

## ET ÜRÜNLERİNDE NİTRİT TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMİN TEŞHİS LİMİTİNİN BELİRLENMESİ

### DETERMINATION OF THE DETECTION LIMITE OF THE METHOD FOR DETERMINING NITRITE IN MEAT PRODUCTS

Nursel DEVELİ IŞIKLI

Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin

**ÖZET:** Bu çalışma, et ürünlerinde nitrit derişiminin saptanmasında kullanılan resmi yöntemin (TS 3137) teşhis limitini belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla kalibrasyon grafiği hazırlanmış ve kolerasyon katsayısı ve regresyon eğrisinin eğimi ve eğrinin y eksenini kestiği noktadaki hatalar hesaplanmıştır. Ayrıca, bu yöntemle analize alınan 70 adet sosis örneğindeki nitrit derişiminin yasal limitlere uygunluğu değerlendirilmiştir. Korelasyon katsayısı 0.99738 olarak bulunmuştur. Eğim ve eğrinin y eksenini kestiği noktanın standart sapma ve güvenilirlik limitleri ise., 0.007,±0.025 ve 0.0049, ±0.016 olarak belirlenmiştir. Yapılan hesaplama sonucu yöntemin teşhis limiti 0.062 µg/mL olarak bulunmuştur. Analize alınan sosis örneklerinin %64 nün 'Gıda Kodeksi'ne uygun olduğu belirlenmiştir.

**ABSTRACT:** This study was done to determine the detection limit of official method for determining nitrite in meat products. For this aim, calibration graph was prepared and correlation coefficient and errors in the slope and intercept of the regression line were determined furthermore, the suitability of the nitrite level in the 70 sausage samples, analyzed with this method to the legal limits was evaluated. Correlation coefficient was 0.99738 The standard deviation and the confidence limits for the slope and intercept were 0.007, ±0.025 and 0.0049, ±0.016, respectively. Detection limit of official methods was found as 0.062 µg/mL. The suitability of the nitrite level in the sausage samples to the legal limit was 64%.

### GİRİŞ

Et ürünlerinde nitrat ve nitritler, renk gelişimine olan katkılarının yanı sıra antioksidan, antibakteriyel etkileri nedeni ile yaygın olarak kullanılırlar. Ancak ürüne ve uygulanan işleme bağlı olarak eklenen nitritin %50 den daha azı analitik olarak saptanabilir. Uygulanan ısıl işlem ve depolama sürecindeki nitrit düzeyindeki azalma sonucu ürün satışı sunulduğunda yaklaşık 5-30 ppm nitrit içerir (CASSENS ve ark., 1979). Et ürünlerinde nitritle ilgili yapılan çalışmalar, olgunlaşma ve pişirme aşamalarının ve de ürüne eklenen katkı maddelerinin başlangıç düzeyini azalttığını göstermiştir (WOOTTON ve ark. 1985; GÖKALP, 1986; ÖZTAN ve HELVACI, 1991).

Ülkemizde ise, 'Gıda Kodeksi Yönetmeliği' çıkartılıncaya kadar ki süreçte, son ürünlerdeki nitrit ve nitrat düzeyi yasal sınır yönünden, ürüne katılan düzey üzerinden değerlendirilmiştir. 1990 yılında, çıkartılan "Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliđinde, üretim aşaması ve son ürün ayrımı yapılmıştır (ANONYMOUS, 1990a). Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde ise, ısıl işlem görmemiş et ürünleri için üretim aşamasında 150 ppm, son ürün için, 50 ppm, kürlenmiş et ürünleri için ise, üretim aşamasında 150 ppm, son ürün için, 100 ppm sınır değeri getirilmiştir (ANONYMOUS, 1997).

Ürüne katılan nitrite kayıplar ortaya çıkabildiği gibi, analiz aşamasında da nitrit kaybı söz konusudur. Et ürünlerine katılan askorbatlar kü edilmiş et ürünlerinde karsinogenik nitrosamin oluşumunu azaltırlar (MIRVISH ve ark., 1972) Ancak, ürünlerdeki askorbat miktarına ve nitrit analizinde kullanılan renk geliştirme ayracının yapısına bağlı olarak, ayraç ve askorbat reaksiyona girer. Bu nedenle nitritin ayraçla reaksiyonu sonucu gelişen pigment maddesi ve dolayısı ile, et ürünündeki gerçek nitrit miktarında kayıplar ortaya çıkar (FOX ve ark, 1981). Et ürünlerindeki nitriti belirlemek için geliştirilmiş resmi yöntemlerden biri olan AOAC deki yöntem, ilk olarak 1925'de kabul edilmiştir .Bu yöntem 1973 yılına kadar değişmeden kalmıştır. Ancak, bazı araştırmacılar bu yöntemin basitleştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Buna bağlı olarak yapılan düzenleme ve kollobratif çalışmalarla basitleştirilmiş yöntem kabul görmüştür (FIDDLER, 1977). 1990 da çıkartılan AOAC'de bu yöntem

yer almıştır (ANONYMOUS, 1990b). Bugün ülkemizde yürürlükte olan TS 3137 deki et ürünlerinde nitrit tayin yöntemi, renk oluşurma ayraçlarının yapısı nedeni ile AOAC resmi yöntemi ile benzerlik göstermektedir (ANONYMOUS, 1978; ANONYMOUS, 1990b). TS 3137'deki nitrit tayin yöntemi aynı zamanda ISO' standardından alınmış ve birçok ülkede resmi olarak kabul edilmiş bir yöntemdir.

Bu çalışma ile, ülkemizde halen yasal olarak kabul edilen TS 3137 deki yöntemin, 'teşhis limiti' belirlenmiştir. Ayrıca, 1998' öncesi bu yöntemle analize alınan sosis örneklerindeki nitrit miktarlarının yasal sınır değerlere uygunluğu, güncelleştirmeden ve güncelleştirilerek karşılaştırılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Ankara bölgesinde üretim yapan et ürünleri işletmelerinden farklı zamanlar da alınan 70 adet sosis örneği kullanılmıştır.

### Yöntem

#### Nitrit Tayini

Sucuk örneklerinin nitrit içeriği, örneklerden hazırlanan ekstraktlara sülfanil amid ve N-1 naftiletendiamin dihidroklorür çözeltilerinin ilavesi ile, geliştirilen aminoazo bileşiğinin oluşturduğu pembe rengin 538 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmesi ile belirlenmiştir (ANONYMOUS, 1978).

**Nitrit stok solüsyonu:** 1 gram Sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) 1000 ml'ye saf su seyreltildi.

**Çalışma solüsyonu:** A-stok solüsyondan 5 mL alınarak 100mL'ye tamamlanmıştır. B-A solüsyonundan, 100 mL'lik balon jöjelere sırası ile, 2,5;5; 10, 15;20 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**Kalibrasyon Eğrisi:** Beş adet 100 mL'lik balon jöjelere beş ayrı çalışma solüsyonu B'den 10'ar mL alınıp üzerlerine yaklaşık 50 mL saf su eklendikten sonra yöntemde belirtildiği şekilde renk oluşturma ayraçları eklenip, geliştirilen rengin 538 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorban değerleri ve bunu karşılayan standart çözeltilerinin derişimlerinden (mL'de mikrogram);

$$y = a + b \cdot x \text{ formülüne göre,}$$

regresyon eğrisi çizilerek kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır (MILLER ve MILLER, 1993). Ayrıca eğrinin, y eksenini kestiği noktanın (a) ve eğimin (b) standart hatası ve güven sınırları hesaplanmıştır (MILLER ve MILLER, 1993).

$$b\text{'nin standart hatası (S}_b\text{); } S_b = \frac{S_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

$$a\text{'nın standart hatası (S}_a\text{); } S_a = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

Formüllerde geçen  $S_{y/x}$  istatistiği ise, aşağıdaki gibi hesaplanmıştır, burada,

$y_i$  = Her bir x değeri için regresyon eğrisinden hesaplanan y değeridir. Formüllerde geçen diğer semboller genel kullanılan anlamlarıdır.

a ve b'nin güven sınırları;

$a \pm t_{s_a}$  ve  $b \pm t_{s_b}$  ifadelerinden bulunmuştur.

$t = n - 2$  serbestlik derecesinde, %95 güven sınırlarında bulunan tablo değeri.

**Teşhis limiti (y):**

Teşhis edilebilir limit kör ve background sinyalinden önemli şekilde farklılık gösteren derişim olarak tanımlanmış ve,

$y - y_b = 3 S_B$  ifadesi ile bulunmuştur (MILLER ve MILLER, 1993).

Burada;  $y_b = a$

$S_B = S_{y/x}$  dir.

**Sosis örneklerindeki nitrit derişimi;**

Sosis örneklerinden hazırlanan ekstraktlarda renk geliştirildikten sonra okunan absorbands değerleri regresyon denkleminde yerleştirilerek ve gerekli seyreltme faktörleri dikkate alınarak sucuk örneklerindeki nitrit derişimi mg/kg olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, kalibrasyon eğrisinden bulunan nitrit derişimlerinin standart sapması,

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \left[ \frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

formülünden bulunmuştur (MILLER ve MILLER, 1993).

Formülide,  $y_0$  = Sosis örneklerindeki nitrit derişiminin ( $x_0$ ) n hesaplanmasında kullanılan deneysel y değeridir.

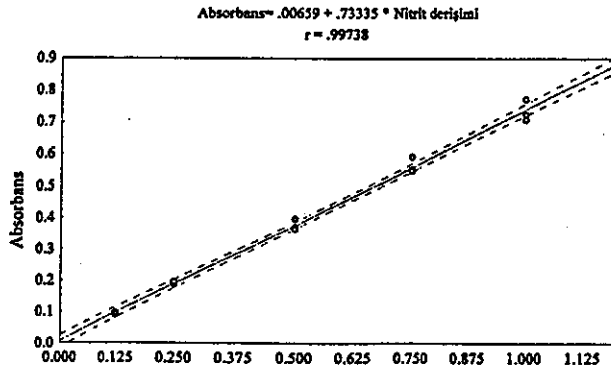
$S_{x_0} = x_0$  değeri için tahmin edilen standart sapma.

Güven aralığı ise;

(n-2) serbestlik derecesinde,  $x_0 \pm t_{s x_0}$  ifadesinden bulunmuştur.

**BULGULAR VE TARTIŞMA****Kalibrasyon Grafiği**

Yöntem bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan nitrit çözeltilerinin ölçülen absorbands değerlerine karşılık gelen nitrit derişimleri ile regresyon eğrisi çizilmiştir (Şekil-1).



Şekil 1- Nitrit kalibrasyon eğrisi

Çizilen regresyon eğrisinde eğim (b) 0.73335 ve eğrinin y eksenini kestiği nokta (a) 0.00659 olarak, kolerasyon katsayısı (r) ise, 0.99738 olarak bulunmuştur. Regresyona ilişkin yapılan varyans analizinde, regresyon ve değişkenler için yapılan t testinde, eğim (b) istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 1).

Eğim ve eğrinin y eksinini kestiği noktanın güvenilirlik sınırlarına ilişkin hesaplamada, bu değerlerin çok küçük değerler olduğu görülmüştür (Çizelge 2). Bu nedenle test edilen grafik için bu değerlerin fazla bir önemi olmamakla beraber, genelde bu tip hesaplamalarda güvenilirlik verilerinin hesaplanmasının yararlı bir önlem olduğu belirtilmiştir (MILLER ve MILLER, 1993).

Çizelge 1. Kalibrasyon Eğrisine İlişkin Regresyon Analizi Sonucu

Varyasyon kaynakları	SD ort.	Kareler	F	Değişken	B std. hatası	B'nin	t
Regresyon	1	1.529451	2470.2**	a	0.00619	0.0127	0.4966
Hata	13	0.000619		b	1.3564	0.02729	49.7010**

\*\* p &lt;0.01

Çizelge 2. a,b,x<sub>0</sub> Değerlerinin Standart Hatası ve Güvenirlik Değerleri

Değişken	n	m	S <sub>y/x</sub>	S <sub>a</sub>	S <sub>b</sub>	S <sub>x0</sub>	%95güv. Sınırı (±)
a	5	3	0.018	0.0049	—	—	0.016
b	5	3	—	—	0.007	—	0.025
x <sub>0.1</sub>	5	1	—	—	—	0.0095	0.030
x <sub>0.1</sub>	5	3	0.018	—	—	0.0072	0.022
x <sub>0.1</sub>	5	5	—	—	—	0.0065	0.021
x <sub>0.3</sub>	5	1	—	—	—	0.0086	0.027
x <sub>0.3</sub>	5	3	0.018	—	—	0.0059	0.019
x <sub>0.3</sub>	5	5	—	—	—	0.0051	0.016
x <sub>0.7</sub>	5	1	—	—	—	0.0067	0.021
x <sub>0.7</sub>	5	3	0.018	—	—	0.0073	0.023
x <sub>0.7</sub>	5	5	—	—	—	0.0096	0.031

Kalibrasyon grafiklerinin çiziminde çok sayıdaki kalibrasyon noktasının kullanımı ile doğruluğun artırılması amaçlanmaktadır. Az sayıda kalibrasyon noktasının kullanımı örneklerin güvenirlilik sınırlarını hesaplamada kullanılan formüldeki 1/n değerinin büyümesine ve aynı zamanda serbestlik derecesinin (n-2) düşmesine ve dolayısı ile güvenirlilik limitlerinin hesabında çok büyük t değerlerinin kullanımını gerektireceği belirtilmiştir (MILLER ve MILLER, 1993). Bu nedenle TS 3137 nitrit standardında verilen üç nokta ile kalibrasyon eğrisi çizmek yerine en az 5 ve/veya 6 nokta ile kalibrasyon eğrisinin çizilmesi güvenirlilik sınırlarının güvenirliliğini artıracığından TS 3137'de eğri çizilmesinde nokta sayısı artırılmalıdır.

Ayrıca kalibrasyon grafiklerinde, örnek güvenirlilik limitlerinin düzeltilmesi için, n sayısının ve de örnekten yapılan okumalarda paralel sayısının (m) artırılması gerektiği belirtilmiştir (WERNIMENT, 1985). Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden, sosis örneklerinden okunan 0.1;0.3;0.7 absorbans değerleri için bulunan x<sub>0</sub> değerlerinin güvenirlilik sınırlarının, paralel sayısı arttıkça daraldığı ancak belli bir değerden sonra daralmanın önemli olmadığı görülmüştür. (Çizelge-2). Aynı örnekten yapılan paralel sayısının artırılması doğruluğu artırmasına karşın daha fazla iş yapılmasını gerektirecek ancak yararı çok küçük olacaktır. Yapılan çalışmada, örneklerin nitrit içeriği belirlenirken hazırlanan ekstraktardan 2-3 okumanın ortalamasının alınmasının yeterli olacağı görülmüştür.

Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde hesaplanan teşhis limiti ise, 0.062 µg/mL olarak bulunmuştur. Buda bize kalibrasyon eğrisi Metot bölümündeki noktalarda çizildiğinde Kodekste önerilen sınır değerler oldukça altındaki derişimlerin test edilebileceğini göstermiştir.

#### **Sosis örneklerindeki nitrit düzeyi ve yasalara uygunluğu**

Deneme kapsamına alınan sosis örneklerindeki nitrit derişimi örneklerden okunan absorbans değerleri kullanılarak ağırlıklı regresyon eğrisinin formülünden hesaplanmıştır (Şekil 1). Sosis örneklerinde bulunan ortalama, minimum ve maksimum nitrit düzeyleri Çizelge-3'de verilmiştir.

Sosis örneklerindeki nitrit düzeyi Gıda kodeksi öncesi ve sonrası yasal düzenlemelere göre değerlendirildiğinde, analize alınan sosis örneklerinin %82.85'i gıda kodeksi öncesi yasal düzeylere uygun iken, gıda kodeksine göre yapılan değerlendirmede ise, %64'ünün bu düzenlemeye uyduğu görülmüştür (Şekil 2).

Bu konuda yapılan benzer çalışmada ise, analize alınan sosis ve salam örneklerinin %96'sı gıda katkı maddeleri yönetmeliğine uygun olduğu ve salam, sosis örneklerinin %86.6'sının 100 ppm den az nitrit içerdiği görülmüştür (SOYUTEMİZ ve ÖZENİR, 1996).

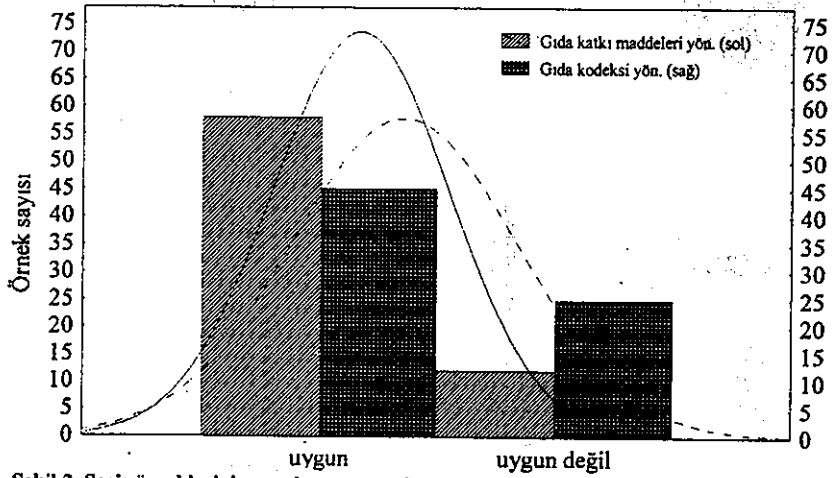
Yapmış olduğumuz çalışmada, analize alınan tüm sosis örneklerinin etiket bilgilerinde, askorbatların kullanıldığı belirtilmiştir. Sosis üretiminde askorbatlarla birlikte uygulanan ısıtma işlemi ve de deniz aşamasında ürüne katılan askorbatların gerçek nitrit düzeyini azalttığı gösterilmiştir (FOX ve ark, 1981; WOOTTON ve ark. 1985). Gıda Kodeksinde belirtilen düzeylere göre uygun olarak kabul edilen ve nitrit içeriği 60-90 ppm arasında bulunan 15 örnekte, yukarıda söz edilen gerekçe nedeni ile, üretim aşamasında 150 ppm in üzerinde nitrit kullanma olasılığının yüksek olduğunu düşündürmüştür. Gıda kodeksinde getirilen sınır değerler tartışılır olmasına karşın, Gıda Kodeksinin, özellikle nitrit gibi riskli katkıları yönünden yararlı bir uygulama olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- ANOYMOUS, 1978. TS 3137 Et Mamullerinde Nitrit Miktarı Tayini. Türk Standartları Enstitüsü, ANKARA.
- ANOYMOUS, 1990a. Gıda Katkı Yönetmeliği. Resmî Gazete, 7 Haziran. Sayı 20541.
- ANOYMOUS, 1990b. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Ed. by K. Helrich. Association of Official Analytical Chemists Inc. Arlington, Virginia, USA.
- ANOYMOUS, 1997 Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Resmî Gazete Sayı: 23172 (mükerrer).
- CASSAENS, R.G., GREASER, M.I., ITO, T., and LEE, M. 1979. Reaction of Nitrite in Meat. Food Technology, 46-55.
- FIDDLER, R.N. 1977. Collaborative Study of Modified AOAC Method of Analysis for In meat and Meat Products. Journal of the AOAC, 60 (3): 594-599.
- FOX, J.B., ZELL, T.E., and WASSERMAN, A.E. 1981. Interaction Between Sample Preparation Techniques and Colorimetric Reagents in Nitrite Analysis in meat Journal of the AOAC, 64 (6): 1397-1402.
- GÖKALP, H.Y. 1986. Residual NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, Carbonyl and TBA values of Turkish Soudjouk manufactured by adding different Starter Cultures and Using Different Ripening Temperatures. Journal of Food Technology, 21:615-625.
- MILLER, J.C and MILLER, J.N. 1993. Statistics for Analytical Chemistry. Ellis Horwood PTR Prentice Hall. New York, London, Tokyo, p. 470.
- MIRVISH, S.S., WALLCAVE, L., EAGEN, M., and SHUBIK, P. 1972. Ascorbate Nitrite Reaction: Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogenic N-nitroso Compounds. Science, 11: 65-70.
- ÖZTAN, A ve HELVACI, 1991. Sosis Üretiminde Nitrosomyoglobin ve Kalıntı Nitrit Miktarını Etkileyen Faktörler. Gıda, 16(2): 117-121.
- SOYUTEMİZ, G.E. ve ÖZENİR, A. 1996. Bursa'da Tüketilen Sucuk, Sosis, Salam ve Pastırmadaki Kalıntı Nitrat ve Nitrit Miktarlarının Saptanması. Gıda, 21 (6): 471-476.
- WERNIMENT, G.T. 1985. Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia USA, p. 183.
- WOOTTON, M., KOK, S.H., and BUCKLE, K.A. 1985. Determination of Nitrite and Nitrate Levels in Meat and Vegetable Products by High Performance Liquid Chromatography. J. Sci. Food Agric. 36: 297-304.

Çizelge 3. Analize Alınan Sosis Örneklerinin Nitrit Derişimi

Örnek cinsi	Örnek sayısı	Nitrit derişimi mg/kg		
		ortalama	minimum	maksimum
Sosis	70	101.03	3.46	676.97



Şekil 2. Sosis örneklerinin yasalara uygun durumu