *Wybrane zastosowania chromatografii jonowej*. Wyd. Śląskiej Wyższej Szkoły Zarządzania im. Gen. J. Ziętka, s. 43-52.
- Witkiewicz Z. 2000. *Podstawy chromatografii*. WNT, Warszawa.
- Wojciechowska R. 2005. Akumulacja azotanów a jakość produktów ogrodnictwa. *Wyd. Coperite, Kraków*, s. 21-27.