



Determination and Validation of Nitrate Levels of Vegetables Grown in the Mediterranean Region[#]

Fatma Hepsağ^{1,a,*}

¹Department of Food Technology, Kadirli School of Applied Sciences, Osmaniye Korkut Ata University, 80760 Kadirli/Osmaniye, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO

[#]This study was presented as an oral presentation at the 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Afyonkarahisar, TARGID 2019)

Research Article

Received : 17/05/2019

Accepted : 17/08/2019

Keywords:

Nitrate
Spinach
Lettuce
Iceberg
Arugula

ABSTRACT

In our study, validation was carried out at 24 and 200 mg/kg enrichment for residue analysis of nitrate active substance only in lettuce samples. Analyses were performed by using high performance liquid chromatography (HPLC) in lettuce, spinach, salad and arugula samples. In order to eliminate the matrix effect, matrix calibration was used, ie calibration of lettuce samples. Validation of the method was performed with criteria such as precision, repeatability, repeatability limit, reproducibility, repeatability limit, accuracy, linearity of calibration and recovery. The calibration curve was found as linear in the range of 0.2-40 mg/kg. The recovery from the samples is between 97.3-100.2 %. The repeatability and reproducibility values for the two concentrations were 1.89 (matrix+24 ppm) and 3.65 (matrix+200 ppm), 3.951 (matrix+24 ppm) and 3.456 (matrix+200 ppm), respectively. The repeatability and reproducibility limit values are within acceptable limits. Accuracy, precision, combined uncertainty and extended uncertainty (95% confidence: k=2) were found as 0.015 (matrix+24 ppm) and 0.004 (matrix+200 ppm), 0.039 (matrix+24 ppm) and 0.006 (matrix+200 ppm), 0.041 (matrix+24 ppm) and 0.007 (matrix+200 ppm), 0.082 (matrix+24 ppm) and 0.014 (matrix+200 ppm). In our study, the highest nitrate ratio was determined in spinach with 3486 mg/kg in total 102 samples. Lettuce following spinach (2825 mg/kg) showed lower nitrate content, while lower concentrations of nitrate were detected in iceberg (1985 mg/kg) and arugula (1870 mg/kg), respectively. The results may be useful in estimating body intake levels for research on the effects of nitrite and nitrate on human health in vegetable producers and in our daily diet. In addition, the nitrate content of the vegetables analysed in the study is an indicator of the use of nitrogenous fertilizers in the Mediterranean region, but showed no problem for human and animal health.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp1): 32-39, 2019

Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Sebzelelerin Nitrat Düzeylerinin Tespiti ve Validasyonu

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 17/05/2019

Kabul : 17/08/2019

Anahtar Kelimeler:

Nitrat
Ispanak
Marul
Baş salata
Roka

Ö Z

Bu çalışmada, validasyon, sadece marul örneklerinde nitrat etken maddesinin kalıntı analizi için 24 ve 200 mg/kg seviyelerinde zenginleştirme ile yapılmıştır. Analizler ise marul, ıspanak, baş salata ve roka örneklerinde yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Matris etkisini elimine etmek için, matrisli kalibrasyon yani marul örneklerine ait kalibrasyon kullanılmıştır. Metodun validasyonu; kesinlik, tekrarlanabilirlik, tekrarlanabilirlik limiti, tekrar üretilebilirlik, tekrar üretilebilirlik limiti, doğruluk, kalibrasyonun doğrusallığı, geri alım gibi kriterler ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, 0,2-40 mg/kg aralığında lineer olarak bulunmuştur. Örneklerden geri alım %97,3-100,2 arasındadır. Tekrarlanabilirlik değerleri, iki konsantrasyon için sırasıyla 1,89 (matrix+24 ppm) ve 3,65 (matrix+200 ppm), tekrar üretilebilirlik değerleri ise 3,951 (matrix+24 ppm) ve 3,456 (matrix+200 ppm) olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik limiti değerleri kabul edilebilir sınırlar içerisindeydi. Doğruluk sırasıyla 0,015 (matrix+24 ppm) ve 0,004 (matrix+200 ppm), kesinlik 0,039 (matrix+24 ppm) ve 0,006 (matrix+200 ppm), birleştirilmiş belirsizlik sırasıyla 0,041 (matrix+24 ppm) ve 0,007 (matrix+200 ppm), genişletilmiş belirsizlik (%95 güvenle; k=2) 0,082 (matrix+24 ppm) ve 0,014 (matrix+200 ppm) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, toplam 102 adet numunede en yüksek nitrat oranı, 3.486 mg/kg ile ıspanakta görülmüştür. Ispanağı izleyen marul (2.825 mg/kg), daha düşük nitrat içeriği gösterirken, sırayla baş salata (1.985 mg/kg) ve rokada (1.870 mg/kg) daha düşük konsantrasyonlarda nitrat tespit edilmiştir. Sonuçlar, sebze üreticileri ve günlük diyetimizdeki nitrit ve nitratın insan sağlığı üzerindeki etkileri üzerine araştırmalar için vücuda alın seviyelerinin tahmin edilmesinde faydalı olabilecektir. Ayrıca çalışmada analizi yapılan sebzelerdeki nitrat oranlarının, Akdeniz bölgesinde azotlu gübre kullanımının yüksek olduğunun göstergesi olup, fakat insan ve hayvan sağlığı açısından bir sorun oluşturmayacağını göstermiştir.

^afatmahepsag@osmaniye.edu.tr

^{id}<https://orcid.org/0000-0002-3688-4106>



Giriş

Gıdaların kirlenmesi, dünya çapında bir sorundur (Chakraborty ve Newton, 2011). Sebzelerdeki yüksek nitrat kirliliği, depolama ve gıda işlemlerinin nitrite dönüşümü üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, sebzenin türü, mevsim, ışık, sıcaklık, büyüme yöntemi ve kullanılan gübrelere bağlı olarak değişkenlik gösterir (EFSA, 2008). Gıda kirliliğini araştırmacılar üç ana kategoriye ayırmışlardır: 1) Pestisit kalıntıları, antibiyotikler, koruyucular içeren gıdaların organik kirlenmeleri 2) Ağır metaller, nitratlar, fosfatlar gibi inorganik kirlenme ve 3) Organometalik kirlenmeler (Chakraborty ve Newton, 2011). Nitrit ve nitrat, azot döngüsünde yer alan doğal bileşikler olup, Avrupa yasaları E249-E252 ile tanımlanan yetkili gıda katkı maddeleri kapsamındadır (Schuddeboom, 1993). Nitratlar için, günlük gıda maddelerinin alımının büyük kısmı sebze tüketimi ile ilgilidir (Corrè ve Breimer, 1979; European Food Safety, 2008). Nitrat birikimi, özellikle lahana, marul ve ıspanak gibi yaprağı tüketilen sebzeler oldukça yüksek oranda görülürken, patates, havuç, bezelye ve fasulye gibi kök ve yumruları tüketilen sebzelerde nispeten düşüktür (Santamaria, 2006; Keeton, 2011). Sebzelerin nitrat ve nitrit içeriği 1-10.000 mg/kg arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Nitrat birikimi; bitki türü, iklimsel koşullar, hasat zamanı ve mahsulün hasattan sonra depolanma koşulları ve tarımsal uygulamalar gibi çevresel faktörler de dahil olmak üzere birçok etken tarafından etkilenir (Leszczyńska ve ark., 2009).

Sebzelerde nitrat konsantrasyon aralığı çok geniştir. Bu durum N-gübre uygulamasının zamanlaması, sıcaklık, ışığa maruz kalma, su ilişkileri, karbondioksit konsantrasyonu, herbisitlerin kullanımı ve toprak tipi gibi farklı yetiştirme özelliklerinden kaynaklanmaktadır (National Research Council, 1981; CCRX, 1988). Nitritler için günlük alım, özellikle kurutulmuş etlerde bulunan gıda katkı maddelerinin tüketilmesiyle ilgili olup, buna karşın nitritlerin endojen nitratın doğal dönüşümünden kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir (EC, 2006).

Nitratlar, nitritler ve azot içeren gübreler, temel bitki besin maddeleri olup, ortamdaki azot gazı ise jeokimyasal döngünün doğal bir parçasıdır. Nitrat, doğal olarak bitkilerde su ve toprakta sodyum nitrat, az miktarda da potasyum nitrat halinde bulunur ve tek başına nispeten toksik değildir. Nitratın kronik toksik etkileri, bakteriyel enzimler tarafından indirgenmesiyle oluşan nitritten kaynaklanır. Bu şekilde topraktaki azotlu organik maddeler, mikroorganizmaların faaliyetleriyle parçalanarak amonyağa dönüşürler (Savaş, 1966). Bu reaksiyonlar dizisi, iki ayrı aşamadan oluşmaktadır. Birincisi nitritleşme olup, amonyak azotunun aerobik bakterilerin *Nitrosomonas* sp. faaliyetiyle nitrit azotuna dönüşmesidir. Nitrit diğer maddelere bağlanan bir şekilde proteinlerden türetilen aminler olarak, toksik ve insanlarda ciddi patolojilere yol açabilir. Bu nedenle, insanlarda nitratın sağlık riski değerlendirilmesi nitrit ve toksisitesinden kaynaklanmaktadır (Speijers, 1996; Pannala ve ark., 2003). İkinci aşama ise nitratlaşma olup, bu aşamada, genelde toprakta bulunan organik maddelerdeki amonyak azotu, nitrat azotuna dönüşür. Toprakta nitrat azotunun açığa çıkması, azotun hemen hemen tümünü bu yoldan sağlayan bitkiler için yaşamsal bir önem taşır (Şahinkaya ve Bayhan, 1972).

Araştırmacılar nitratın, nitrite göre insanlar ve hayvanlar için daha fazla toksik olduğunu savunmaktadırlar. Bunun nedeni, nitratların nitrat redüktaz enzimi ve ayrıca sebzelerde bulunan C vitamini ile diğer indirgeyici ajanlarla nitrite indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Nitritler, vücuttaki alkilaminlerle reaksiyona girerek, kanserojen etkiye sahip nitrozamin bileşiklerini oluştururlar (Cintya ve ark., 2016). Bazı yazarlar diyetteki ana nitrat kaynağının, sebzeler olduğunu bildirmişlerdir (Santamaria, 2006; Sindelar ve Milkowski, 2012; Menard ve ark., 2008). Nitrat biriktirici sebzeler; roka, turp, hardal, pancar, pazı, ıspanak ve Amarantaceae familyası üyeleri olup; marul, kereviz ve maydanozunda nitrat içeriğinin yüksek olduğu bilinmektedir (Santamaria, 2006).

Akdeniz bölgesinde; Antalya, Mersin, Adana ve Osmaniye’de satışı yapılan ve piyasaya sunulan 102 adet ıspanak, marul, baş salata ve roka numunelerinin nitrat konsantrasyonlarını belirlemek için yürütülmüş olan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, doğrulama modeli ile validasyon değerlendirmesine tabi tutulmuştur.

Materyal ve Yöntem

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

HPLC’de kullanılan asetonitril (CH₃CN) ve sodium hidroksit (NaOH), sodium nitrit (NaNO₂), potasyum nitrat (KNO₃) Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)’den temin edilirken, 18,2 MΩ dirençli ultra saf su ve Milli-Q saflaştırma sistemi (Millipore, Molsheim, Fransa)’de gerekli analizler için sağlanmıştır. Ayrıca çalışmada; HPLC cihazı (Dionex), IonPac AS 11 HC kolonu, degasser, gradient pompa, UV-DAD dedektör kullanılmıştır (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Numunelerin Temini, Hazırlanması, Analizleri ve Validasyon Çalışmaları

Marul (*Lactuca sativa*), ıspanak (*Spinacia oleracea*), baş salata (*Lactuca sativa* var. *capitata*) ve roka (*Eruca sativa*) numuneleri, her biri 3 kg olarak Antalya, Mersin, Adana ve Osmaniye pazarlarından temin edilmiştir. Çalışmada, 34 adet marul örneği (M), 34 adet ıspanak (I), 34 adet baş salata (A) ve 34 adet roka (R) şeklinde kodlanmıştır.

Nitratın tespiti ve miktarın belirlenmesi için, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Önce her bir örneğin yenilebilir olmayan kısımları (kök ve odunsu kısımlar) ayrılarak, geri kalan kısımları parçalanmış ve ezilerek homojenize edilmiş, sonra analize kadar -20°C’de saklanmıştır. Numune çalışma sıcaklığının 25°C’nin üstüne çıkmamasına özen gösterilmiştir. Denemede, 10 g numune tartılarak, 250 ml’lik erlenmayere konulmuştur. Üzerine 60°C 50 ml ultra saf su ilave edilerek, 30 dk mekanik çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Sonra 250 ml’lik mezüre aktarılarak, üzerine 50 ml asetonitril eklenmiştir. 200 ml’ye ise ultra saf su ile tamamlanmıştır. Oda sıcaklığına gelmesi beklenerek, kaba filtre kâğıdı yardımıyla erlenmayere süzülmuştür. Süzüntü hafifçe karıştırılıp, 0,45 µm’lik enjektör filtresinden geçilerek 2 ml’lik vialer alınmıştır. Dilüsyon faktörü, 20 olarak hesaplanmıştır.

Validasyon için, tayin limiti ve ölçüm limiti, lineer ölçüm aralığı belirlenmiş, tek analist tarafından marul örneklerinde farklı günlerde tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve geri

kazanım çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 1). Yapraklı sebzelerde nitratların belirlenmesi için uygulanan analitik metot, Dionex Corporation tarafından inorganik anyonların tespiti için önerilen kromatografik ayrımı uyarlayan EN 12014-4: 2005 sayılı resmi yöntemden başlayarak optimize edilmiştir. Bu yöntem, 657/2002/EC sayılı karar ve 882/2004/EC sayılı karar ile uyumlu olarak Thompson validasyon ilkelerine göre, bir doğrulama modelinin ardından yapraklı sebzelerde nitratların belirlenmesi için tam olarak doğrulanmıştır (Thompson ve ark., 2002; NMKL Method, 2000; European Union, 2004; CCRX, 1988). Bu yöntemin en önemli validasyon parametreleri Çizelge 2'de sunulmuştur.

Kalibrasyon Grafiğinin Çizilmesi

Potasyum nitrat, higroskopik madde olduğu için, 110°C'de 1 saat kurutulmuştur. Önce ana stok çözeltisi (1000 ppm) hazırlanmıştır (1000 ml balon jöje içine 1,5 g sodyum nitrit, 1,629 g potasyum nitrat konularak, tamamen homojen olana kadar karıştırılmıştır. Ultra saf su ile hacim tamamlanmıştır). Hazırlanan çözelti, buzdolabında 2 hafta saklanabilir. Sonra, ara stok çözelti (100 ppm) hazırlanmıştır (ana stok çözeltisinden 10 ml alınıp 100 ml balon jöjeye alınarak, ultra saf su ile hacim tamamlanmıştır). Bu ara stok çözeltisinden 0,2 ppm, 0,6 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm ve 40 ppm standart çözelti hazırlanarak cihazda okumalar gerçekleştirilmiştir. Sonra bu konsantrasyonlara karşı alan grafiği çizilerek, Şekil 1'deki kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Walters, 1991). Dionex HPLC cihazı korelasyon katsayısı (r^2)= 0,9996

Bulgular ve Tartışma

Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için, doğal kontamine marul numuneleri 10'ar kez HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Tayin limiti ve ölçüm limiti, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Tayin Limiti} = \text{ORT} + (3 \times S'_0), S'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Ölçüm Limiti} = \text{ORT} + (10 \times S'_0)$$

ORT= Aritmetik ortalama

s_0 = Kör örnek (0 veya 0'a yakın konsantrasyon seviyesindeki) analiz sonuçlarından hesaplanan standart sapma

S'_0 = Düzeltilmiş standart sapma

Lineer Ölçüm Aralığı

Şekil 1'de görüldüğü üzere, lineer ölçüm aralığını belirlemek amacıyla; 8 farklı konsantrasyonda (0,2; 0,6; 1,3; 10; 20; 40 mg/kg) standartlar hazırlanarak. Dionex HPLC cihazına enjekte edilmiş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Bu amaçla tek analist tarafından, iki farklı günde nitrat içeren marul örneğine 24 ppm (1. konsantrasyon) ve 200 ppm (2. konsantrasyon) düzeyinde nitrat ilavesiyle 10'ar adet analiz yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Çizelge 2 ve Çizelge 3'de verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik Limiti

Tekrarlanabilirlik limiti, her iki gün için ayrı ayrı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$r = 2,8 \times s_r$$

r = Tekrarlanabilirlik limiti

s_r = Standart sapma

1. Konsantrasyon (Matrix+24 ppm)

1. gün için: $r = 2,8 \times 0,676 = 1,894$

2. gün için: $r = 2,8 \times 0,527 = 1,475$

II. Konsantrasyon (Matrix+200 ppm)

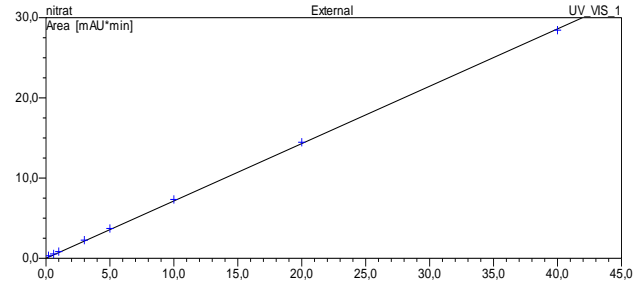
1. gün için: $r = 2,8 \times 1,304 = 3,652$

2. gün için: $r = 2,8 \times 1,032 = 2,891$

Çizelge 1. Tayin limit (LOD) ve ölçüm limit (LOQ) değerleri

Table 1. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values

Dionex	
Analiz No	Nitrat (mg/kg)
1	13,683
2	12,992
3	14,053
4	14,327
5	12,188
6	12,809
7	12,657
8	13,225
9	12,706
10	10,756
ORT	12,940
s	1,016
LOD	13,905
LOQ	16,155



Şekil 1 HPLC cihazının kalibrasyon grafiği

Figure 1 Calibration graphic of the HPLC instrument

Çizelge 2 Konsantrasyona ait tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları (Matrix+24 ppm)

Table 2 Concentration repeatability study results (Matrix+24 ppm)

Dionex (Matrix+24 ppm)		
Analiz No	1. gün (mg/kg)	2. gün (mg/kg)
1	36,212	35,253
2	36,827	36,884
3	36,441	36,483
4	36,577	35,862
5	37,184	36,423
6	35,15	35,636
7	36,466	35,714
8	35,279	36,444
9	36,577	36,148
10	35,567	36,739
ORT	36,228	36,159
s	0,676	0,527
RSD	0,019	0,015

Çizelge 3 Konsantrasyona ait tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları (Matrix+200 ppm)

Table 3 Concentration repeatability study results (Matrix+200 ppm)

Dionex (Matrix+200 ppm)		
Analiz No	1. gün (mg/kg)	2. gün (mg/kg)
1	211,234	211,973
2	213,023	212,755
3	213,963	212,582
4	214,884	211,388
5	213,807	212,61
6	214,89	213,995
7	214,529	214,568
8	213,371	213,792
9	211,329	212,289
10	213,636	213,985
ORT	213,467	212,994
s	1,304	1,032
RSD	0,006	0,005

Çizelge 4 Konsantrasyona ait tekrar üretilebilirlik çalışması sonuçları (1. Konsantrasyon)

Table 4 Concentration reproducibility study results (1. concentration)

Matrix+24 ppm (1. konsantrasyon)			
Cihaz	No	1. gün	2. gün
Dionex	1	36,212	35,253
	2	36,827	36,884
	3	36,441	36,483
	4	36,577	35,862
	5	36,186	37,244
	6	36,274	35,835
	7	36,828	35,378
	8	37,054	38,894
	9	35,546	37,049
	10	36,343	35,973
ORT		36,730	36,551
s		1,130	1,671
RSD		0,039	
Sbirleşik		1,411	
Tek. ürt. lim.		3,951	
2 kişi ort.		36,641	

Çizelge 5 Konsantrasyona ait tekrar üretilebilirlik çalışması sonuçları (2. konsantrasyon)

Table 5 Concentration reproducibility study results (2. concentration)

Matrix+200 ppm (2. konsantrasyon)			
Cihaz	No	1. gün	2. gün
Dionex	1	211,234	211,973
	2	213,023	212,755
	3	213,963	212,582
	4	214,884	211,388
	5	212,763	213,110
	6	211,900	212,732
	7	213,848	213,669
	8	212,407	214,433
	9	212,877	212,776
	10	213,962	213,199
ORT		213,340	212,627
s		1,078	1,303
RSD		0,006	
Sbirleşik		1,234	
Tek. ürt. lim.		3,456	
2 kişi ort.		212,983	

Tekrar Üretilebilirlik

Tek analist tarafından, farklı günlerde toplam 20'şer adet tekrar üretilebilirlik çalışması yapılmıştır. Çalışmalar, aşağıdaki Çizelge 4 ve Çizelge 5'de verilmiştir. Her bir konsantrasyon düzeyinde günler arasındaki fark, F testi ile test edilmiş ve her 2 konsantrasyon düzeyinde de fark önemsiz bulunmuştur.

Tekrar Üretilebilirlik Limiti

Tekrar Üretebilirlik Limiti (R); aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir.

$$R = 2,8 \times S_{\text{birleşik}}$$

Doğruluk

Doğruluk için gerçeklik (bias) çalışması, geri kazanım ile yapılmıştır. Bu amaçla tek analist tarafından; bünyesinde nitrat içeren marul örneğine 24 ppm (1. konsantrasyon) ve 200 ppm (2. konsantrasyon) düzeyinde nitrat ilavesiyle, 10'ar adet analiz yapılarak 10'ar adet hata (bias) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 7'de verilmiştir.

$$\% \text{ Hata (Bias)} = [(X_i - X_t) / X_t] \times 100$$

X_i = Ölçülen değer

X_t = Gerçek değer

Geri Kazanım

Geri kazanım için tek analist tarafından, bünyesinde nitrat içeren marul örneklerine 24 ppm ve 200 ppm düzeyinde nitrat ilave edilmiştir. Sonuçlar ve hesaplanan % geri alma oranları Çizelge 8 ve Çizelge 9'da verilmiştir:

Geri alma oranı aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır:

$$\%R = [(CF - CU) / CA] \times 100$$

CF = Standart eklenmiş kör örnek ölçüm sonucu

CU = Standart eklenmemiş kör örnek ölçüm sonucu

CA = Eklenen standart miktarı

$$\%R = \frac{\bar{X}}{X_{\text{ref}}} \times 100$$

\bar{X} = Referans malzeme ile yapılan analiz sonuçları ortalaması

X_{ref} = Referans değer (referans materyalin sertifika değeri)

$\%R$ = Geri kazanım oranı

Belirsizlik Kaynakları ve Hesaplamaları

Metodun belirsizlik kaynakları; örnek tartımından gelen belirsizlik, örnek hacminden gelen belirsizlik, standart hazırlamadan gelen belirsizlik, kalibrasyon eğrisinden gelen belirsizlik, kesinlikten gelen belirsizlik, doğruluktan gelen belirsizliklerin toplamı şeklinde tanımlanmıştır.

Çizelge 6 Tekrar üretilebilirlik limiti çalışması sonuçları

Table 6 Results of reproducibility limit study

Değerler	Matrix	Matrix+200 ppm
Sbirleşik	1.411	1.234
Tekrar Üretilebilirlik Limiti	3.951	3.456

Çizelge 7 Doğruluk çalışması değerleri

Table 7 Accuracy study values

Dionex	Matrix +24 ppm		Matrix +200 ppm	
	1. gün (mg/kg)	2. gün (mg/kg)	1. gün (mg/kg)	2. gün (mg/kg)
Analiz No				
1	36,212	35,253	211,234	211,973
2	36,827	36,884	213,023	212,755
3	36,441	36,483	213,963	212,582
4	36,577	35,862	214,884	211,388
5	37,184	36,423	213,807	212,610
6	35,150	35,636	214,890	213,995
7	36,466	35,714	214,529	214,568
8	35,279	36,444	213,371	213,792
9	36,577	36,148	211,329	212,289
10	35,567	36,739	213,636	213,985
11	36,186	35,973	212,763	213,110
12	36,274	37,244	211,900	212,732
13	36,828	35,835	213,848	213,669
14	37,054	35,378	212,407	214,433
15	35,546	38,894	212,877	212,776
16	36,343	37,049	213,962	213,199
Xi	36,282	36,372	213,467	212,994
Xt	36,940	36,940	212,940	212,940
%Hata	1,781	1,538	0,247	0,025

Çizelge 8 Konsantrasyona ait % geri alma sonuçları (1. konsantrasyon)

Table 8 Concentration % recovery results (1. concentration)

Dionex	Matrix +24 ppm (1. konsantrasyon)					
	1. gün (mg/kg)			2. gün (mg/kg)		
	Sonuç (mg/kg)	% Geri Alma	Geri Alma	Sonuç (mg/kg)	% Geri Alma	Geri Alma
Analiz No						
1	36,212	96,967	0,970	35,253	92,971	0,930
2	36,827	99,529	0,995	36,884	99,767	0,998
3	36,441	97,921	0,979	36,483	98,096	0,981
4	36,577	98,488	0,985	35,862	95,508	0,955
5	37,184	101,017	1,010	36,423	97,846	0,978
6	35,150	92,542	0,925	35,636	94,567	0,946
7	36,466	98,025	0,980	35,714	94,892	0,949
8	35,279	93,079	0,931	36,444	97,933	0,979
9	36,577	98,488	0,985	36,148	96,700	0,967
10	35,567	94,279	0,943	36,739	99,163	0,992
11	36,186	96,858	0,969	35,973	95,971	0,960
12	36,274	97,225	0,972	37,244	101,267	1,013
13	36,828	99,533	0,995	35,835	95,396	0,954
14	37,054	100,475	1,005	35,378	93,492	0,935
15	35,546	94,192	0,942	38,894	108,142	1,081
16	36,343	97,513	0,975	37,049	100,454	1,005
ORT	36,282	97,258	0,973	36,372	97,635	0,976
s	0,611	2,545	0,025	0,893	3,722	0,037

Doğruluktan gelen belirsizlik, Çizelge 8’de verilen geri alma sonuçlarının ortalaması ve standart sapması bulunmuş olup, aşağıdaki formül göre t değeri hesaplanmış ve geri almaların 1’den farkının önemi test edilmiştir.

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{u(\bar{R})}$$

\bar{R} = Geri alma oranlarının ortalaması

$u(\bar{R})$ = Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması (s/\sqrt{n})

Matrix+24 ppm (1. konsantrasyon)

Matrix+24 ppm marul örneğinde nitrat için; bulunan $t=4,310$ değeri, t ’nin %95 güven aralığında, t - dağılımı tablosu da bulunan kritik değeri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen t değerleri tablo değeri ile karşılaştırılarak ($n-1=15$ için t değeri 2,131’dir), “geri alma oranlarının ortalamasının 1’den farkı önemlidir” yorumu yapılmıştır. Bu durumda, doğruluktan gelen belirsizlik aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$u(R_a) = \sqrt{\left(\frac{1 - \bar{R}}{k}\right)^2 + u(\bar{R})^2}$$

$u(\bar{R})$ = Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması
 $u(R_a)$ = Doğruluktan gelen belirsizlik
 s = Geri alma oranlarının standart sapması
 n = Yapılan analiz tekrar sayısı
 k = Genişletilmiş belirsizlik hesabında kullanılan kapsama faktörü
 $u(\bar{R}) = s/\sqrt{n} = 0,006$
 $u(R_a) = 0,015$

Matrix+200 ppm (2. konsantrasyon)

Matrix+200 ppm marul örneğinde nitrat için; bulunan $t=5,316$ değeri, t 'nin %95 güven aralığında, t - dağılımı tablosunda bulunan kritik değeri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen t değerleri, tablo değeri ile karşılaştırılarak ($n-1=15$ için t değeri 2.131'dir), "geri alma oranlarının ortalamasının 1'den farkı önemlidir" yorumu yapılmıştır. Bu durumda, doğruluktan gelen belirsizlik aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$u(R_a) = \sqrt{\left(\frac{1 - \bar{R}}{k}\right)^2 + u(\bar{R})^2}$$

$u(\bar{R})$ = Geri alma oranlarının ortalamalarının standart sapması
 $u(R_a)$ = Doğruluktan gelen belirsizlik
 s = Geri alma oranlarının standart sapması
 n = Yapılan analiz tekrar sayısı
 k = Genişletilmiş belirsizlik hesabında kullanılan kapsama faktörü
 $u(\bar{R}) = s/\sqrt{n} = 0,001$
 $u(R_a) = 0,004$

Kesinlikten Gelen Belirsizlik
Kesinlikten gelen belirsizlik için, tekrar üretilebilirlik RSD'leri kullanılmıştır.

Birleştirilmiş Belirsizlik
Belirsizlik bileşenleri Çizelge 10'da, birleştirilmiş belirsizlik ise Çizelge 11'da verilmiştir.

NMKL Method No 165. 2000 incelendiğinde; marulda tekrar üretilebilirlik limitinin (R) 59,6 olduğu görülmektedir. Çalışmamızda ise; R değerleri iki konsantrasyon için sırasıyla 3,951 (matrix+24 ppm) ve 3,456 (matrix+200 ppm) olmak üzere daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla tekrar üretilebilirlik limiti değerleri, kabul edilebilir sınırlar içerisindedir. Hesaplanan hata ve geri kazanım oranları da uyumlu bulunmuştur.

102 adet marul, ıspanak, baş salata ve roka örneklerinin nitrat miktarları Çizelge 12'de verilmiştir. Örneklerin %19,6'sında (20 adet), yüksek miktarlarda nitrat bulunmuştur. Çizelgeden de görülebileceği gibi, nitrat miktarları sırasıyla marulda 74-2825 mg/kg, ıspanakta 32-3486 mg/kg, baş salata örneklerinde 33-1985 mg/kg ve roka örneklerinde 24-1870 mg/kg arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmada, en fazla nitrat miktarı 3486 mg/kg ile ıspanak, sonra 2825 mg/kg ile marul, 1985 mg/kg ile baş salata ve 1870 mg/kg olarak roka örneklerinde saptanmıştır. Bu değerler, "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde belirtilen maksimum limit değerlerin altında kalmaktadır. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde (2011), nitrat için belirtilen maksimum limitler, açık tarla koşullarında yetiştirilen marullarda 3000 mg/kg, taze ıspanakta 3500 mg/kg, açık tarla koşullarında yetiştirilen baş salata tipi marullarda 2000 mg/kg ve rokada 6000 mg/kg'dır.

Çizelge 9 Konsantrasyona ait % geri alma sonuçları (2. konsantrasyon)

Table 9 Concentration % and results (2. concentration)

Dionex	Matrix +200 ppm (2. konsantrasyon)					
	1. gün (mg/kg)			2. gün (mg/kg)		
Analiz No	Sonuç (mg/kg)	%Geri Alma	Geri Alma	Sonuç (mg/kg)	%Geri Alma	Geri Alma
1	211.234	99.147	0.991	211.973	99.517	0.995
2	213.023	100.042	1.000	212.755	99.908	0.999
3	213.963	100.512	1.005	212.582	99.821	0.998
4	214.884	100.972	1.010	211.388	99.224	0.992
5	213.807	100.434	1.004	212.61	99.835	0.998
6	214.89	100.975	1.010	213.995	100.528	1.005
7	214.529	100.795	1.008	214.568	100.814	1.008
8	213.371	100.216	1.002	213.792	100.426	1.004
9	211.329	99.195	0.992	212.289	99.675	0.997
10	213.636	100.348	1.003	213.985	100.523	1.005
11	212.763	99.912	0.999	213.11	100.085	1.001
12	211.9	99.480	0.995	212.732	99.896	0.999
13	213.848	100.454	1.005	213.669	100.365	1.004
14	212.407	99.734	0.997	214.433	100.747	1.007
15	212.877	99.969	1.000	212.776	99.918	0.999
16	213.962	100.511	1.005	213.199	100.130	1.001
ORT	213.276	100.168	1.002	213.116	100.088	1.001
s	1.142	0.571	0.006	0.896	0.448	0.004

Çizelge 10 Belirsizlik sonuç tablosu

Table 10 Uncertainty result table

Belirsizlik Bileşenleri	Matrix+24 ppm	Matrix+200 ppm
Doğruluk	0,015	0,004
Kesinlik	0,039	0,006

Çizelge 11 Birleştirilmiş belirsizlik tablosu

Table 11 Unifed uncertainty table

Değerler	Matrix+24 ppm	Matrix+200 ppm
Birleştirilmiş Belirsizlik	0,041	0,007
Genişletilmiş Belirsizlik (%95 güvenle, k=2)	0,082	0,014

Çizelge 12 Marul, ıspanak, baş salata ve roka örneklerine ait nitrat miktarları (mg NO₃/kg)Table 12 Nitrate amounts of lettuce, spinach, iceberg and arugula samples (mg NO₃/kg)

ÖS (Marul)	NM (mg/kg)	ÖS (Ispanak)	NM (mg/kg)	ÖS (Baş salata)	NM (mg/kg)	ÖS (Roka)	NM (mg/kg)
M1	87	I1	32	A1	135	R1	772
M2	1112	I2	3486	A2	132	R2	70
M3	175	I3	58	A3	136	R3	1870
M4	79	I4	389	A4	38	R4	35
M5	1293	I5	412	A5	45	R5	228
M6	102	I6	1114	A6	947	R6	24
M7	118	I7	365	A7	252	R7	339
M8	224	I8	425	A8	1985	R8	41
M9	2135	I9	2136	A9	65	R9	447
M10	74	I10	78	A10	1870	R10	49
M11	77	I11	2345	A11	78	R11	54
M12	186	I12	52	A12	271	R12	1158
M13	97	I13	286	A13	82	R13	67
M14	2111	I14	95	A14	84	R14	664
M15	104	I15	382	A15	273	R15	63
M16	1132	I16	2165	A16	45	R16	76
M17	135	I17	85	A17	41	R17	874
M18	1148	I18	115	A18	236	R18	68
M19	158	I19	368	A19	34	R19	164
M20	216	I20	425	A20	33	R20	65
M21	974	I21	523	A21	347	R21	1135
M22	154	I22	498	A22	85	R22	439
M23	75	I23	302	A23	986	R23	33
M24	81	I24	258	A24	75	R24	32
M25	87	I25	947	A25	476	R25	330
M26	912	I26	125	A26	715	R26	25
M27	103	I27	118	A27	38	R27	127
M28	210	I28	1102	A28	239	R28	34
M29	114	I29	185	A29	41	R29	631
M30	96	I30	145	A30	47	R30	374
M31	207	I31	74	A31	148	R31	76
M32	2825	I32	65	A32	33	R32	75
M33	84	I33	219	A33	1134	R33	568
M34	75	I34	33	A34	44	R34	1169
MİN	74	MİN	32	MİN	33	MİN	24
MAX	2825	MAX	3486	MAX	1985	MAX	1870
ORT	493	ORT	571	ORT	329	ORT	359

ÖS: Örnek sayısı, NM: Nitrat Miktarı

Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında, içerdikleri nitrat düzeylerine göre çalışılan sebzeler en yüksekte en düşüğe doğru ıspanak, marul, baş salata ve roka olarak sıralanmıştır. Petersen ve Stoltze (1999) ve Hunt ve Turner (1994), ıspanak örneklerinde yüksek nitrat seviyelerinin bulunabileceğini doğrulamışlardır. Konu ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, Stavroulakis ve ark. (2018) 396 adet sebze örneğinde basit, hızlı ve hassas bir iyon kromatografisi yöntemini kullanarak, nitrat tayini yapmışlardır. Sonuçlar, sebzelerdeki nitrat miktarının, 10 mg/kg-5619 mg/kg aralığında olduğunu göstermiştir. Yapraklı, kök ve sap sebzeler, diğer sebzelerle kıyasla en fazla bulaşmış olanlardır. Numunelerin yaklaşık %87'si

nitratla kirlenmiş; ancak analiz edilen numunelerin hiçbiri nitrat için maksimum limitlerin üstüne çıkmamıştır. Bir başka çalışmada, taze sebzelerdeki nitrit ve nitrat içeriği, sırasıyla tatlı hardalda 15,22-22,46 mg/kg, brokolide 12,57-6,55 mg/kg, ıspanakta 20,26 ile -90,60 mg/kg ve marulda 18,77 ile -32,68 mg/kg arasında tespit edilmiştir (Cintya ve ark., 2018). Suh ve ark. (2013) Güney Kore'de 25 farklı sebzelerin nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını, 0,6-719 mg/kg ve 0,1-635 mg/kg arasında bulmuşlardır. Farklı bir çalışmada, geleneksel olarak yetiştirilen marullarda örneklerin %51'inde ve entegre yetiştirilen marullarda %34'ünde 1000-2500 mg/kg aralığında nitrat kaydedilirken, organik olarak yetiştirilen marul

örneklerinde, sadece 1 adet örneğin 1000 mg/kg'ın üzerinde nitrat içerdiği tespit edilmiştir (Žnidarčič ve Kmecl, 2018). Bir diğer çalışmada, 75 adet ıspanak ve 75 adet marul örneklerinde iyon kromatografi yöntemi ile nitrat analizleri yapılmış ve 4 adet ıspanakta ve 5 adet marul örneğinde, yasal sınırların üstünde nitrat seviyeleri tespit edilmiştir (Iammarino ve ark., 2014).

Sonuç

Bu çalışmada, nitrat konsantrasyonlarını ölçmek için, 102 adet yapraklı sebze örneği (34 adet marul, 34 adet ıspanak, 34 adet baş salata ve 34 adet roka) analiz edilmiştir. Analizler, doğrulanmış bir yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) metodu ile gerçekleştirilmiştir. Ispanaktaki nitrat düzeyi 32-3486 mg/kg, marulda 74-2825 mg/kg, baş salata'da 33-1985 mg/kg ve roka örneklerinde 24-1870 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Örneklerde bulunan nitrat konsantrasyonlarının hiçbiri, yasal sınırların üstünde olmamıştır. Bu nedenle, bu sebze türlerini tüketmenin, insan ve hayvan sağlığı açısından herhangi bir risk oluşturmayacağı kanısına varılmıştır. Yine de yüksek nitrat konsantrasyonlarına sahip numunelerin yüzdesi göz önüne alındığında, zaman zaman çiftçi eğitimleri ile iyi tarım uygulamalarının yapılmasına, tarımda özellikle sebze türlerinde, nitrat düzeylerinin daha iyi kontrol edilmesine ve sürekli nitrat izleme programlarına olan ihtiyacı vurgulamak gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilmiş bulgular, yapraklı sebzelerde nitrat gelişimini sağlayan mekanizma anlayışımızı derinleştirebilecek gelecekteki araştırmaların temellerini atmamıza yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

Chakraborty S, Newton AC. 2011. Climate change. plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology*, 60: 2-14.

Cintya H, Silalahi J, Putra EDL, Satria D. 2016. Analysis of Nitrate and Nitrite in Vegetables in Medan City. *Der Pharma Chemica*. 8(24): 52-57.

Cintya H, Silalahi J, Putra EDL, Siburian R. 2018. The Influence of Fertilizer on Nitrate, Nitrite and Vitamin C Contents in Vegetables. *Orient. J. Chem.* 34: 2614-2621.

CCRX (Coördinatie Commissie voor de metingen van Radioactiviteit en Xenobiotische stoffen) 1988. Metingen van radioactiviteit en xenobiotische stoffen in het biologisch milieu in Nederland 1986. [Measurements of radioactivity and xenobiotics in the Dutch biological environment 1986.] VROM, Leidschendam. 70 p.

Corrè WJ, Breimer T. 1979. Nitrate and nitrite in vegetables. Wageningen, Netherland: Centre for Agricultural Publishing and Documentation.

European Union Commission Regulation (EC). 2004. No. 882/2004. Off. J. Eur. Comm .L165: 1-141.

European Commission Regulation 1882/06. (2006). Laying down methods of sampling and analysis for the official control of the levels of nitrates in certain foodstuffs. Official Journal of the European Communities L 364/25.

European Food Safety. 2008. Nitrate in vegetables: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. Question No. EFSA-Q-2006-071. EFSA J., 689: 1-79.

Hunt J, Turner MK. 1994. A survey of nitrite concentrations in retail fresh vegetables. *Food Addit. Contam.* 11: 327-332.

Iammarino M, Di Taranto A, Cristino M. 2014. Monitoring of nitrites and nitrates levels in leafy vegetables (spinach and lettuce): a contribution to risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* 94: 773-778.

Keeton JT. 2011. History of Nitrite and Nitrate in Food. In: Bryan N, Loscalzo J. (eds). Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease. Nutrition and Health. Humana Press.

Leszczyńska T, Filipiak-Florkiewicz A, Cieślak E, Sikora E, Pisulewski PM. 2009. Effects of Some Processing Methods on Nitrate and Nitrite Changes in Cruciferous Vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 22(4): 315-321.

Menard C, Heraud F, Volatier JL, Leblanc JC. 2008. Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France. *Food Addit. Contam.* 25: 971-88.

National Research Council. 1981. The Health Effects of Nitrate, Nitrite, and N-Nitroso Compounds: Part 1 of a 2-Part Study. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/19738>.

NMKL (Nordic Committee of Food Analysis). (2000). Nitrite and nitrate in foodstuffs by ion chromatography. NMKL No. 165. Available from: <http://www.nmkl.org>.

Pannala AS, Mani AR, Spencer JP, Skinner V, Bruckdorfer KR, Moore KP, Rice Evans CA. 2003. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Rad Biol Med.* 34: 576-584.

Petersen A, Stoltze S. 1999. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. *Food Addit. Contam.* 16: 291-299.

Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J. Sci. Food Agr.* 86: 10-17.

Savaş R. 1966. Toprak ve Gübre Bilgisi. Ankara: Tarım Bakanlığı, Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü Ders Kitapları No: 3.

Schuddeboom LJ. 1993. Nitrates and Nitrites in Foodstuffs. Council of Europe, Strasbourg.

Sindelar JJ, Milkowski AL. 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide.* 26: 259-66.

Speijers GJA. 1996. Nitrate. In Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants in Food. World Health Organization (WHO). Food Additives Series 35, Geneva, pp. 325-360.

Stavroulakis G, Kafouris D, Christofidou M, Paikousis L, Christou E, Christodoulidou M, Kanari P, Ioannou-Kakouri E. 2018. Occurrence of nitrate in vegetables and dietary exposure assessment for the Cypriot adolescent consumers. *Accreditation and Quality Assurance*, 23(2): 115-122.

Suh J, Paek O, Kang YW, Ahn JE, Jung JS, An YS, Park SH, Lee SJ, Lee KH. 2013. Risk Assessment on Nitrate and Nitrite in Vegetables Available in Korean Diet. *J. Appl. Biol. Chem.* 56(4): 205-211.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R. 2002. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry.* 74(5): 835-855.

Şahinkaya H., Bayhan O. 1972. Nitrifikasyon Bakterileri Üzerinde Bir Araştırma. Ankara: TÜBİTAK, Sayı:18.

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. 2011. Resmi Gazete Tarihi: 29.12.2011 Resmi Gazete Sayısı: 28157 (3.mükerrer).

Walters CL. 1991. Nitrate and nitrite in foods, V. In: Hill M. (ed.). Nitrates and nitrites in food and water. Chichester, UK: Ellis Horwood Limited series in Food Science and Technology.

Žnidarčič D, Kmecl V. 2018. The influence of cultivation method on nitrate content in some lettuce samples. *Acta Agriculturae Slovenica*, 111(3): 683-690.