

YEM VE YEM HAMMADDELERİ İLE BAZI BİYOLOJİK SIVILARDA NİTRİT  
VE NİTRAT ANALİZİ

Sezai Kaya\*

**Analysis of nitrite and nitrate in feeds, feed raw materials and some biological fluids**

**Summary:** *A method was made to adapt for determining the concentrations of nitrate and nitrite in feedstuffs and some biological fluids. The nitrite was determined spectrophotometrically by diazotization of sulfanilamid and subsequent coupling with N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine. The concentration of nitrite plus nitrate was determined similarly but after reduction of nitrate to nitrite on a cadmium column. Therefore, in samples containing both form of nitrogen, nitrate was measured by the difference of the 2 values.*

*Nitrite and nitrate were added to those samples in the concentrations between 0.5-60 ppm, and sensitivity and ratio of recovery of the method were determined. From the results of experimental analysis it was found that the mean recovery for nitrite was  $97.02 \pm 0.94$ ,  $95.70 \pm 1.02$  and  $99.70 \pm 0.24$  percent in feedstuffs, plasma and rumen fluid, respectively; for nitrate was  $94.70 \pm 1.9$ ,  $93.90 \pm 2.67$  and  $98.40 \pm 0.65$  percent in feedstuffs, plasma and rumen fluid, respectively. On the other hands, it was found that the concentrations in the feedstuffs to the level  $1 \mu\text{g/g}$ . and in the plasma and rumen fluid to the level  $0.1 \mu\text{g/ml}$  for both ions can be measured.*

*It is concluded that the method has given comparable results to those used for the determination nitrite and nitrate in feedstuffs and some biological fluids.*

**Özet:** *Yem ve yem hammaddeleri ile bazı biyolojik sıvılardaki nitrit ve nitrat yoğunluğunun belirlenmesi için geriye kazanç denemelerine dayanan bir yöntem uyarlaması yapıldı. İncelenen numünelere 0.5-60 ppm arasında nitrit ve nitrat katılarak yöntemin geriye kazanç yüzdesi ve duyarlılığı belirlendi. Nitrit ve nitrat katılarak yöntemin geriye kazanç yüzdesi ve duyarlılığı belirlendi. Nitrit iyonu için geriye kazanç yüzdesi ortalama olarak yem ve yem hammad-*

delerinde  $97.02 \pm 0.94$ , plazmada  $95.70 \pm 1.02$  ve rumen sıvısında  $99.70 \pm 0.24$ ; nitrat için yem ve yem hammaddelerinde  $94.70 \pm 1.9$ , plazmada  $93.90 \pm 2.67$  ve rumen sıvısında  $98.4 \pm 0.65$  olarak bulundu. Numüne çeşidi dikkate alınmaksızın yapılan değerlendirmede katılan nitritin ortalama olarak  $\% 96.3 \pm 0.98$  ve nitratın  $\% 95.5 \pm 1.7$  oranında geriye kazanıldığı hesaplandı. Yöntemle, yem ve yem hammaddelerinde  $1 \mu\text{g/g}$ , plazma ve rumen sıvısında  $0.1 \mu\text{g/ml}$  yoğunluğundaki nitrit ve nitratın ölçülebileceği ortaya konuldu. Yöntemin benzerleri ile karşılaştırılabilecek derecede iyi sonuçlar verdiği sonucuna varıldı.

### Giriş

Nitrit ve nitratlar doğal olarak toprak, su, atmosfer, tüm bitki kısımları ve ette bulunur. Tarımda azotlu gübrelerin fazla miktarda kullanımı ile insan, hayvan ve endüstriyel artıklardan kaynaklanan nitrojenle tahıllar, bitkiler, toprak ve sudaki nitrojen seviyesi sürekli şekilde artar (15, 29). Diklorofenoksi asetik asit türevi herbisidlerin kullanılması sonucu hayvanlar için zehirleyici olabilecek miktarlarda nitrat bitkilerde birikebilmektedir (11). Ayrıca, bitkilerde nitrat birikimi üzerine hava şartlarının da önemli bir etkisi söz konusudur (8).

Aşırı miktarda nitrat alınması durumunda, nitrit şekillenme hızı nitrit yıkımından fazla olabilmekte ve sonuçta sindirim kanalındaki nitrit yoğunluğu artmaktadır. Böylece, fazla miktarda oluşan nitrit emilerek aşağıda sıralanan etkilere sebep olabilmektedir: 1. Kan hemoglobininin methemoglobine çevrilmesi ile anoksi, 2. kan basıncındaki düşme sonucu hemodinamik bozukluklar ve 3. karsinojenik etkili N-Nitrozo bileşiklerin şekillenmesi sonucu hayvanlarda ve hayvansal ürünleri tüketenlerde kanser tehlikesi artışı (6, 15, 16, 18).

Bitkiler topraktaki azotu tümüyle değerlendiremezler. Bu durum toprağın nitrojen miktarının artışında önemli bir rol oynar. Fazla verim elde etmek amacı ile fazla miktarda azotlu gübre kullanılması toprağın azot yükünü gittikçe artırır. Nitratların önemli bir kaynağı da fazla miktarda azotlu madde ihtiva eden ve nitratlara çevrilebilen insan ve hayvanların artıklarıdır. Öyleki, 450 kg'lık bir sığırın yılda ortalama 43 kg'dan fazla, bir insanın da 5 kg'a yakın nitrojen çıkarıldığı hesaplanmıştır. Böylece, küçük bir bölgedeki hayvansal artıklar önemli bir nitrojen kaynağı oluştururlar. Atılan bu miktarın sadece  $\% 10$ 'unun ekili alanlara tekrar döndüğü düşünülürse, ne kadar önemli bir çevre sorununun olduğu kolayca anlaşılır (29). Böyle alanlarda yetişen çeşitli yem bitkilerinde zehirleyici düzeyde nitrat birikebilir ve hayvanlar için başlıca tehlikeyi bu bitkiler teşkil eder (4, 11).

Endüstriyel artıklar ve lağım suyu akıntıları doğrudan yüzey sularına karışan yoğun nitrojen bileşikleri kaynağıdır. Bir yandan bu bileşikler, diğer yandan devam eden nitrifikasyon işlemi ile yüzey ve yeraltı sularının azot miktarı gittikçe artar (3, 22). Petrol rafinerileri, yakıt ve besin endüstrisinden kaynaklanan artıklar azotla kirlenmenin önemli bir nedenini teşkil ederler (29).

Nitratların önemli kaynaklarından birisi de içme sularındır. Coğrafi şartlara, insan ve hayvansal artıkların atılma şekline, yerel olarak uygulanan gübrelemenin derecesine ve endüstriyel azotlu maddelerin atılmasına göre yüzey ve yeraltı sularındaki nitrat ve nitrit yoğunluğu çok geniş limitler arasında değişir. Genel olarak yüzey sularında 10 mg/l'den fazla nitrat ve 1 mg/l'den fazla nitrit bulunmamaktadır (2, 22, 29).

Bazı et ürünlerine aroma ve renk verilmesi ile muhafazalarında kullanılan nitrat ve nitritler, bazan bu tür besin maddelerinde normalden çok fazla miktarda (6570 mg/kg) bulunarak, özellikle insanlar için tehlikeli olmaktadır (29).

Kendisi çok az toksik bir madde olan nitrat, alındıktan sonra mikrobiyal yaşamın söz konusu olduğu yerlerde amonyağa indirgenirken ara yerde nitrit şekillenmesi ve bunun da emilerek hemoglobini methemoglobine çevirmesi sonucu dolaylı şekilde toksisitesini oluşturur. Hemoglobinin methemoglobine çevrilmesi vücutta her zaman meydana gelirse de, ikincinin miktarı daima düşük ve değişmeyen bir seviyede tutulur (3, 15, 22). Böyle sabit bir düzeyin sağlanması kanda normal olarak bulunan Diaforaz I ve II enzimleriyle gerçekleştirebilir (11). Kandaki methemoglobin yoğunluğu % 5-10 olduğunda ilk siyanoz belirtileri, %50 ya da üzerinde olduğunda ölüm görülebilir (3, 29). Ölüm nedeni şiddetli methemoglobinin yol açtığı asfeksidir (24).

Karbonhidrat alımının sınırlandırılması, beslenmenin asgariye indirilmesi, nitratlı yemin alım hızı, bazı iz element eksiklikleri ve nitrite indirgenmeye yardımcı faktörlerin bulunup bulunmaması önem taşırsa da (8, 26, 29), alınan nitrat miktarı ve kandaki methemoglobin yoğunluğu arasında son derece önemli ve yakın bir ilişki vardır. Her yemlemeyle 0.15 g/kg NO<sub>2</sub> alındığında, kandaki methemoglobin yoğunluğu % 50'nin üzerine yükselmekte ve birkaç dakika içinde ölüm meydana gelebilmektedir (3, 7, 14). Sığırlarda günlük alınabilir nitrat miktarı hakkında oldukça değişik görüşler vardır.

Bazı araştışıcılar (11) günlük en fazla alınabilir miktar olarak 0.1 g/kg NO<sub>2</sub>'dan bahsederken, bazıları da (14) günlük 90 g nitrat alınabileceğini ifade etmişlerdir.

Nitrat ve nitritler N-Nitrozo bileşiklerin n maddeleri olarak bilinirler. 1956 yılında ilk kez dimetilnitrozaminin ratlarda karaciğer kanserine yol atığının belirlenmesinden sonra, birçok deney hayvanında kansere neden olan 100'den fazla N-Nitrozo bileşik bulunmuştur. Bu bileşiklerin insanlarda da benzer etkilerinin olduğu düşünülebilir. Zira, asit ortamda nitroz asit sekonder aminlerle ve N-substitute amidlerle reaksiyona girerek N-Nitrozo bileşikleri meydana getirirler. Mide z suyu da nitrasyon reaksiyonu için ideal bir ortam oluşturur (3).

Nitrat ve nitrit zehirlenmelerinin teşhisi klinik belirtiler ve laboratuvar analizlere göre yapılır. Laboratuvarda, yenilen besin maddesi, su, mide içeriği, idrar ve kanda nitrat ve nitrit ve ayrıca, kanda methemoglobin yönünden analizler yapılarak teşhise gidilir. Yaygın şekilde kullanılan yöntemlerde, analiz numnesinin hazırlanması, nitrit ve nitratın ekstraksiyonu ve kirletici maddelerin uzaklaştırılmasından sonra (10, 14, 19, 21, 27), çoğunda nitrat ve nitrit miktarı spektrofotometreyle lme esasına dayanan benzer basamaklar izlenir (1, 5, 9, 12, 13, 20, 21, 28).

Bu çalışmada, gerek insanlar ve gerekse hayvanlar için toksik etkisi olan nitrit ve nitratın çeşitli yem ve yem hammaddeleri ile bazı biyolojik sıvılarda aranması amacı ile basit, güvenilir ve duyarlı bir yöntem uyarlaması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Materyal olarak çeşitli karma yem ve yem hammaddeleri ile plazma ve rumen sıvısı kullanıldı. Belirtilen bu maddelere 0.5-60 ppm arasında çeşitli miktarlarda nitrit ve nitrat katularak yem ve yem hammaddelerinden 43, plazmadan 18 ve rumen sıvısından 23 geriye kazanç analizi yapıldı.

Schneider ve Yeary (21) ile Kaam ve ark. (12) tarafından bildirilen metotlardan yararlanarak uyarlanan bir metotla analizler gerçekleştirildi. Metotta baştan sona demineralize su kullanıldı. Tüm cam malzemeler yıkandıktan ve bu suyla çalkalandıktan sonra etdde kurutuldu.

*Ayrıçlar*

1. *Sulfanilamid ayrıracı* (%2'lik; 97.5 ml su ve 2.5 ml fosforik asit ile hazırlandı).
2. *Sulfanilamid ayrıracı* (% 0.5'lik; % 50'lik HCL'de hazırlandı).
3. *N-(-1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochlorid ayrıracı* (NEDA) (% 0.5'lik; suyla hazırlandı).
4. *Süblime çözeltisi* (%0.5'lik; suyla hazırlandı).
5. *Sodyum karbonat çözeltisi* (0.5 M olarak suyla hazırlandı).
6. *Amonyum klorür tamponu* (pH 9.6).
7. *Hidrojen peroksit çözeltisi* (%0.025'lik; suyla hazırlandı).

**Numünelerin analize hazırlanması**

*Kan*: Bir tübe EDTA'lı 10-15 ml kan alındı. Hemen 10 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Plazma analiz edilene dek soğutucuda saklandı.

*Rumen sıvısı*: 20 ml kadar rumen sıvısı alınarak, renk giderici olarak kurşun asetat katıldı ve analize kadar soğutucuda saklandı. Analize başlanmadan önce ortamdaki fazla kurşun asetat sodyum sulfatla giderildi.

*Yem ve yem hammaddeleri*: Numuneler analizden önce değirmende çekilerek ezildiler.

*Yemlerden nitrit ve nitrat ekstraksiyonu*: 100 ml'lik erlenmayere 5 g yem numünesi konuldu. 1 g aktif kömür, yaklaşık 70 ml su ve 5 ml civa klorür çözeltisi katılarak ağız mantar bir tıpa ile kapatılıp 50°C'ye ayarlı su banyosuna konuldu. Ara sıra çalkalanarak burada 30 dakika tutuldu. Soğutuldu. 5 ml sodyum karbonat çözeltisi ilave edilip karıştırıldıktan sonra suyla hacmi 100 ml'ye ulaştırıldı. 5 dakika kadar beklendi ve süzülde.

*Nitrit miktarının ölçülmesi*: Filtrattan 10 ml alınarak 25 ml'li mezüre konuldu. 5 ml su ve 0.5 ml hidrojen peroksit çözeltisi katıldı ve karıştırıldı. 5 ml sulfanilamid-fosforik asit ayrıracı katıldı ve iyice karıştırıldı. 3-4 dakika beklendi. 0.5 ml NEDA ayrıracı katıldı. 20 dakika beklendi. Kullanılan numüne ile aynı şekilde hazırlanan blankle 540 nm'de sıfıra ayarlanmış 10 mm küvetli spektrofotometrede absorbansı okundu. Daha önce hazırlanan nitrit standard eğrisi ile karşılaştırarak numündeki nitrit miktarı  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi: Elde

edilen deger analiz edilen numüne ağırlığı dikkate alınarak ppm'ce çevrildi.

*Plazma ve rumen sıvısı*: 25 ml'lik mezüre 0.5 ml plazma ya da rumen sıvısı konuldu. Suyla hacmi 5 ml'ye tamamlandıktan sonra, yem ve yem hammaddelerinde nitrit ölçülmesinde "hidrojen peroksit katılmasıyla" başlanarak aynı yol izlendi.

*Nitrit standard eğrisi*: 25 ml'lik mezürlere 20 µg/ml'lik NO<sub>2</sub>- uygulama standardından 0.025-0.625 ml arasında çeşitli miktarlarda konulup "5 ml su ilavesiyle" başlanarak, yukarıdaki gibi devam edilip, spektrofotometrede, suyla hazırlanan blenke karşı okunarak standard nitrit eğrisi çizildi (Grafik 1).

### **Nitrat miktarının ölçülmesi**

*Plazma ve rumen sıvısının temizlenmesi*: 10 ml'lik santrifüj tübüne 2 ml plazma ya da rumen sıvısı konuldu. 4 ml civa klorür eklendi. İyice karıştırıldı. En azından 3 dakika beklendi. 4 ml sodyum karbonat katıldı, karıştırıldı ve 1 dakika beklendi. Bu sürenin sonunda 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 50 ml'lik behere 5 ml supernatant sıvı alındı.

*Nitratın nitrite indirgenmesi*: 50 ml'lik behere yem ve yem hammaddelerine ait filtrattan 10 ml alındı. 5 ml su ve 5 ml de amonyum klorür tamponu katıldı. İyice karıştırıldı. Hazırlanan ve rejenere edilen kadmiyum indirgeme kolonuna (12) karışım aktarıldı. Elue edildi. Kolon 10 ml tuz çözeltisi ile yıkandı. 50 ml eluat elde edilene kadar kolondan su geçirildi. 25 ml'lik mezüre bundan 10 ml alındı. 5 ml sulfanilamid-HCl ayırıcı katıldı ve iyice karıştırıldıktan sonra 3 dakika beklendi. 2 ml NEDA katıldı, karıştırıldı ve hacmi suyla 25 ml'ye ulaştırıldı. 20 dakika beklendi. Bu süre sonunda 540 nm'de blenke karşı okundu.

Numüne analizi durumunda, numünenin içerdiği tüm nitrat nitrite çevrilmesi sebebiyle, nümünenin gerçek nitrat düzeyi daha önce bulunan nümüne nitriti miktarının, burada elde edilen total nitrit değerinden (indirgenmiş nitrat-mevcut-nitrit) çıkararak, nitrata ekimolar çevrilme sağlamak amacı ile elde edilen bu değer 1.348 ile çarpılmasından sonra bulundu.

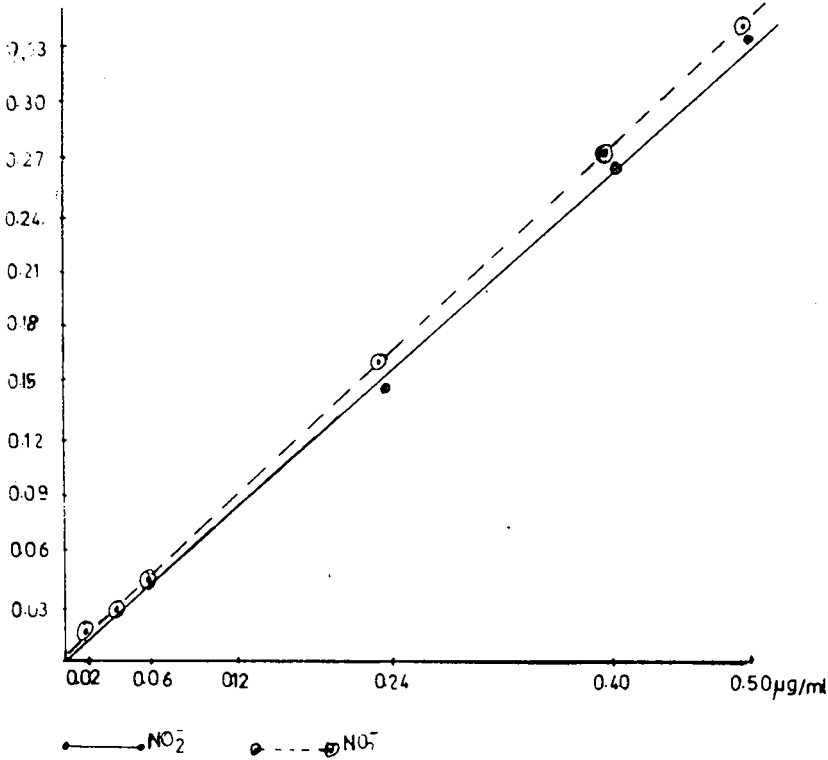
*Plazma ve rumen sıvısı*: 50 ml'lik beherdeki 5 ml plazma yada rumen sıvısı supernatantına "5 ml su katılmasıyla" başlayarak yem

ve yem hammaddelerinde, nitratın nitrite indirgenmesindeki yol izlenip nitrat,  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulundu.

*Standard nitrat eğrisi:* 10 ml'lik santrifüj tübüne 0.1 mg/ml  $\text{NO}_3^-$  standardından 5-125  $\mu\text{g}$ 'a denk gelecek şekilde çeşitli miktarlarda konuldu. Her birinin hacmi distile suyla 2 ml'ye tamamlanarak "civa klorür" ilavesiyle başlanıp, numünelerin analizindeki yol izlenerek, standard nitrat eğrisi çizildi (Grafik 1).

### Bulgular

Nitrit ve nitrite indirgendikten sonra nitrat iyonu asit çözeltide sulfanilamid ile reaksiyona girerek bir diazonyum tuzu şekillendirir. Oluşan bu tuz daha sonra aromatik bir maddeyle tepkimeye sokularak, spektrofotometreyle ölçülebilen pembe renkli ve dayanıklı bir bileşik meydana getirir.



Grafik 1 Nitrit ve nitrat standard eğrisi.

Spektrofotometrede son okuma aşamasında, 0.02–0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'ye denk gelecek şekilde 20  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_2^-$  ve 100  $\mu\text{g}$   $\text{NO}_3^-$  /ml'lik standard çözeltilerle hazırlanarak çizilen nitrit ve nitratın standard eğrileri Grafik 1'de görülmektedir.

Grafik 1 incelendiğinde, kullanılan kadmiyum indirgeme metodu ile ortamdaki nitratın % 100 oranında nitrite indirgendiği kolaylıkla anlaşılmaktadır. Bundan kolon verimliliğinin tam olduğu sonucu çıkar.

Yem ve yem hammaddeleri ile plazma ve rumen sıvısına 0.5–60 ppm'e denk gelecek şekilde nitrit ya da nitrat katılarak yapılan geriye kazanç denemelerinden alınan ve çizilen standard eğrilerle karşılaştırılarak elde edilen üç grup numüneye ait ortalama geriye kazanç yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1 incelendiğinde, bireysel analiz sonuçlarına göre hesaplanan geriye kazanç yüzdesinin nitrit için 92.4–100; nitrat için 86.6–100 arasında değiştiği anlaşılmaktadır. Eşit yoğunluklarda nitrit ve nitrat katılarak yapılan geriye kazanç denemelerinde, analiz edilen numune çeşidine göre, numunelerden ortalama geriye kazanç yüzdesinin nitrit için 93.5–98.6; nitrat için 92–99.7 arasında olduğu görülmektedir. Çeşitli düzeylerde nitrit ve nitrat katılarak yapılan geriye kazanç denemelerinde, tüm numünelerde ortalama geriye kazanç yüzdesi nitrit için  $96.3 \pm 0.98$  ve nitrat için  $95.5 \pm 1.70$  olarak bulundu.

Tablo 1. Yem ve yem hammaddesi, plazma ve rumen sıvısından nitrit ve nitratın geriye kazancı

Katılan miktar ppm	Geriye kazanç oranı (%)		
	Yem ve yem hammaddesi	Rumen sıvısı	Plazma
$\text{No}_2^-$ 0.5 1.0 1.5 3.0 6.0	98.6	100	97.3
	98.4	98.8	98.0
	98.7	100	95.6
	95.7	100	94.4
	94.7	100	92.4
Ortalama	97.02+0.95	99.7+0.24	95.7+1.02
$\text{No}_3^-$ 0.5 5.0 15.0 30.0 60.0	98.6	100	100
	99.2	100	100
	95.2	97	86.6
	92.4	98.0	93.2
	88.7	97.3	90
Ortalama	94.7+1.9	98.4+0.65	93.9+2.67



Analiz edilen numüne ağırlıkları dikkate alınarak, spektrofotometreyle en az miktarda belirlenebilen nitrit ve nitrat miktarı bulunarak, metodun duyarlılık derccesi hesaplandı. Her iki iyonun 0.02  $\mu\text{g/ml}$ 'lik yoğunluklarının verdiği absorbansın 0.015 dolayında olduğu ve bu absorbansı veren nitrit ve nitratın bulunduğu yem ve yem hammaddesi ya da plazma-rumen sıvısı miktarı dikkate alındığında, metodun yem ve yem hammaddelerindeki duyarlılık düzeyinin 1 ppm, plazma ve rumen sıvısında 0.1 ppm olduğu hesaplandı.

### Tartışma ve Sonuç

Çeşitli besin maddelerindeki nitrit ve nitrat yoğunluğunun belirlenmesinde genellikle iki tekniğe başvurulur: nitratın nitrite indirgenmesi ve nitritin nitrata oksidasyonu. Burada, önce total nitrit-nitrat miktarı ölçülerek total nitrojen yoğunluğu bulunur, daha sonra nitritin veya nitratın miktarı oksidasyon ya da indirgenmeden önceki veya sonraki farktan hesaplanır.

Toyoda ve ark. (25) çeşitli besin maddelerinde nitrit ve nitrat ölçülmesi için 2,4-xylenol metodunu Gaz-sıvı kromatografiye uyarlayarak oksidasyon esasına dayanan bir metot bildirmişlerdir. Bunda, nitrit 2,4-xylenol ile nitratın ölçülmesinden önce sulfamik asit ile ortamdan uzaklaştırılmakta ve permanganatla nitrata oksidasyondan sonra 2,4-xylenol metodu ile Gaz-sıvı kromatografide ölçülmektedir.

Nitratın ölçülmesi esasına dayanan teknikler özellikle düşük düzeyde nitrat ve suda çözünebilir organik madde ihtiva eden numunelerde hatalı sonuçlar vermektedir. Bu hatalı değerler: kuvvetli asitlerin varlığında organik madde ile nitratın indirgenmesinden, bazı yöntemlerde nitrat olarak ölçülen renge yardımcı olabilen önemli ölçüdeki yanmadan ve ekseriyetle birlikte ekstrakte edilen ve nitratın ölçülmesinde interferans yapan organik anyonlardan kaynaklanmaktadır (23, 27).

Günümüzde yaygın biçimde kullanılan metotlar ortamdaki nitritin ölçülmesi esasına dayanırlar. Bunun için önce ortamdaki nitrat nitrite indirgenir. Bu indirgeme işlemi bakır, çinko, hidrazin sulfat, kadmiyum tozu ve süngerimsi kadmiyum gibi çeşitli indirgeyici maddelerin kullanılması ile başarılabilmektedir. Ancak, sayılan bu maddelerin çoğu ya yetersiz indirgeme yapabilmekte ya da nitriti amonyağa kadar indirgeyebilmektedir. Genellikle, en iyi sonuç veren ve en fazla kullanılan indirgeme metodu, süngerimsi kadmiyumla hazırlanandır (12, 21, 27).

Süngerimsi metalik kadmiyum ile hazırlanan çeşitli kolon tipleriyle ve özellikle pH 9.5-9.7 arasında, kolondan geçen sıvının akış hızı 4.6 ml/dak. olacak şekilde ayarlandığında ve her kullanımdan sonra kolon rejenere edildiğinde, ortamdaki nitrat hemen hemen tamamı ile nitrite indirgenmektedir. Çeşitli araştırmacılar (21, 27) bu teknikle indirgenmenin % 100 dolayında gerçekleştiğini kaydetmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan metotla elde edilen sonuçların da literatürdekilerle uygunluk gösterdiği saptanmıştır (Grafik 1).

İncelenen numunelere 0.5-6 ppm'e denk gelecek şekilde katılan nitritin yem ve yem hammaddelerinden %  $97.02 \pm 0.94$ , plazmadan %  $97.7 \pm 1.02$  ve rumen sıvısından %  $99.7 \pm 0.24$  oranında geriye kazanıldığı bulunmuştur. Nitratın geriye kazanç yüzdesinin belirlenmesinde de benzer yol izlendi ve Tablo 1'de görüleceği üzere katılan nitrat, yem ve yem hammaddelerinden %  $94.7 \pm 1.9$ , plazmadan %  $93.9 \pm 2.67$  ve rumen sıvısından %  $98.4 \pm 0.65$  oranında tekrar geriye kazanılmaktadır. Nitrat için bulunan bu değerler ayrıca, kullanılan kadmiyum indirgeme kolonunun verimliliğinin çok yüksek olduğunu da göstermektedir.

Toyoda ve ark. (25) çeşitli besin maddeleri ile yaptıkları çalışmada, nitrat ve nitritin, sırasıyla % 83-100 ve % 80-100; Kaam ve ark. (12) gene çeşitli besin maddeleri ile yaptıkları çalışmada, nitritin % 87-107 ve nitratın % 91-105 oranında; Schneider ve Yeary (21) plazmadan nitrit'in % 100 ve nitrat'ın buna yakın oranda, Kühnert (17) çeşitli biyolojik sıvılardan nitrat ve nitrit'in % 97-99 oranında geriye kazanıldığını belirtmişlerdir. Bu literatür verilerinden de anlaşılacağı üzere, önemli derecede güvenilir ve tekrarlanabilir olarak belirtilen metotlarla yapılan denemelerde de nitrit ve nitratın geriye kazanç yüzdeleri yüksek olmakta ve belli bir varyasyon gösterebilmektedir. Metotla elde edilen ve yukarıda sıralanan, aynı nitelikli verilerin daha dar sınırlar içinde değişkenlik gösterdiği dikkate alınrsa, uygulanan metodun tekrarlanabilirlik ve güvenilirlik yönlerinden oldukça yeterli olduğu görülür.

Nitrat ve nitrit'in çeşitli miktarlarını katarak yapılan geriye kazanç denemeleri sırasında, ayrıca, yapılan duyarlılık hesaplamalarında, metodun yem ve yem hammaddelerinde 1 ppm, plazma ve rumen sıvısında 0.1 ppm nitrit ya da nitrat'a duyarlı olduğu bulundu. Kühnert (17) tarif ettiği xyleneol nitrifikasyon metodunun biyolojik sıvılardaki duyarlılık sınırını 0.5 ppm olarak belirtmiştir. Kaam ve ark. (12) kullandıkları metotla çeşitli besin maddelerinde 1 ppm'e kadar

bulunan nitrit ve nitratın ölçülebileceğini bulmuşlardır. Toyoda ve ark. (25) kullandıkları gaz-sıvı kromatografi ile çeşitli besin maddelerinde 0.1 ppm'e kadar nitrat kalıntısını ölçmüşlerdir. Wegner (28) biyolojik sıvılarda 0.15-1.5, Schneider ve Yeary (21) plazmada 0.1 ppm'e kadar nitrit ya da ekimolar nitrat'ı belirleyebildiklerini ifade etmişlerdir. Yöntemin duyarlılık düzeyine ilişkin veriler, yukarıdaki benzeri değerlerle karşılaştırıldığında, kullanılan metot yönünde bazı olumlu sonuçlar dikkati çekmektedir.

Bazı karma yem ekstraktlarında, nitrit ve nitratla interferens yapan yeşilimsi-sarı pigmentlerle karşılaşmaktadır. Ayrıca, ortamda bulunabilecek çok az miktardaki askorbik asit de spektrofotometrik okumayı önemli derecede engelleyebilmektedir. Bu güçlükler yem numunesinin ekstraksiyonu sırasında ortama katılan aktif kömürle etkili bir şekilde giderilmektedir (27).

Sonuç olarak şu söylenebilir ki, nitrat ve nitrit zehirlenmelerinin teşhisinde klinik belirtiler yanında, kullanılan yem ve yem hammaddeleri ile içilen su ve zehirlenenlerden alınan kan ve mide barsak içeriğine ait numünelerin belirtilen maddeler yönünden laboratuvar analizi önem taşır. O nedenle, arzedilen metotun, bir bütün olarak, amacı karşılayabileceği, basit, duyarlı ve uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

#### Literatür

- 1- **Adriaanse, A. and Robbers, J.E.** (1969): *Determination of nitrite and nitrate in some horticultural and meat products and in samples of soil.* J. Sci. Ed. Agric., 20; 321-325.
- 2- **Borneff, m.** (1980). *Untersuchungen an sauglinge in gegenden mit nitrathaltigen trinkwasser.* Zbl. Bact. Hyg. 1, Abt, Orig B. 172: 59-66.
- 3- **Burden, J. R.** (1980): *Nitrate contamination of New Zealand oquifers: a review.* N. Z. Vet J., 25: 205-220.
- 4- **Engel, R.E. and Zubriski, J.C.** (1982): *Nitrogen concentrations in spring wheat of several growth stages.* Commun. In Soil Sci., Plant Anal., 13: 531-544.
- 5- **Furman, N.H.** (1962): *Standart methods of chemical analysis.* 6th ed. Vol. 1. D Van Nostrand Comp., Inc. Princeton, New Jersey.
- 6- **Geurink, J.H., Malestein, A., Kemp, A., Korzeniowski, A. and Th. Van't Klooster, A.** (1982): *Nitrate poisoning in cattle. 7. Prevention.* J. Agric. Sci., 30: 105-113.
- 7- **Geurink, J.H., Malestein, A., Kemp, A. and Th. Van't Klooster, A.** (1979): *Nitrate poisoning in cattle. 3. The relationship between nitrate intake with hay or fresh roughage and the speed of intake on the formation of methemoglobin.* Neth. J. Agric. Sci., 27:268-276.
- 8- **Haliburton, J.C. and Edwards, W.C.** (1978): *Nitrate poisoning in Oclahoma cattle during the winter of 1977-1978.* Vet. Human Toxicol., 20: 401-403.

- 9- **Housholder, G.T., Dollahite, J.W. and Yulse, R.** (1966): *Diphenilamin for the diagnosis of nitrate intoxication.* J.A.V.M.A., 148: 662-665.
- 10- **Ishigami, K. and Inove, K.** (1976): *Metabolizm of nitrate and methemoglobinemia in ruminants.* Res. Bull. Obihiro. Univ., 10: 45-55.
- 11- **Jones, L.M.** (1974): *Veterinary pharmacology and therapeutics.* 3th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.
- 12- **Kaam, L., McKeown, G.G. and Marison Smith, O.** (1965): *New colorimetric method for the determination of the nitrate and nitrite content of baby foods.* J.A.O.A.C., 48: 892-897.
- 13- **Kaçar, B.** (1972): *Nitrat halindeki azotum tayini.* Bitki analizleri. A.Ü. Ziraat Fakültesi yayınları 455, uygulama klavuzu 155. A.Ü. Basımevi, 1972. Ankara.
- 14- **Kemp, A., Geurink, J.H., Haalstra, R.T. and Malestein, A.** (1977): *Nitrate poisoning in cattle. 2. Changes in nitrate in rumen Fluid and methemoglobin formation in blood after high nitrate intake.* Neth. J. Agric. Sci., 25: 51-62.
- 15- **Korzeniowski, A., Geurink, J.H. and Kemp A.** (1980): *Nitrate poisoning in cattle 5. The effect of tungsten on Nitrate formation by rumen microbes.* Neth. J. Agric. Sci., 28: 16-19.
- 16- **Korzeniowski, A., Geurink, J.H. and Kemp, A.** (1981): *Nitrate poisoning in cattle. 6. Tungsten (wolfram) as a prophylactic against nitrate-nitrite intoxication in ruminants.* Neth. J. Agric. Sci., 29: 37-47.
- 17- **Kühnert, M.** (1967): *Ein vorschlag zur bestimmung von nitrat-und nitritverbindungen im biologischen material.* Monatsch. Vet. Med., 22: 608-611.
- 18- **Mirna, A. and Rau, G.** (1981): *Einflub der bestrahlung auf in lebensmitteln vorkommende reaktionsproducte des nitrats.* Arch. Lebensmittelhyg., 33: 95-100.
- 19- **Musser, A.W. and Lingeman, R.B.** (1963): *Chemical analysis in clinical medicine.* In standard methods of chemical analysis. Welcher, F.J. ed. Vol. IIA. 6th ed. D Van Nostrand Comp. Inc., Princeton, New Jersey.
- 20- **Rauter, W. and Wolterstorfer, W.** (1982): *Nitrate in gemuse.* Z. Lebensm. Unters Forsch., 175: 122-124.
- 21- **Schneider, N.R. and Yeary, R.A.** (1973) : *Measurement of nitrite and nitrate in blood.* Am. J. Vet. Res., 34: 133-135.
- 22- **Selenka, F.** (1980): *Gesundheitliche bewertung des nitrats im trinkwasser.* Zbl. Bakt. Hgy., I. Abt. Orig. B 172: 44-58.
- 23- **Taras, M.J.** (1963): *Water analysis.* In standard methods of chemical analysis. Welcher, F.J. ed., 6 th ed. Vol. IIA. D Van Nostrand Comp. Inc., Princeton, New Jersey.
- 24- **Thienes, C.H. and Halcy T.J.** (1972): *Clinical toxicology.* 5th ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- 25- **Toyoda, M., Suzuki, H., Ito, Y. and Iwaida, M.** (1978): *Gas-liquid chromatographic determination of nitrate and nitrite in cheese, ham fish, sausage, cod roes and salmon roes.* J.A. O.A.C., 61: 508-512.

- 26- **Turner, C.A. and Kienholz, E.W.** (1972): *Nitrate toxicity*. Feedstuffs. 27:28-30.
- 27- **Usher, C.D. and Telling, G.M.** (1975): *Analysis of nitrate and nitrite in feedsuffs: A critical review*. J. Sci. Fd. Agric., 2: 1793-1805.
- 28- **Wegner, T.N.** (1972): *Simple and sensitive procedure for determining nitrate and nitrite in mixture in biological fluids*. J. Dairy Sci., 55: 642-644.
- 29- **World Health Organization** (1978): *Nitrate, nitrite and N-Nitroso compounds*. Environmental Health Criteria 5. Geneva.