

**BESİN MADDELERİNDE NİTRAT VE NİTRİT
İÇERİĞİNİN SAPTANMASI**

ANALİTİK TOKSİKOLOJİ ve BROMATOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Ecz. GÜLAY AKÖZ

ANKARA — 1981

26

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

BESİN MADDELERİNDE NİTRAT VE NİTRİT
İÇERİĞİNİN SAPTANMASI

ANALİTİK TOKSİKOLOJİ ve BROMATOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Ecz. GÜLAY AKÖZ

Rehber Öğretim Üyesi : Doç. Dr. FİLİZ HINCAL

ANKARA - 1981

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini esirge-
meden yardım eden, araştırmamı yöneten değerli hocam Doç.Dr.
Filiz Hıncal'a, gösterdikleri yakın ilgi ve yardımlarından
dolayı Bölüm Başkanı Sayın hocam Prof. Dr. Suna Duru'ya te-
şekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışma arkadaşlarıma, Dr. Aytekin Temizer'e
ve Ecz. Aşkın İşimer'e çalışmalarım süresince gösterdikleri
yakın ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ ve AMAÇ	1
I. GENEL BİLGİLER	3
I.1. Nitrat ve Nitritin Çevresel Kaynakları	3
I.2. Nitrat ve Nitritin Kimyasal Özellikleri ve Reaksiyonları	3
I.3. Nitrozamin Oluşumu	4
I.4. Çevresel ve Biyolojik Ortamda Taşınma- ları ve Dönüşümü	6
I.4.1. Azot Döngüsü	6
I.4.2. Besinlerde Dönüşüm	8
I.5. Nitrat ve Nitritin Çevresel Düzeyleri ve Bunlarla Temas	10
I.5.1. Hava	10
I.5.2. Su	11
I.5.3. Besinler	11
I.5.4. Popülasyon Genel Temas Düzeyinin Hesaplanması	14
I.6. Nitrat ve Nitritin Biyolojik Yazgısı ..	15
I.6.1. Gastrointestinal Absorpsiyon ...	15
I.6.2. Biyotransformasyon ve Eliminasyon	15
I.7. Nitrat ve Nitritin Biyolojik Etkileri .	16
I.7.1. Deneysel Çalışmalar	16

I.7.1.1.	Akut ve Subakut Toksisite Çalışmaları .	16
I.7.1.2.	Kronik Toksisite ve Karsinojenite Çalışmaları	17
I.7.1.3.	Embriyotoksisite	18
I.7.1.4.	Mutajenite	18
I.7.1.5.	Beslenme Faktörleri ile Etkileşme	19
I.7.2.	Insandaki Etkileri	19
I.7.2.1.	Epidemiyolojik Çalışmalar	21
I.7.2.1.2.	Sebzelerle Temas	21
I.7.2.1.3.	Besinler Yoluyla Kazai Yüksek Temas ..	22
I.7.2.1.4.	Hava Yoluyla Temas ..	22
I.7.2.2.	Nitratlara Duyarlıkta Etkili Faktörler	22
I.7.2.3.	Nitrat ve Nitrit için Doz Cevap İlişkisi	23
I.8.	Nitrozamin'lerin Toksisitesi	23
I.9.	Sağlık Riskinin Değerlendirilmesi	24
I.10.	Nitrat ve Nitrit Tayini için Analitik Yöntemler	25
I.10.1.	Nitrat Tayini	25
I.10.1.1.	Spektrofotometrik	25
I.10.1.2.	Nitratın Amonyaya İndirgenmesi	26
I.10.1.3.	Geri Titrasyon	27
I.10.1.4.	Diğer Yöntemler	27

	<u>Sayfa No</u>
I.10.2. Nitrit Tayini	27
I.10.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler	27
I.10.2.2. Diğer Yöntemler	28
II. DENEYSEL KISIM	29
II.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
II.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	29
II.3. Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemi	29
II.3.1. Kullanılan Çözeltiler	30
II.3.2. Nitrit Tayin Yöntemi	31
II.3.2.1. Nitrit Absorpsiyon Spektrumu	31
II.3.2.2. Nitrit Standart Eğrisi	32
II.3.3. Nitrat Tayin Yöntemi	32
II.3.3.1. İndirgenme Kolonları- nın Hazırlanması ...	32
II.3.3.2. Nitrat Absorpsiyon Spektrumu	35
II.3.3.3. Nitrat Standart Eğrisi	36
II.4. Analitik Yöntemin Standardizasyonu ...	39
II.4.1. İndirgenme Kolonlarının Standardizasyonu	39
II.4.1.1. Kolonların Tekrarla- nabilirliği	
II.4.1.2. Kolonların Rejenerasyonu	41
II.4.2. Berraklaştırıcı Ajanların Nitrit Tayinine Etkisi	41
II.4.3. Berraklaştırıcı Ajanların Nitrat Tayinine Etkisi	42

II.4.4.	Nitrit ve Nitratın Birbirinin Tayinine Etkisi	42
II.5.	Sebzelerde Nitrit ve Nitrat Tayini ...	44
II.5.1.	Örnekleme	44
II.5.2.	Örnek Miktarı	44
II.5.3.	Ön Hazırlık İşlemleri	44
II.5.4.	Tayinler ve Hesaplamalar	45
II.5.5.	Verim Hesaplaması	46
II.6.	İstatistiksel Değerlendirmeler	48
III.	BULGULAR	49
III.1.	Sebzelerin Kış Döneminde Ölçülen Nitrit ve Nitrat İçerikleri	49
III.2.	Sebzelerin Yaz Döneminde Ölçülen Nitrit ve Nitrat İçerikleri	49
III.3.	Sebzelerde Nitrit ve Nitrat İçerikleri Arasındaki İlişki	49
II.3.1.	Kış Sebzeleri	49
II.3.2.	Yaz Sebzeleri	55
III.4.	Kış ve Yaz Sebzelerinde Nitrit ve Nitrat Miktarları Arasındaki Farkın Önemli Kontrolü	55
III.5.	Haşlama İşleminin Nitrit ve Nitrat Miktarlarına Etkisi	55
III.6.	Bekletme Süresinin Nitrit ve Nitrat Miktarlarına Etkisi	55
III.7.	Pazıda Sap ve Yapraklardaki Nitrit ve Nitrat Miktarları	61

	<u>Sayfa No</u>
IV. SONUÇ ve TARTIŞMA	62
IV.1. Kullanılan Analitik Yöntemin Üstünlükleri	62
IV.2. Sebzelerden Elde Edilen Sonuçlar	67
ÖZET - Türkçe	73
ÖZET - Yabancı Dilde	74
KAYNAKLAR	75
EKLER	93
ÖZGEÇMİŞ	96

GİRİŞ ve AMAÇ

Nitrat, bitkisel materyalin doğal bir bileşenidir. Miktarı, bitkinin cinsine göre (genetik) farklı olabildiği gibi, iklim, coğrafik koşullar, gübreleme ve olgunlaşma ve saklanma koşulları gibi çevresel etmenlere göre de değişiklik gösterebilmektedir (1).

Genel olarak nitrat toksisitesi, in vitro ve in vivo koşullarda bakteriler aracılığı ile veya in vitro koşullarda intramoleküler reaksiyonlarla indirgenerek dönüştüğü nitrit nedeniyledir (2). Nitritlerin özellikle bebeklerde methemoglobinemiye sebep oluşunun (3-5) bilinmesinin yanısıra son yıllarda besinlerde doğal olarak bulunan aminlerle (6,7) ve kullanılan bazı ilaçların yapısındaki aminlerle (8-10) (in vivo veya in vitro) birleşerek oluşturdukları nitrozaminlerin karsinogenik olduğu gösterilmiştir.

Yapay gübre kullanımındaki artış, (5, 11-13), nitrat ve nitritlerin et ürünlerinde koruyucu, renk ve aroma güzelleştirici olarak kullanımları (1) ve nihayet içme ve kullanma sularının kalitesinin çevresel faktörlere bağımlılığı (13,14)

nedeniyle besinlerdeki nitrat ve nitrit içeriğinin incelenmesi zorunludur.

Bu noktalardan hareketle bu çalışmada günlük diyetimizin bir parçası olarak tüketilen sebzelerde nitrat ve nitrit içeriğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

I. GENEL BİLGİLER

I.1. Nitrat ve Nitritin Çevresel Kaynakları:

Nitrat ve nitrit, toprakta, yüzey ve yeraltı sularında, havada ve bitkilerde doğal olarak bulunur. Doğal nitrat ve nitrit kaynaklarını, kireçtaşı kayaları, kalsitler, bazı kurumuş göl yatakları gibi jeolojik oluşumlar, atmosferik azot ile hayvan ve bitkilerin ölü hücreleri ve atıkları oluşturur (13,15).

İnsanlar da direkt veya dolaylı olarak doğadaki azot dengesini bozarlar. Şöyleki, azotlu yapay gübrelerin aşırı kullanımı ile bitkilerde (5,11,12), ve yüzey ve yeraltı sularında (16,17) nitrat miktarı yükselir. Hayvancılık bölgeleri ve açık tuvaletlerden gelen yoğun hayvan ve insan atıkları ise toprakta ve kuyu sularında azotlu maddelerin artmasına neden olur (13). Şehir kullanım suları da önemli nitrat kaynaklarıdır, çünkü temizleme işlemi sırasında toprak filtrelerden geçerken amonyak nitrata oksitlenebilir. Havuzlarda dinlendirerek temizleme yönteminde ise oluşan kokunun giderilmesi için sodyum nitrat ilave edilir (15).

Bütün bu kaynakların yanısıra nitrat ve nitritler et (18) ve balık (19) ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanıldıkları için bu gıdalarda önemli miktarlarda bulunabilmektedir.

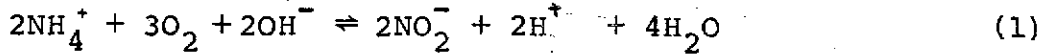
I.2. Nitrat ve Nitritin Kimyasal Özellikleri ve Reaksiyonları

Kuvvetli bir asit ($pK_a = -1.37$) olan nitrik asit, oksidan bir maddedir. Sulu çözeltilerinde tamamen dissosiyeye

olarak hidroksonyum ve nitrat iyonlarına ayrışır. Nitrik asidin konjuge bazı olan nitratlar, bizmut ve cıvanın bazik nitratları hariç suda kolay çözünürler.

Nitröz asit ise zayıf bir asittir ($pK_a = 3.37$) ve kararlı değildir, ancak soğuk, seyreltik ve sulu çözeltilerde bulunabilir, aksi takdirde çok çabuk parçalanarak su ve azot trioksit veya nitrik asit, azot monoksit ve su açığa çıkarır. Nitröz asidin konjuge bazı olan nitritler kendisinden daha dayanıklı olup, gümüş nitrit hariç suda kolay çözünürler (20).

Doğada, yüzey suları ve toprakta nitrifikasyon adı verilen, amonyak halindeki azotun nitrat ve nitritlere çevrilmesi iki aşamada olur (21,22):



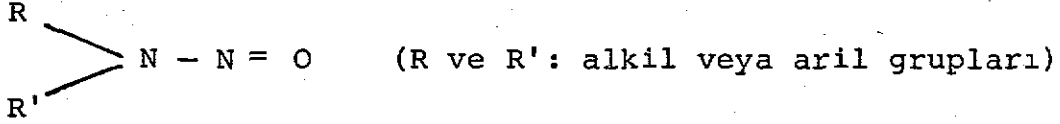
Birinci aşamada amonyum iyonu Nitrozomonas ve Nitrosokokkus adı verilen iki grup bakteri tarafından nitrite oksitlenir. İkinci aşamada ise nitrit, nitrata Nitrobakteri'ler tarafından çevrilir.

Bitkiler azotu nitrat ve amonyum halinde topraktan alırlar ve daha sonra aminlere indirgenen azot, amino asit sentezinde kullanılır (22).

I.3. Nitrozamin Oluşumu

Bazıları yağsı sıvı, bazıları katı, bazıları ise gaz halinde olabilen ve birçoğunun karsinojenitesi hayvan

deneyleriyle belirlenen (23) nitrozaminlerin genel yapıları şu şekilde gösterilebilir:

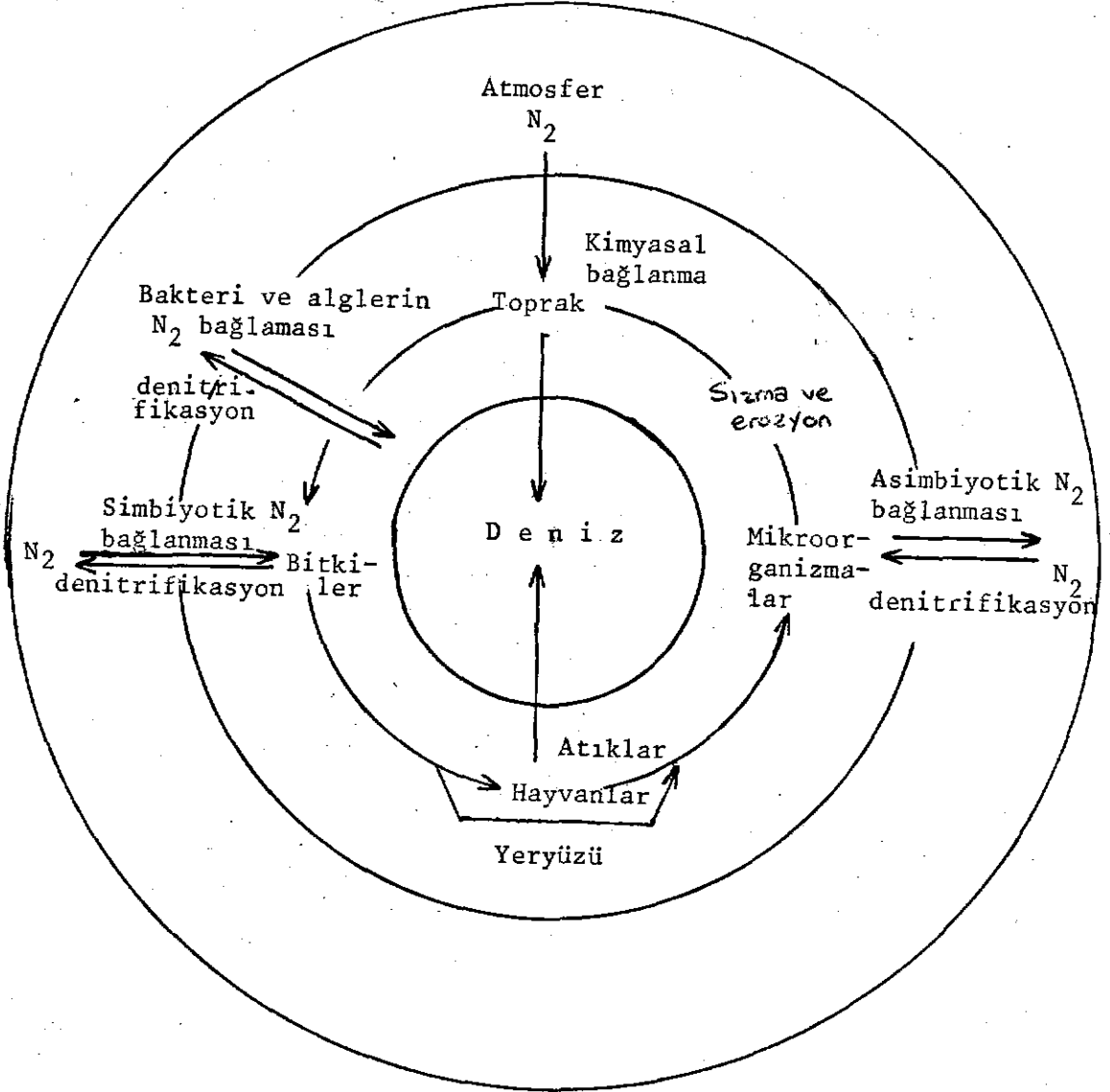


Nitrozaminler, nitritler ile asit ortamda sekonder (6), hafif asit ortamda tersiyer (7,24) veya kuarterner aminlerin (24) reaksiyona girmesi ile invitro besinlerin işlenmesi, saklanması, hazırlanması sırasında veya in vivo memelilerin midelerinde oluşabilmektedirler (7,23,24-27). Bu sekonder, tersiyer ve kuarterner amonyum bileşikleri doğal olarak besinlerde (6) bulunabildikleri gibi bazı pestisit ve herbisitlerde (25,28,29), ilaçlarda (8-10) ve baharatlarda da (30) bulunabilmektedirler. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda nitrozaminler asit ortamda ve nitrit varlığında bu bileşiklerden sentez edilmişlerdir (17,23,31,32).

Askorbik asit, nitrozaminlerin oluşumunu büyük bir olasılıkla, nitrit ile reaksiyona girerek engellerken (33,34) gallik asit ve tanen çözeltileri pH'ya ve gallik asitin konsantrasyonuna bağlı olarak farklı etki gösterirler (35). 0.0125 M konsantrasyonda pH = 4'te katalitik etki gösteren gallik asitin konsantrasyonu yükseldikçe oluşan nitrozamin miktarı azalır.

I.4. Nitrat ve Nitritin Çevresel ve Biyolojik Ortamda Taşınması ve Dönüşümü

I.4.1. Azot Döngüsü



Şekil 1. Azot Döngüsü (22).

Azot, hava, su, toprak, mikroorganizma, bitki, hayvan ve insan gibi değişik yollarla atmosfer ve yeryüzü arasında devamlı değişim halindedir. Azotun bu şekilde taşınma ve dönüşümüne azot döngüsü denir (Şekil 1). Azot döngüsünü iklim şartları, hayvan ve bitki topluluğunun cinsi ve yoğunluğu,

tarımsal işlemler ve hayvancılık etkiler (22).

Atmosferde azot N_2 halinde bulunur ve inerttir. Elementer azotun atmosferdeki toplam miktarı 4.5×10^{15} tondur (15). Biyosferde ise, bazı simbiyotik ve asimbiyotik mikroorganizmalar elementer azotu tutarak azot bileşiklerini oluştururlar. Toprakta Rhizobium adı verilen bakterilerin baklagillerin köklerindeki ortak yaşamları sırasında havadaki azotu tutarak bitkinin kullanabileceği hale getirmelerine simbiyotik azot tutulması adı verilir. Mikroorganizmalar tarafından havanın serbest azotunun dolaysız olarak tutulup kullanılmasına asimbiyotik azot tutulması denir. Bu mikroorganizmalar yaşamlarını bağımsız olarak sürdürürler. Aerobik Azotobakter ve anaerob Clostridium bakterileri ve ayrıca mavi-yeşil alglerden Nostok, asimbiyotik azot tutabilirler. Biyolojik bağlanma ile oluşan amonyak, daha önce I.2'de anlatılan şekilde nitrifikasyon ile nitrit ve nitrata dönüşür. Toprakta oluşan nitratin sınırlı bir miktarı bitkiler tarafından kullanılır, geri kalanın bir kısmı yeraltı sularına sızarak nehirlere ve denizlere karışırken diğer kısmı denitrifikasyon ile azota veya azotmonoksite dönüşerek tekrar atmosfere döner. Denitrifikasyon toprakta ve deniz, ırmak ve göllerdeki tortullarla su arasındaki iç yüzeyde oluşur (15,22). Biyolojik fiksasyon ve yapay gübreleme ile ortama verilen nitratlar, bitkilerde genellikle biyolojik moleküllerin ve özellikle proteinin sentezinde kullanılır (2). Bitki ve hayvan atıkları ve ölü hücreleri, bağlı azotu toprağa geri verir ve bunun bir kısmı tekrar atmosfere geçer ve böylece azot döngüsü tamamlanır (22).

I.4.2. Besinlerde Dönüşüm

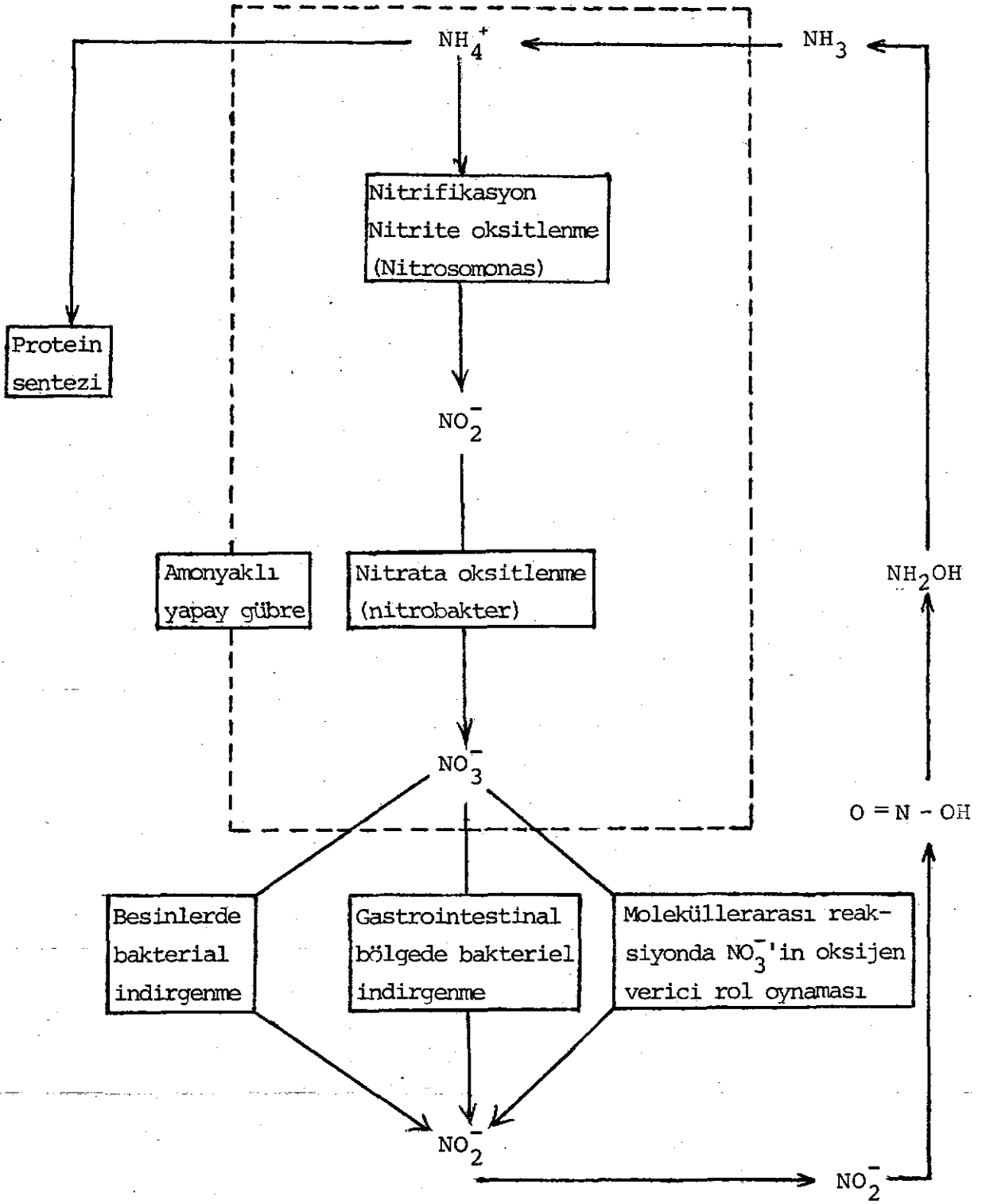
Sebzelerde, hasat edildikten sonra saklama, işleme ve kullanma sırasında veya in vivo şartlarda gastrointestinal sistemde, nitrat nitrite indirgenebilmektedir. Mikroorganizmalar, zirai yetiştirme şartlarına ilaveten sıcaklık (çevreden gelen veya kötü depolama ve yetersiz havalandırma sonucu), rutubet, bitkinin yetiştirme şartları ve kesme ve hasat sırasında sebzenin uğradığı zarar gibi etmenlere bağlı olarak nitratı, nitrite indirgerler (2). Nitratın indirgenmesi ile ilgili üç olası yol vardır (Şekil 2).

i. Aerob şartlarda nitrat, mikrobiyolojik indirgenme ile nitrite çevrilir. Enterokokkuslar, Hafnia, Aerobacter aerogenes, B. cereus, B. subtilis, B. magaterium, B. alvei mikroorganizmaları kötü işleme ve hazırlama şartlarında nitratı nitrite indirgemektedirler.

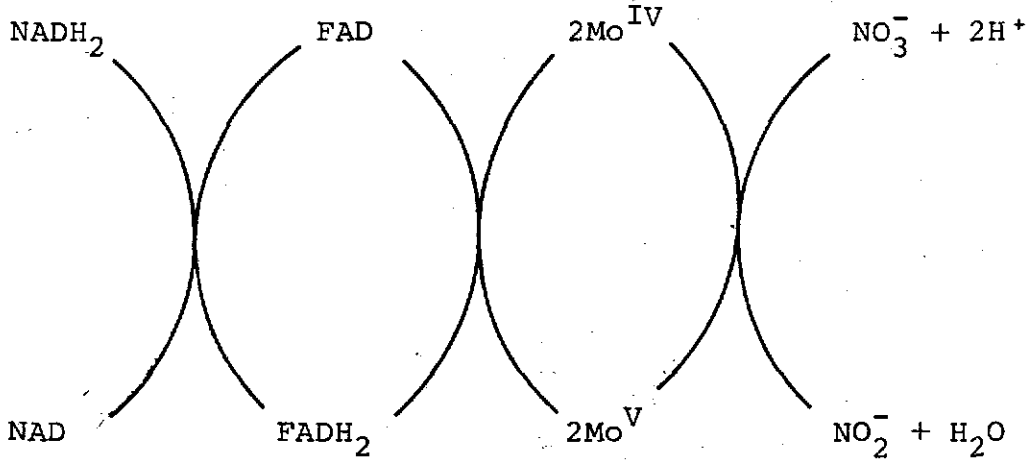
ii. Dispeptik bebeklerde gastrointestinal sistemde E. coli ile in vivo nitrat nitrite indirgenmektedir.

iii. Anaerob şartlarda, moleküllerarası reaksiyonlarda nitrat oksijen verici olarak rol oynar ve nitrite çevrilir (Şekil 3). Çok sıkı depolanmış ıspanaklarda bu mekanizma ile nitrat, nitrite indirgenir.

Taze ıspanakta yapılan çalışmalarda oda ısısında 4 gün bekletme ile, nitrat miktarında azalma ile birlikte nitrit miktarında yükselme görülmüştür. Soğukta saklandığında ise bu



Şekil 2. Sebzelere Nitrit Oluşumu (2).



Şekil 3. Anaerob Nitrat İndirgenmesi (2).

değişim 28 gün içinde gerçekleşmiştir (11,36). Yapılan başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (37). Bebek mamalarında yapılan çalışmalarla E. coli içeren örneklerde nitrit miktarında artma olduğu saptanmıştır (38).

I.5. Nitrat ve Nitritin Çevresel Düzeyleri ve Bunlarla Temas

I.5.1. Hava

Atmosferdeki azot oksit gazları, bir dizi fotokimyasal reaksiyonlarla, nitrat ve nitrit bileşiklerine çevrilebilmektedirler. Havadaki nitrat ve nitrit miktarı diğer nitrat ve nitrit kaynakları ile karşılaştırıldığında çok düşük değerlerde (1-40 µg/m³) olsa bile, yerleşim merkezlerinde sağlık açısından

önem taşımaktadır. Özellikle şimşek çaktığı zaman önemli miktarlarda nitröz ve nitrik asit oluşabilmektedir (20).

I.5.2. Su

Yüze ve yeraltı sularındaki nitrat ve nitritlerin konsantrasyonları, jeokimyasal şartlar, insan ve hayvan atıklarının karışması, azotlu yapay gübrelerin bölgesel kullanım miktarları ve azot içeren endüstriyel atıkların karışmaları ile değişebilmektedir. Dünya Sağlık Teşkilatı içme sularında 45 mg/L'den daha fazla nitrat bulunmaması gerektiğini bildirmiştir (39). Bu değer azot olarak 10 mg/L'ye eşdeğerdir. Türk Gıda Tüzüğü'ne (40) göre ise içme ve kullanma sularında nitrat miktarı 45 mg/L kaynak sularında ise 25 mg/L'dan fazla bulunmamalı ayrıca nitrit kesinlikle olmamalıdır.

Gübrelemenin etkisiyle bazı yüze sularında nitrat miktarı artmaktadır ve toplam azotun % 55-60'ı nitrat olarak bulunabilmektedir (16). Minnesota (41) ve Worksop'ta (17) içme sularındaki yüksek nitrat seviyeleri nedeniyle bu bölgelerde methemoglobinemi ve kanser vakaları fazladır.

I.5.3. Besinler

Besinlerde nitrat ve nitritler, sebzelerde, et ve balık ürünlerinde ve sebze konservelerinde görülmektedir. Bebeklerde birçok zehirlenme vakalarının nedeni olan ıspanağın (38,42,43, 44) yanısıra lahana, maydanoz, karnabahar, kereviz başta olmak üzere birçok sebze önemli miktarlarda nitrat içermektedir (45-48). Meyvelerde ise nitrat yok denecek kadar azdır,

ancak muzda (80 ppm) ve çilekte (50 ppm) bir miktar bulunur (47).

Sebzelerdeki nitrat ve nitrit miktarları sebzenin cinsine göre değişebildiği gibi, aynı sebze de sıcaklık, nem miktarı, havalanma, güneş ışığı, olgunluk, kalıtım, çevre ve kullanılan azotlu gübre miktarları nedeniyle büyük farklılıklar gösterir (43,49). Nitratın bazı sebzelerde aşırı toplanmasına neden olan etmenler şunlar olabilmektedir (1):

- i. Özellikle olgunlaşma döneminde aşırı gübreleme,
- ii. Bitkide beslenme bozukluğunun olması (örneğin molibden eksikliği olan bitkide nitrat birikir)
- iii. Olgunlaşma döneminde ışık şiddetinin azalması
- iv. Su eksikliği
- v. Kimyasal işlemlerle bitkinin zarar görmesi
- vi. Bazı bitki türlerinin nitrat biriktirmesi (genetik)

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, pazının kış aylarında daha çok nitrat içerdiği, yazın ise 86.4-654.4 mg/kg N_2O_5 'e eşdeğer miktarda nitrat içerdiği saptanmıştır (50). Ispanaklarda ise (51) sap kısmında daha fazla miktarlarda nitrat bulunmuştur.

Gübreleme miktarı ile besinlerdeki nitrat miktarlarının artışı birbiriyle çok ilgilidir, ancak nitrit miktarlarında bir değişiklik görülmemiştir (11).

Nitrit, et ürünlerinde üç ayrı amaçla kullanılır (1); karakteristik rengin oluşturulması, aromanın güzelleştirilmesi

ve antibakteriyel etkisi. Renk oluşumu, azot monoksitin myoglobinin ile birleşerek ete kırmızı-pembe renk veren nitrosilmyoglobinin oluşturmasına bağlıdır. Aromatik etki ise nitritin et bileşenleri ile reaksiyona girmesi ile görülmektedir. Nitritin esas kullanılış nedeni olan antibakteriyel etkisi ise sterilizasyon ısısından daha düşük ısı uygulanan et ürünlerinde, Clostridium botulinum'un üremesini ve böylece toksin oluşumunu engellemektir. Balık ürünlerinde de bu antibakteriyel etkisi nedeni ile kullanılır. ABD'de ve bazı Avrupa ülkelerinde etlerde bakiye nitrit 200 ppm'i aşmamak üzere sodyum nitrit ilavesine izin verilmiştir (1).

Bebekler nitratın toksik etkilerine karşı yetişkinlere göre daha duyarlı oldukları için bebek mamaları üzerine daha önemle eğilinmiştir (52).

İçine su karıştırılmış sütlerde, bir miktar nitrat ve nitrit görülebilmektedir. Peynir imalatında Bacterium coli'nin üremesi ile oluşan hava deliklerinin önlenmesi için % 0.03 oranında sodyum nitrat veya sodyum nitrit kullanılmaktadır (53). Sütlerde (54) ve peynirlerde (53,55,56) yapılan çalışmalarda, nitrat ve nitrit çok düşük miktarlarda bulunmuştur.

Ülkemizde sebze konservelerinde yapılan çalışmalarda, konservelerde bulunan nitratın ana kaynağının sebze olduğu, salamura hazırlanmasında kullanılan suyun fazla önem taşımadığı ileri sürülmüştür. Konservelerdeki nitrat aşınmayı hızlandırıcı olarak rol oynadığı için önemlidir. Nitrat, kalayın aşınma sonucu açığa çıkmasına neden olurken, kendisi nitrit

ve amonyağa parçalanır. Kalay ise ortamdaki sitrik asit ile toksik kalay sitrat bileşiğini oluşturarak zehirlenmelere yol açar (49).

Meyve sularında ise (57,58) çok düşük miktarlarda nitrat bulunur, ancak ticari meyve sularında, doğal olarak elde edilen meyve sularına göre daha fazla nitrat bulunması kullanılan suda nitrat miktarının yüksek olduğuna gösterir.

I.5.4. Popülasyonun Genel Temas Düzeyinin Hesaplanması

İstanbul kuyu sularında yapılan inceleme sonuçlarına göre analizi yapılan sularda 1.48-177.7 mg/L nitrat bulunmaktadır (14). Bunu yaklaşık 2-180 mg/L olarak kabul edersek ve günde (ılıman bir iklimde) 2 litre kadar su içildiğini varsayarsak su yolu ile günlük vücuda alınan nitrat miktarı 4-360 mg arasında olacaktır. Sebzelere ve et ürünlerinden günlük ne kadar nitrat alındığını hesaplamak zordur, çünkü bu gıdalardaki miktarlar birbirinden farklı olduğu gibi yeme alışkanlıkları da çok değişebilmektedir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada değişik kaynaklardan haftalık alınabilecek nitrat miktarları şöyle tahmin edilmiştir (17); Toplam haftalık 400-450 mg nitrattan 225 mg'ı sebzelerden, 110 mg'ı etten, 105 mg ise sudan alınmaktadır. Ancak bu değerler genelleştirilemez zira yeme alışkanlıkları ve çevresel nitrat miktarları çok farklılık gösterir. Nitrit miktarları ise daha çok farklılık gösterdiği için tahmin yapmak güçtür. Dünya Sağlık Teşkilatı (20), nitrat için günlük alınabilecek miktar olarak

5 mg/kg, nitrit için ise 0.4 mg/kg olarak kısıtlama koymuştur.

I.6. Nitrat ve Nitritin Biyolojik Yazgısı

I.6.1. Gastrointestinal Absorpsiyon

Nitrat ve nitritler besinlerle etkileşmeden mideden hızla absorplanırlar (1,17) ve etkileri 1-2 saat için görülür (59). Nitratların bir kısmı gastrointestinal bölgede mikroflora tarafından metabolize edilebilir (13). Ortamın pH'sı, uygun besin elementlerinin olması (eser elementler ve karbonhidratlar gibi) ve bulunan organizmalara bağlı olarak nitrat, nitrite, azot oksitlere (N_2O_5, NO, NO_2), hidroksil amine ve amonyaka indirgenir. Oluşan bu maddeler absorplanarak toksik etkiler gösterebilirler.

I.6.2. Biyotransformasyon ve Eliminasyon

Nitratlar absorplandıktan sonra idrar ile çok çabuk atılırlar (1). Nitratın idrardaki konsantrasyonu vücuda alınan nitrat miktarı ile orantılıdır. Nitrat alımı haftada 400-450 mg olduğunda idrardaki konsantrasyon 1.0 m.mol/L., alınan miktar haftada 1000 mg'a çıktığında 2.6 m.mol/L.'ye yükselmektedir (17).

Nitrat ve nitritlerin tükrük ile itrahları incelendiğinde, nitrat ve nitrit miktarı yüksek sebze suyu içenlerin tükrüklerinde aldıkları miktarlarla orantılı nitrat ve nitrit değerleri bulunmuştur. Alınan yüksek miktarda nitrattan sonra tükrükte nitrit konsantrasyonu artmaktadır. Oral mikroflora;

pH, sıcaklık, nitrat ve elektron verici konsantrasyonlarına bağlı olarak, nitratı nitrite indirgemektedir (60,61).

I.7. Biyolojik Etkileri

İlk defa 1895'te Mayo, nitratların sığırlarda akut zehirlenmelere neden olduğunu farketmiştir (20). Daha sonraları 1918'de Santa Cruz'da sığırların nitrat tuzu kayalarını yalamaları neticesinde zehirlendikleri anlaşılmıştır (15). İnsanlarda görülen nitrat zehirlenmeleri ise ilk defa 1945'te Comly tarafından rapor edilmiş ve kuyu sularındaki nitrat miktarı ile bebek zehirlenmeleri arasında ilişki olduğu ileri sürülmüştür (3). Oğünden beri bu konuda araştırmalar devam etmektedir.

I.7.1. Deneysel Çalışmalar

I.7.1.1. Akut ve Subakut Toksisite Çalışmaları

Nitritin bilinen akut toksisitesi methemoglobinemi yapmasıdır. Nitrat, direkt olarak etkisi olmamakla birlikte nitrite indirgenerek aynı etkileri gösterir. Ancak nitrit ile hemoglobin arasındaki reaksiyon henüz kesin olarak anlaşılamamıştır (1,62). Nitrat ve nitritler vazodilatasyon yaparak methemoglobinemik etkiyi arttıırırlar (41). Nitrit varlığında hemoglobinin hem kısmında bulunan Fe(II), Fe(III)'e yükseltgenir ve oluşan methemoglobinin oksijen ile tersinir bağlanma yeteneği yoktur, bu nedenle % 20 methemoglobin oluştuğunda hipoksi oluşur (63).

Yapılan hayvan deneyleri sonucunda (64), hemoglobinin

nitrit ile methemoglobine yükseltgenmesi ve methemoglobinin NADH-methemoglobin redüktaz enzim sistemi ile tekrar hemoglobine indirgenmesi her hayvan türü için farklı hızda ve türe özgü olduğu bildirilmiştir.

Askorbik asit eksikliği olan kobaylara s.c. sodyum nitrit verildiğinde methemoglobin seviyeleri ve ölüm oranı kontrol grubuna göre artış gösterir (65). Akut toksik etkinin, deney hayvanlarının yaşı ve oral verilirken aldığı besinlerle değişebildiği ve etkinin birkaç saat içinde geçebildiği bildirilmiştir (66).

I.7.1.2. Kronik Toksikite ve Karsinojenite Çalışmaları

Sıçanlar üzerinde yapılan 24 aylık kronik çalışmada yüksek dozda nitrit alan grupların deney hayvanlarında nitrit ile orantılı olarak methemoglobin seviyelerinde artış görülmüştür. 2 sene sonunda kesilen hayvanların iç organları incelendiğinde bazılarının kalp dokularında küçük hücre odakları, fibrozis ve dejeneratif odaklar görülmüştür. Koroner arterler dilate ve incelmış olduğu halde kan damarları kalınlaşmış, hipertrofiye uğramış ve daralmıştır. İkinci hedef organ olan akciğerlerde ise bronşlar dilatedir ve çeperlerde lenfositlerce oluşturulan infiltrasyon vardır. Mukoza ve kasta atrofi, bronşial eksuda ve anfizem oluşmuştur (67). Benzer bir çalışmada (66) sıçanlar üç kuşak incelenmiş ve kan tablosunda ve organlarda hiçbir değişiklik gözlenmemiştir. Çok yüksek doza rağmen yaşam süresinde önemli oranda bir azalma olmamıştır, yalnızca hemoglobin seviyelerinde düşme görülmüştür. Karsinogenik hiçbir etki de gözlenmemiştir. 2 sene süre ile izlenen

başka bir deney grubunda ise akciğer tümörleri açısından bir artış görülmemiştir (68).

I.7.1.3. Embriyotoksosite

Nitritler doza bağımlı olarak embriyotoksik etki gösterirler. Düşük dozlarda hiçbir embriyotoksik veya teratojenik etki gözlenmezken (69), yüksek dozlarda nitrat ve nitrit, düşüklere ve fetal ölümlere neden olmuş, ayrıca dişilerin üremeleri de büyük ölçüde zarar görmüştür (70,71). Fetal ölümler, maternal methemoglobinemi ile oluşan hipoksi nedeniyledir (71). Yüksek dozda nitrit verilen gebe sıçanlarda anemi, methemoglobinemi gözlenirken doğa yavruların ölüm oranlarında artış, büyüme hızlarında yavaşlama görülmüştür (67). 60 mg/kg dozda sodyum nitrit gebe kobaylara s.c. verildiğinde düşük olurken, askorbik asit yetersizliği olan kobaylarda bu doz 45 mg/kg'a düşmektedir (65).

I.7.1.4. Mutajenite

Nitrat ve nitritin mutajeniteleri hakkında henüz yeterli çalışma bulunmamakla birlikte nitroz asidin kuvvetli bir mutajen olduğu (72) ve DNA transformasyonunda mutasyon yaptığı (73) bildirilmiştir. E. coli (72,74), Salmonella typhimurium (72,75) içeren bakteri sistemlerinde ve A. nidulans (76) ta nitroz asidin mutajenik olduğu gösterilmiştir. Salmonella typhimurium ile yapılan çalışmada nitrit ile işlenmiş Japon balığı, sığır eti ve sosis ekstresi denenmiştir. Japon balığı

ekstrezi mutajenik olduğu halde diğerlerinde bu etki görülmemiştir. Mutajenite, nitritin iki misli askorbik asit eklenerek önlenmiştir (75).

I.7.1.5. Beslenme Faktörleri ile Etkileşim

Bu konuda yapılan çalışmalar askorbik asit (33, 34, 65, 67, 75, 77) ve Vit. A üzerinde (78, 79) yoğunlaşmıştır.

1 - 90 günlük bebeklere nitrit içeren su ile birlikte askorbik asit verildiğinde, askorbik asitin methemoglobin seviyesindeki yükselmeyi engellediđi görülür (67).

Ayrıca nitritin gastrointestinal kanalda karoten ve vitamin A'yı absorplanamadan parçaladığı hayvan deneyleri ile gösterilmiştir (78, 79).

I.7.2. Nitrat ve Nitritin İnsandaki Etkileri

Sağlıklı bireylerde total hemoglobinin %1'i methemoglobin şeklindedir. Yeni doğmuş bebeklerde ve prematurelerde ortalama %2 olan bu değer %5'e kadar yükselebilmektedir (5). Çocuklarda, %5 e kadar olan methemoglobin seviyelerinde hiçbir semptom gözlenmemekte ancak bu değer aşıldığında siyanoz başlamaktadır (4). Methemoglobin konsantrasyonu %70'e ulaştığında asfiksiye bağlı ölümler görülmektedir. Anemili hastalarda daha düşük konsantrasyonlarda ölüm görülebilmektedir (5). Methemoglobineminin klinik belirtileri 1-2 saat içinde ortaya çıkar ve bulantı, kusma, terleme ve parmak uçları, burun ve kulaklarda belirgin siyanoz ile kendini gösterir. %70 konsantrasyona ulaştığında

ataksi, dispne, aşırı salivasyon, bayılma ve şuur kaybı görülür, %90 konsantrasyonda ise fataldir (59). Methemoglobine-miyi etkileyen etmenler şunlardır;

- Fetal hemoglobin: Fetal hemoglobin, methemoglobine daha kolay yükseltgenebilmektedir ve bebeklerde hemoglobinin %80'i bu şekildedir (67).

- Bakteriler : Nitratları nitrite indirgeyebilen bakterilerin ağızda ve gastrointestinal kanalda, pH = 5 - 7 arasında etkili olabildikleri gözlenmiştir (67).

- Mide pH'sı : Mide pH'sı 4.6'dan daha yüksek olduğu zaman nitratı indirgeyebilen bakterilerin üreyebilmeleri için uygun bir ortam yaratılmış olur. Normalde bebeklerde 2 - 5 arasındaki mide pH'sı diareli bebeklerde 4.6 - 6.5 değerlerine yükselebilmektedir (77).

- Gastrointestinal bozukluk: Enterobakterilerin hepsi nitratı nitrite indirgeyebilirler. Gastrointestinal bozukluklarda barsaklardan ince barsağa geçebilen bu bakteriler pH'ya bağımlı olarak üreyebilmektedirler (67).

- Diyet : B. subtilis (nitrat indirgeyici) içeren bebek mamaları methemoglobinin ana kaynağını oluşturur. Nitrat içeren sudan fazla içilmesi, diyetle askorbik asit veya fazla oranda nitrat ve nitrit içeren sebzelerin bulunması çok önem taşımaktadır (63).

- Methemoglobin indirgenmesi: Göbek kordonunda methemoglobin redüktaz hızı laktat ve glikoz varlığında çok

yavaşlar. Bunun NADH-methemoglobin redüktaz kofaktörünün geçici bozukluğu neticesi olduğu (78, 79), veya enzimin kendisinin düşük aktivitesi oluşu (80) neticesi ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.

I.7.2.1. Epidemiyolojik Çalışmalar

Fazla miktarda nitrat içeren şehir suyu, kaynatıldığında nitrat yoğunlaşmış ve bu su ile hazırlanan süt tozu preparatı bir bebekte methemoglobinemiye neden olmuştur (81). Bunun gibi daha bir çok vakalarda sular, etler ve sebzelerle ilgili epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır (21, 41, 44, 59, 67, 82, 83).

I.7.2.1.1. Su Yoluyla Temas

Birçok olayın kaynağının iyi açılmamış kuyulardan alınan ve fazla miktarlarda nitrat içeren sular olduğu anlaşılmıştır (21). Suda nitrat miktarının yüksek olması çocukları daha çok etkilemektedir zira, kurutulmuş süt ürünleri gibi su ile seyreltilerek kullanılan birçok preparatlar bulunmaktadır (4, 21, 41). Bildirilen bu vakalardan bazıları fatal sonuçlanmış ve nitrat konsantrasyonu 70 - 250 mg/L'ye kadar çıkmıştır (4).

I.7.2.1.2. Sebzelerle Temas

Yapılan çalışmalar fazla miktarlarda nitrat biriktirebildiği için genellikle ıspanak üzerinedir. Ispanak püresi yiyen iki bebekte (43) ve ıspanak yemeği yiyen 14 bebekte (38)

ayrı ayrı methemoglobinemi vakaları görülmüştür. Her iki olayda da taze ıspanak yaprakları kullanıldığı, pürede yapılan analizde nitritin 2180 mg/kg bulunduğu, yemek yapılan ıspanağın ise en az 24 saat beklediği rapor edilmiştir.

I.7.2.1.3. Besinler Yolu ile Kazai Temas

Et ve balık ürünlerine katkı maddesi olarak konan nitrat ve nitritler, yeterli kalite kontrolü yapılmadığı zaman kazaen veya etin daha güzel görünebilmesi için kasıtlı olarak fazla konabilmekte ve bunun sonucu zehirlenmeler olabilmektedir. Kazaen fazla miktarlarda nitrit ilave edilmiş olan bir çeşit sosisten yiyen 6 kişi siyanoza girmiştir (84). Ayrıca yendiğinde baş ağrısı yapan et ürünleri bildirilmiştir (85).

I.7.2.1.4. Hava Yolu ile Temas

Hava yoluyla alınan nitratlar solunum yolları irtasyonu yapabilirler. Nitratlar sülfatlarla birlikte havada bulunurlarsa astım riski her birinin tek başına yaptığı etkiye oranla artmaktadır (39). Bu konudaki çalışmalar henüz çok yetersizdir.

I.7.2.2. Nitratlara Duyarlılıkta Etkili Faktörler

I.7.2. başlığı altında açıklanan methemoglobinemiye etkileyen fetal hemoglobin miktarı, gastrointestinal bozukluk, mide pH'sı, beslenme alışkanlıkları, bakteri etkisi, methemoglobinin indirgenme hızı etmenleri, nitratlara duyarlılıkta da aynı önemi taşımaktadır. Ayrıca hamile kadınların ve

karsinomalı hastaların hemoglobinlerinin methemoglobinemiye daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır (86).

I.7.2.3. Nitrat ve Nitrit için Doz-Cevap İlişkisi

Çok sağlıklı olmamakla birlikte nitrat ve nitrit için doz-cevap ilişkisi tahminleri yapılabilir (82). Total hemoglobinin % 10'unu methemoglobine çevirebilen nitrat miktarının hipotetik olarak 2 mg/kg olduğu hesaplanmıştır. Bu değer günlük 10-15 mg/kg doza karşılık gelmektedir. Bu hipotetik hesaplama su için yapılmış olmakla birlikte diğer kaynaklar da hesaba katılarak günlük doza dikkat edilirse % 10 methemoglobin düzeyine neden olan miktara yaklaşılmadan sağlıklı bir diyet uygulanabilir, ancak bütün kaynaklardan gelebilecek kesin nitrat miktarlarını bilebilmek olanaksızdır.

I.8. Nitrozaminlerin Toksisitesi

Sıçanlarda dimetilnitrozamin ile deneysel olarak karaciğer tümörü oluşturulmasından sonra (87), bu konuda birçok çalışmalar yapılmıştır.

Nitrozaminler prokarsinojen özelliktedirler. Metabolik aktivasyon ile dönüştükleri reaktif elektrofilik ürünlerin nükleik asitteki guaninin 7 pozisyonuna bağlandıkları bildirilmiştir (88). Nitrozaminler çok düşük dozlarda bile etkilidirler (1). Örneğin dimetilnitrozaminin 0.075 mg/kg günlük dozu sıçanda karsinojenik etkilidir. Nitrozaminler

nitrozaminin cinsine ve deney hayvanının türüne göre değişik hedef organları seçerler (17). Örneğin dimetilnitrozamin sıçanlarda karaciğer tümörü oluşmasını indükler, oysa dibutilnitrozamin mesane tümörü oluşmasına neden olur. Dietilnitrozamin ise denenen bütün hayvan türlerinde karsinogeniktir ve insanlar için de karsinogenik olduğu kabul edilebilir (27).

Nitrozaminler aklorhidrik midede bakterilerin etkisi ile nitritlerden ve aminlerden sentez edilebilirler, ancak aklorhidrik mideye oranla mesanede daha çok nitrozamin oluşabilir, çünkü daha çok bakteri bulunur, sekonder amin konsantrasyonu daha fazladır ve inkübasyon süresi daha uzundur. Bunu doğrulayan in vivo sıçan deneyleri yapılmıştır, ayrıca üriner enfeksiyonu olan iki hastanın idrar örneklerinde nitrozamin bulunmuştur. Birçok üriner enfeksiyonun amili olan E. coli, aynı zamanda iyi bir nitrozama ajanıdır (17).

Nitrozaminlerin karsinogenik (88), mutajenik (89), embriyotoksik ve teratojenik (69) etkileri üzerinde çalışmalar yoğun bir şekilde devam ederken Kuzey Şili'de içme suyu ve o bölgede yetişen toprak ürünlerinde yüksek miktarlarda nitrat bulunuşu ile orta yaşlarda görülen gastrik kanserler arasında çok büyük bir ilişki olduğu saptanmıştır (90).

I.9. Sağlık Riskinin Değerlendirilmesi

Doz-cevap ilişkisi henüz kesinleşmemesine rağmen, yapılan çalışmalardan bazı yararlı sonuçlar çıkarmak mümkündür.

Şöyle ki, nitrat ve nitritin en etkili olduğu grup, özellikle 3 aylıktan daha küçük, 0 - 1 yaş arası bebeklerdir. Daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde methemoglobinemi vakası çok nadirdir. Süt tozlarının sulandırılmasında kullanılan suyun nitrat ve nitrit içeriğinin fazla olmamasına, püre halinde verilen sebzelerin düşük miktarda nitrat ve nitrit içeren türlerden seçimine özen gösterilmelidir, beklemiş yemekler bebeklere yedirilmemelidir.

Et ve balık ürünlerinde gıda katı maddesi olarak kullanılan nitrat ve nitritlerin miktarı da en düşük seviyede tutulmalı ve devamlı kontrol edilmelidir. Böylece temasın azaltılması ile risk azaltılabilir.

I.10. Nitrat ve Nitrit Tayini için Analitik Yöntemler

I.10.1. Nitrat Tayin Yöntemleri

I.10.1.1. Spektrofotometrik Yöntemler

a. Fenolik bir Grubun Nitrolanması :

En çok kullanılan fenol disülfonik asitin nitrolanması esasına dayanan spektrofotometrik tayinlerdir (91, 92). Türk Standartları Enstitüsü sularda nitrat tayini için bu yöntemi vermektedir (93). Bunun yanısıra ksilenollerin (94) ve kromotropik asitin (95 - 97) nitrolanmaları yöntemleri de bulunmaktadır. Ana ilke; nitratların derişik sülfürik asit ile nitrik aside hidroliz olabilmeleridir. Oluşan nitrik asit, fenoldisülfonik asidi, ksilenolü veya kromotropik asidi nitro

türevlerine çevirir. Bu nitro türevlerinin alkali tuzları renkli bileşikler olup, spektrofotometre ile görünür bölgede ölçülebilir.

b. Organik bir Bileşiğin Nitratlar Tarafından Oksidasyonu :

Bu yöntem için değişik organik belirteçler kullanılmıştır. Brusin (98) ve difenilamin (99, 100) bunların en çok bilinenleridir. Ayrıca striknidin (101) ve biantronil (102) de kullanılmıştır.

c. Nitratın Nitrite İndirgenmesi :

Nitrat, nitrite hidrazin (103), çinko (104 - 106), nitrat - redüktaz enzimi (107, 108) ve kadmiyum (109) ile indirgenir, nitrit, I.10.2.1. de anlatıldığı şekilde diazolama-kenetleme reaksiyonu ile oluşan azo boyar maddelerin spektrofotometrik analizi ile tayin edilmektedir.

d. Ultraviyole Spektrofotometrik Analiz:

Nitratların perklorik asitteki çözeltileri 210 nm'de ölçülebilen ultraviyole absorpsiyon spektrumuna sahiptirler (110).

I.10.1.2. Nitratın Amonyaka İndirgenmesi

(Kjeldahl Yöntemi)

Bu yöntemde nitrat, sülfonik asit ve katalizörler yardımı ile amonyum sülfata çevrilir ve kuvvetli baz ilavesiyle oluşan amonyak distile edilir ve normalitesi ve miktarı bilinen bir asit ilavesinden sonra geri titre edilir (111).

I.10.1.3. Geri Titrasyon (Redoks reaksiyonu)

Nitrat iyonu, aşırı miktarda indigo karmin belirteci ile sülfürik asit ortamında reaksiyona sokulur. Reaksiyona girmeyen indigo karmin potasyum permanganat çözeltisi ile geri titre edilir (112). Indigo karminin reaksiyona girmesi, sıcaklık, reaksiyon şartları ve sülfürik asit reaksiyonuna bağlıdır ve yine potasyum permanganatın indigo karmin ile titrasyonu sıcaklık ve pH'ya bağlıdır.

I.10.1.4. Diğer Yöntemler

Bunlar, polarografi (113, 114), selektif iyon elektrodu yöntemi (115 - 117) ve zorlanmış akım sıvı kromatografisi yöntemleridir (118).

I.10.2. Nitrit Analiz Yöntemleri

I.10.2.1. Spektrofotometrik Yöntemler

a. Diazolama-Kenetleme Reaksiyonları :

Bir aromatik aminin diazolanması ve oluşan bu diazo bileşiğinin bir naftalen türevidir ile renkli azoboyar madde oluşturmasına dayanır. Kullanılan diazolama ajanları; Sülfanilik asit (119), sülfanilamid (120), p-nitroanilin (121), 4-aminoasetofenon (122), 4-aminofenil trimetilamonyum (104) dur. Kenetleme belirteci olarak ise 1-naftilamin (123), N-1-naftiletildiamin (120), N, N-dimetil-1-naftilamin (104), azulen (121), N-fenil-1-naftilamin, N-fenil-2-naftilamin (122), 1-naftilamin sülfonik asit (124) kullanılır.

Bütün bu belirteçlerin amacı aynı olup azoboyar madde oluşturmaktır. Ancak önemli olan, kompleksin veya belirtecin dayanıklılığı, kompleksin oluşma hızı ve renk şiddeti farklılıkları veya bazı arilaminlerin karsinojenitesidir.

b. Organik Moleküllerin Oksidasyonu :

Nitrit, tiyoüre ile asit ortamda reaksiyona girince oluşan tiyosiyamik asit, ortama eklenen Fe(III) ile tiyosiyanat kompleksini oluşturur. Bu kompleksin 455 nm'de absorbanası ölçülerek nitrit miktarı bulunabilmektedir (125).

c. Serbest Radikal Kromojenlerin Oluşturulması:

Çok çeşitli belirteçlerden nitröz asit ile elde edilen serbest radikal kromojenlerin spektrofotometrik olarak ölçümleri yöntemidir. Kullanılan belirteçler; fenotiyazin, 1-metil-2-kinolazin, N, N, N', N'-tetrametilbenzidin, N, N, N', N'-tetrametil-4, 4'-diamino tiyobenzofenon olabilmektedir (126).

I.10.2.2. Diğer Yöntemler

Polarografi (114) ve zorlanmış akım sıvı kromatografisi (118), nitrit tayin yöntemi olarak kullanılabilir.

II. DENEYSEL KISIM

II.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyak	(Merck)
Çinko	(Merck)
Çinko sülfat	(Horasan)
Hidroklorik asit	(Merck)
Kadmiyum sülfat	(Riedel)
N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorür	(Fluka AG, Buchs SG)
Potasyum ferro siyanür	(Merck)
Sodyum klorür	(Merck)
Sodyum nitrat	(Merck)
Sodyum nitrit	(Riedel)
Sülfanilamid	(Merck)

II.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Cam kolon	(1.2 x 30 cm boyutlarında, musluklu)
Çalkalayıcı	(Mas Laborteknik)
Blender	(Waring)
Magnetik karıştırıcı	(Heidolph)
pH metre	(Beckman)
Spektrofotometre	(Hitachi 181)

II.3. Nitrat ve Nitrit Tayin Yöntemi

Nitrit miktar tayini, bir diazolama-kenetleme reaksiyonunu takiben oluşan azo boyar maddenin spektrofotometrik olarak ölçümü ile yapılmıştır.

Nitrat miktar tayini ise, bir kadmiyum indirgeme kolonundan geçirilerek nitrite indirgenmeyi takiben aynı yöntemle yapılmıştır.

II.3.1.Kullanılan Çözelti ve Belirteçler

- Carrez I Çözeltisi : 150 g potasyum ferro siyanür ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) distile suda çözülür, çözelti 1000 ml'ye tamamlanır.

- Carrez II Çözeltisi : 300 g çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) distile suda çözülür, çözelti 1000 ml'ye tamamlanır.

- 0.1 N Hidroklorik Asit Yıkama Çözeltisi .

- Kadmiyum Sülfat Çözeltisi : 100 g kadmiyum sülfat distile suda çözülür, çözelti 500 ml'ye tamamlanır.

- Kenetleme Belirteci : 0.5 g N-(1-naftil)-etilen-diamin dihidroklorür 100 ml distile suda çözülür (Buzdolabında saklanmalıdır)

- Sodyum Klorür Çözeltisi : 100 g sodyum klorür 500 ml distile suda çözülür.

- Sodyum Nitrat Stok Çözeltisi : 0.1848 g sodyum nitrat distile suda çözülür, 5 ml tampon çözelti eklenir ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- Sodyum Nitrit Stok Çözeltisi : 0.15 g sodyum nitrit distile suda çözülür, 5 ml tampon çözelti eklenir ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- Sulfanilamid Belirteci : 1.25 g sulfanilamid 250 ml %18.75 lik hidroklorik asit çözeltisinde (1 kısım der. HCl + 1 kısım distile su) çözülür.

- Tampon Çözelti : (pH = 9.6 - 9.7) 500 ml distile suya 20 ml derişik hidroklorik asit ve 50 ml derişik amonyum hidroksit çözeltisi eklenir, çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

- Seyreltik Tampon Çözelti : 100 ml tampon çözelti distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

[Tüm çözeltilerin hazırlanmasında ve tüm yıkama ve analitik işlemler boyunca kullanılan distile su, bidistile sudur. Mascarini FA 60 aletinden geçirilmek suretiyle 0.1 ^{µm}dan daha saf olarak elde edilmiştir.]

II.3.2.Nitrit Tayin Yöntemi

II 3.2.1. Nitrit Absorpsiyon Spektrumu

II.3.1. de verildiği şekilde hazırlanan sodyum nitrit stok çözeltisinden 25 ml alınır, 100 ml'lik balonjojeye konur, 1 ml tampon çözelti, 1 ml Carrez II çözeltisi ve 1 ml Carrez I çözeltisi eklenir. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır, 10 dakika süreyle arasıra çalkalanarak bekletilir. Whatman NO: 42 süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntünün 4 ml'si 100 ml'lik bir balonjojeye alınır. 5 ml tampon çözelti eklenip distile su ile 100 ml ye tamamlanır. Bu çözeltinin 10 ml'si 25 ml'lik bir balonjojeye aktarılır ve 2.5 ml sulfanilamid belirteci eklenip, karıştırılır. 3 dakika bekletilir. 1 ml

kenetleme belirteci eklenir ve çözelti 25 ml'ye distile su ile tamamlanır. 20 dakika bekletilir.

10 µg/25 ml NO₂⁻'e eşdeğer konsantrasyonda hazırlanan bu çözeltinin 400 ila 600 nm arasında köre karşı çizilen absorpsiyon spektrumu Şekil 4'de görülmektedir. λ_{max} = 540 nm olarak belirlenmiştir.

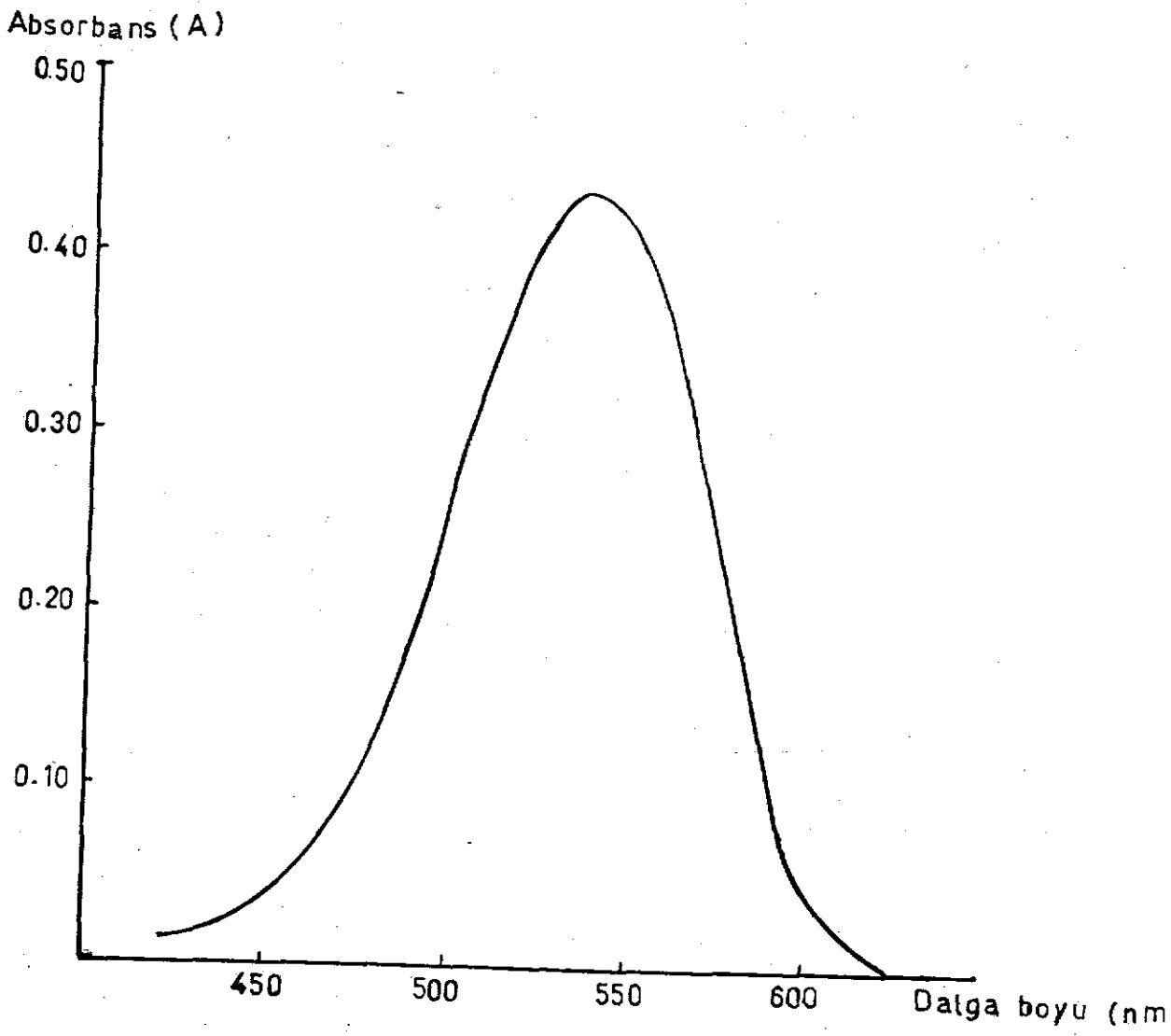
II.3.2.2. Nitrit Standart Eğrisi

Sodyum nitrit stok çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 12.5, 25 ve 32.5 ml alınarak 100'er ml'lik balonjojelere aktarılır ve distile su ile yaklaşık 50 ml'ye tamamlanır. Her bir çözeltiliye II.3.2.1. de anlatılan işlemler uygulanır ve elde edilen çözeltilerin absorpsiyonları 540 nm'de köre karşı ölçülür. Bulunan değerler konsantrasyona (1, 2, 3, 5, 10, 13 µg NO₂⁻/25 ml) karşı grafiğe geçirilerek standart eğri hazırlanır. Şekil 5'de NO₂⁻ standart eğrisi görülmektedir.

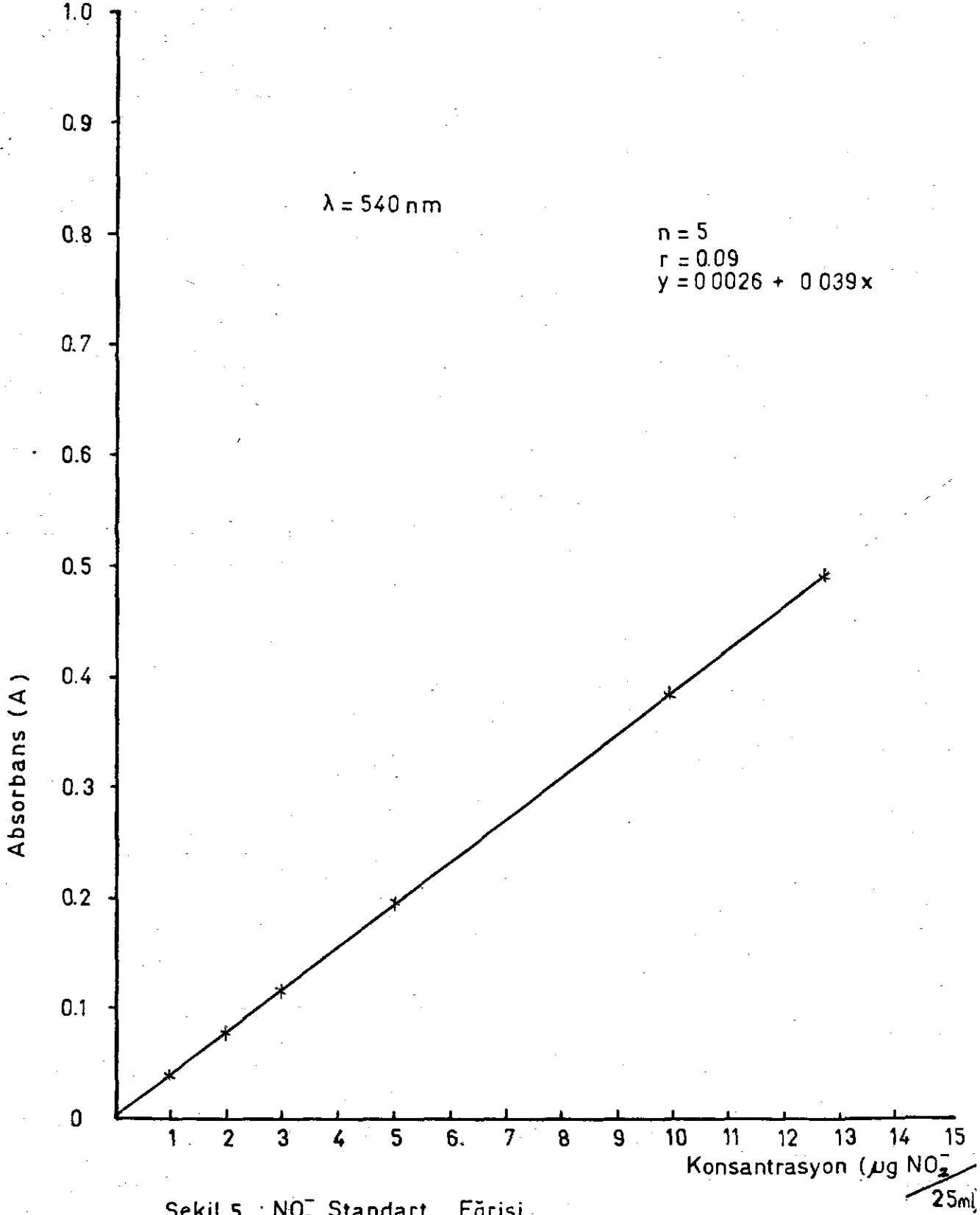
II.3.3. Nitrat Tayin Yöntemi

II.3.3.1. İndirgeme Kolonlarının Hazırlanması

500 ml %20 lik kadmiyum sülfat çözeltisine 100 g granül halindeki çinko atılır. 3 saat süreyle reaksiyona bırakılır. Bu sürenin sonunda granüllerin üzerinde oluşan metalik kadmiyum kazınır, alınır. Blendera konur, 500 ml distile su eklenir, yüksek hızda 2 saniye karıştırılarak parçalanır. Elde edilen ince metal parçaları 20 No'lu elek üzerinde distile su ile yıkanır ve 36 No'lu elek üzerinde kalan 20 - 40 mesh büyüklüğündeki kadmiyum partikülleri toplanır. Elde edi-



Şekil 4: NO_2^- Absorpsiyon Spektrumu



Sekil 5 : NO_2^- Standart Eğrisi

25ml

len kadmiyumun çinko içermediği polarografik analiz ile belirlendikten sonra kullanılmıştır. Kadmiyumun polarogramı Ek 1'de verilmiştir.

İç çapı 1.2 cm ve boyu 30 cm olan bir cam kolona distile su doldurulur. Yüksekliği 2 cm olacak şekilde cam pamuğu hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek hafifçe bastırılarak kolonun alt ucuna yerleştirilir. Cam pamuğunun üzerine 7 cm yükseklik tutacak miktarda kadmiyum azar azar, tekdüze olacak şekilde kolon kenarına vurularak yerleştirilir. Musluk açılıp, 25'er ml distile su ile iki kez yıkanır. Kolonlar kullanılmaya kadar sodyum klorür çözeltisi ile doldurularak muhafaza edilir. Kullanılacağı zaman, sodyum klorür çözeltisi akıtılır, 2 kez 25 ml distile su geçirilerek yıkanır, 1 kez seyreltik tampon çözelti ile yıkanır. Kadmiyum düzeyinin 1 mm kadar üzerinde tampon çözelti ile dolu kolona tayini yapılacak örnek çözeltisi dikkatle ilave edilir. Akış hızı 1 ml/dk olacak şekilde örnek kolondan geçirilir.

II.3.3.2. Nitrat Absorpsiyon Spektrumu

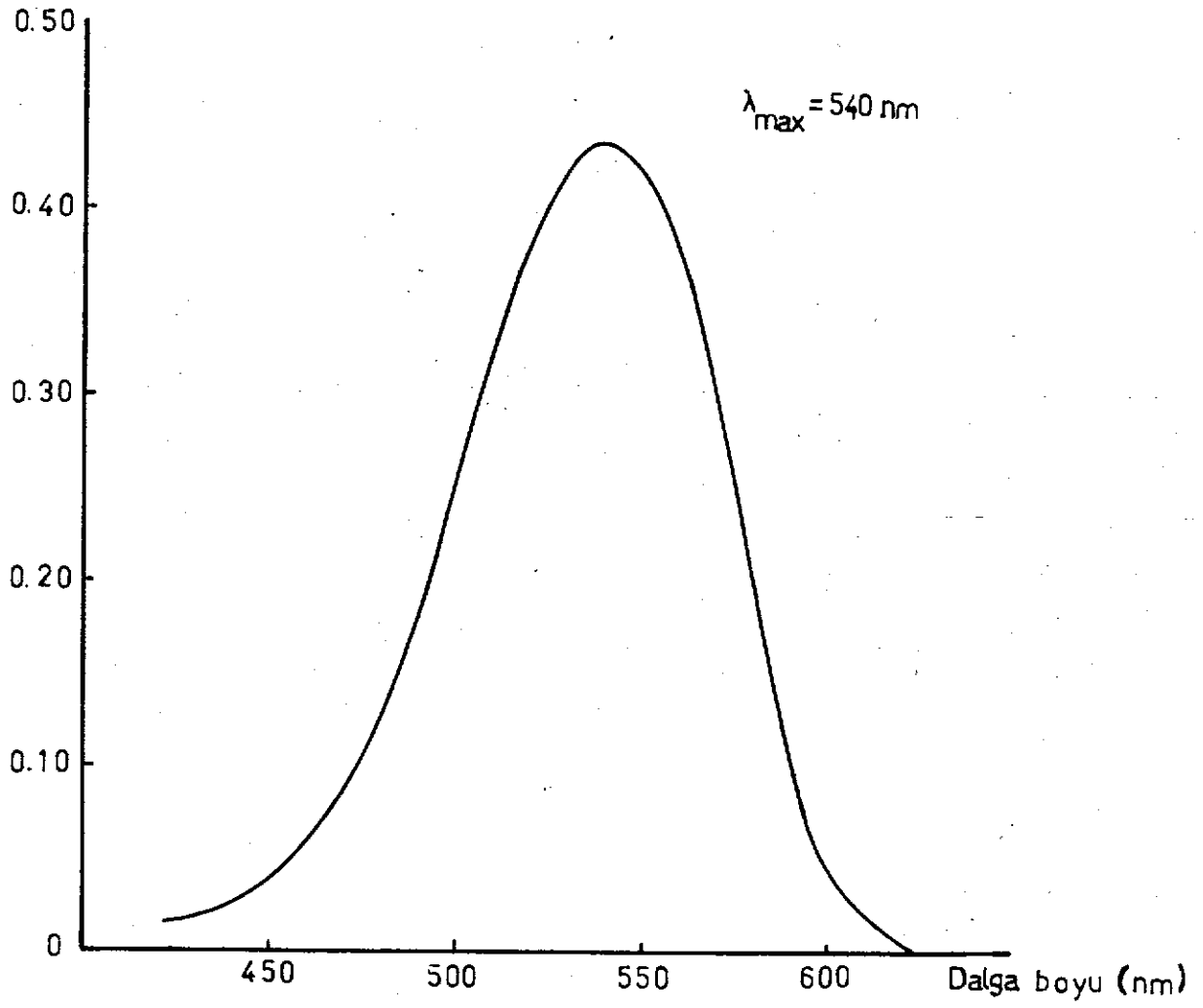
II.3.1'de hazırlanışı verilen sodyum nitrat stok çözeltisinden 25 ml alınarak 100 ml'lik bir balonjojeye aktarılır. 1 ml tampon çözelti, 1 ml Carrez II çözeltisi ve 1 ml Carrez I çözeltisi eklenir. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır, 10 dakika süreyle arasıra çalkalanarak bekletilir. Whatman No: 42 süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntünün 4 ml'si küçük bir behere alınır ve üzerine yaklaşık 20 ml'ye tamamlayacak kadar distile su ilave edilir ve çalkalanır. 5 ml

tampon çözelti eklenip karıştırıldıktan sonra kolondan geçirilir. Kolondan geçen çözelti 100 ml'lik balonjojeye toplanır ve süzüntü 100 ml'ye tamamlanıncaya kadar kolon distile su ile yıkanır. Bu çözeltinin 10 ml'si 25 ml'lik balonjojeye alınır ve 2.5 ml--sülfanilamid belirteci eklenip karıştırılır. 3 dakika bekletilir. 1 ml kenetleme belirteci eklenir ve çözelti distile su ile 25 ml'ye tamamlanır. 20 dakika bekletilir. Böylece 10 µg/25 ml NO₂⁻ 'e eşdeğer konsantrasyonda hazırlanan NaNO₃ çözeltisinin 400 ila 600 nm arasında köre karşı absorpsiyon spektrumu alınır. Şekil 6'da indirgenme kolonundan geçirilen NO₃⁻ 'ın absorpsiyon spektrumu görülmektedir ($\lambda_{max} = 540 \text{ nm}$ 'dir). Bu spektrumun Şekil 4'ten farklı olmaması kadmiyum kolonlarda indirgenme işleminin kantitatif olduğunu göstermektedir.

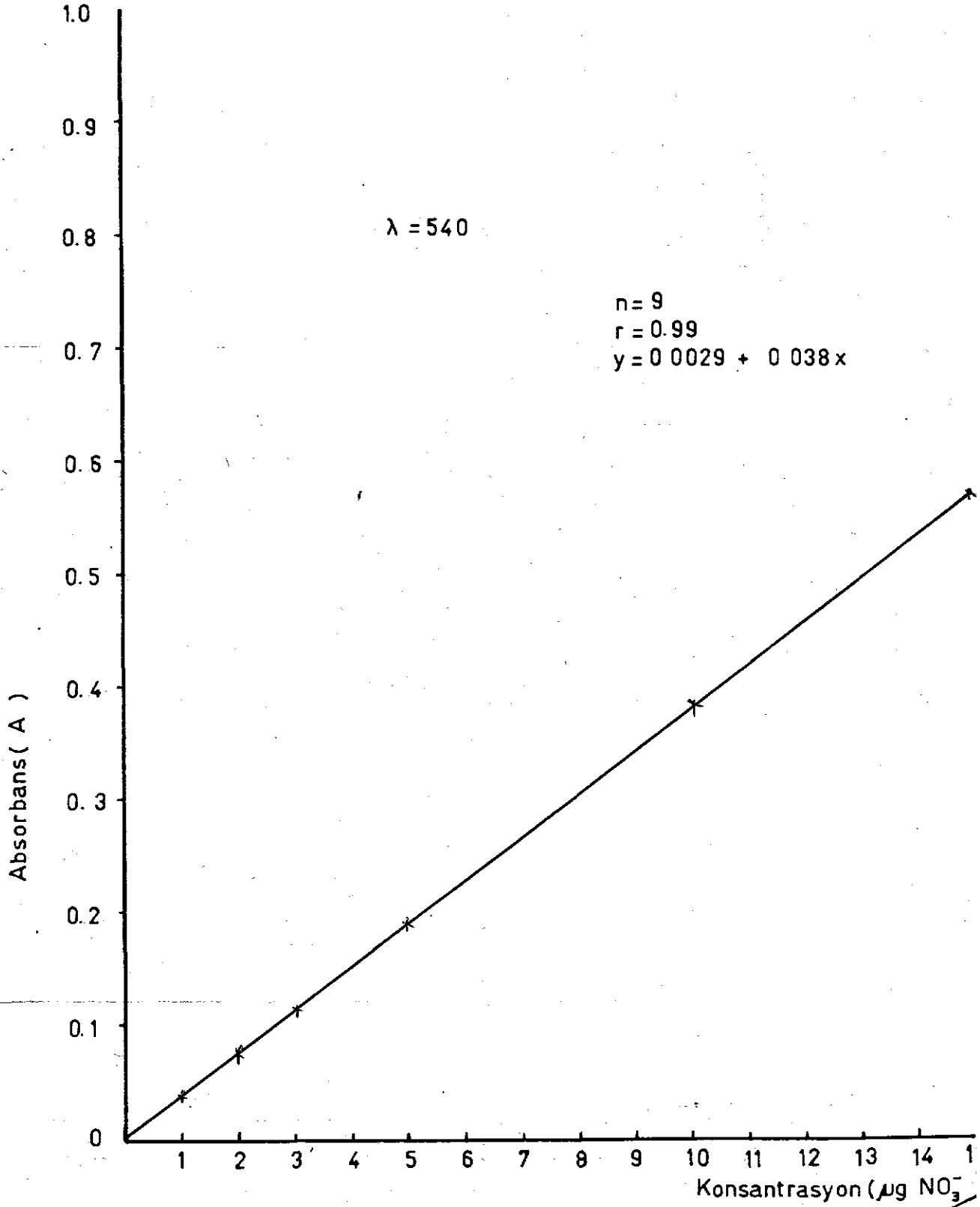
II.3.3.3. Nitrat Standart Eğrisi :

Sodyum nitrat stok çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 25, 37.5 ml alınarak 100'er ml'lik balonjojelere konur. II.3.3.2'de anlatılan işlemler sırasıyla uygulandıktan sonra elde edilen çözeltilerin 540 nm'deki absorpsiyonları köre karşı okunur. Bulunan absorpsiyon değerleri konsantrasyonlara (1, 2, 3, 5, 10, 15 µg/25 ml NO₂⁻ 'e eşdeğer) karşı grafiğe geçirilerek standart eğri hazırlanır. Şekil 7'de NO₃⁻ tayini için hazırlanan standart eğri görülmektedir.

Absorbans (A)



Şekil 6: İndirgeme Kolonundan Geçirilen NO_2^- in Absorpsiyon Spektrumu



Sekil 7 : NO₃⁻ Standart Eğrisi

25ml

II.4. Analitik Yöntemin Standardizasyonu

Nitrit ve nitrat tayini için kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve çeşitli etmenlerin etkilerini araştırmak üzere bir dizi araştırma yapılmıştır.

II.4.1.İndirgeme Kolonlarının Standardizasyonu

II.3.3.1'de verilen yöntemle 3 adet indirgeme kolonu hazırlanmıştır. Bu üç kolonun etkinliklerinin aynı olup olmadığı ve her bir kolonun etkinliğinin tekrarlanabilirliği araştırılmıştır.

II.4.1.1. Kolonların Tekrarlanabilirliği

1, 2, 3, 5, 10 ve 15 $\mu\text{g}/25 \text{ ml NO}_2^-$ 'e eşdeğer konsantrasyonlarda nitrat çözeltileri ile her bir kolonda 3'er deney yapılarak standart eğriler çizilmiştir. Bu deneylere ait veriler Tablo 1'de özetlenmiştir. Sonuçlar kolonların tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Böylece standart eğri olarak her üç kolonun ortalaması kullanılmıştır. Tayinlerde ise her üç kolon birbirinin yerine kullanılabilir. Bu ilk kontrollerden 6 ay sonra 3 ayrı konsantrasyonda NO_3^- çözeltileri ile ve her kolonla 2'şer deney yapılarak kolonların tekrarlanabilirliği tekrar kontrol edilmiştir. Bu deneylerin sonuçları da Tablo 2'de görülmektedir. İstatistiksel değerlendirmeler bu süre içinde de tekrarlanabilirlik olduğunu göstermektedir.

STANDART EĞRİ DENKLEMİ		r [*]
I. KOLON	$y = 0.0026 + 0.037x$	0.999
II. KOLON	$y = 0.0034 + 0.038x$	0.999
III.KOLON	$y = 0.0008 + 0.038x$	0.999
<u>ORT.DEĞER</u>	<u>$y = 0.0029 + 0.038x$</u>	<u>0.999</u>

TABLO 1: Kolonların Tekrarlanabilirliği (1. Kontrol)

STANDART EĞRİ DENKLEMİ		r [*]
I.KOLON	$y = 0.0048 + 0.037x$	0.999
II.KOLON	$y = 0.0046 + 0.038x$	0.999
III.KOLON	$y = 0.0070 + 0.038x$	0.999
<u>ORT.DEĞER</u>	<u>$y = 0.0060 + 0.038x$</u>	<u>0.999</u>

TABLO 2: Kolonların Tekrarlanabilirliği (2. Kontrol)

* r : Korrelasyon katsayısı

II.4.1.2. Kolonların Rejenerasyonu

Kolonlar her kullanımdan sonra 50 ml. (hazırlanışı II.3.1.de anlatılan) seyreltik tampon çözelti ile yıkanır. Her deney günü sonunda (her 4 kez kullanımdan sonra) 25 ml 0.1 N HCl çözeltisi ile bir kez, 25 ml distile su ile iki kez ve en son 25 ml seyreltik tampon çözelti ile yıkanır.

II.4.2.Berraklaştırıcı Ajanların Nitrit Tayinine Etkisi

Buraya kadar anlatılan analitik yöntem sonuçta sebzelerde NO_2^- ve NO_3^- tayininde kullanılacağından ve bitkisel matelyalde çalışırken ekstreyi bulandıran ve renk veren matelyalin uzaklaştırılması zorunlu olduğu için berraklaştırıcı ilavesi yapılmıştır. Berraklaştırıcı ajan olarak kullanılan Carrez I ve Carrez II çözeltilerinin NO_2^- ve NO_3^- miktar tayinlerini etkileyip etkilemediğinin araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Bu amaçla 1, 2, 3, 5, 10 ve 13 $\mu\text{g}/25$ ml konsantrasyonlarda bir dizi NO_2^- çözeltisinin absorbansları berraklaştırıcı ilave edilmeden ve edildikten sonra ölçülerek birbiriyle kıyaslanmıştır.

Ayrıca daha sonraki deneylerde bitkilere daha yüksek oranda berraklaştırıcı ilavesinin gerektiği görüldüğünden berraklaştırıcı miktarının arttırılmasının analitik yöntem etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 3'de görülmektedir. Bu verilerden farkın önemli olmadığına karar verilmiştir.

Kullanılan Standart NO ₂ ⁻ çözü. Kons. (µg/25 ml)	A B S O R B A N S			
	Berraklaştırıcı ilave edilmemiş	Berraklaştırıcı ilave edilmiş		
		2 ml	5 ml	15 ml
1	0.038	0.038	0.039	0.038
2	0.078	0.077	0.078	0.078
3	0.118	0.117	0.115	0.115
5	0.199	0.197		
10	0.405	0.391		
13	0.520	0.501		

Tablo 3: Berraklaştırıcı Ajan İlavesinin Nitrit Tayinine Etkisi

II.4.3. Berraklaştırıcı Ajanların Nitrat Tayinine Etkisi

Nitrit tayinine bir etkisi olmadığı gösterilen berraklaştırıcı ajanların ayrıca nitrat tayininde herhangi bir etkisinin olup olmadığı yapılan deneylerle incelenmiştir. Elde edilen verilerden berraklaştırıcı ajanların nitrat tayinini de etkilemediği sonucuna varılmıştır.

II.4.4. Nitrit ve Nitratın Birbirinin Tayinine Etkisi

Sebzelerde nitrit ve nitrat birarada bulunduğu için birbirlerinin analitik tayinlerini etkileme olasılıklarını inceleme gereği duyulmuştur. Nitrit ve nitratın çalışılan sebzelerde bulunabilme oranları gözönüne alınmış ve buradan en düşük, orta ve yüksek oranlar seçilerek bu oranlarda hazırlanan standart nitrit-nitrat karışımları ile nitrit ve nitrat tayinleri yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4'de özetlenmiştir.

NİTRAT		NİTRİT		NİTRAT NİTRİT	NO ₃ ⁻ TAYINI		NO ₂ ⁻ TAYINI	
μg/25 ml	μg/25 ml	μg/25 ml	VERİM %		BULUNAN NO ₃ ⁻	VERİM %	BULUNAN NO ₂ ⁻	VERİM %
40	2	20	100.43	20	100.43	1.88	94.00	
40	5	8	100.43	8	100.43	4.82	96.52	
40	10	4	101.10	4	101.10	9.67	96.7	
400	2	200	100.41	200	100.41	1.88	94.00	
400	5	80	100.08	80	100.08	4.82	96.52	
400	10	40	99.74	40	99.74	9.75	97.5	
4000	2	2000	100.35	2000	100.35	1.88	94.00	
4000	5	800	100.92	800	100.92	4.82	96.52	
4000	10	400	100.75	400	100.75	9.67	96.7	

TABLO 4: Nitrit ve Nitratın Birbirlerinin Tayinine Etkisi

II.5. Sebzelerde Nitrit ve Nitrat Tayini

II.5.1.Örnekleme

Kışın 12 Aralık 1980 - 9 Şubat 1981, yazın ise 2 - 22 Haziran 1981 tarihleri arasında Ankara'nın çeşitli pazar yerlerinden rastgele örnekleme ile alınan biber, fasulye, havuç, kabak, karalahana, karnabahar, kereviz, kırmızı turp, kıvırcık, lahana, maydanoz, pazı, pırasa, salatalık ve siyah turp sebzelerinde 10'ar adet çalışılmıştır.

II.5.2.Örnek Miktarı

Çalışılan sebzelerden biber, fasulye, havuç, kabak, kereviz, kırmızı turp, pazı, pırasa, salatalık ve siyah turp 1'er kg, kara lahana, karnabahar ve lahana 1'er adet, kıvırcık 2'şer adet, maydanoz ise 3 - 4'er demet alınmıştır.

II.5.3.Ön Hazırlık İşlemleri

Sebzeler alındıkları gün ilk 2 saat içinde ayıklanıp yıkandıktan sonra bidistile su ile iyice yıkanır. Suyu süzül-
dükten sonra bıçakla veya rende ile küçük parçalar haline getirilir ve tekdüze olana kadar karıştırılan her bir sebzededen paralel çalışma için 2'şer örnek ayrılır. 125 g örnek tartılır ve üzerine 5 ml tampon çözelti eklenir. Toplam hacim 250 ml olana kadar distile su ilave edildikten sonra Waring blender'da 30 saniye süreyle kıyılır, bir erlene aktarılır. Çalkalayıcıda 10 dakika çalkalanır ve bir saat kadar sık sık karıştırılarak oda ısısında bekletilir. Üzerine 20 ml Carrez

II çözeltisi ve 20 ml Carrez I çözeltisi ilave edilir ve her ilaveden sonra karıştırılır. 10 dakika bekletildikten sonra Whatman No: 42 süzgeç kağıdından süzülür (Süzüntü A).

II.5.4.Tayinler ve Hesaplamalar

Nitrat ve Nitritin Birlikte Tayini :

10 ml Süzüntü A bir behere alınır, üzerine yaklaşık 10 ml distile su ve 5 ml tampon çözelti eklenir ve karıştırılır. Kolondan geçirilerek 100 ml'lik balonjojeye toplanır ve hacmi tamamlanana kadar kolon distile su ile yıkanır. Bu çözeltiden 20 ml alınarak başka bir 100 ml'lik balonjojeye konur ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (Süzüntü B). Belli bir miktar (d ml) Süzüntü B, 25 ml'lik balonjojeye konur, üzerine 2.5 ml sülfanilamid belirteci eklenir ve karıştırıldıktan sonra 3 dakika bekletilir. Süre sonunda 1 ml kenetleme belirteci ilave edilir ve 20 dakika bekletilir. 540 nm'de köre karşı absorbands değeri ölçülerek miktar tayini yapılır. Bulunan bu değer NO_2^- ve indirgenmiş NO_3^- miktarıdır. NO_2^- miktarı bulunduktan sonra bu toplam değerden çıkarıldığında NO_3^- miktarı hesaplanmış olur.

Nitrit Tayini :

20 ml Süzüntü A 25 ml'lik balonjojeye konur. Üzerine 2.5 ml sülfanilamid belirteci eklenir, 3 dakika bekletilir. 1 ml kenetleme belirteci eklenir, 20 dakika bekletildikten sonra absorbands ölçülür ve buradan nitrit miktarı hesaplanır.

Hesaplamalar :

Nitrit (NO_2^-) miktarı ppm ;

$$\frac{f \times 290}{125 \times 20} = f \times 0.116 = y \text{ ppm } \text{NO}_2^-$$

Nitrat (NO_3^-) miktarı ppm ;

$$\left[\left(\frac{g \times 290 \times 100 \times 100}{10 \times 125 \times 20 \times d} \right) - y \right] \frac{62}{46} = \left(\frac{g \times 116}{d} - y \right) \frac{62}{46}$$

f : NO_2^- tayininde okunan absorbans değerinin NO_2^- standart eğrisinden bulunan konsantrasyon olarak değeri ($\mu\text{g}/25 \text{ ml}$)

g : $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ tayininde okunan absorbans değerinin NO_3^- standart eğrisinden bulunan konsantrasyon olarak değeri ($\mu\text{g}/25 \text{ ml}$)

d : Eluat B'den alınan miktar (ml.)

Hesaplama işlemi ile ilgili bir örnek Ek II'de verilmiştir.

II.5.5.Verim Hesaplaması

Sebzelerde NO_2^- ve NO_3^- tayininde bitkisel materyalden gelebilecek etkileşimler nedeniyle verimin değişip değişmediğinin araştırılması düşünülmüştür. Bu amaçla NO_2^- ve NO_3^- içeriği saptanan iki sebze cinsinde bilinen miktar NO_2^- ve NO_3^- ilavesiyle tayinler yapılmış ve böylece geri elde etme yüzde-leri hesaplanmıştır. Seçilen iki sebzedden biri NO_2^- ve NO_3^- içerikleri düşük olan salatalık, diğeri yüksek olan kıvırcıktır. Sonuçlar Tablo 5'de görülmektedir.

SEBZE	Sebzenin doğal NO ₂ (veya NO ₃) içeriği mg/kg	Eklenen NO ₂ (veya NO ₃) mg/kg	Beklenen mg/kg	Bulunan mg/kg	S _x [*]	S ^{**}	V ^{***}	Verim %
I-SALATALIK	A) NO ₂	0.098	0.198	0.197	4.28x10 ⁻³	6.05x10 ⁻³	3.07	99.49
	B) NO ₃	459.258	0.598	0.549	2.86x10 ⁻³	4.05x10 ⁻²	7.38	91.81
II-KIVIRCIK	A) NO ₂	0.191	1.098	1.003	6.07x10 ⁻³	8.58x10 ⁻³	0.856	91.35
	B) NO ₃	2205.80	40	487.49	1.02	1.446	0.297	97.64
I-SALATALIK	A) NO ₂	0.191	859.26	851.326	0.775	1.095	0.129	99.08
	B) NO ₃	2205.80	1259.26	1235.518	4.013	5.675	0.459	98.11
II-KIVIRCIK	A) NO ₂	0.191	0.391	0.39	5.571x10 ⁻³	7.88x10 ⁻³	2.021	99.74
	B) NO ₃	2205.80	1.191	1.202	1.222x10 ⁻²	1.73x10 ⁻²	1.438	100.92
I-SALATALIK	A) NO ₂	0.191	2.191	2.195	5.199x10 ⁻²	7.35x10 ⁻³	0.335	100.18
	B) NO ₃	2205.80	2805.80	2790.534	1.9	2.687	0.096	99.46
II-KIVIRCIK	A) NO ₂	0.191	3405.80	3367.145	17.59	24.88	0.739	98.87
	B) NO ₃	2205.80	4605.80	4475.409	10.30	14.568	0.326	97.17

★ S_x⁻ : Standart hata

★★ S : Standard sapma

★★★ V : Varyasyon katsayısı

Tablo 5 : Verim Hesaplaması

II.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Standart çözeltilerle ve sebze örnekleriyle yapılan çalışmaların sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Aritmetik ortalamanın standart hatası ayrıca standart sapma, varyasyon katsayısı hesaplanmış, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki sayısal ilişki (regresyon), ilişkinin kuvveti (korrelasyon) ve önemliliği araştırılmıştır. Önem kontrolleri için parametrik testlerden t testi kullanılmıştır.

III. BULGULAR

Farklı zamanlarda yapılan analizler neticesinde sebzelerin NO_2^- ve NO_3^- içerikleri saptanmış, bazı sebzelerde saklama ve haşlama koşullarının etkisi ve NO_2^- ve NO_3^- 'ın sebzelerin farklı kısımlarındaki dağılımı incelenmiştir.

III.1. Sebzelerin Kış Döneminde Ölçülen Nitrit ve Nitrat İçerikleri

Aralık - Şubat aylarında Ankara'nın çeşitli pazar yerlerinden alınan 16 çeşit sebze de 10'ar örnekte çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 6-A ve 6-B de istatistiksel değerlendirmeleriyle verilmiştir.

III.2. Sebzelerin Yaz Döneminde Ölçülen Nitrit ve Nitrat İçerikleri

Kış döneminde analizi yapılan sebzelerden yazın bulunabilen 7 çeşit Haziran ayında yine 10'ar örnekle çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 7-A ve 7-B'de özetlenmiştir.

III.3. Sebzelerde Nitrit ve Nitrat İçerikleri Arasındaki İlişki

III.3.1. Kış Sebzeleri

Kışın çalışılan sebzelerin NO_2^- ve NO_3^- miktarları arasındaki ilişkinin kuvveti ve önemliliği Tablo 8'de görülmektedir.

NİTRİT İÇERİĞİ

SEBZE	Ait ve üst sınırlar $\frac{mg}{kg}$	\bar{x}^1	S_x^{-2}	S^3	V^4
BİBER	0.073-0.168	0.127	0.01	0.03164	24.738
FASULYE	0.081-0.183	0.123	0.008	2.28×10^{-2}	18.537
HAVUÇ	0.016-0.086	0.043	0.007	2.3×10^{-2}	53.488
İSPANAK	0.077-0.298	0.187	0.022	7.206×10^{-2}	38.535
KABAK	0-0.136	0.058	0.013	4.1×10^{-2}	70.69
K. LAHANA	0.132-0.756	0.307	0.056	1.798×10^{-1}	58.567
KARNABAHAAR	0-0.119	0.056	0.011	3.4×10^{-2}	60.714
KEREVİZ	0.08-0.251	0.14	0.019	6×10^{-2}	42.857
K. TURP	0.026-0.140	0.09	0.011	3.6×10^{-2}	40.000
KIVIRCİK	0.043-0.151	0.07	0.01	3.1×10^{-2}	44.286
LAHANA	0.026-0.163	0.084	0.012	3.9×10^{-2}	46.429
MAYDANOZ	0.039-0.296	0.114	0.023	7.2×10^{-2}	63.158
PAZI	0.028-0.195	0.091	0.019	5.8×10^{-2}	63.602
PIRASA	0-0.061	0.038	0.007	2.2×10^{-2}	57.895
SALATALIK	0-0.111	0.021	0.011	3.4×10^{-2}	161.905
S. TURP	0-0.235	0.086	0.02	6.4×10^{-2}	74.419

TABLO 6-A: Sebzelerin Kış Döneminde Ölçülen Nitrit İçerikleri

1: \bar{x} : Aritmetik ortalama

3: S: Standart sapma

2: S_x^{-2} : Standart hata

4: V: Varyasyon katsayısı

SEBZE	NİTRAT İÇERİĞİ				
	Alt ve üst sınırlar mg/kg	\bar{x} ¹	S_x^2	S ³	V ⁴
BİBER	14.212-54.285	36.834	3.853	12.183	33.075
FASULYE	244.931-381.57	351.868	12.941	40.924	11.630
HAVUÇ	4.764-461.065	122.511	53.34	165.514	135.101
İSPANAK	164.805-865.378	398.131	73.819	233.436	58.633
KABAK	268.977-514.928	404.466	26.483	83.746	20.705
K.LAHANA	336.386-1766.003	1156.426	161.776	511.58	44.238
KARNABAHAÇ	0.902-97.365	33.555	10.596	33.508	99.86
KEREVİZ	8.224-781.946	209.162	72.91	230.563	110.232
K.TURP	3.627-961.6	193.158	90.52	286.248	148.194
KIVIRCIK	765.143-2155.29	1394.211	152.492	482.222	34.587
LAHANA	2.574-145.16	69.892	17.113	54.117	77.429
MAYDANOZ	116.185-1313.351	478.492	109.573	346.502	72.415
PAZI	2017.014-3854.45	2912.132	166.183	525.516	18.046
PIRASA	3.461-747.309	189.111	70.762	223.769	118.327
SALATALIK	52.625-169.614	85.848	11.929	37.724	43.943
S.TURP	0-1700.274	647.794	180.463	570.675	88.095

TABLO 6-B: Sebzelerin Kış Döneminde Ölçülen Nitrat İçerikleri

1 : \bar{x} : Aritmetik ortalama 3 : S: Standart sapma

2 : S_x^2 : Standart hata 4 : V: Varyasyon katsayısı

SEBZE	Nitrit İçeriği				
	Alt ve üst sınırlar mg/kg	\bar{x}	S_x^2	S^3	V^4
BİBER	0.116-0.614	0.311	0.459	1.452×10^{-1}	46.688
FASULYE	0.072-0.79	0.228	0.076	2.4×10^{-1}	105.263
KABAK	0.086-0.312	0.141	0.022	6.81×10^{-2}	48.298
KIVIRCIK	0.205-2.86	1.239	0.266	8.42×10^{-1}	67.958
MAYDANOZ	0.14-0.652	0.415	0.065	2.06×10^{-1}	49.639
PAZI	0.093-0.575	0.345	0.041	1.29×10^{-1}	37.391
SALATALIK	0.052-0.161	0.100	0.013	4×10^{-2}	40.000

TABLO 7-A:Sebzelerin Yaz Döneminde Ölçülen Nitrit İçerikleri

1 : \bar{x} : Aritmetik ortalama 3 : S : Standart sapma

2 : s_x^2 : Standart hata 4 : V : Varyasyon katsayısı

SEBZE	Nitrat İçeriği				
	Alt ve üst sınırlar mg/kg	\bar{x}^{-1}	S_x^{-2}	S^3	V^4
BİBER	25.009-112.267	79.503	7.672	24.261	30.516
FASULYE	111.223-633.009	263.431	50.021	158.179	60.046
KABAK	156.815-849.135	324.093	70.896	224.191	69.175
KIVIRCIK	298.211-1419.821	756.179	126.26	399.268	52.801
MAYDANOZ	198.376-1322.621	521.395	121.232	383.368	73.527
PAZI	382.63-1559.403	920.214	96.651	305.638	33.214
SALATALIK	60.56-332.854	186.942	31.198	98.656	52.774

TABLO 7-B: Sebzeilerin Yaz Döneminde Ölçülen Nitrat İçerikleri

¹ : \bar{x} : Aritmetik ortalama ³ : S : Standart sapma

² : s_x^{-2} : Standart hata ⁴ : V : Varyasyon katsayısı

SEBZE	r [*]	t ^{**}	p ^{***}
BİBER	0.179	0.515	p > 0.05
FASULYE	0.640	2.358	p < 0.05
HAVUÇ	0.145	0.414	p > 0.05
ISPANAK	-0.026	-0.074	p > 0.05
KABAK	0.363	1.101	p > 0.05
KARA LAHANA	0.104	0.298	p > 0.05
KARNABAHAHAR	0.036	0.101	p > 0.05
KEREVİZ	-0.501	-1.637	p > 0.05
KIRMIZI TURP	0.025	0.070	p > 0.05
KIVIRCIK	0.492	1.598	p > 0.05
LAHANA	-0.47	-1.506	p > 0.05
MAYDANOZ	-0.345	-1.039	p > 0.05
PAZI	-0.438	-1.378	p > 0.05
PIRASA	-0.09	-0.255	p > 0.05
SALATALIK	-0.082	-0.232	p > 0.05
SİYAH TURP	-0.25	-0.730	p > 0.05

TABLO 8: Kış Sebzelerinde NO₂⁻ ve NO₃⁻ İçerikleri Arasındaki İlişki

* r : Korrelasyon katsayısı

** t : Hesaplanan t değeri

*** p : İlişkinin rastgele olma olasılığı

III.3.2. Yaz Sebzeleri

Sebzelerin yaz döneminde ölçülen NO_2^- ve NO_3^- miktarları arasında ilişki olup olmadığı istatistiksel olarak araştırılmış ve sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

III.4. Kış ve Yaz Sebzelerinde Nitrit ve Nitrat Miktarları Arasındaki Farkın Önem Kontrolü

7 farklı sebzenin kış ve yaz dönemlerinde saptanan NO_2^- ve NO_3^- miktarlarının mevsimsel farklılıklarının önem kontrolü yapılmış, sonuçlar Tablo 10'da gösterilmiştir.

III.5. Haşlama İşleminin Nitrit ve Nitrat Miktarlarına Etkisi

Sebzeler kıyılarak ve kıyılmadan olmak üzere iki şekilde 10'ar dakika haşlanmıştır. Bu şartlarda haşlama suyuna geçen ve sebze kalan NO_2^- ve NO_3^- miktarları ıspanak ve pazı için 2'şer örnekle çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 11-A ve 11-B de verilmiştir.

III.6. Bekletme Süresinin Nitrit ve Nitrat Miktarlarına Etkisi

6 kıvırcık örneği 4 gün süresince oda ısısında (25°C) bekletilmiş ve örneklerin hergün NO_2^- ve NO_3^- miktarları ölçülmüştür. Bekletme süresinin 4 gün olarak kısıtlanmasının nedeni, bu süre sonunda kıvırcık örneklerinin kullanılamayacak hale gelmesidir. Sonuçlar Tablo 12'de yer almaktadır.

SEBZE	★ r	★★ t	★★★ p
BİBER	0.029	0.084	p > 0.05
FASULYE	0.852	4.603	p < 0.01
KABAK	0.010	0.354	p > 0.05
KIVIRCIK	0.309	-1.122	p > 0.05
MAYDANOZ	-0.255	-0.745	p > 0.05
PAZI	0.355	1.074	p > 0.05
SALATALIK	0.479	1.543	p > 0.05

TABLO 9: Yaz Sebzelerinde NO_2^- ve NO_3^- İçerikleri Arasındaki İlişki

- ★ r : Korrelasyon katsayısı
★★ t : Hesaplanan t değeri
★★★ p : İlişkinin rastgele olma olasılığı

SEBZE	NO ₂ ⁻			NO ₃ ⁻		
	t	P	Artış görülen dönem	t	P	Artış görülen dönem
BİBER	-3.903	P < 0.01	YAZ	-4.970	P < 0.001	YAZ
FASULYE	-1.371	P > 0.05	-	1.711	P > 0.05	-
KABAK	-3.248	P < 0.01	YAZ	1.062	P > 0.05	-
KIVIRCIK	-4.391	P < 0.001	YAZ	3.223	P < 0.01	KIŞ
MAYDANOZ	-4.365	P < 0.001	YAZ	-0.262	P > 0.05	-
PAZI	-1.509	P > 0.05	-	10.361	P < 0.001	KIŞ
SALATALIK	-4.639	P < 0.001	YAZ	-3.026	P < 0.01	YAZ

TABLO 10: Yaz ve Kış Sebzelerinde NO₂⁻ ve NO₃⁻ Miktarları Arasındaki Farkın Önem Kontrolü

SEBZE	NİTRİT				
	Standart işleme saptanan içerik (mg/kg)	Kıyılıp - Haşlanmış		Bütün - Haşlanmış	
		Sebzede kalan mg/kg (% miktarı)	Suya geçen mg/kg (% miktarı)	Sezede kalan mg/kg (% miktarı)	Suya geçen mg/kg (% miktarı)
İSPANAK I	0.391	0.244 (62.56)	0.146 (37.44)	0.283 (72.01)	0.110 (27.99)
İSPANAK II	0.210	0.120 (57.14)	0.090 (42.86)	0.162 (76.42)	0.05 (23.58)
PAZI I	0.585	0.313 (51.82)	0.291 (48.18)	0.334 (57.79)	0.244 (42.21)
PAZI II	0.304	0.162 (52.60)	0.146 (47.40)	0.203 (68.93)	0.106 (31.07)

TABLO 1-A: Haşlama İşleminin Nitrit Miktarlarına Etkisi

NİTRAT

SEBZE	Standart işleme saptanan içerik (mg/kg)	Kıyılıp - Haşlanmış		Bütün - Haşlanmış	
		Sebzede kalan mg/kg (% miktarı)	Suya geçen mg/kg (% miktarı)	Sebzede kalan mg/kg (% miktarı)	Suya geçen mg/kg (% miktarı)
İSPANAK I	315.094	151.928 (48.19)	164.199 (52.08)	153.948 (49.36)	157.913 (50.64)
İSPANAK II	280.089	114.413 (41.64)	160.386 (58.36)	149.55 (53.62)	129.383 (46.38)
PAZI I	813.79	221.884 (24.69)	665.532 (75.31)	387.694 (48.19)	416.838 (51.81)
PAZI II	967.150	365.123 (38.02)	595.246 (61.98)	481.047 (50.53)	470.908 (49.47)

TABLO 11-B: Haşlama İşleminin Nitrat Miktarlarına Etkisi.

KIVIRCIK ÖRNEK NO.	NİTRİT				NİTRAT			
	1. gün mg/kg	2. gün mg/kg (% artış)	3. gün mg/kg (% artış)	4. gün mg/kg (% artış)	1. gün	2. gün mg/kg (% azalma)	3. gün mg/kg (% azalma)	4. gün mg/kg (% azalma)
1	0.243	0.263 (8.23)	0.33 (35.80)	0.453 (86.42)	1620.851	1419.821 (12.40)	1383.917 (14.62)	1224.367 (24.46)
2	0.205	0.221 (7.81)	0.234 (14.15)	0.253 (23.42)	1324.197	1280.324 (3.31)	1192.604 (9.94)	1065.011 (19.57)
3	0.146	0.275 (88.96)	0.727 (397.95)	1.015 (595.21)	563.478	530.808 (5.91)	398.478 (29.28)	333.877 (40.75)
4	0.146	0.186 (27.40)	0.229 (56.85)	0.90 (516.44)	713.849	582.808 (18.36)	522.580 (26.79)	457.713 (35.88)
5	0.124	0.154 (24.19)	0.259 (108.87)	0.352 (183.86)	647.290	439.761 (32.06)	251.161 (61.20)	240.614 (62.83)
6	0.106	0.162 (52.83)	0.253 (138.68)	0.298 (180.85)	707.165	668.093 (5.53)	470.921 (33.41)	335.98 (52.50)

TABLO 12: Bekletme Süresinin Nitrit ve Nitrat Miktarlarına Etkisi

III.7. Pazıda Sap ve Yapraklardaki Nitrit ve Nitrat Miktarları

Pazının değişik kısımlarındaki NO_2^- ve NO_3^- miktarlarını araştırmak üzere 2 pazı örneği önce bütün olarak incelendiği gibi yaprak ve saplari da ayrı ayrı incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 13'de görölmektedir.

NİTRİT			
SEBZE	Yaprak +Sap mg/kg	Yaprak mg/kg(% miktarı)	Sap mg/kg(% miktarı)
PAZI I	0.285	0.118 (41.40)	0.167 (58.60)
PAZI II	0.337	0.140 (41.54)	0.197 (58.46)
NİTRAT			
	Yaprak +Sap mg/kg	Yaprak mg/kg(% miktarı)	Sap mg/kg(% miktarı)
PAZI I	949.359	267.892 (28.22)	681.467 (71.78)
PAZI II	825.707	323.677 (39.20)	502.03 (60.80)

TABLO 13: Pazının Sap ve Yapraklarındaki Nitrit ve Nitrat Miktarları

IV. SONUÇ ve TARTIŞMA

IV.1. Kullanılan Analitik Yöntemin Üstünlükleri

Bu çalışmada tarif edilen ve sebzelere uygulanan yöntem, Adriaanse (124) ve Schall (127) yöntemlerinden uyarlanmıştır. Nitrit tayini yöntemi olan bu diazolama-kenetleme reaksiyonu, indirgeme kolonu ilavesi ile nitrat tayininde de kullanılmaktadır. Yapılan araştırmada gerek nitrit gerekse nitrat miktarları aynı yöntem uygulanarak yapılmış olmakla süre, çözücü, kimyasal madde kullanımı yönlerinden avantaj sağlanmıştır. Schall (127)'in metodu yaş ve kuru hayvan yemlerinde nitrat ve nitrit tayini için standart yöntem olarak kabul edilmiştir (128).

Seçilen yöntemde kullanılan diazolama ve kenetleme belirteçlerinin diğerlerine olan üstün yanları, sülfanilamid çözeltisinin dayanıklı oluşu, renk şiddetinin fazla olması nedeniyle ölçümlerin daha duyarlı yapılabilmesi, belirteçlerin saflığı, kolay elde edilebilmesi, oluşan renkli kompleksin 2 saatten az olmamak üzere dayanıklı olması, ve kenetleme kademesinin 20 dakikada tamamlanmasıdır (119, 120).

I.10.1.1. de anlatılan spektrofotometrik nitrat tayin yöntemlerinden fenolik bir grubun nitrolanması gibi direkt nitrolama yöntemleri besin analizlerinde tercih edilmemektedir, çünkü organik maddeler, özellikle karbonhidrat, klorür, ve nitrit, yöntemi interfere eder (54). TSE'nün sularda nitrat tayini için verdiği (93) fenoldisülfonik asit ile reaksi-

yonda ise, meydana gelen bileşiğin sarı rengi, bitkilerden gelen pigmentler tarafından kapatılabilmekte (91) ve ayrıca analiz için fazla miktarda örneğe ihtiyaç olup, konsantre hale gelebilmesi için de buharlaştırma işlemine gerek duyulmaktadır. Bu nedenle de zaman alıcı ve zor bir yöntemdir (96).

Fenoldisülfonik asit yerine ksilenol veya kromotropik asit kullanılmaktadır, ancak ksilenol yöntemi organik solvanla ekstraksiyon ve distilasyon işlemlerinin uygulanmasını gerektirir (97, 105). Ayrıca nitrit ve klorür, yöntemi interfere eder. Kromotropik asit kullanıldığında ise bromat, bromür, klorat, demir (III), ve nitrit, yöntemi interfere edicidir (105, 129).

Organik bileşiklerin nitratlar tarafından oksidasyonu yönteminde ise özgülük yoktur ve yükseltgen maddelerle aynı sonuçlar elde edilir. Ayrıca reaksiyonun güçlüğü ve sıcaklık, çalkalama gibi (99) etmenlere bağımlı oluşu tercih edilmeme nedenleridir (103). Bu grupta en çok kullanılan brusin metodu da oluşan renkli bileşiğin renk şiddetinde farklılık görülebildiği gibi Lambert-Beer Kanununa uymaz (108).

Nitratın, nitrite indirgenmesi için çeşitli bileşikler kullanılır. Hidrazin ile yapılan indirgenme reaksiyonunun en az 8 saat sabit bir sıcaklıkta yürütülmesi gerekir ve toplam 20 saat sürer (130), nitrit miktarının fazla oluşu yöntemi etkiler (131). Çinko tozu bir çok çalışmada indirgeyici ajan olarak kullanılmasına karşın kesin sonuç vermemektedir, çünkü sonuçlar, çinko tozunun partikül büyüklüğüne ve

sağlandığı kaynağa göre değişmektedir (54). Çinko tozu ile verim % 85 - 91 olabilmekte iken kadmium % 97 - 99 olabilmektedir.

I.10.1.2. başlığı altında anlatılan Kjeldahl yöntemi, amino asitler ve albuminoidler de amonyağa indirgendiği için tercih edilmez (111).

I.10.1.3. de anlatılan redoks reaksiyonları özgül ve duyarlı değildirler ve yöntemi interfere eden madde çok fazladır (97, 112).

I.10.2.1. de anlatılan spektrofotometrik nitrit tayini yöntemlerinden organik moleküllerin oksidasyonu, duyarlılığı az olmasına rağmen basit olduğu için uygulanan bir yöntemdir (125), ancak özgül değildir ve yükseltgen ve indirgen maddeler interfere ederler (132). Serbest radikal kromojenlerin oluşturulması yönteminde ise belirteçlerin sentezi uzun sürdüğü ve uğraştırıcı olduğu için tercih edilmemektedir (132).

Bu çalışmada kullanılan yöntemin, Fe(II), Fe(III), Sn(II), Cu(II), Ag(I), Ag(II), Sb(III) ve SO_3^{2-} tarafından interfere edilmediği (124), duyarlılığı ve özgüllüğünün iyi olduğu (121) görülmüştür, ancak herhangi bir hatanın önlenmesi için sıcaklığın, kolondan akış hızının sabit tutulması gereklidir. Ayrıca kolonlardan geçerken ve diazolama-kenetleme reaksiyonu sırasında pH'ya dikkat etmek gerekir. Kolonlardan geçerken indirgenme için en uygun pH = 9,6 (109), diazolama-kenetleme reaksiyonu için ise pH = 2 veya daha düşük olması gerekmektedir (130, 133). Bunun için de kolondan

geçen çözeltinin pH'sı tampon çözelti ile, diazolama reaksiyonunun yapılacağı çözeltinin pH'sı ise sülfanilamid belirteci içindeki hidroklorik asit ile ayarlanmaktadır. Sıcaklık ise 5 - 30°C arasında sonuca etki etmemektedir (134). Kenetleme reaktifi olarak karsinojen olduğu için terkedilen 1-naftilamin yerine N-(1-naftil)-etilendiamin kullanılmıştır, ancak bu maddenin de karsinojenik olabileceği düşünülmektedir (135).

Kullanılan kimyasal maddelerin kolay bulunabilir ve ucuz oluşu ve çözücü olarak distile su kullanılması, basit oluşu, yöntemin diğer üstünlükleridir.

Kolay bir işlemlle elde edilen, metalik kadmiyumun, çinko içermediği polarografik olarak belirlenmiştir (Ek.1). Ayrıca kolonların etkinliği, NO_3^- çözeltisi geçirilip NO_2^- e indirgenmeyi takiben elde edilen çözeltinin absorpsiyon spektrumunun (Şekil 6), NO_2^- spektrumu (Şekil 4) ile aynı oluşu ile gösterilmiştir. λ max'lar aynıdır ve bulunan λ max (540 nm.) başka araştırmalarla uyumludur (127). Ayrıca NO_2^- ve kolondan geçirilen NO_3^- çözeltilerinin standart eğrileri arasında da önemli bir fark yoktur (Şekil 5, ve Şekil 7) ve bu eğriler Lambert-Beer Kanununa uymaktadır. Kolonların tekrarlanabilirliği gösterilmiş ve etkinliklerinde fark olmadığı için (Tablo 1 ve 2) üç kolon birbirinin yerine kullanılmıştır. Kolonların hazırlanışı, temizlenmesi ve rejenerasyonu kolaydır ve 1 yıllık kullanım süresince tıkanma görülmemiştir. Suda çözünen proteinler ve diğer organik maddeler

kolonu tikayabilir (127) ancak 0.1 N HCl ile yıkanma işlemin-
den sonra tekrar aynı etkinlik ve akış hızı elde edilmiştir.

Sebzelerde bulunan askorbik asit nitrit ile etkileş-
mektedir (33, 34) ancak vücuda alınan toplam nitrit miktarı
önemli olduğu düşünülerek askorbik asit ortamdan uzaklaştırıl-
madan nitrit ve nitrat miktarları tayin edilmiştir.

Bitki ekstraktındaki pigmentleri ve bulanıklık veren
materyali çöktürücü olarak ilave edilen potasyum ferro siyanür,
ortamda çinko sülfatın bulunması ile hemen çökelek verir ve
ayrıca potasyum ferro siyanürün çözeltideki nitrit ile reak-
siyona girmesi önlenir (124). Kullanılan berraklaştırıcı ajan-
ların tayin yöntemini önemli ölçüde etkilemediği Tablo 3'te
görülmektedir.

Nitrit ve nitrat'ın birbirlerinin tayinlerine etkisi
değişen oran ve konsantrasyonlarda araştırıldığında, Tablo
4'de görüldüğü gibi önemli bir etki gözlenmemiştir.

Bitkilerde doğal olarak bulunan oranlarda nitrit var-
lığında nitrat tayini ortalama %100.42 ile yapılırken, nitrat
varlığında nitrit, % 94 - % 97.5 verimle (ort. % 95.93) ya-
pılabilmektedir. Ancak % 4.07 lik verim kaybı yapılan araş-
tırma koşulları içinde önemli bulunmamış, bu nedenle herhangi
bir düzeltme faktörü kullanılmamıştır. Ayrıca bitkisel mater-
yalde yapılan tayinlerde verim hesabı, NO_2^- ve NO_3^- düzeyleri
en düşük ve en yüksek iki sebze örneği ile yapılmıştır. Tablo
5 de görülen oldukça uyumlu ve yüksek verimler diğer verilerle
birlikte kullanılan yöntemin duyarlı, kesin ve doğru bir yön-
tem olduğunu göstermektedir.

IV.2. Sebzelere Edilen Sonuçlar

Aralık-Şubat aylarında yapılan nitrit ve nitrat tayinlerinin sonuçları, Tablo 6-A ve Tablo 6-B de görüldüğü gibi 10'ar örnekle çalışılan 16 çeşit sebzenin hemen hepsinde geniş varyasyon göstermektedir. Aynı durum, yaz aylarında yapılan ve Tablo 7-A ve Tablo 7-B deki verilerde de görülmektedir. Kış aylarındaki en düşük varyasyon gerek nitrit gerekse nitrat için fasulyede görülmektedir. (NO_2^- : 18.54, NO_3^- : 11.63). Yaz aylarındaki en düşük varyasyon ise, nitrit için pazıda (37.39), nitrat için biberde (30.52) görülmektedir. Yaz ve kış tabloları karşılaştırıldığında genel bir değerlendirme ile kış aylarındaki varyasyonların (NO_2^- : 18.54-161.91, NO_3^- : 11.63 - 148.19) yaz aylarındaki varyasyonlardan (NO_2^- : 37.39 - 105.26, NO_3^- : 30.52 - 73.53) büyük olduğu görülmüştür. Varyasyonların bu derece büyük oluşu sebzelerin yapay gübreleme, güneş ışığı, sıcaklık, nem miktarı, olgunluk gibi (Başlık I.5.3) bitkilerdeki nitrat birikimini etkileyen faktörlerin önemini ortaya koymaktadır. Yapılan diğer çalışmalarda da sebzelerde benzer nitrat miktarları bulunmuştur (Tablo 14). Nitrit miktarlarının düşüklüğü ise yine başka çalışmalarla uygunluk göstermektedir (48).

Nitrat ve nitrit içerikleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde, fasulye dışındaki sebzelerde tam bir ilişki olmadığı görülmektedir (Tablo 8). Fasulye'nin nitrat ve nitrit içeriği arasındaki ilişki hem kış hem yaz aylarında bulunduğu için rastlantı sonucu olduğu söylenemez.

NİTRAT MİKTARLARI (mg/kg)							
SEBZE	KAYNAK NO	45	46	47	48	50	51
BİBER			110-352	80-180	62		
FASULYE			132-273	160-320			
HAVUÇ	442	18	18	80-320			
ISPANAK		238	238	220-2460	2220		207-2865
KABAK		0	0				
KARNABAHAH		53	53	120-670			
KEREVİZ	1212			290-1160			
KIVIRCIK	870-1250	488-893	488-893		1100-1400		
LAHANA		158-471	158-471	30-520	784		
MAYDANOZ		1698	1698	200-2460			86.4-654.4
PAZI				260-860			
PIRASA				20-300	24		
SALATALIK	121			280-540			
TURP			1250-1734				

TABLO 14 : Faydalanılan Kaynaklardaki Nitrat Miktarları

Buradan görüldüğü gibi NO_2^- oluşumu sadece NO_3^- 'in yüksek miktarlarda oluşuna bağlanamaz. Nitrit'in amonyağa indirgenmesi (2) veya aminlerle birleşerek nitrozamin oluşturması (6,7), yüksek nitrat miktarlarına karşın, düşük nitrit'e neden olabileceği düşünülebilir.

Sebzelerin saptanan nitrat ve nitrit miktarlarının, kış ve yaz dönemleri değerleri kıyaslandığında görülmektedir ki nitrit miktarları yazın artmakta, nitrat miktarları ise biber ve salatalık için yazın, kıvırcık ve pazı için kışın yükselmektedir. Pazı için alınan sonuçlar bu konuda yapılan bir araştırma ile uygunluk göstermektedir (50). Kış aylarında sebzelerin daha yüksek nitrat içermelerinin beklenmesine (50) rağmen biber ve salatalıkla yazın yükselmesi, iklim şartlarının yanısıra olgunlaşma döneminde aşırı gübreleme, su eksikliği, beslenme bozukluğu, kimyasal işlemlerle bitkinin zarar görmesi gibi diğer faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir.

İspanak ve pazı değişik şekillerde haşlanıp sebze kalan ve suya geçen nitrat ve nitrit miktarları hesaplanmıştır. Isı ile NO_3^- ve NO_2^- in değişmediği ancak suya geçtiği (136,137) Tablo 11'de görülmektedir. Bu veriler ortalama olarak değerlendirildiğinde, kıyılarak haşlanan ıspanakta suya geçen oran NO_2^- için % 52.17, sebze kalan % 47.83 iken NO_3^- için sırasıyla % 55.22 ve % 44.92 dir. Oysa bütün halde haşlandığında suya geçen oran NO_2^- için % 25.79, NO_3^- için % 48.51 olmaktadır. Sebze kısmında ise % 74.21 NO_2^- ve % 51.49 NO_3^- kalmaktadır.

Pazıda da yine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu veriler göstermektedir ki; Sebzeler haşlandıkları zaman, önemli miktarlarda NO_2^- ve NO_3^- sebze suyuna geçmekte, ayrıca kıyılarak haşlandığında bütün halde haşlanmaya kıyasla suya geçen miktar daha fazla olmaktadır. O halde küçük bebeklere sebze püresi hazırlanırken, yüksek miktarlarda nitrit ve nitrat içeren sebzelerin kullanılması halinde kıyılıp haşlandıktan sonra suyunun atılarak verilmesi, methemoglobinemi riskini azaltma açısından düşünülebilir.

Sonuçlara göre en yüksek miktarlarda nitrat içeren pazı (2912.13 ppm); kıvırcık (1394.21 ppm) ve karalahana (1156.43 ppm), arasında kıvırcık ayrı bir önem taşımaktadır. Zira yaz, kış hem çok tüketilen hem de çiğ yenen bir sebzedir. Ayrıca tüketilmeden önce gerek satıcıda, gerekse alındıktan sonra evlerde bekletilebilmektedir. Bunlar gözönüne alınarak, kıvırcık örneği oda ısısında 4 gün bekletilmiş, her gün NO_3^- ve NO_2^- miktarları tayin edilmiştir (Tablo 12). Kararlı bir artış olmamasına rağmen NO_2^- miktarları (ortalama olarak) ikinci gün % 34.9, üçüncü gün % 125.38, dördüncü gün % 264.37 artmıştır. NO_3^- miktarı ise, ikinci gün (ortalama) % 12.93, üçüncü gün % 32.50, dördüncü gün % 39.33 azalma göstermektedir. Böylece başka araştırmalarda da saptandığı gibi (11, 137) nitrat miktarı azalırken, nitrit miktarı yükselmektedir.

Oda ısısında bekletme sırasında bakteriyel etki ile NO_3^- , NO_2^- 'e indirgenebilmektedir. Kıvırcık örneğinde görüldüğü gibi NO_2^- miktarı % 264.37 oranında artabilmektedir. Buna göre

NO_3^- miktarı yüksek olan sebzelerin bekletme sırasında bakterilerin etkisi ile tehlikeli miktarlarda NO_2^- içerebildikleri gözönünde tutulmalı ve sebzelerin günlük tüketilmesine özen gösterilmelidir.

Ayrıca azalan nitrat miktarının, artan nitrit miktarına göre daha fazla oluşu, yine nitrit'in amonyağa indirgenmesi veya nitrozamin oluşturması olasılıklarını düşündürmektedir.

Pazı'nın sap ve yapraklarının ayrı ayrı incelenmesi ile Tablo 13'de görüldüğü gibi nitrat'ın ortalama % 66'sı, nitrit'in ise ortalama % 58.5'i sap kısmında bulunmuştur. Nitrat ve nitrit miktarlarının yaprakta daha düşük olması pazının sap kısmının atılarak geri kalan kısmın kullanılmasının daha uygun olacağını göstermektedir.

Sonuç olarak, bazı sebzelerin nitrat içerikleri oldukça yüksek bulunmuştur. Ancak bu, nitrit miktarlarının da yüksek olacağını göstermemektedir. Sebzelerle alınan nitratın ne ölçüde önemli olduğu ise şöyle açıklanabilir ; 2155.29 mg/kg nitrat içeren kıvırcık örneğinden 250 g kadar yendiğinde yaklaşık 550 mg nitrat alınmış olur. 178 mg/lt nitrat içeren kuyu suyundan (14) da 2 litre içildiğini varsayarsak toplam 906 mg nitrat alınır. Nitratın günlük tüketim miktarı 5 mg/kg vücut ağırlığı olarak sınırlandırılmış olduğu (20) gözönünde tutulursa, et ürünleri ve diğer kaynaklar bir yana bırakıldığında sadece içme suyu ve kıvırcık ile toksik seviyelere çıkabileceği görülmektedir. 10 kg'lık bir bebek için günlük alınabilecek nitrat miktarı 50 mg'dır. Nitrat içeriği 3850 mg/kg

olan pazıdan yaklaşık 13 g; 2155 mg/kg olan kıvırcıktan 23 g; 865 mg/kg olan ıspanaktan 58 g yenmesi ile bu değere ulaşılmaktadır. Ancak bu sebzelerle birlikte askorbik asit alındığında, askorbat anyonu nitrit ile reaksiyona gireceğinden nitrit ile nitratın toksik etkilerinin önemli ölçüde azaltılabileceği düşünülebilir.

Kötü saklama koşullarında (veya midede) nitratların nitritlere indirgenerek methemoglobinemi yapması veya aminlerle birleşen nitritin karsinojenik nitrozaminlere dönüşmesi, sebzelerin nitrat ve nitrit içeriklerinin önemini ortaya koymaktadır. Ancak daha sağlıklı sonuçlara varabilmek için sebzelerde nitrozamin miktarlarının da tayin edilmesi gerekmektedir. Bir ön çalışma olarak ele alınan bu araştırmanın, besin maddelerinde nitrozamin oluşumu ve düzeylerinin incelenmesi çalışmalarına yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

ÖZET

Günlük diyetimizin önemli bir bölümünü oluşturan 16 farklı sebze de nitrat ve nitritin miktarlarını saptamayı amaçlayan bu araştırmada, analiz yöntemi olarak nitrit tayini esasına dayanan, spektrofotometrik bir yöntem kullanılmıştır. Materyalin nitrat içeriği bir kadmiyum indirgeme kolonu kullanılarak nitrite indirgenmeyi takiben saptanmıştır.

Farklı zamanlarda Ankara çevresinden sağlanan farklı sebzelerin nitrat ve nitrit içerikleri saptanmış, nitrat miktarları kış aylarında yüksek bulunmuştur. Yaz aylarında ise genellikle nitrit miktarları kışa oranla daha yüksektir.

Ayrıca nitrat ve nitrit içeriklerinin bekletme ve haşlama işlemleri ile değişimi ve sebzenin farklı kısımlarındaki dağılımı incelenmiştir.

Sonuç olarak, basit, duyarlı, kesin ve doğru bir yöntemle sebzelerin nitrat ve nitrit içerikleri saptanmış, haşlama ve saklanma koşullarının etkisi incelenerek karsinojen nitrozamin oluşması ya da methemoglobinemiye neden olması bakımlarından öngörüşel olarak değerlendirilmiştir.

SUMMARY

A spectrophotometric method which is based on nitrite detection was used as a method of analysis in this research, objective of which was the determination of nitrates and nitrites in 16 species of vegetables which comprise an important part of our daily consumption.

Determination of the nitrate contents of the material was preceded by reduction to nitrite by passing through a cadmium reduction column.

The nitrate and nitrite contents of different vegetables, taken at varying times in Ankara, was determined and the nitrate contents were observed to be much higher in winter, whereas nitrite contents were observed to be relatively higher in summer.

In conclusion, nitrate and nitrite contents of vegetables and the effect of storage and cooking conditions were determined by using a simple accurate sensitive and a precise method. And finally effect of nitrite contents of diet on the formation of carcinogenic nitrosamines and/or development of methemoglobinemia was hypothetically evaluated.

KAYNAKLAR

1. Wolff, I.A., Wasserman, A.E., Nitrates, nitrites and nitrosamines, *Science*, 177, 15(1972).
2. Achtzehn, M.K., Hawat, H., Zur Nitritbildung in Gemüse und Gemüsezubereitungen. 1. Mitt Rohspinat, *Die Nahrung*, 14, 383(1970).
3. Comly, H.H., Cyanosis in infants caused by nitrates in well water, *J. Am. Med. Assoc.*, 129, 112(1945).
4. Knotek, Z., Schmidt, P., Pathogenesis, incidence and possibilities of preventing alimentary nitrate methemoglobinemia in infants, *Pediatrics*, 34, 78(1964).
5. Phillips, W.E.J., Naturally occurring nitrate and nitrite in foods in relation to infant methaemoglobinaemia, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 9, 219(1971).
6. Lijinsky, W., Epstein, S.S., Nitrosamines as environmental carcinogens, *Nature*, 225, 21(1970).
7. Lijinsky, W., Keefer, L., Conrad, E., Van de Bogart, R., Nitrosation of tertiary amines and some biologic implications, *J. Natl. Cancer Inst.*, 49, 1239(1972).
8. Lijinsky, W., Conrad, E., Van de Bogart, R., Carcinogenic nitrosamines formed by drug nitrite interactions, *Nature*, 239, 165(1972).
9. Lijinsky, W., Reaction of drugs with nitrous acid as a source of carcinogenic nitrosamines, *Cancer Res.*, 34, 255(1974).

10. Rao, G.S., N-Nitrosamines from drugs and nitrite:
Potential source of chemical carcinogens in humans?,
Pharm. Int., 1, 187(1980).
11. Lee, C.Y., Shallenberger, R.S., Downing, D.L.,
Stoewsand, G.S., Peck, N.M., Nitrate and nitrite
nitrogen in fresh, stored and processed table beets
and spinach from different levels of field nitrogen
fertilization, J. Sci. Fd. Agric., 22, 90(1971).
12. Heisler, E.G., Siciliano, J., Krulick, S., Porter, W.L.,
White, J.W., Nitrate and nitrite content of market
potatoes, J. Agr. Food Chem., 21, 970(1973).
13. Ridder, W.E., Dehme, F.W., Nitrates as an environmental,
animal and human hazard, Clin. Toxicol., 7, 145(1974).
14. Güray, Ö., Demir, L., İstanbul sularında methemoglobinemi
sebebi olarak nitrat araştırması, Tıp Fak. Mecm., 39,
473(1976).
15. Nichols, M.S., Nitrates in the environment, J. Am.
Water Works Assoc., 57, 1319(1965).
16. Kohl, D.H., Shearer, G.B., Commoner, B., Fertilizer
nitrogen: Contribution to nitrate in surface water in a
corn belt watershed, Science, 174, 1331(1971).
17. Hill, M.J., Hawksworth, G., Tattersall, G., Bacteria,
nitrosamines and cancer of the stomach, Br. J. Cancer,
28, 562(1973).

18. Fox, J.B., Rosemary, A.N., Nitrite in meat. Effect of various compounds on loss of nitrite, *J. Agr. Food Chem.*, 22, 302(1974).
19. Fong, Y.Y., Chan, W.C., Nitrate, nitrite, dimethyl-nitrosamine and N-nitrosopyrrolidine in some Chinese food products, *Food Cosmet. Toxicol.*, 15, 143(1977).
20. Fassett, D.W., "Nitrates and Nitrites", Toxicants Occuring Naturally in Foods, Washington, National Academy of Sciences, 2. baskı (1973), sayfa 7.
21. Walton, G., Survey of literature relating to infant methemoglobinemia due to nitrate-contaminated water, *Am. J. Public Health*, 41, 986(1951).
22. Burris, R.H., "Nitrogen Fixation", Bonner, J., Varner, J.E. (derleyenler), *Pland Biochemistry*, New York - London, Academic Press (1965), sayfa 961.
23. Mirvish, S.S., Formation of N-nitroso compounds : Chemistry, kinetics, and in vivo occurrence, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 325 (1975).
24. Fiddler, W., Persabene, J.W., Doerr, R.C., Wasserman, A.E., Formation of N-nitrosodimethylamine from naturally occurring quaternary ammonium compounds and tertiary amines, *Nature*, 236, 307(1972).
25. Egert, G., Greim H., Formation of dimethylnitrosamine from pesticides carrying methylated tertiary amino groups in the presence of nitrite at pH 3, *Fd. Cosmet. Toxicol.* 14, 193(1976).

26. Gross, R.L., Newberne, P.M., Naturally occurring toxic substances in foods, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 22, 680(1977).
27. Issenberg, P., Nitrite, nitrosamines and cancer, *Fed. Proc.*, 35, 1322(1976).
28. Elespuru, R.K., Lijinsky, W., The formation of carcinogenic nitroso compounds from nitrite and some types of agricultural chemicals, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 11, 807(1973).
29. Khan, S.U., Young, J.C., N-Nitrosamine formation in soil from the herbicide glyphosate, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1430(1977).
30. Sen N.P., Donaldson, B., Charbonneau, C., Miles W.F., Effect of additives on the formation of nitrosamines in meat curing mixtures containing spices and nitrite, *J. Agr. Food Chem.*, 22, 1125(1974).
31. Magee, P.N., Toxicity of nitrosamines, Their possible human health hazards, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 9, 207(1971).
32. Hawksworth, G.M., Hill, M.J., Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines, *Br. J. Cancer*, 25, 520(1971).
33. Mirvish S.S., Wallcave, L., Eagen, M., Shubik, P., Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds, *Science*, 177, 65(1972).

34. Cardesa, A., Mirvish, S.S., Haven, G.T., Shubik, P., Inhibitory effect of ascorbic acid on the acute toxicity of dimethylamine plus nitrite in the rat, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145, 124(1974).
35. Walker, E.A., Pignatelli, B., Castegnaro, M., Effects of gallic acid on nitrosamine formation, Nature, 258, 176(1975).
36. Phillips, W.E.J., Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh and processed spinach during storage, J. Agr. Food Chem., 16, 88(1968).
37. Heisler, E.G., Siciliano, J., Krulick, S., Feinberg, J., Schwartz, J.H., Changes in nitrate and nitrite content and search for nitrosamines in storage-abused spinach and beets, J. Agr. Food Chem., 22, 1029(1974).
38. Sinios Von, A., Wodsak, W., Die Spinatvergiftung des Säuglings, Dtsch. Med. Wschr., 90, 1856(1965).
39. Environmental Health Criteria 5, "Nitrates, Nitrites and N-Nitroso Compounds", World Health Organization, Geneva (1977).
40. Aydın, M., Gıda Kontrolü ve Mevzuatı, Odalar Birliği Matbaası, Ankara (1976), sayfa 62.
41. Bosch, H.M., Rosenfield, A.B., Huston, R., Shipman H.R., Woodward, F.L., Methemoglobinemia and Minnesota well supplies, J. Am. Water Works Assoc., 42, 161(1950).

42. Kübler, D.W., Methämoglobinämien im Säuglingssalter nach Spinatfütterung, Dtsch. Med. Wschr., 90, 1881(1965).
43. Hölscher, P.M., Natzschka, J., Methämoglobinämie bei Jungen Säuglingen durch nitrit haltigen Spinat, Dtsch. Med. Wschr., 89, 1751(1964).
44. Simon, C., Nitrite poisoning from spinach, Lancet, 16, 872(1966).
45. Wilson, J.K., Nitrate in foods and its relation to health, Agron. J., 41, 20(1949).
46. Jackson, W.A., Steel, J.S., Boswell, V.R., Nitrates in edible vegetables and vegetable products, Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 90, 349(1967).
47. Achtzehn, M.K., Hawat, H., Die Anreicherung von Nitrat in den Gemusearten-eine Möglichkeit der Nitratintoxikation bei Säuglingen?, Die Nahrung, 13, 667(1969).
48. Siciliano, J., Krulick, S., Heisler, E.G., Schwartz, J.H., White, J.W., Nitrate and nitrite content of some fresh and processed market vegetables, J. Agric. Food Chem., 23, 461(1975).
49. Ekşi, A., Cemeroğlu, B., Bazı sebze konservelerinde nitrat miktarı üzerinde bir araştırma, Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yıllığı, 27, 155(1977).
50. Cemeroğlu, B., Doğan, A., Pazi yapraklarında nitrat miktarı, Doğa, 2, 72(1978).

51. Tekeli, S.T., Gürses, Ö.L., Türkiye'de yetiştirilen ıspanakların nitrat miktarları üzerinde araştırmalar, Ankara Univ. Ziraat Fak. Yıllığı, 22, 340(1973).
52. Kamm, L., McKeown, G.G., Smith D.M., New colorimetric method for the determination of the nitrate and nitrite content of baby foods, J. Assoc. Off. Agric. Chem., 48, 892(1965).
53. Rammel, C.G., Joerin, M.M., Determination of nitrite in cheese and other diary products, J. Dairy Res., 39, 89(1972).
54. Manning, P.B., Coulter, S.T., Jenness, R., Determination of nitrate and nitrite in milk and dry milk products, J. Dairy Sci., 51, 1725(1968).
55. Dubrow, H., Kabisch, W., Untersuchungen über den Nachweis von Nitraten und Nitriten in Käse, Milchwiss., 15, 543(1960).
56. Von Schulz, M.E., Kay, H., Mrowetz, G., Untersuchungen über das Verhalten von Nitrat im Käse, Milchwiss., 15, 556(1960).
57. Ekşi, A., Doğal ve ticari turunçgil meyve sularında nitrat miktarı ve kalite kontrolü açısından anlamı, Ankara Univ.Ziraat Fak.Yıllığı,25,497(1975)

58. Ekşi, A., Cemeroğlu, B., Doğal ve ticari bazı meyve sularında nitrat miktarı üzerinde araştırma, Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yıllığı, 26, 570(1976).
59. Orgeron, J.D., Martin, J.D., Caraway, C.T., Martine, R.M., Hauser G.H., Methemoglobinemia from eating meat with high nitrite content, Public Health Rep., 72, 189(1957).
60. Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G., Preussman, R., The influence of dietary intake of nitrate on the nitrite content in human saliva: A factor of possible relevance for in vivo formation of N-nitroso compounds, Food Cosmet. Toxicol., 14, 545(1976).
61. Tannenbaum, S.R., Sinskey, A.J., Weisman, M., Bishop, W., Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation, J. Natl. Cancer Inst., 53, 79(1974).
62. Smith, R.P., "Toxic Responses of the Blood", Doull, J., Klassen, C.D., Amdur, M.O. (derleyenler), The Basic Science of Poisons, New York-Toronto-London, Macmillan Pub. Co., 2. baskı, (1980), sayfa 320.
63. Shuval, H.I., Gruener, N., Infant methemoglobinemia and other health effects of nitrates in drinking water, Prog. Wat. Tech., 8, 183(1977).

64. Smith, J.E., Beutler, E., Methemoglobin formation and reduction in man and various animal species, *Am. J. Physiol*, 210, 347(1966).
65. Kociba, R.J., Sleight, S.D., Nitrite toxicosis in the ascorbic acid-deficient guinea pig, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 424(1970).
66. Druckrey, H., Steinhart, D., Beuthner, H., Schneider, H., Klärner, P., Prüfung von Nitrit auf cronisch toxische Wirkung an Raten, *Arzneimittel-Forsch.*, 13, 320(1963).
67. Shuval, H.I., Gruener, N., Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment, *Am.J. Public Health*, 62, 1045(1972).
68. Taylor, H.W., Lijinsky, W., Tumor induction in rats by feeding heptamethyleneimine and nitrite in water. *Cancer Res.*, 35, 812(1975).
69. Alexandrov, V.A., Jänisch, W., Die teratogene Wirkung van Äthylharnstaff und Nitrit bei Ratten, *Experimentia*, 27, 538(1971).
70. Sleight, S.D., Atallah, O.A., Reproduction in the guinea pig as affected by chronic administration of potassium nitrate and potassium nitrit, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12, 179(1968).
71. Sinha, D.P., Sleight, S.D., Pathogenesis of abortion in acute nitrite toxicosis in guinea pigs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 340(1971).

72. Kaudewitz, F., Production of bacterial mutants with nitrous acid, *Nature*, 183, 1829 (1959).
73. Horn, E.E., Herriot, R.M., The mutagenic action of nitrous acid on "single-stranded" (denatured) haemophilus transforming DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 48, 1409 (1962).
74. Verly, W.G., Barbason, H., Dusart, J., Petitpas-Dewandre, A., A comparative study of the action of ethyl methane sulphonate and HNO_2 on the mutation to streptomycin resistance of *Escherichia coli* K 12, *Biochim. Biophys. Acta*, 145, 752 (1967).
75. Marquardt, H., Rufino, F., Weisburger, J.H., Mutagenic activity of nitrite-treated foods: Human stomach cancer may be related to dietary factors, *Science*, 196, 1000 (1977).
76. Siddiqi, O.H., Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*, *Genet. Res.*, 3, 303 (1962).
77. Marriott, W.M., Hartmann, A.F., Senn, M.J.E., Observations on the nature and treatment of diarrhea and the associated systemic disturbances. *J. Pediatr.*, 3, 181 (1933).
78. Ross, J.D., Desforges, J.F., Reduction of Methemoglobin by erythrocytes from cord blood, *Pediatrics*, 23, 718 (1959).

79. Ross, J.D., Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes, *Blood*, 21, 50(1963).
80. Bartos, H.R., Desforges, J.F., Clark, N., Erythrocyte DPNH dependent diaphorase levels in infants, *Pediatrics*, 37, 991(1966).
81. Vigil, J., Warburton, S., Haynes, W.A., Kaiser, L.R., Nitrates in municipal water supply cause methemoglobinemia in infant, *Public Health Rep.*, 80, 1119(1965).
82. Winton, E.F., Tardiff, R.G., McCabe, L.J., Nitrate in drinking water, *J. Am. Water Works Assoc.*, 63, 95(1971).
83. Shearer, L.A., Goldsmith, J.R., Young, C., Kearns, D.A., Tamplin, B.R., Methaemoglobin levels in infants in an area with high nitrate water supply, *Am. J. Public Health*, 62, 1174(1972).
84. Bakshi, S.P., Fahey, J.L., Pierce, L.E., Sausage-cyanosis-Aquired methemoglobinemia nitrite poisoning, *N. Eng. J. Med.*, 277, 1072(1967).
85. Henderson, W.R., Raskin, N.H., "Hot-Dog" headache: Individual susceptibility to nitrite, *Lancet*, 2, 1162(1972).
86. Metcalf, W.K., Sensitivity of haemoglobin to oxidation in various conditions, 190, 543(1961).

87. Magee, P.N., Barnes, J.M., The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine, *Br. J. Cancer*, 10, 114(1956).
88. Swann, P.F., Magee, P.N., Nitrosamine-induced carcinogenesis : The alkylation of N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitroso-urea and ethylmethanesulphonate, *Biochem. J.*, 125, 841(1971).
89. Magee, P.N., Barnes, J.M., Carcinogenic nitroso compounds, *Adv. Cancer Res.*, 10, 163(1967).
90. Zaldivar, R., Wetterstrand, W.H., Further evidence of a positive correlation between exposure to nitrate fertilizers (NaNO_3 and KNO_3) and gastric cancer death rates : Nitrites and nitrosamines, *Experientia*, 31, 135(1975).
91. Johnson, C.M., Ulrich, A., Determination of nitrate in plant material, *Anal. Chem.*, 22, 1526(1950).
92. Taras, M.J., Phenoldisulfonic acid method of determining nitrate in water, *Anal. Chem.*, 22, 1020(1950).
93. TS-266, İçme Suları, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 3. baskı (1972).
94. Holler, A.C., Huch, R.V., Colorimetric determination of nitrates and nitric acid esters, *Anal. Chem.*, 21, 1385(1949).

95. Batten, J.J., Spectrophotometric microdetermination of nitrate with cromotropik asit reagent, Anal. Chem., 36, 939(1964).
96. West, P.W., Lyles, G.L., A new method for determination of nitrates, Anal. Chim. Acta, 23, 227(1960).
97. West, P.W., Ramachandran, T.P., Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropik asit, Anal. Chim. Acta, 35, 317(1966).
98. Fisher, F.L., Ibert, E.R., Beckman, H.F., Inorganic nitrate, nitrite or nitrate-nitrite: Rapid colorimetric determination of microgram quantities in aqueous solution, Anal. Chem., 30, 1972(1958).
99. Kolthoff, I.M., Noponen, G.E., Diphenylamine sulfonic acid as a reagent for the colorimetric determination of nitrates, J. Am. Chem. Soc., 55, 1448(1933).
100. Roberts, A.G., Diphenylamine test for nitrates in mixtures of cellulose esters, Anal. Chem., 21, 813(1949).
101. Westland, A.D., Langford, R.R., Determination of nitrate in fresh water, Anal. Chem., 28, 1996(1956).
102. Nawratil, B., Marcantonatos, M., Monnier, D., A spectrophotometric method for the determination of traces of nitrate. Application to water analysis, Anal. Chim. Acta, 68, 217(1974).

103. Mullin, J.B., Riley, J.P., The spectrophotometric determination of nitrate in natural waters, with particular reference to sea-water, *Anal. Chim. Acta*, 12, 464(1955).
104. Lambert, J.L., Zitomer, F., Differential colorimetric determination of nitrite and nitrate ions, *Anal. Chem.*, 32, 1684(1960).
105. Bhatta, M.K., Townshend, A., Spectrophotometric determination of small amounts of nitrate and nitrite by conversion to nitrotoluene and extraction into toluene, *Anal. Chim. Acta*, 56, 55(1971).
106. Middleton, K.R., Colorimetric determination of nitrate in water as orange I, *Chem. and Ind.*, 34, 1147(1957).
107. Garner, G.B., Baumstark, J.S., Muhrer, M.E., Pfander, W.H., Microbiological determination of nitrate, *Anal. Chem.*, 28, 1589(1956).
108. Senn, D.R., Carr, P.W., Determination of nitrate ion at the part per billion level in environmental samples with a continuous flow immobilized enzyme reaction, *Anal. Chem.*, 48, 954(1976).
109. Nydahl, F., On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium, *Talanta*, 23, 349(1976).

110. Bastian, R., Weberling, R., Palilla, F., Ultraviolet spectrophotometric determination of nitrate application to analysis of alkaline earth carbonates, *Anal. Chem.*, 29, 1795(1957).
111. Bremner, J.M., Keeney, D.R., Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite, *Anal. Chim. Acta*, 32, 485(1965).
112. Maly, J., Fadrus, H., Nitrate determination with indigo carmine, *Am. Waterworks Assoc., J.*, 67, 395(1975).
113. Hamm, R.E., Withrow, C.D., Polarographic nitrate determination, *Anal. Chem.*, 27, 1913(1955).
114. Annino, R., McDonald, J.E., Polarographic determination of nitrite and nitrate, *Anal. Chem.*, 33, 475(1961).
115. Keeney, D.R., Byrnes, B.H., Genson, J.J., Determination of nitrate in waters with the nitrate-selective ion electrode, *Analyst*, 95, 383(1970).
116. Qien, A., Selmer-Olsen, A.R., Nitrate determination in soil extracts with the nitrate electrode, *Analyst*, 94, 888(1969).
117. Westcott, C.C., A simplified method for determining nitrates in food, *Food Technol.*, 25, 709(1971).
118. Davenport, R.J., Johnson, D.C., Determination of nitrate and nitrite by forced-flow liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Chem.*, 46, 1971(1974).

119. Kershaw, N.F., Chamberlin, N.S., Determination of nitrites. Discussion of the Shinn Method as applied to examination of water, *Ind. Eng. Chem., (Anal. Ed.)*, 14, 312(1942).
120. Shinn, M.B., Colorimetric method for determination of nitrite, *Ind. Eng. Chem., (Anal. Ed.)*, 13, 33(1941).
121. Garcia, E.E., Determination of nitrite ion using the reaction with p-nitroaniline and azulene, *Anal. Chem.*, 39, 1605(1967).
122. Celardin, F., Marcantonatos, M., Monnier, D., Analytical study of two diazotization-coupling reactions. Application to the determination of nano-amounts of nitrite in water. *Anal. Chem. Acta*, 68, 61(1974).
123. Rider, B.F., Mellon, M.G., Colorimetric determination of nitrites, *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)*, 18, 96(1946).
124. Adriaanse, A., Robbers, J.E., Determination of nitrite and nitrate in some horticultural and meat products and in samples of soil, *J.Sci. Fd. Agric.*, 20, 321(1969).
125. Hutchinson, K., Boltz, D.F., Spectrophotometric determination of nitrite and thiourea, *Anal. Chem.*, 30, 54 (1958).
126. Sawicki, E., Stanley, T.W., Pfatt, J., Johnson, H., Sensitive new methods for autocatalytic spectrophotometric determination of nitrite through free-radical chromogens, *Anal. Chem.*, 35, 2183(1963).

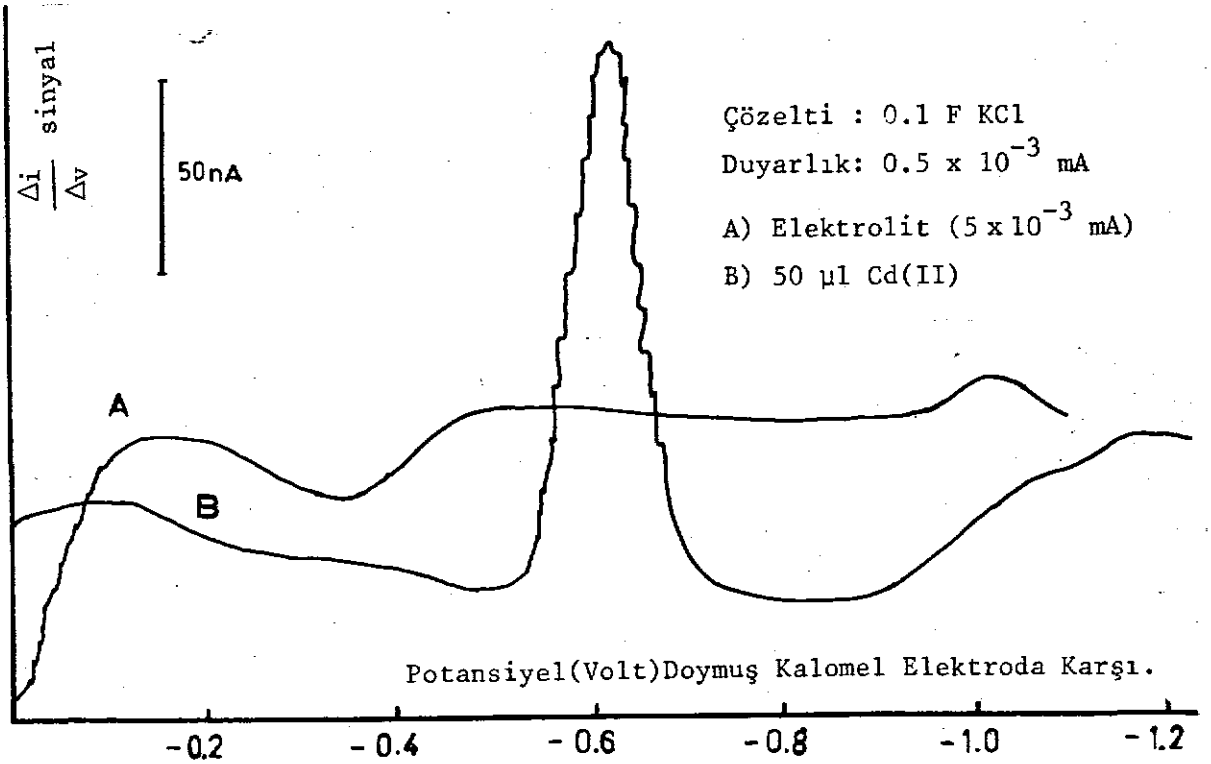
127. Schall, E.D., Hatcher, D.W., Colorimetric determination of nitrates and nitrites in feeds, J. Am. Off. Agric. Chem., 51, 763(1968).
128. Horwitz, W., Senzel, A., Reynolds, H., Park, D.L. (derleyenler), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12. baskı (1975), sayfa 132.
129. Sawicki, E., Johnson, H., Stanley, T.W., Determination of nitrate or nitrate plus nitrite with 1-Aminopyrene Anal. Chem., 35, 1934(1963).
130. Chow, T.J., Johnstone, M.S., Determination of nitrate in sea water, Anal. Chim. Acta, 27, 441(1962).
131. Morris, A.W., Riley, J.P., The determination of nitrate in sea water, Anal. Chim. Acta, 29, 272(1963).
132. Gabbay, J., Almog, Y., Davidson, M., Donagi, A.E., Rapid spektrophotometric micro-determination of nitrites in water, Analyst, 102, 371(1977).
133. Bendschneider, K., Robinson, R.J., A new spektrophotometric method for the determination of nitrite in sea water, J. Marine Res., 11, 87(1952).
134. Matsunaga, K., Oyama, T., Nishimura, M., Extraction-photometric determination of nitrite in fresh and sea water, Anal. Chim. Acta, 58, 228(1972).

135. Allen, S.E., Chemical Analysis of Ecological Materials, New York, John Wiley and Sons (1974), sayfa 452.
136. Kilgore, L., Stasch, A.R., Barrentinè, B.F., Nitrate content of beets, collards, turnip greens, J. Am. Diet. Assoc., 43, 39 (1963).
137. Phillips, W.E.J., Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh and processed spinach during storage, J. Agr. Food Chem., 16, 88(1968).

EKLER

EK-I. Kadmiyum Kolonlarının Safliğı

İndirgeme kolonlarında kullanılan kadmiyumun elde edildikten sonra, çinko karışmış olabileceği düşünülerek polarografik analiz yapılmıştır. Önce elektrolitin (5×10^{-3} mA) polarogramı alınmıştır. Daha sonra elektrolit çözeltilisine 0.1 F HCl içinde 10^{-2} M konsantrasyonda hazırlanan Cd^{++} çözeltilisinden 50 µl ilave edilip ve içinden 20 dakika azot gazı geçirildikten sonra polarogramı alınmıştır. (Şekil 8). Kadmiyumun -0.6, çinkonun -1.0 voltta pik vermesi gerekmektedir. Sadece -0.6 voltta pik görüldüğü için kadmiyumun çinko içermediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 8. Cd^{++} ve Zn^{++} 'nun Türevsel Puls Polarogramları.

EK II. Ispanakta NO_2^- ve NO_3^- Miktarı Hesaplanması :

Ispanak örneğinin II.5.3 ve II.5.4. de anlatılan işlemlerden geçtikten sonra 540 nm'de ölçülen Absorbansları;

$$\text{NO}_2^- \text{ Absorbansı} = 0.098$$

$$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- \text{ Absorbansı} = 0.385$$

$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ Tayini için Eluat B'den alınan miktar (d) = 5 ml.

NO_2^- Miktarının Hesaplanması :

Okunan A değerinin Şekil "NO₂⁻ standart Eğrisi" 'de konsantrasyon olarak karşıtı bulunur (f), Bu şöyle de yapılabilir ; Standart eğrinin denklemi, $y = 0.0026 + 0.039 x$ olduğuna göre A değeri denkleme konarak f değeri hesaplanır.

$$0.098 = 0.0026 + 0.039 f$$

Buradan $f = 2.446 \mu\text{g}/25 \text{ ml}$ 'dir.

f Değerini $\frac{f \times 290}{125 \times 20}$ formülüne koyduğumuzda ;

$$\text{NO}_2^- = 0.284 \text{ mg/kg} (= y \text{ ppm}) \text{ bulunur.}$$

NO_3^- Miktarının Hesaplanması :

NO_2^- ve indirgenmiş NO_3^- A değerinin Şekil 7'de konsantrasyon olarak karşıtı bulunur (g).

NO_3^- Standart Eğri denklemi ; $y = 0.0029 + 0.038 x$ dir. Okunan A değeri denkleme konursa, buradan g değeri hesaplanabilir.

$$0.385 = 0.0029 + 0.038 \text{ g}$$

Burada $g = 10.055$ hesaplanır. d , y ve g değerleri,

$$\left[\left(\frac{g \times 290 \times 100 \times 100}{125 \times 10 \times 20 \times d} \right) - y \right] \frac{62}{46} \text{ formülüne konur.}$$

$$\left[\left(\frac{10.055 \times 290 \times 100 \times 100}{125 \times 10 \times 20 \times 5} \right) - 0.284 \right] \frac{62}{46}$$

Buradan $\text{NO}_3^- = 314.033 \text{ mg/kg}$ bulunur.

[Formüldeki $\frac{62}{46}$ oranı, NO_3^- molekül ağırlığının NO_2^- molekül ağırlığına oranıdır.]

ÖZGEÇMİŞ

1957 yılında Ankara'da doğdum. İlk ve orta öğrenimi Ankara'da yaptım. 1974 yılında H.Ü. Eczacılık Fakültesi'ne girdim. 1978 yılında mezun oldum, aynı yıl H.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Toksikoloji ve Bromatoloji Bilim Dalı'nda asistan olarak göreve başladım. Halen aynı görevdeyim.