



YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ BESİN MADDELERİNDEKİ NİTRAT VE NİTRİT İYONLARININ SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE İNDİREKT TAYİNİ

Kimyager Mevlüde CANLICA

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Anorganik Kimya Programında
hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sezen İSLİMYELİ

İSTANBUL - 1994

İÇİNDEKİLER

Özet, Summary

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. GENEL BÖLÜM	2
2.1. Besinlerdeki Nitrat ve Nitrit İyonları	2
2.2. Nitrat ve Nitrit İyonlarının Zararları	4
2.3. İşlenmiş Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit İyonlarının Rolü	6
2.4. Spektrofotometrik Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemleri	9
2.4.1. Direkt UV-Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri	9
2.4.2. Görünür Bölgede Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri	10
2.5. İşlenmiş Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemleri	13
2.6. Bakır (I) Neokuproin ile Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemleri	14
3. DENEYSEL BÖLÜM	18
3.1. Maddeler ve Çözücüler	18
3.2. Çözeltiler	18
3.3. Gereçler	19
3.4. Çalışma Yöntemi	19
3.4.1. Deney Koşulları	19
3.4.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	20
3.4.3. Yöntemin İşlenmiş Et Ürünlerine Uygulanması	21
4. SONUÇLAR	22
4.1. Bakır (I) Neokuproin ile Spektrofotometrik Tayin Yöntemi	22
4.1.1. Deney Koşulları	22
4.1.2. Ölçü Eğrisi	25
4.2. İşlenmiş Et Ürünlerinin Analizi	27
5. TARTIŞMA	29
6. KAYNAKLAR	31

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması sırasında yardımlarıyla bana her zaman destek olan, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli Hocam Prof.Dr. Sezen İSLİMYELİ'ne, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Mahmure ÖZGÜR'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde maddi olanaklarıyla destek veren Y.T.Ü. Araştırma Fonuna (Proje No:92-B-01-02-02) teşekkürlerimi sunarım.

Mevlûde CANLICA

ÖZET

Bu çalışmanın ilk bölümünde nitrat ve nitrit iyonlarının zararları; genel spektrofotometrik nitrat tayin yöntemleri; işlenmiş et ürünlerindeki nitrat ve nitrit tayin yöntemleri ile bakır(I)neokuproin nitrat iyon çifti oluşumuna dayanan miktar tayin yöntemlerinin bir dökümü yapıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde sudaki nitrat iyonunun bakır(I) neokuproin kelatı ile oluşturduğu iyon çiftinin metil izobütil keton (MIBK) ekstraktındaki absorbansının ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntemin en uygun koşulları saptandı. Buna göre 1 ml 0.01M bakır(II) sülfat, 1 ml 0.25M hidroksilamonyum sülfat ve 5 ml pH 6.2 fosfat tampon çözeltisi içeren tüplere, 100 µg/ml nitrat iyonu içeren sodyum nitrat çözeltisinden 0.2-1.0 ml eklendi. Karışım 10 ml 2.25×10^{-3} M neokuproin / MIBK çözeltisiyle ekstre edildi. Organik fazın absorbans değerleri 452 nm'de ölçüldü (n=5). Ortalama absorbans değerleri ile konsantrasyon (µg/ml) arasında ölçü eğrisi hazırlandı. Regresyon analizi ile doğrunun denklemi $A=0.08C-0.0091$ olarak hesaplandı ($r=0.9995$).

Nitrit iyonu da nitrata benzer şekilde iyon çifti oluşturduğundan bu iki iyonun bir arada tayini için şöyle çalışıldı: Nitrit iyonu, serik sülfat ile nitrata yükseltgenerek toplam nitrat miktarı, sülfamik asitle azota indirgenerek nitrat miktarı tayin edildi. Aradaki farktan nitrit iyonu miktarı bulundu.

Spektrofotometrik yöntem piyasada mevcut bazı işlenmiş et ürünlerinde nitrat ve nitrit iyonları tayinine uygulandı. Çalışılan onyediyet adet işlenmiş et ürünlerindeki sodyum nitrat (mg/kg) ve sodyum nitrit (mg/kg) miktarlarının -üç ürün hariç- yasal sınırlar içerisinde olduğu belirlendi. Sonuç olarak; işlem görmüş et ürünlerinde nitrat ve nitrit iyonlarının tayini için atomik absorpsiyon spektrofotometrisinde uygulanmış olan bakır(I) neokuproin iyon çifti yönteminin moleküler spektrofotometrik olarak da uygulanabileceği saptandı.

SUMMARY

In the first part of this work, the harmful effects of nitrate and nitrite ions; general spectrophotometric assay methods of nitrate ion; nitrate and nitrite determination methods in processed meat products; and the methods of determination based on formation of copper (I) neocuproine. nitrate ion-pair are reviewed.

In the second part of the work, optimum conditions of the spectrophotometric method based on measuring the absorbance values of the ion-pair produced by nitrate ion and copper(I)neocuproine chelate in the methyl isobuthyl ketone(MIBK) extract, were determined. Accordingly; 0.2-1.0 ml portions of the sodium nitrate solution containing 100 $\mu\text{g/ml}$ nitrate ion were added into the tubes containing 1 ml of 0.01M cupric sulfate, 1 ml of 0.25M hydroxylammonium sulfate and 5 ml of pH 6.2 phosphate buffer solutions. The mixtures were extracted by 10 ml of 2.25×10^{-3} M neocuproine/MIBK solution. The absorbance values of the organic phase were measured at 452 nm ($n=5$). A calibration graph was plotted between mean absorbance and concentration ($\mu\text{g/ml}$) values. The linear equation of the calibration graph was calculated by regression analysis as $A=0.08C-0.0091$ ($r=0.9995$).

Since nitrite ion also forms ion-pair similar to the nitrate ion, the simultaneous determination of these two ions was performed as follows: The nitrite ion was oxidized to nitrate by ceric sulfate and the total amount of nitrate was determined. Nitrite ion was reduced to nitrogen by sulfamic acid and the nitrate was determined. The difference of the two determination gave the amount of nitrite ion.

The spectrophotometric method was applied to the determination of nitrate and nitrite ions in the processed meat products present in the market. The amounts of sodium nitrate (mg/kg) and sodium nitrite (mg/kg) in seventeen processed meat products were found in legal limits, except three products. As a result, the copper (I) neocuproine solvent extraction

method which was applied atomic absorption spectrophotometrically to the determination of nitrate and nitrite ions in the processed meat products, can also be applied molecular spectrophotometrically .



1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Toksik etkileri nedeniyle nitrit iyonunun ve bakteriyolojik olarak kolayca nitrite dönüşebilen nitrat iyonunun besin kaynaklarımızda fazla miktarda bulunması sağlığımız yönünden sakıncalıdır. Bu nedenle nitrathı gübrelerle yapılan gübrelemenin ve bu iyonları bulundurma olasılığı yüksek olan su kaynaklarının, sebzelerin ve işlem görmüş et ürünlerinin kontrolu önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, piyasadaki işlem görmüş et ürünlerinde katkı maddesi olarak bulunan nitrat ve nitrit iyonlarının, yasal sınırlar içinde olup olmadıklarının kontrolu için, miktarlarının tayin edilmesidir. Bunun için sudaki nitrat iyonunun bakır(I)neokuproin kelatıyla oluşturduğu iyon çiftinin MIBK'daki çözeltisinin absorbans ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntem esas alınmıştır.Yöntemin optimum koşulları belirlendikten sonra bazı işlem görmüş et ürünlerinin tayinleri gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BÖLÜM

2.1-Besinlerdeki Nitrat ve Nitrit İyonları

Besinlerden aldığımız nitratin en büyük kaynağı esas olarak sebzeler ve nitratça zengin su kaynaklarıdır(1).

Nitratlar bitkilerin doğal bileşenleridir. Birçok sebzede önemli miktarda bulundukları halde meyvalarda az bulunurlar. Ispanak, pancar, turp, patlıcan, kereviz, kıvırcık ve şalgam yüksek oranda nitrat içeren sebzeler arasındadır. Bazı örneklerin nitrat içeriği 3000 ppm' den daha yüksek olabilir. Ancak bildirilen değerler; genetik, çevresel,örnekleme ve olgunluk faktörlerine göre çok farklı olabilmektedir. Sebzelerde nitrat birikiminde en önemli faktörler;

- a. Yüksek gübreleme düzeyi (özellikle olgunlaşma döneminde)
- b. Nitrat biriktirme eğiliminde olan türler
- c. Olgunlaşma sırasındaki ışık azlığı
- d. Susuzluk
- e. Kimyasal işlemlerle bitkinin hasarlanmasıdır.

Bu faktörler arasındaki etkiler de dikkate alındığında aynı bitkiler için farklı değerler ortaya çıkabilmektedir.

Kişiler en az bitkilerle aldıkları kadar nitrati, yedikleri işlem görmüş et ürünlerinden de alırlar.

Bazı su kaynakları, özellikle kuyu sularının da yüksek nitrat içeriği olduğu sıkça belirtilmektedir. Bu yüksek nitrat içeriği birçok kaynaktan gelebilmektedir. Bu kaynaklar; toprak ve kayalıklar, gübrelerin zirai

kullanımı, mikroorganizmalar, bitkilerin azot tutmaları ile özellikle bitki ve çamursu artıkların bozunmalarıdır. Nitrat bunlardan yeraltı sularına sızar. Evlerde kullanılan sulardaki nitrat azotunun 10 ppm'i aşmaması gerekir. Kuyu sularında bu miktarın üzerinde nitrat bulunduğu birçok örneklerde saptanmıştır.

Yiyecek ve yemlerde normalde oluşan nitrat , nitrite indirgenebiliyor ise toksik olmaktadır. Yoksa makul bir konsantrasyonda nitrat iyonu hızla idrarla atılır. Nitratın nitrite indirgenebildiği durumlar dört türdür:

a. Büyükbaş hayvanların işkembelerindeki mikrobik ortam nitratın nitrite indigenmesine yol açar. Nitritin absorpsiyonu ise hayvanda toksisite yapabilir. Böylece yüksek nitratlı su veya yem aldığı anda tehlike söz konusudur.

b. Dört aylıktan küçük bebeklerin mideleri daha az asitli olduğundan nitratı nitrite dönüştüren mikroorganizmalar gelişebilir. Sonuçta bebeklere yüksek nitratlı su vermek tehlikeli olabilir.

c. Pişmiş ıspanak mikropların gelişmesine yarayacak bir ortamda saklanırsa nitrat iyonu nitrite dönüşebilir.Çocuklarda, oda sıcaklığında bırakılan ıspanaktan oluşan bir çok toksisite olayı bildirilmektedir. Bu tür zehirlenmeler başka yüksek nitratlı bitkilerde de görülmekle birlikte en çok ıspanakta rastlanmaktadır.

d. Nitratça zengin nemli yem materyallerinde nitrat nitrite indirgenir. Bu yemin tüketilmesi hayvanlarda toksik etki yapabilir.

Yüksek oranda nitrat ve nitrit içeren diğer bir önemli besin grubu işlem görmüş et ürünleridir. Çünkü bu ürünlere hazırlanmaları sırasında tat, renk ve antibakteriyel etki oluşturmak üzere belli oranlarda nitrat ve nitrit iyonları katılmaktadır. Bu nedenle yiyecekler, yemler ve su kaynaklarındaki nitrat içerikleri tayini. yüksek nitrat içerikli örneklerin zarar veremeyecekleri

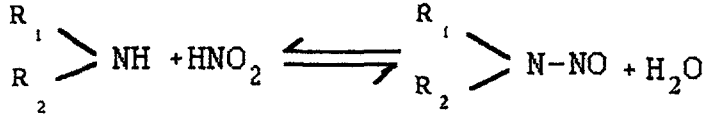
yerlere atılması ve yiyeceklerde nitrat kullanımının azaltılması önem taşımaktadır.

2.2. Nitrat ve Nitrit iyonlarının Zararları

Nitrat iyonu tek başına toksik etkili değildir ve idrarla hızla atılır. Ancak bazı ortamlarda nitrit iyonuna dönüşebilmekte ve buna bağlı olarak toksik etkili maddelerin ortaya çıktığı bir dizi reaksiyonun başlamasına neden olabilmektedir. Bu yüzden nitrat ve nitrit iyonunun günlük alınma miktarının, kg vücut ağırlığı için 0,4 mg'ı aşmaması tavsiye edilmiştir(2). Ayrıca nitritler siyanür zehirlenmesinde antidot olarak 30-300 mg'lık dozlarda ve vazodilasyonda ilaç etken maddesi olarak kullanıldığından bu konuya özel önem verilmesi gerekmektedir(3).

Nitrit iyonunun toksik etkisi esas olarak iki nedenle ortaya çıkmaktadır: Bunlardan birincisi ve kesin kanıtlanmış olanı nitritin kan pigmenti hemoglobin (Hb) ile methemoglobin (Met.Hb) oluşturmaları, yani methemoglobinemi'ye neden olmasıdır. Kandaki, Fe(II) iyonu içeren solunum pigmenti Hb normalde oksijeni dokulara taşımak için gevşek yapılı oksihemoglobin (Hb.O_2) kompleksi oluşturur. Fe(II),Fe(III)'e oksitlendiğinde ise Hb oksijen taşıma yeteneğini kaybeder ve kahverengi Met.Hb oluşur. Kanda nitrit bulunması Met.Hb oluşumuna yol açar. Met.Hb oluşumu düşük konsantrasyonlarda reversibldir. Ancak konsantrasyonun % 70'in üstüne çıkması boğulmaya neden olur.

Nitritin ikinci önemli toksik etkisi, vücuttaki aminlerle nitrozaminleri oluşturmaları ve bu bileşiklerden bazılarının kanserojen etkili olmasına dayanır (1,4-7). Bu konuda deney hayvanları üzerinde birçok denemeler yapılmış ve incelenen nitrozaminlerin dörtde üçünde hayvanlarda kanserojen etki gözlenmiştir.



İnsanlarda in vivo olarak bu etki kesin ve tek bir kanser nedeni olarak somutlaştırılmamış olmakla birlikte bu konuda birçok çalışma yürütülmekte ve nitrozaminlerin ve bunların oluşumuna neden olan nitrat ve nitrit iyonlarının diyetle olabildiğince azaltılması gerektiği vurgulanmaktadır. Normalde nitrozolanma sekonder aminlerle ortaya çıkmaktadır. Ancak sonraki çalışmalar nitrozaminlerin yiyecek ve ilaçlarda mevcut tersiyer aminler ve katerner amonyum bileşiklerinden de oluştuğunu göstermiştir (8).

Nitrozolanma reaksiyonu kimyasal yolla ya da mikroorganizmaların metabolik aktivitesi sonucu gerçekleşebilir. Nitrozolanma; aminin bazikliği, pH, madde konsantrasyonu ve bazı anorganik iyonların varlığı gibi faktörlerden etkilenebilir. Tiyosiyanat iyonunun özel bir önemi vardır. Bu iyon insan tükürüğünde normal olarak 12-33 mg/100 ml. seviyesinde mevcuttur (sigara içen insanlarda daha yüksek) ve nitrozolanmanın hızını artırabilir.

Nitrozaminin işlem görmüş yiyeceklerde oluşma potansiyeline ek olarak sindirim sisteminde hazmedilen nitrit ve sekonder aminler, nitrozamin oluşmasına neden olabilirler. Çeşitli in vivo çalışmalarda, ince barsak mikroorganizmalarının üretildiği ortamlarda amin ve nitritten nitrozamin oluştuğu gözlenmektedir.

Normal koşullarda insan midesi ve üst sindirim kanalı çok asidik olduğundan nitrati nitrite dönüştüren bakteriler içermez ve alınan nitrat ve nitrit kısa sürede idrarla mesaneye taşınır. Daha az asidik olan ve bakteri üretebilen mesane ve ince barsaklarda nitrozamin oluşumu kolaylaşır. Mide

asiditesi daha az (yani pH'ı yüksek)olan çocuklarda ve bazı yetişkenlerde nitrozamin oluşumu gözlenebilir(9).

Nitrozaminler için belirlenen diğer potansiyel kaynaklar olarak çevresel faktörler, amince zengin tütün dumanı, yüksek dozda ve uzun süre alınan sekonder amin gruplu ilaç maddeleri sayılmaktadır(10,11).

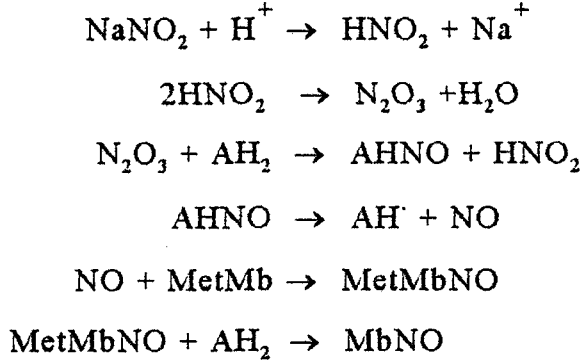
2.3-İşlenmiş Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit İyonlarının Rolü

Besinlerdeki nitrat ve nitrit kaynaklarının en önemlilerinden biri de işlenmiş et (ve balık) ürünleridir.Nitrat iyonu nitrite dönüştükten sonra koruyucu etkisi ortaya çıktığından ete doğrudan nitrit iyonu da katılabilmektedir.Bu iyonların ete katılabilecekleri maksimum yasal miktarlar; sodyum nitrat cinsinden sucuk gibi fermente et ürünlerinde 500 mg/kg et ile salam sosis gibi ısı işlemi görmüş et ürünlerinde 300 mg/kg et ve sodyum nitrit cinsinden salam, sosis gibi ısı işlemi görmüş et ürünlerinde 150 mg/kg et olarak sınırlanmıştır (12-14A).

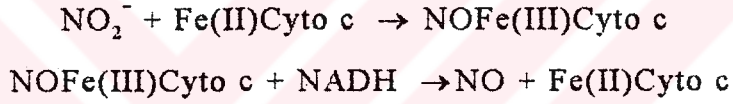
İşlem sırasında nitritin üç ayrı fonksiyonu bulunmaktadır:

a. Tipik bir renk oluşturmaları

Nitritin renk oluşumundaki rolü etteki miyoglobin(Mb) ile nitrozilmiyoglobin (MbNO) pigmentinin oluşmasına neden olan azotmonoksiti (NO) açığa çıkarmasıdır.Ete katılan nitritin askorbik asit, sistein, kinon gibi indirgenlerin varlığında azotmonoksitide indirgendiği; bunun da metmiyoglobin (MetMb) ile nitrozilmetmiyoglobin (MetMbNO) kompleksini oluşturduğu; bu kompleksin ise askorbik asit eşliğinde nitrozilmiyoglobine (MbNO) indirgendiği postüle edilmiştir(15). Bununla ilgili reaksiyon denklemleri şöyledir:



NO'nun oluşumu için önerilen diğer bir mekanizma; nitritin indirgenmiş sitokrom c [Fe(II)Cyto c] ve indirgenmiş nikotinamid adenindinükleotid (NADH) tarafından indirgenildiğini savunur.



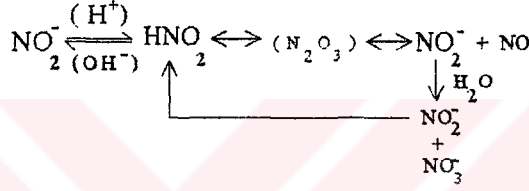
b. Tipik bir tad oluşturmaları

İşlem görmüş et tadı nitritin et komponentleri üzerindeki aktivitesinin bir fonksiyondur. Nitritin et pigmentleri ile "kozmetik etki" denen reaksiyonu ve antibakteriyel etkisi üzerinde durulurken karakteristik işlem görmüş et tadının oluşumuna pek dikkat edilmemiştir. Ancak nitritin jambon ve sosislerin tadı üzerindeki etkisi için bazı raporlar bulunmaktadır(16).

c. Antibakteriyel aktivite

Steril ortamı sağlayıcı sıcaklıktan daha düşük sıcaklıkta yapılan işlem sırasında nitrit varlığı stabilizeyi sağlamaktadır. Böylece etin bozunmasına yol açan clostridium botulinum bakterileri ile toksinlerin üremesi inhibe edilir. C. botulinum'un et ürünlerinde üremesi komplike bir olgudur ve bu

olgu mevcut birçok sporun etkileşmesine; uygulanan ısıнын miktarına ve kullanılan sodyum klorür ve sodyum nitritin konsantrasyonuna bağlıdır. pH da nitritin antibakteriyel etkisi üzerinde önemli bir rol oynayabilir. pH 7.5 ile 6.0 arasında pH'ın bir birim azalmasıyla antibakteriyel etkide yaklaşık 10 kat artış olduğu, model sistemlerde gösterilmiştir. Daha asidik koşullarda ise daha fazla miktarda dissosiyeye olmamış nitroz asit vardır ve bu; clostrida üremesinin inhibisyonundan sorumlu moleküler maddedir(17). Nitroz asit oluşumu aşağıdaki reaksiyon ile gösterilebilir.



En büyük antibakteriyel aktivitenin gözleendiği pH 4.5-5.5'da mevcut nitroz asit miktarı en fazladır.

Nitritin özellikle tuzlu suda yetişen balık konservelerinde kullanılması daha sınırlıdır(10mg/kg).Çünkü bazı deniz balıklarında bolca dimetil-ve trimetilamin bulunabilir ve bunlar da nitrit ile N-nitrozodimetilamin oluşturabilirler (18).

Nitrit iyonunun zehirli etkilerine karşın et ürünlerinde kullanımından vazgeçilmeyişi bu iyonun yarar/zarar dengesinin gözetilmesi ve yerine daha az zararlı bir maddenin henüz saptanmamış olması yüzündendir. Ancak nitrit iyonunun et ürünündeki miktarının yasal sınırlarda olduğu sıkı kontrol edilerek ve bu ürünler daha az tüketilerek bu iyonun zararlarından korunabiliriz.

2.4-Spektrofotometrik Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemleri

2.4.1-Direkt UV-Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri

UV-Spektrofotometrik nitrat ve nitrit tayini toprak ekstraktı,içme suları, meşrubatlar,kültür sıvısı,nehir suları,deniz suları,tütün ve lağım pisliğinde uygulama bulmuştur.

Toprak ekstraktında nitrat tayininde çift dalga UV-spektrofotometrik yöntem kullanılırken (19),diğer bir yöntem; toprak örneğinin önce 1 M sodyum klorür ile ekstraksiyonunu takiben sülfürik asit ile asitlendirilerek ve daha sonra elementel bakırla kaplanmış çinko ile amonyağa indirgenerek okunan 210 nm 'deki absorbanslarının farkının alınması esasına dayanır(20). Başka bir çalışmada toprak ekstraktındaki nitrat ve nitrit toplamı; asitli ortamda 210 nm'deki absorbanstan,nitrat ve nitrit Raney nikeliyle indirgendikten sonra ölçülen absorbansların farkı alınarak bulunmuş; nitrit özel olarak sülfamik asitle giderilerek nitrat miktarı saptanmıştır(21,22).

Tütünde spektrofotometrik nitrat tayini çeşitli işlemlerden sonra 208 nm'deki absorbansın ölçümüne dayanır(23).

Çeşitli su örneklerinde bulunan nitrat ve nitrit, absorpsiyon maksimumu olan 224 nm ve 231 nm'de ve izobestik nokta olan 219 nm'deki absorbansların ölçülmesi yoluyla birarada tayin edilmiştir(24-26).

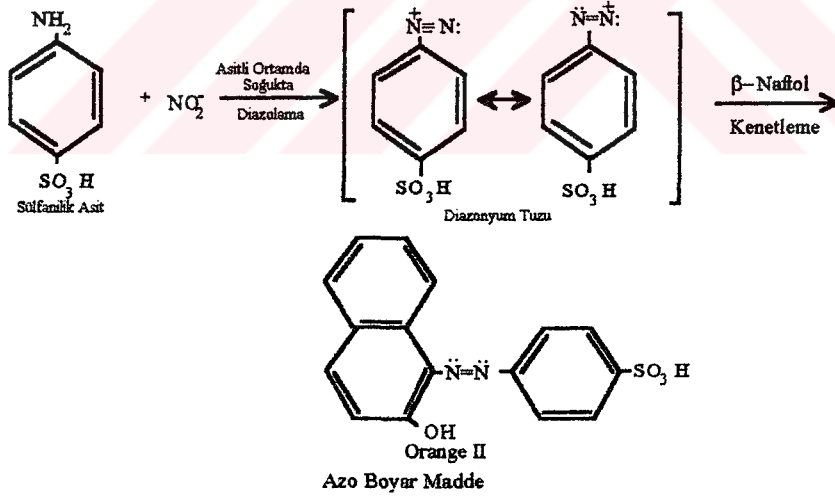
Kültür sıvısında nitrat tayini, 210 nm'deki absorbansın ölçümüyle yapılmış, örnekte nitrit bulunması halinde bu iyon diazolama-kenetleme yöntemiyle tayin edilmiştir(27).

Bunların dışında nitrat ve nitrit iyonlarının çeşitli materyallerden direkt UV-spektrofotometrik yöntemle tayin edildiği çeşitli çalışmalara rastlanmıştır(28-31).

2.4.2-Görünür Bölgede Spektrofotometrik Analiz Yöntemleri

Görünür bölgede yapılan nitrat ve nitrit tayinlerinde en çok kullanılan yöntem; nitrit iyonunun asitli ortamda diazolanması ile elde edilen diazonyum tuzunun çeşitli aromatik bileşiklerle kenetlenmesi sonucu oluşan azoboyar maddelerinin spektrofotometrik olarak absorbanslarının ölçümüne dayanır. Bunun için çeşitli diazolama-kenetleme belirteçleri kullanılmaktadır.

Örnek reaksiyon:



Önemli bir diazolama-kenetleme belirteci sülfanilamid ile N-(1-naftil) etilendiamindir. Bu yöntem çeşitli materyallerde bulunan nitritin, sülfanilamidle diazolanması sonucu oluşan diazonyum tuzunun, N-(1-naftil)etilendiamin ile oluşturduğu renkli ürünün absorbansının

ölçümüne dayanır. Nitrat ve nitrit içeren örneklerde ise nitrat ölçümü bu iyonun nitrit iyonuna indirgenmesinden sonra yapılmıştır. Bu yöntem deniz suyunda (32,33), bitki ve toprakta(34), ve taze yaprakta(35,36) uygulama alanı bulmuştur. İndirgeme işlemi genelde elementel kadmiyum ile (32-34) ya da çinko tozu ile(35,36) yapılmıştır. Süt ve süt ürünlerindeki nitrat ve nitrit iyonlarının tayininde örnek önce deproteinize edilmiş, nitratın kadmiyum ile nitrite indirgenmesinden önce ve sonra aynı belirteçlerle çalışılarak oluşan renkli ürünün absorbansı 538 nm'de ölçülmüştür(37-39).

Önemli diazolama-kenetleme belirteçlerinden birisi de Griess-Illosvay belirtecidir. Sirke ve şarapta nitrat ölçümü için bu iyon önce kuvvetli alkali ortamda çinko tozu ile nitrite indirgenmiş ve sonra bu belirteçlerle reaksiyona sokularak oluşan renkli ürünün 530 nm'deki absorbansı ölçülmüştür(40). İndirgeme işlemi doğal sularda bakır(II) varlığında pH 9,6'da hidrazin ile sağlanırken (41), toprakta Cu/Cd tekniği kullanılmıştır(42). Yöntem havuç(43) ve pamuktaki(44) nitrat ve nitrit tayinlerinde de kullanılmıştır.

Griess belirteci olarak da bilinen sülfanilik asit ve 1-naftilamin kullanılarak yapılan nitrat ve nitrit tayinlerine de sıklıkla rastlanmaktadır (45-47). Bu çalışmalarda nitrat ve nitrit tayin edilirken materyallere ve diğer deney koşullarına bağlı olarak absorpsiyon maksimumu 520 ile 530 nm arasında değişebilmektedir. Nitratın nitrite indirgenmesi çinko, kadmiyum ya da hidrazin/bakır(II) sülfat kullanılarak yapılmıştır.

Diğer bir belirteç çifti sülfanilamid ile 1-naftilamin -7- sülfonik asit (Cleve's Asit 1-7) olup, toprak, et, sebze, meyve ve su örneklerine uygulanmıştır (48,49). Yöntem sülfanilamid ile diazolan nitritin Cleve's

asit 1-7 ile kenetlenmesi sonucu oluşan renkli ürünün 520 nm'deki absorbans değerinin ölçümüne dayanır.

Buraya kadar belirtilen popüler diazolama-kenetleme belirteçlerinden başka, çeşitli materyallerde nitrat ve nitrit tayini için değişik diazolama-kenetleme belirteçleri kullanılmıştır. Zambelli belirteci (Sülfanilik asit + fenol) ile sütlerde çalışılmış (50) ve renkli ürünün absorbansı 440 nm'de ölçülmüştür. Aynı belirteçlerle suda da çalışılmıştır (51). Lağım pisliğinde bulunan nitrat brucine-sülfanilik asit ve nitrit, sülfanilamid-N-(1-naftil)etilendiamin ile tayin edilirken (52), sulu çözeltideki nitrat ve nitrit ortanilik asit ile rezorsinol belirteçleri kullanılarak tayin edilmişlerdir (53,54). Toprak ve sudaki nitritin mikro miktarda tayininde p-aminoasetofenon ile rezorsinol kullanılırken diğer iyonla girişimi kompleks yapıcı maddeler ile maskelenerek giderilmiştir (55). İçilebilir ve kirli sulardaki nitrit tayininde p-aminoasetofenon ile N-(1-naftil)etilendiamindihidroklörür kullanıldığında 545 nm'de maksimum absorpsiyon veren erguvan kırmızısı bir renk gözlenmiştir (56). Doğal sulardaki nitritin FIA ile spektrofotometrik tayininde p-aminoasetofenon ile diazalamayı takiben m-fenilendiamin ile 30°C'de kenetleme yapılmıştır (57). Nitrit için p-aminobenzoik asit ve 1-hidroksi-2-naftolik asit ile yapılan başka bir çalışmada maksimum absorpsiyonun 525 nm'de olduğu görülmüştür (58). 555 nm dalga boyunda p-aminobenzenesulfonamid ile N-(1-naftil)etilendiamindihidroklörür (59) ve p-aminobenzoik asit ile N-(1-naftil)etilendiamindihidroklörür (60) çiftiyle de çalışmalar yapılmıştır.

Nitrat iyonunun fenol türevleri ile derişik sülfürik asitli ortamda nitro fenollerini oluşturmaya dayanan reaksiyon, bu iyonun oluşan renkli ürün üzerinden görünür bölgede spektrofotometrik tayinine esas oluşturmıştır. Bu yöntem 2,6-Ksilenol (61), 2,4-Ksilenol (62,63), fenol-2,4-disulfonik asit

(64) ve fenol kullanılarak suda ve çeşitli materyallerde nitrat iyonu tayinine uygulanmıştır. Nitrat yanında nitrit iyonunun da bulunması durumunda işlem doğrudan uygulanarak nitrat miktarı; nitrit iyonu hidrojen peroksit, serik sülfat, potasyum permanganat gibi yükseltgenlerle nitrata yükseltgendikten sonra uygulanarak toplam nitrat miktarı tayin edilmektedir. İki sonucun arasındaki fark ise nitrit iyonu miktarını vermektedir (61-64). Ya da nitrat iyonu nitrolama ile tayin edilirken, nitrit iyonu başka bir örnekte nitratin yanında diazolama-kenetleme yöntemiyle tayin edilebilmektedir (65).

Nitrat iyonunun bakır(I)neokuproin kelatı ile iyon çifti oluşturmaya ve oluşan ürünün MIBK ile ekstraksiyonundan sonra absorbansının ölçülmesine dayanan spektrofotometrik bir yöntem bulunmaktadır (66,67).

2.5-İşlenmiş Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemleri

İşlem görmüş et (sosis, salam, sucuk, jambon, vb.) ve balık ürünlerinde nitrat ve nitrit iyonlarının tayini için önce bu ürünlerdeki proteinler çeşitli belirteçler (sodyum hidroksit, potasyum ferrisiyanür, çinko sülfat, alüminyumamonyum sülfat vb.) kullanılarak çöktürülmekte, daha sonra iyonların tayini işlemine geçilmektedir. Bu iyonların tayini için çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Bu yöntemler esas olarak; iyon seçici elektrotlar ile potansiyometrik (68-70), iyon kromatografik (71-77), spektrofotometrik (78-84) ve atomik absorpsiyon spektrofotometrik (AAS) (85) yöntemlerdir.

Spektrofotometrik yöntemler esas olarak nitrit üzerinden diazolama-kenetleme reaksiyonu ya da nitrat iyonu üzerinden nitrolama reaksiyonları sonrası görünür bölgede absorbans ölçümlerine dayandırılmıştır. Örneğin diazolama-kenetleme belirteci olarak, sülfanilamid ile N-(1-naftil) etilendiamin kullanılan bir çalışmada et ürünü % 0,2'lik sodyum hidroksit ile ekstre edildikten sonra çinko sülfat ile deproteinize edilmiş, sonra pH 8,6

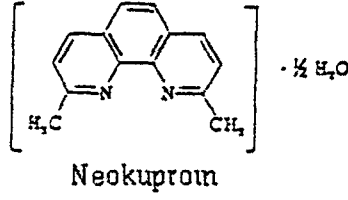
tamponunda yukarıdaki belirteçlerle reaksiyona sokularak oluşan renkli ürünün 540 nm'deki absorbansı ölçülmüştür (78,79). Aynı işlemler, bir kez de nitrat iyonu nitrite indirgendikten sonra tekrarlanmış, aradaki farktan nitrat miktarına geçilmiştir. Diazolama-kenetleme belirteçlerinin farklı olması durumunda değişik çalışmalarda renkli ürünün absorbansı 420 nm (80), 522 nm (81), 540 nm (82,83) gibi farklı dalga boylarında olabilmektedir.

Nitrat iyonunun fenolik bileşikler nitrolamasına ve oluşan renkli ürünün absorbansının ölçülmesine dayanan yöntem (61-65) et ürünlerinde de uygulama alanı bulmuştur (84). Uygulamada et ürünü boraks ile deproteinize edildikten sonra sülfürik asitli ortamda salisilik asit ile nitrosalisilata dönüştürülmüş ve ürünün 415 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. 2,4-ksilenol ile sülfürik asitli ortamda 6-nitro-2,4-ksilenol oluşmasına dayanan spektrofotometrik yöntem, ofisiyal yöntem olarak AOAC ve TSE'nin et ve et ürünlerinde nitrat tayini için uygulanmasını istediği yöntem olmaktadır(12,13). Nitrit için verilen ofisiyal yöntem ise sülfanilamid ve N-(1-naftil)etilendiamindihidroklorür diazolama-kenetlenme belirteçleri ile 540 nm'deki absorbans ölçümlerine dayanan spektrofotometrik yöntemdir.

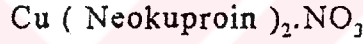
2.6. Bakır(I)neokuproin ile Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemleri

Kumamaru ve arkadaşları nitrat iyonunun bakır(I)neokuproin kelatı ile iyon çifti oluşturduğunu ve bunun, hafif asitli ortamda kelatın MIBK'a ekstraksiyonunu arttırdığını saptamışlar ve MIBK'daki bakır konsantrasyonunu AAS olarak 324.7 nm'de tayin ederek buradan nitrat miktarına geçmişlerdir(86,87).

Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), yapısındaki metil gruplarının sterik etkisi nedeniyle bakır için özellikle seçici olarak kelat yapıcı bir belirteçtir.



Bakır (I) neokuproin kelatının nitrat iyonuyla oluşturduğu iyon çiftinin formülü ise,



olarak saptanmıştır(86). Bu ürün tercihan organik çözücünde çözünmekte ve sözü edilen çalışmaya olanak sağlamaktadır.

Bakır(I) iyonu ortama katılan bakır(II) sülfat ve hidroksilamonyum sülfat çözeltilerinden oluşturulmakta, hafif asitli ortam ise fosfat tamponu ile sağlanmaktadır. Neokuproin, organik çözücü olan MIBK'daki çözeltisi halinde hazırlanmakta, iki fazın karışmasıyla da sulu çözeltideki nitrat iyonu, sözü edilen iyon çifti halinde organik faza geçmektedir.

Nitrit iyonu da nitrata benzer şekilde iyon çifti oluşturmakta, ancak nitrata göre ondabir hassasiyette tayin edilebilmektedir(yaklaşık 10 katı miktarda).

Houser ve Fauth tarafından yapılan bir çalışmada nitrat iyonu doğrudan, nitrit iyonu ve alifatik nitro bileşikleri ise serik sülfat yada potasyum permanganatla nitrata yükseltgendikten sonra bakır(I)neokuproin.

nitrat iyon çifti üzerinden AAS yöntemi ile tayin edilmişlerdir(88).Aromatik nitro ve nitrozo bileşikleri ise rezonans stabilizasyonu ve bağın kısa oluşu nedeni ile negatif sonuç vermişlerdir.Nitrat iyonunun nitrit ve (veya) alifatik nitro grupları ile bir arada olması durumunda ise,nitrit(nitro)grubu serik sülfatla nitrata yükseltgenerek toplam nitrat miktarı,sülfamik asitle azota indirgenerek yalnızca nitrat miktarı saptanmakta,aradaki farktan nitrit (nitro) miktarına geçilebilmektedir(88).

Bu üç çalışma Kirkbright ve Johnson tarafından yapılan AAS ile indirekt analiz yöntemleri taramasında bildirilmiştir(89).

Sözü edilen AAS yöntemi Gallego ve arkadaşları tarafından FIA ile kombine edilerek uygulanmıştır(90).Bu çalışmada FIA'nın ve reaksiyonun koşulları incelenmiştir. Araştırmacılar bu incelemeleri sonucunda uygun pH alanını 3.5-5.6 olarak bulmuşlar ve pH 4.5 fosfat tamponunu kullanmışlardır. En uygun bakır(II) sülfat, hidroksilamoyum sülfat ve neokuproin konsantrasyonları ise sırasıyla $4.0 \times 10^{-3}M$, $4.5 \times 10^{-3}M$ ve %0.05 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, ayrıca çeşitli yabancı iyonların tayin üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bunun sonunda tiyosiyanat, perklorat ve kloratın 1:1 oranında; klorür, bromür gibi iyonların 10:1 oranında, sülfat, fosfat, karbonat gibi iyonların 1000:1 oranında girişim yaptığı saptanmıştır. Aynı araştırmacılar yöntemi işlem görmüş et ürünlerine ve sebzelere uygulamışlardır(85). İşlem görmüş et ürünlerinde nitrat ve nitrit ile birarada bulunan iyonlardan fosfat ve askorbatın tayini etkilemediğini saptamışlar, klorürün etkisini gidermek üzere gümüş sülfat ile çöktürme yada iyon değiştirici reçineden geçirmenin uygulanabileceğini belirtmişlerdir. Nitrat iyonunun nitritle bir arada tayini için serik sülfatla yükseltgenme sonucu toplam nitrat, sülfamik asitle nitrit giderilerek nitrat iyonunu tayin etmişler, aradaki farktan nitrit iyonuna geçmişlerdir.

Bakır(I)neokuproin.nitrat üzerinden uygulanan AAS yöntemi Hoshikawa ve arkadaşları tarafından bitki materyalinde nitrat tayini için kullanılmıştır(91).

Yamamoto ve arkadaşları bakır(I) neokuproin.nitrat iyon çiftinin 456 nm'de verdiği maksimum absorpsiyondan yararlanarak vis-spektrofotometrik nitrat tayini gerçekleştirilmiştir(66,67). Araştırmacılar fazla miktar sülfat ve karbonat iyonlarının girişim yapmadığını, fazla miktarda klorür iyonu varsa gümüş sülfat ile çöktürülmesi, demir(III) ve alüminyum(III) varsa bunların negatif girişimini tartarik asitle maskelenmesi gerektiğini bildirmişler ve yöntemi nehir suyuna uygulamışlardır.Nitrit oranı 5 kattan fazla ise sülfamik asitle uzaklaştırmışlardır.

3.DENEYSEL BÖLÜM

3.1.Maddeler ve Çözücüler

Bakır sülfat¹,hidroksilamonyum sülfat¹,sodyum dihidrojen fosfat¹, disodyum hidrojen fosfat¹,sodyum nitrat¹,sodyum nitrit¹,neokuproin¹,metil izobütil keton²(MIBK),sodyum hidroksit¹,serik sülfat¹,sülfamik asit²,çinko sülfat¹, gümüş sülfat¹, sülfürik asit¹, amonyak¹, bidistile su.

3.2.Çözeltiler

Sodyum nitrat (NaNO_3)	: 1.6×10^{-3} M($100 \mu\text{g/ml NO}_3^-$)
Sodyum nitrit (NaNO_2)	: 1.6×10^{-3} M($74.2 \mu\text{g/ml NO}_2^-$)
Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	:0.01M
Hidroksilamonyum sülfat($(\text{NH}_2\text{OH})_2\text{SO}_4$):0.25M	
pH 5.8-7.0 tampon çözeltileri	:0.25M sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)ve 0.25M sodyum hidroksit (NaOH)çözeltilerinden hazırlandı.

Disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$):0.25 M	
Neokuproin ($(\text{CH}_3)_2\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$)	: 2.25×10^{-3} M, MIBK'da
Sülfürik asit (H_2SO_4)	:% 10
Seryum sülfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	:% 2, sülfürik asitte
Sülfamik asit ($\text{H}_2 \text{NSO}_3 \text{H}$)	:% 0.5, sülfürik asitte
Çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	:1.0M
Gümüş sülfat (AgSO_4)	: %5, amonyakta

1 Merck, E.Merck AG. Darmstadt

2 Baker Analyzed

3.3 Gereçler

Spektrofotometre (Shimadzu,UV-150 02 Double beam spectrophotometer), pH metre (Metrohm E 510 Herisau) ile pH elektrodu (Metrohm AG-CH-9101 Herisau), 10x10x45 mm cam küvetler (Hellma, 100-05), analitik terazi (Mettler H72 , 0.1 mg'a kadar duyarlı), girdap karıştırıcı (kermanlar to mix), santrifüj (Janetzki T30), parçalayıcı (Braun), ultra-homojenizatör (Bosch scintilla SA) bidistile su cihazı (NS 278.TS 8234), organik faz ayırıcı süzgeç kağıdı (597 HY Rundfilter, Schleicher ve Schuell), plastik kapaklı ağzı şilifli 30 ml'lik cam reaksiyon tüpleri ve çeşitli cam malzemeler (Teknik cam).

3.4 Çalışma yöntemi

3.4.1 Deney Koşulları

Nitrat iyonunun bakır (I) neokuproin kelatı ile oluşturduğu iyon çiftinin MIBK'daki çözeltisiyle gerçekleştirilen spektrofotometrik yöntemin ideal koşulları incelendi.Bunun için literatürde genelde uygulanan koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. Bu amaçla reaksiyon tüplerine sırasıyla ;

- 1 ml 0.01 M bakır sülfat,
- 1 ml 0.3 M hidroksilamonyum sülfat,
- 5 ml pH 6.0 fosfat tamponu,

0.6 ml 1.6×10^{-3} M sodyum nitrat çözeltileri katıldı. Yeterli miktarda disodyum hidrojen fosfat ile pH 6.0'a getirildi. Karışım 10 ml neokuproin çözeltisi ile girdap karıştırıcıda bir dakika süre ile karıştırıldı. Organik faz, faz ayırıcı kağıttan süzülerek ayrıldı. Süzüntünün (MIBK'lu faz) absorbansı, aynı şekilde hazırlanmış sodyum nitrat içermeyen boş deneme çözeltisine karşı 350- 500 nm arasında ölçüldü. Boş deneme çözeltisi, MIBK' da bir

miktar bakır(I)neokuproin kelatinin da çözünmesi nedeniyle renkli olduğundan,boş deneme ve nitratlı çözeltinin absorbansları neokuproin çözeltisine karşı okunup aradaki farklar esas alındı. Maksimum absorpsiyon dalga boyunda çalışılarak en uygun belirteç miktarları, en uygun pH değeri, girdap karıştırıcıda karıştırma süresi, oluşan rengin dayanıklılık süresi ve ayrıca nitrit tayini için gerekli en uygun serik sülfat ve sülfamik asit miktarları saptandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1.' de verilmektedir.

3.4.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Nitrat iyonunun bakır (I) neokuproin ile oluşturduğu iyon çiftinin MIBK' daki absorbansının konsantrasyonu ile olan ilişkisini incelemek amacıyla reaksiyon tüplerine sırasıyla;

1 ml 0.01 M bakır sülfat,

1 ml 0.25 M hidroksilamonyum sülfat,

5 ml pH 6.2 fosfat tamponu ile 100 µg/ml konsantrasyonundaki nitrat çözeltisinden alınan 0.2-0.4-0.6-0.8-1.0 ml'lik hacımlar katıldı. Ayrıca her bir tübe nitrat çözeltisi hacımları 1 ml'ye tamamlanacak şekilde bidistile su eklendi. Daha sonra her bir tübe disodyum hidrojen fosfat çözeltisi katılarak pH 6.2 ye getirildi. 10 ml, 2.25×10^{-3} M neokuproin çözeltisi katıldıktan sonra karışım girdap karıştırıcıda 1.5 dakika süreyle karıştırıldı. Faz ayırıcı kağıttan süzöldükten sonra organik fazın absorbansı 452 nm'de boş deneme çözeltisine karşı okundu. Aynı şekilde 5 kez çalışılarak ortalama absorbans değerleriyle konsantrasyonlar arasında ölçü eğrisi hazırlandı.Sonuçlar bölüm 4.1.2 ' de verilmektedir.

3.4.3 Yöntemin İşlenmiş Et Ürünlerine Uygulanması

Çalışılan işlem görmüş et ürünleri (salam, sosis, sucuk ve jambon) parçalandı ve her birinden 10 gramlık ikişer tartım alındı, 25 ml su ilavesinden sonra homojenize edildi ve hacmi su ile 100 ml'ye tamamlandı. Elde beş dakika çalkalandıktan sonra çökeltinin dibe çökmesi beklendi. Üstteki berrak sıvıdan 20 ml'lik hacım, 25 ml'lik bir balonjojeye aktarıldı. Proteinlerin çöktürülmesi için 1 ml çinko sülfat çözeltisi eklendi ve balonjoje beş dakika sıcak su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra su ile hacmine tamamlandı, karıştırıldı ve siyah bant süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntüdeki klorür iyonları 1-2 ml gümüş sülfat çözeltisi ile çöktürüldü. Çökelti santrifüjlendikten ve mavi bant süzgeç kağıdından süzüldükten sonra süzüntüden 1 ml'lik iki ayrı hacım alındı ve Bölüm 3.4.2'de olduğu gibi çalışıldı. Ancak disodyum hidrojen fosfat çözeltisi ile pH ayarı yapılmadan önce örneklerden birine 0.2 ml serik sülfat, diğerine ise 0.2 ml sülfamik asit çözeltisi katıldı. Her tartım ile iki paralel çalışma yapıldı. Ölçülen absorban değerlerinin ortalamasına karşılık gelen nitrat iyonu miktarları ölçü eğrisinden hesaplandı. Serik sülfat içeren örnekten toplam nitrat iyonu miktarı bulundu. İki sonuç arasındaki farktan nitrit iyonu miktarına geçildi.

4. SONUÇLAR

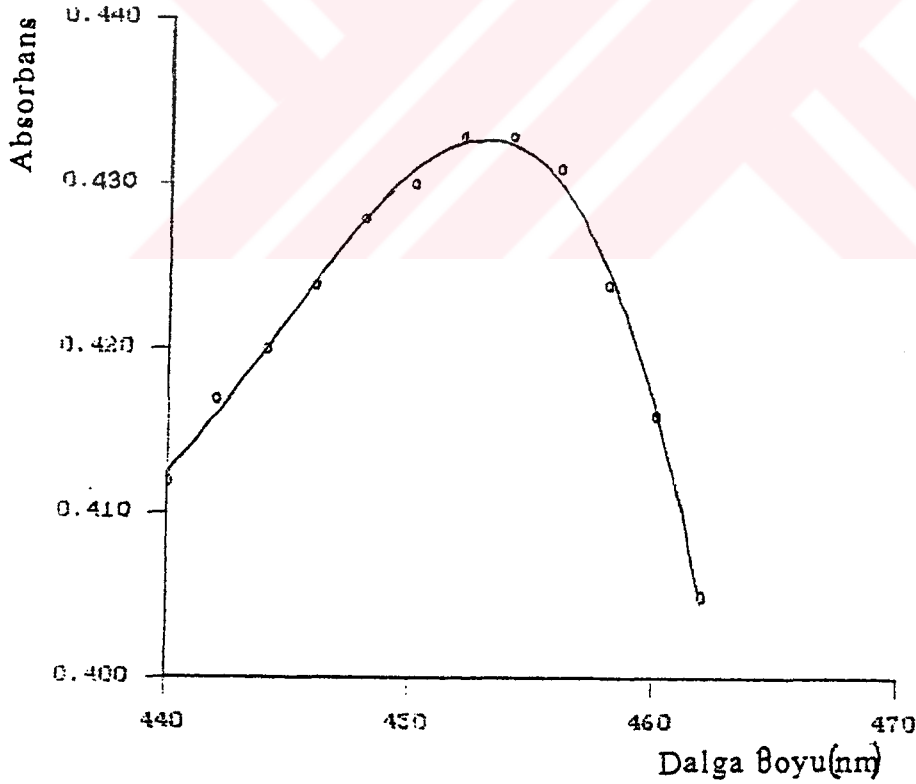
4.1. Bakır (I) neokuproin ile Spektrofotometrik Tayin Yöntemi

4.1.1. Deney Koşulları

Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde çalışılarak optimum deney koşulları için aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

a. Absorpsiyon Spektrumu

100 $\mu\text{g/ml}$ sulu nitrat çözeltisinin 0.6 ml'si ile Bölüm 3.4.1.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak absorbans ve dalga boyu değerleri arasında bir absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumdan maksimum absorbansın 452 nm'de olduğu saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. Absorpsiyon Spektrumu

b. Hidroksilamonyum Sülfat Miktarı

Bakır, bakır(I) halinde tutmaya yetecek hidroksilamonyum sülfat miktarını saptamak amacıyla nitrat iyonu miktarı 100 µg/ml çözeltiden 0.6 ml olarak, bakır(II) sülfat miktarı ise 1 ml 0.01 M olarak sabit tutuldu ve 0.15-0.35 M konsantrasyondaki hidroksilamonyum sülfat çözeltilerinden birer ml ilave etmek suretiyle Bölüm 3.4.1.'deki işlem tekrarlandı. Bu işlemler sonucunda en uygun hidroksilamonyum sülfat konsantrasyonu 0.25M olarak saptandı (Cetvel 1).

Cetvel 1. Farklı Hidroksilamonyum Sülfat Konsantrasyonlarındaki Absorbans Değerleri

Hidroksilamonyum Sülfat Konsantrasyonu (M)	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
A	0.333	0.436	0.442	0.441	0.438

c. En Uygun pH

0.6 ml 100 µg / ml nitrat içeren sodyum nitrat çözeltisi alınarak ve pH 5.8 ile 7.0 arasında değişen yedi ayrı tampon çözeltisi ile çalışılarak en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH araştırıldı. Yapılan deneyler sonunda en uygun değeri pH 6.2 olduğu saptandı (Cetvel 2).

Cetvel 2. Farklı pH'lardaki Absorbans Değerleri

pH	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
A	0.292	0.434	0.482	0.418	0.400	0.370	0.320

d. Karıştırma Süresi

0.6 ml 100 µg/ml sulu nitrat çözeltisiyle pH 6.2 de, girdap karıştırıcıda neokuproin/MIBK ile farklı karıştırma sürelerinde deneyler tekrarlandı. Yeterli karıştırma süresi 1.5 dakika olarak saptandı (Cetvel 3).

Cetvel 3. Farklı Karıştırma Sürelerindeki Absorbans Değerleri

Zaman (Dakika)	0.5	1.0	1.5	2.0
A	0.412	0.475	0.512	0.510

e. Neokuproin Miktarı

0.6 ml 100 µg/ml nitrat içeren çözelti ile farklı konsantrasyonlardaki neokuproin/MIBK çözeltileri ile deneyler tekrarlandı. Bunun sonunda en uygun neokuproin çözeltisi konsantrasyonu $2.25 \times 10^{-3} \text{M}$ olarak saptandı(Cetvel 4).

Cetvel 4. Farklı neokuproin/MIBK Konsantrasyonlarındaki Absorbans Değerleri

Neokuproin/MIBK Konsantrasyonu (M)	1.5×10^{-3}	1.75×10^{-3}	2.0×10^{-3}	2.25×10^{-3}	2.5×10^{-3}
A	0.490	0.530	0.558	0.608	0.524

f. Rengin Dayanıklılığı

MIBK fazına ekstre edilen bakır(I)neokuproin.nitrat iyon çiftinin absorbansının zamanla değişimi incelendi.Bu amaçla bir deney çözeltisinin absorbansı belli zaman aralıklarıyla ölçüldü. Bu deneyler sonunda absorbansın en az 48 saat süreyle sabit kaldığı saptandı.

g. Serik Sülfat Miktarı

Örneklerdeki nitrat ve nitrit iyonunun toplam miktarını saptamak amacıyla nitrit iyonunun nitrata yükseltgenmesi için serik sülfat çözeltisi kullanıldı. Bunun için 74.2 µg/ml nitrit iyonu içeren sodyum nitrit çözeltisinin 1.0 ml'si ile ve serik sülfat çözeltisinden sırasıyla 0.1-0.2-0.3 ml'lik hacımlar katılarak Bölüm 3.4.1.'deki deneyler tekrarlandı. Sonuçta MIBK fazında en yüksek ve 10 µg/ml nitrat ile elde edilene en yakın absorbans değerini veren serik sülfat çözeltisi miktarı 0.2 ml olarak belirlendi. Isıtmanın sonuçları etkilemediği saptandı.

h. Sülfamik Asit Miktarı

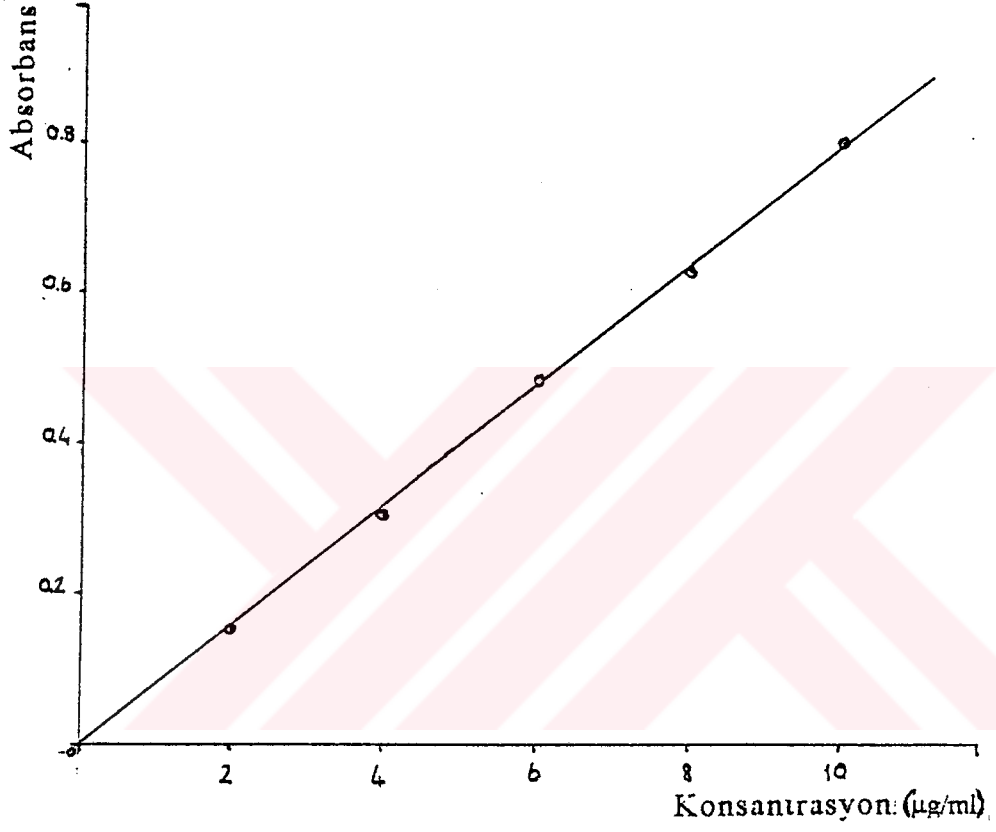
Örneklerdeki nitrat iyonunun nitrit yanında saptamak amacıyla nitritin ortamdan uzaklaştırılması (azota indirgenmesi) için sülfamik asit kullanıldı.

Bunun için 74.2 µg /ml nitrit içeren sodyum nitrit çözeltisinin 1.0 ml'si ile ve sülfamik asit çözeltisinden sırayla 0.1-0.2-0.3 ml'lik hacımları katılarak Bölüm 3.4.1. deki işlemler tekrarlandı. Sonuçta örnek çözeltisinin boş deneme ile aynı absorbansı göstermesi için yeterli sülfamik asit çözeltisi miktarı 0.2 ml olarak belirlendi. Isıtmanın sonuçları etkilemediği saptandı.

4.1.2. Ölçü Eğrisi

Sulu çözeltide 20-100 µg / ml (MIBK fazında 2.0-10.0 µg / ml) konsantrasyon aralığında 5 kez, Bölüm 3.4.1.de anlatıldığı gibi çalışılarak ve ortalama absorbans değerleri kullanılarak ölçü eğrisi hazırlandı(Şekil 2).

Ölçü eğrisine ait değerler ve regresyon analizinin sonuçları Cetvel 4'de görülmektedir.



Şekil 2 Ölçü Eğrisi

Cetvel 5. Ölçü Eğrisine Ait Değerler ve Regresyon Analizi

C \ A (µg/ml)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	$\bar{A}$	S	$\frac{S}{\bar{A}} \times 100$
2	0.154	0.157	0.153	0.150	0.151	0.153	$2.74 \cdot 10^{-3}$	1.79
4	0.304	0.307	0.304	0.308	0.300	0.305	$3.13 \cdot 10^{-3}$	1.03
6	0.484	0.480	0.486	0.485	0.480	0.483	$2.83 \cdot 10^{-3}$	0.58
8	0.623	0.625	0.626	0.628	0.622	0.625	$2.39 \cdot 10^{-3}$	0.38
10	0.796	0.790	0.798	0.791	0.796	0.794	$3.49 \cdot 10^{-3}$	0.44
$A = 0.08C - 0.0091$ $r = 0.9995$								

4.2. İşlenmiş Et Ürünlerinin Analizi

Koşulları geliştiren yöntem piyasada satılmakta olan değişik markalardan beş adet salam, beş adet sosis, üç adet sucuk, üç adet jambon ve bir adet hamburger köftesi örneğinde nitrat ve nitrit tayini için uygulandı. Nitrat iyonu miktarları kg ette mg sodyum nitrat cinsinden, nitrit iyonu miktarları ise kg ette mg sodyum nitrit cinsinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Cetvel 6'da toplu halde görülmektedir.

Cetvel 6. İşlenmiş Et Ürünlerinde Bulunan NaNO_3 ve NaNO_2 Miktarları (mg/kg)

Örnek	Salam 1	Salam 2	Salam 3	Salam 4	Salam 5	Sosis 1	Sosis 2	Sosis 3	Sosis 4	Sosis 5
NaNO_3	154.1	192.6	188.4	137.0	171.3	180.0	227.0	308.3	154.1	282.5
NaNO_2	55.0	59.0	145.6	110.9	55.5	52.0	27.5	55.5	97.1	13.9

Örnek	Sucuk 1	Sucuk 2	Sucuk 3	Jambon 1	Jambon 2	Jambon 3	Hamburger Köftesi
NaNO_3	334.0	256.7	462.4	325.4	325.4	248.3	214.1
NaNO_2	27.5	72.8	3.5	69.4	90.2	27.5	6.9

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda ilk olarak nitrat iyonunun bakır(I)neokuproin ile hafif asitli ortamda oluşturduğu $\text{Cu}(\text{neokuproin})_2\text{NO}_3$ iyon çiftinin MIBK'daki absorbansının ölçülmesine dayanan spektrofotometrik yöntemin (66,67) optimum koşulları tarafımızdan incelendi. Bu incelemeler sonunda en uygun çözelti konsantrasyonları 0.01M bakır sülfat, 0.25M hidroksilamonyum sülfat ve $2.25 \times 10^{-3}\text{M}$ neokuproin olarak; en uygun pH değeri ise 6.2 olarak belirlendi. Bu koşullarda son çözeltideki (MIBK) 2-10 $\mu\text{g/ml}$ nitrat iyonu konsantrasyon aralığında çalışılarak ve 452 nm'de absorbans değerleri okunarak ölçü eğrisi elde edildi($n=5$).

Yöntem nitrat iyonu ile genelde birarada bulunan nitrit iyonuna da uygulanabilmekte birlikte burada hassasiyet nitrata göre yaklaşık onda bir olmaktadır(85). Bu nedenle nitrit iyonunun nitrata yükseltgenerek ortamdaki toplam nitratin tayini hem iki iyonun birarada tayinine olanak sağlamakta, hemde nitrit iyonunun tayin sınırını yükseltmektedir. Aynı bir örnekte nitrit iyonu sülfamik asitle giderilerek nitrat iyonu tayin edilmekte ve iki sonuç arasındaki farktan nitrite geçilmektedir. Çalışmamızda sülfamik asit ile yükseltgen olarak seçilen serik sülfatın optimum konsantrasyonları da incelendi. Bunlar sırasıyla %0.5 ve % 2 olarak saptandı.

Çalışmamızın ikinci aşamasında optimum koşulları saptanan spektrofotometrik yöntem işlenmiş et ürünlerine uygulandı. Bunun için piyasada mevcut tanınmış markaların salam, sosis, sucuk ve jambon gibi ürünlerinden seçilerek bunlardaki nitrat ve nitrit miktarları saptandı. Nitrat miktarları $\text{mg NaNO}_3/\text{kg et}$, nitrit miktarları ise $\text{mg NaNO}_2/\text{kg et}$ cinsinden belirlendi. Onyedü ürünün analizi sonunda bulunan sonuçların -üç tanesi hariç- yasal sınırlar (salam, sosis, jambon için 300 $\text{mg NaNO}_3/\text{kg et}$, 150 $\text{mg NaNO}_2/\text{kg et}$; sucuk için 500 $\text{mg NaNO}_3/\text{kg et}$) içerisinde olduğu saptandı.

Yöntemin su ve sebze örneklerine uygulanabilirliği denendi. Bu denemeler sonunda yöntemin hassasiyetinin içme suyu ve sebzelerde nitrat tayini için yetersiz, nitrat iyonunun oldukça fazla miktarda katıldığı işlenmiş et ürünlerindeki tayinler için ise uygun bir yöntem olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; işlem görmüş et ürünlerinde nitrat ve nitrit iyonlarının tayini için atomik absorpsiyon spektrofotometrisinde uygulanmış olan bakır(I)neokuproin iyon çifti yönteminin moleküler spektrofotometrik olarak da uygulanabileceği saptandı.



6.KAYNAKLAR

- 1- Wolf, I. A., Wasserman, A. E., Science, *177*, 15(1972)
- 2- Orgeron, J. D., Martin, J. D., Caravay, C. J., Martin, R. M., Hauser, G. H., Public Health Rep-, *72*, 189(1957)
- 3- The Merck Index, Merck L Co., Rahway, N.J., 11th Ed., p-7635(1989)
- 4- Luinsky, W., Epstein, S. S., Nature, *225*, 21(1970)
- 5- Archer, M. C., Clark, S. D., Thilly, J. E., Tannenbaum, S. R., Science, *174*, 1341 (1971)
- 6- Swan, P. F., Proc.R.Soc.Med., *70*(2), 113(1977).-Ref. C. A., *87*, 713f(1977)
- 7- Moehler, K., Umsch. Wiss. Tech., *77*, 236(1977).-Ref. C. A., *87*, 33984(1977)
- 8- Fiddler, W., Pensabene, J. W., Nature, *236*, 307(1972)
- 9- Hawksworth, G., Hill, M. J., Biochem. J., *122*, 28P(1971)
- 10- Nevraht, G., Experientia, *23*, 400(1967)
- 11- Serfontein, W. J., Smith, J. H., Nature, *214*, 169(1967)
- 12- JAOAC, *63*, 376(1980)
- 13- TSE, TS 1069 (1974)
- 14.- İTO, Yayın no: 1988-26, S.120 (1988)
- 14A- GMT, Resmi Gazete, Sayı 20541, 32 (1990)
- 15- Fox, J. B., Jr., Thomson, J. S., Biochemistry, *2*, 465(1963)
- 16- Cho, I. C., Bratzler, L. J., J.Food Sci., *35*, 668(1970)
- 17- Shonk, J. L., Silliker, J. H., Harper, R. H., Appl. Microbiol, *10*, 185(1962)
- 18- Howsam, Can.Int.Food Technol.J., *3*, 66(1970)
- 19-Norman, R. J., Edberg, J. C., Stucki, J. W., SoilSci.Soc. Am. J., *49*(5), 1182(1985), Ref.C.A.*103*, 177442s(1985)

- 20- Yi, X., Li, Y., Han, L., TurangTongbao, (6), 35(1983). -Ref.C.A.103, 53170g (1985)
- 21- Norman, R.J., Stucki, J.W., Soil Sci.Soc.Am.J., 45(2), 347 (1981).
Ref.C.A.95, 5631c(1981)
- 22- Heinzman, F.X., Miyazawa, M., Pavan, M.A., Rev.Bras.Cienc Solo, 8(1), 159(1984). -Ref.C.A.101, 150593p(1984)
- 23- Hans, Barkemeyer. Beitr.TabakForsch., 3(7), 455(1966). -Ref.C.A.66, 73356t(1967)
- 24- Koida, G., Mishima, K., Tokumari, Y., Saimatsu, J., Kagawa, K., Kohno, Y., Ueno, H., Oka, A., Meshima- Shi Eisei Kenyusho Nenpo, (6), 36(1987).
Ref C.A, 109, 43242 s(1988)
- 25- Hihiro, K., Tanaka, T., Kavahara, A., Jpn.Tokyo Koho J P 61 18;135 [86 18,135](Cl.GO1N21/59), 10.May.1986, Appl.76/105, 163, 01Sp 1976; 5 pp.Ref C.A 106, 27120 h (1987)
- 26- Morries, P., Water Treat.Exam., 20(2), 132, 455(1966). - Ref.C.A., 75, 132843k(1971)
- 27- Anda, T., Ogata, S., Nippen Doje Hiriyogaku Zasshi, 56(1), 56(1985).
Ref.C.A.103, 210251d (1985)
- 28- Miles, D.L., Espejo, C., Analyst, 102(1211)104(1977).Ref.C.A.87, 73161 j (1977)
- 29- Mertens, J., Massart, D.L.Bull.Soc.Chim.Belg., 80(12), 151(1971).
Ref.C.A.75, 80127 h(1971)
- 30- Thomson, K.C., Blankley, M. Analyst, 109(8), 1053 (1984). -Ref.C.A.102, 31769m(1985)
- 31- Kozi, T.G., Katz, S.A., Jenniss, S.W.Spectrosc.Lett., 20(6-7), 507(1987).
Ref.C.A.107, 241993 j(1987)
- 32- Iseave, A.B., Bogoyavlenskii, A.N.Okeondogiya, 8(3), 539(1968).
Ref.C.A.69, 82629g(1968)
- 33- Watanuki, K., Bunseki Kagaku 18(10)1280(1969). -Ref.C.A.72, 5657e, (1970)
- 34- Singh, J.P., Plant Soil , 110(1), 137(1988). -Ref.C.A.109, 229408f, (1988)

- 35- Irving, G.C.J., Bouma, D., Commun. Soil Sci. Plant Anal., **17**(12), 1299 (1986)-Ref.C.A **106**, 101251v(1987)
- 36- Kuecke, M., Przemeck, E. T., Landwirtsch Forsch., **36**(1-2), 140(1983) Ref.C.A., **100**, 66691r, (1984)
- 37- Munksgaard, L.L., Thymark, L.L., **13**(5), 410(1988).-Ref.C.A. **109**, 91352z (1988)
- 38- International IDF-Standart. 95A:1984, Milchwissenschaft, **40**(8), 457(1985).-Ref.C.A. **103**, 121855m(1985)
- 39- Anom.(Fed.Rep.Ger.), Milchwissenschaft, **36**(8), 472(1981). Ref.C.A. **95**, 113538m(1981)
- 40- Simko, Mrs.N., Mattyasovszky, Pol., Elelmiszervizsgalati Kozlem, **16**(1), 27(1970).-Ref.C.A. **73**, 108182g(1970)
- 41- Rybokhoz, Izuch. Vnulr. Vodoemov, *No. 3*, 51(1970).-Ref..C.A. **75**, 143843 m(1971)
- 42- Stock, W.D., Commun. Soil Sci. Plant Anal., **14**(10), 925(1983). -Ref.C.A. **100**, 5194j(1984)
- 43- Racz, E., Csonka, A. Elelmiszervizsgalati Kozl **34**(4), 203(1988).-Ref.C.A. **110**, 171867g(1989)
- 44- Spann, K.P., Lyons, D.J., Quensl. J. Agric. Anim. Sci., **42**(1)35(1985). Ref.C.A. **106**, 31923g(1987)
- 45- Henriksen, A., Analyst, **90**(1067), 83(1965).-Ref.C.A. **62**, 10222 d(1965)
- 46- Britt, Jr., R.D., Tech. Eau Assainissement, *NO:238* 29(1966).-Ref.C.A. **66**, 51882j(1967)
- 47- Zimmermann, K., Van Lengerken. J., Mahrung, **23**(9-10), 929(1979). Ref.C.A. **92**, 96453 s(1980)
- 48- Bunton, N.G., Crosby, N.P., Patterson. S.J. Analyst, **94**(1120), 585(1969). Ref.C.A., **71**, 87384r(1969)
- 49- Xu, S., Fang, Z., Fenxi, Huaxue, **11**(2), 93(1983).-Ref.C.A. **99**, 10551p (1983)
- 50- Di Sipio, F., Trulli, G., Ind. Aliment, **28**(268), 131(1989).-Ref.C.A. **110**, 230270 g(1989)

- 51- Liong, C., Dong, M., Zhonghua Yufangyixue Zazhi, *17*(6), 362(1983).
Ref.C.A., *100*, 197522 j(1984)
- 52- Kozi, T.G., Katz, S.A., Jennis, S.W., Spectrosc.Lett., *20*(6-7)509(1987).
Ref.C.A. *107*, 241993 j(1987)
- 53- Bashir, W.A., Flamerz, S., Ibrahim, S.K., Int.J. Environ, Anal. Chem., *15*(2)
65(1983).-Ref.C.A., *99*, 93395q(1983)
- 54- Jelghe, N., Claeys, A., Analyst, *110*(3), 314(1989).-Ref.C.A. *103*,
47439k(1985)
- 55- Wu, Q.F., Liu, P.F., Talanta, *30*(5), 374(1983).-Ref.C.A. *99*, 168560 a(1983)
- 56- Kaur, P., Sunita, S., J., Indian Chem. Soc., *64*(7), 428(1987).-Ref.C.A. , *107*,
242284r(1987)
- 57- Nakashima, S., Yagi, M., Zenki, M., Takahaha, A., Toei, K., Anal. Chim Acta.,
155, 263 (1983).-Ref.C.A. *100*, 56593 w(1984)
- 58- Ramakrishna, T.V., Balasubramanian, N., Z. Gesamte Hyg. Ihre Grenzgeb.,
30(8) 467(1984).-Ref.C.A. *102*, 665796 b(1985)
- 59- Matsuhisa, Kiichi, Ohzeki, K., Nippon Kagaku Kaishi, (11), 1593(1983).
Ref.C.A. *100*, 39290 c(1984)
- 60- Zhou, C., Wang, Q., Chen, S., Youkuang, *2*(1)59(1983).-Ref.C.A. *102*,
89150u(1985)
- 61- D.W.W. Andrews, Analyst, *89*(1064)730(1964).-Ref.C.A. *62*.26186b(1965)
- 62.-Norwitz, G., Gordon, H., Anal. Chim Acta, *89*(1), 177, (1977)-Ref.C.A. *96*,
19490 9x(1977)
- 63- Norwitz, G., Kelliner, P.N., Anal. Chim Acta, *109*(2), 373, (1979)
Ref.C.A. *91*, 167885n(1979)
- 64- Sayato, Y., Ando, M., Matsui, S., Tonomura, M., Eesei, Kagaku, *16*(6),
311(1970).-Ref.C.A., *75*, 80125f(1971)
- 65- Collet, P., Dtsch. Lebensm. Rudsch., *79*(11), 370, (1983)-Ref.C.A. *100*,
84305x(1984)
- 66- Yamamoto, Y., Okamoto, N., Tao, E., Nippon Kagaku Zasshi, *89*(4), 399
(1968).-Ref.C.A. *69*, 15948p(1968)

- 67- Okamoto, N., J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. A-2, 32(3), 308(1968)-Ref. C.A. 71, 76967g (1969)
- 68- Choi, K.K., Fung, K. W., Analyst, 105(1248), 241(1980)-Ref. C.A. 93, 44035q(1980)
- 69- Yu, J.M., Sun, V.F., Shih Pin Yu Fa Hiao Kung Yeh, (6), 16(1986)
- 70- Berlioz, B., Vallon, J.J., Anal. Chim. Acta, 183, 67-74(1985)
- 71- Eek, L., Ferrer, N., J. Chromatogr., 322(3), 491m(1985)-Ref. C.A. 102, 183851n(1985)
- 72- Kordorouba, V., Pelletier, M., Milt. Geb. Lebensmitteluynters. Hyg., 79(1), 90 (1980).- Ref. C.A. 109, 72142q(1988).
- 73- Schreiner, G., Kiesel, K.H., Gehlen, K.H., Fischer, A., Arch. Lebensmittel. Hyg., 39(2), 49(1988)-Ref. C.A. 109, 36721u(1988)
- 74- Jackson, P.E., Haddad, P.R., Dilli, S., J. Chromatogr., 295(2), 471(1984). Ref. 101, 109052y(1984)
- 75- Eggers, N.J., Cattle, Dawnl., J. Chromatogr., 354, 490(1986).
- 76- Hartley, A.M., Curran, D.J., Anal. Chem., 35, 686(1963)
- 77- Bartik, M., Kupka, J., Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 25, 3356(1960). Ref. Fresenius Z. Anal. Chem. 183, 234(1961).
- 78- Barbieri, G., Gavioli, E., Sala, G., Beneventi, G.P., Ind. Aliment., 22(2), 84(1983).-Ref. C.A., 98, 196492c(1983).
- 79- Ishikawa, M., Yamamoto, M., Watanabe, T., Masui, T., Narita, H., Shizuoka-Ken Eisei Kenyusha Hokoku, 24, 51(1981).-Ref. C.A. 97, 54089g(1982)
- 80- Barbieri, G., Sala, G., Gavioli, E., Beneventi, G., Bol. Chim. Unione Italy Lab. Prov., Pate Sci., 5(4), 611(1979).-Ref. C.A. 92, 127031r(1980)
- 81- Barbieri, G., Gavioli, E., Beneventi, G., Rivsoc. Ital. Sci. Aliment 52, 9(6), 425 (1980).-Ref. C.A., 95, 5220t(1981)
- 82- Bousset, J., Fleischwirtschaft., 60(7), 1325(1980).-Ref. C.A. 93, 130713r (1980)

- 83- Bousset, J., *Ann. Tech. Agric.*, **29**(3), 415(1980). -Ref. C. A. **96**, 102571m (1982)
- 84- Selmeçi, G., Aczel, A., Peter, S., *Elelmiszervizsgalati Kozl.*, **21**(4), 187(1975). -Ref. C. A., **84**, 162969g(1976)
- 85- Silva, M., Gallego, M., Valcarcel, M., *Anal. Chim. Acta*, **179**, 341(1986)
- 86- Kumamaru, T. Tao, E., Okamoto, N., Yamamoto, Y. *Bull. Chem. Soc.*, **38**(12), 2204(1965)
- 87- Yamamoto, Y., Kumamaru, T., Hayashi, Y., Otani, Y., *Bunseki Kagaku* **18**(3), 359(1969). -Ref. C. A. **71**, 9421m(1969)
- 88- Houser, M. E., Futh, M. I., *Microchem. J.*, **15**(3), 399(1970)
- 89- Kirkbright, G. F., Johnson, H. N., *Talanta*, **20**, 433(1973)
- 90- Gallego, M., Silva, M., Valcárcel, M., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **323**(1), 50(1986)
- 91- Hoshikawa, G., Fudano, Y., *Kagawa Dalgaku Nugakubu Gagujutsu Hokoku*, **27**, 111(1976). -Ref. C. A., **86**, 85637m(1977)