

## NITRITE DETERMINATION BY THE DIFFERENTIAL PULSE POLAROGRAPHIC METHOD

**Gülnur KESER KARAOĞLAN\***

*Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Davutpaşa-İSTANBUL*

**Geliş/Received: 13.04.2005 Kabul/Accepted: 17.11.2005**

### ABSTRACT

In this work; the optimum conditions of the differential pulse polarographic method conditions of the polarographic reduction of diphenylnitrosoamine which was occurred by nitrite ion and diphenylamine in perchloric acidic medium and thiocyanate ion as catalyst, were determined. At these polarogram conditions, nitrite ion gave a maximum diffusion current at -0.56 V. The differential pulse polarograms were obtained by working at these conditions with 1 mL portions of the solutions containing 0.5-2.5 µg/mL nitrite ion (n=5). A calibration graph was plotted between the mean of maximum diffusion current values determined at -0.56 V ( $I_d$ ) and the last nitrite concentrations (0.02-0.1µg/mL). The linear equation of the calibration graph was calculated by regression analysis as  $I_d = 445 c + 4.78$  ( $r = 0.9997$ ). The differential pulse polarographic method was applied for nitrite determination in five saliva samples. The Standard addition method was applied to eliminate matrix effect.

**Keywords:** Polarography, Nitrite, Saliva, Diffusion current.

### DİFERANSİYEL PULS POLAROGRAFİK YÖNTEMLE NİTRİT MİKTAR TAYİNİ

#### ÖZET

Bu çalışmada nitrit iyonunun perklorik asitli ortamda, tiyosiyanat iyonunun katalizör etkisinde difenilamin ile oluşturduğu difenilnitrozaminin polarografik olarak indirgenmesine dayanan diferansiyel puls polarografik yöntemin optimum koşulları belirlendi. Bu polarogram koşullarında nitrit iyonunun -0.56 V'da maksimum difüzyon akımı gösterdiği saptandı. Belirlenen koşullarda 0.5-2.5 µg/mL nitrit iyonu içeren çözeltilerin 1 mL'si ile çalışılarak diferansiyel puls polarogramları elde edildi (n=5). -0.56 V'daki maksimum difüzyon akım değerlerinin ortalaması  $I_d$  ile son nitrit konsantrasyonları (0.02-0.1µg/mL) arasında ölçü eğrisi hazırlandı. Regresyon analiziyle doğru denklemi  $I_d = 445 c + 4.78$  ( $r = 0.9997$ ) olarak hesaplandı. Diferansiyel puls polarografik yöntem beş adet tükürük örneğinde nitrit tayini için uygulandı. Matris etkisini gidermek amacıyla tayin standart katma yöntemiyle yapıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Polarografi, Nitrit, Tükürük, Difüzyon akımı.

### 1. GİRİŞ

Doğada özellikle bitkilerde ve su kaynaklarında bulunan nitrat iyonu fazla miktarda alındığında ve bakteriyolojik ortamda nitrit iyonuna dönüştüğü durumlarda toksik etki göstermektedir.

\* e-posta: gulnurkeser@hotmail.com; Tel: (0212) 449 19 51

## *Nitrite Determination by the Differential Pulse...*

Birçok yiyecek ve işlenmiş et ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılan nitrat iyonunun nitrit iyonunu oluşturması insan sağlığı açısından zararlı etkiler oluşturur [1]. Yetişkinlerde mide asitliği yüksek miktarda bulunduğundan nitrit iyonunu meydana getirecek koşullar oluşmamaktadır. Fakat çocuklarda mide asitliğinin daha az olması nedeni ile nitrat iyonu nitrite dönüşebilmekte ve buna bağlı olarak toksik etki oluşmaktadır. Örneğin : piştikten sonra oda sıcaklığında beklemiş olan ıspanağın çocuklarda zehirlenmelere sebep olduğu bilinmektedir. Bu sonuç çocukların daha az asidik midelerinde üreyen bakteriler tarafından nitrit iyonunun oluşmasına dayandırılmıştır. Bu nedenle günlük nitrit alımının kilogram vücut ağırlığı başına 0.4 mg'la sınırlandırılması tavsiye edilmiştir [1].

Nitrit iyonunun kanıtlanmış toksik etkisi iki nedene bağlı olarak oluşmaktadır. Birinci nedene göre nitrit iyonu kan pigmenti olan hemoglobin ile methemoglobin oluşturur. Demir (II) içeren solunum pigmenti olan hemoglobin oksijeni dokulara; gevşek yapılı bir kompleks olan oksihemoglobin yoluyla taşımaktadır. Demir (II) iyonu, demir (III)'e oksitlendikten sonra oksijen taşıma yeteneğini kaybeder ve kahverengi methemoglobin maddesini oluşturur. Böylece kanda nitrit iyonunun bulunması methemoglobin oluşmasına neden olmaktadır. Kandaki hemoglobinin methemoglobine dönüşme oranı % 70'in altında olduğunda bu reaksiyon tersinir olduğu halde, daha yüksek konsantrasyon düzeylerinde boğulmaya neden olabilir [1].

Değişik materyallerde bulunan nitrit tayini için birçok yöntem geliştirilmiştir. Kapiler zone elektroforez ile suda [2], enzimatik spektrofotometrik yöntem nitrat ile bir arada [3], basit Griess reaksiyonu ile biyolojik materyallerde [4], spektrofotometrik yöntem ile suda [5,6] ve kıyı sularında [7], elektron paramanyetik rezonans spektrometri (EPRS) ile meyve ve sebzelerde [8], flow-injection kemilüminesans yöntem ile suda [9] nitrit tayini yapılmıştır. Nitrit tayin yöntemi olarak daha çok düşük konsantrasyon düzeylerine (ppb) inildiği için polarografik yöntemlerden yararlanılmıştır. Nükleer atıklarda diferansiyel puls polarografik (DPP) yöntem [10], su örneklerinde osilopolarografik yöntem [11] ve katodik single sweep polarografik [12] yöntemler kullanılarak nitritin direkt tayini yapılmıştır.

Nitrit iyonunun indirekt polarografik tayininde az önemli yöntem diazolama-kenetleme sonucu oluşan azo bileşikleri üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bu reaksiyon eşliğinde DPP yöntem [13], DP adsorptif stripping voltametry [14], su yiyecek ve biyolojik materyallerde DPP [15] yöntemler ile  $\text{NO}_2^-$  iyonunun indirekt tayini yapılmıştır.

Metallik tuz ve tiyosiyanat tuzu eşliğinde polarografik redüksiyon ile su, sucuk, sosis örneklerinde nitrit single sweep polarografik (SSP) [16], su, yiyecek, tükürük ve nitratta bulunan nitrit tayini DPP, SSP [17] yöntemler ile yapılmıştır.

Nitrit iyonunun indirekt tayin yöntemlerinden biri nitritin difenilamin ile oluşturduğu difenilnitrozo amin üzerinden DPP yöntem ile tayindir. Geliştirilen yöntem işlenmiş et ürünleri, ve su örneklerine [18], su ve meşrubatlara [19], işlenmiş yiyeceklere [20] uygulanmıştır. Bu çalışmada nitrit tayini için uygulanacak diferansiyel puls polarografik yöntem; sulu çözeltide, düşük pH'da, nitrit iyonunun difenilamin ile tiyosiyanat iyonu katalizöründe difenilnitrozoamin oluşturmasına ve bu ürünün -0.55 V ile -0.64 V yarı dalga potansiyelinde verdiği polarogramın incelenmesine dayanmaktadır.

Nitrozolama reaksiyonu kimyasal yolla veya mikroorganizmaların metabolik aktivitesi sonucu oluşabilir. Nitrozolama; madde konsantrasyonu, amin bazikliği, pH ve bazı anorganik iyonların varlığı gibi faktörlerle değişim gösterebilir. Örneğin: insan tükürüğünde 12-33 mg/100 mL düzeyinde bulunan tiyosiyanat iyonu nitrozolama hızını artırabilmektedir.

Sindirim sisteminde hazmedilen nitrit ve sekonder aminler nitrozoamin oluşmasına neden olabilirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda; ince barsak mikroorganizmalarının ürettiği ortamlarda amin ve nitritten nitrozoamin oluştuğu görülmüştür.

Bütün bu nedenlerden dolayı nitrit iyonlarının çeşitli materyallerde tayini önem taşımakta ve bu konuda bilim çevrelerinin çok sayıda araştırma yapması gerekmektedir.

## 2.DENEYSEL ÇALIŞMA

### 2.1. Maddeler ve Çözücüler

Bu çalışmada, sodyum nitrit, difenilamin, sodyum tiyosiyanat, perklorik asit, metanol, elementel çinko (destile su ile yıkanıp kurutulmuş) ve permanganat üzerinden destillenmiş bidestile su kullanılmıştır.

### 2.2. Gereçler

Yapılan deneysel çalışmada, Polarograf (Metrohm Herisav Polarecord E 506), analitik terazi (Metler H72, 0.1 mg'a kadar duyarlı), etüv (Heraeus), bidestile su cihazı (NS 278.TS 8234), goache krozesi alet ve gereçlerinden yararlanılmıştır.

### 2.3. Çözeltiler

Bu çalışmanın deneysel kısmında,  $1.0 \times 10^{-2}$  M sodyum nitrit (stok çözeltisi),  $2.6 \times 10^{-3}$  M (% 40'lık metanolde) difenilamin ((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH) (Çözelti A), 0.1 M sodyum tiyosiyanat (NaSCN) (Çözelti B), 0.4 M perklorik asit (HClO<sub>4</sub>) (Çözelti C) ve 5.0 mL A + 10.0 mL B + 10.0 mL C karışımının bidestile su ile 100.0 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanan belirteç çözeltisi kullanıldı. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı ve havayla oluşabilecek difenilnitroamini parçalamak üzere bir çinko tanesi içeren kahverengi şişede saklandı.

### 2.4. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

105°C'de kurutulmuş sodyum nitritten 15 mg tartıldı ve 100 mL'lik balonjojeye konarak bidestile su ile hacmine tamamlandı. Elde edilen 100 µg/mL NO<sub>2</sub><sup>-</sup> iyonu içeren çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerin her birinden 1 mL alınarak 25 mL'lik balon jojeye konuldu ve günlük olarak hazırlanan belirteç çözeltisiyle hacmine tamamlandı. Elde edilen bu standart çözeltilerden 10 dakika süre ile azot gazı geçirildikten sonra belirlenen optimum çalışma koşullarında diferansiyel puls polarogramı alındı. Aynı şekilde beş kez çalışılarak ortalama difüzyon akımı I<sub>d</sub> değerleri ile son nitrit konsantrasyonları (0.02-0.1 µg/mL) arasında ölçü eğrisi hazırlandı.

### 2.5. Yöntem

Nitrit iyonunun perklorik asitli ortamda pH 1.5'da difenilamin ile, sodyum tiyosiyanat katalizörlüğünde, oluşturduğu difenilnitroaminin polarografik olarak indirgenmesine dayanan diferansiyel puls polarografik tayin yönteminin polarografik optimum koşulları incelendi. Buna göre 5 mL  $2.60 \times 10^{-3}$  M (% 40'lık metanolde) difenilamin, 10 mL 0.1 M sodyum tiyosiyanat ve 10 mL 0.4 M perklorik asit içeren karışımı su ile 100 mL'ye seyreltildi. 1 µg/mL nitrit iyonu içeren sulu çözeltinin 1 mL'si 25 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı ve belirteç çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 40 ng/mL nitrit iyonu içeren bu çözeltiliye mümkün olan en yüksek hassasiyette çalışılarak elde edilen diferansiyel puls polarogramının optimum koşulları sırasıyla; U<sub>başlangıç</sub> : -0.4 V, ΔU : -0.5 V, t<sub>damla ömrü</sub> : 0.8 s, damla hızı : 2 mm/damla, hassasiyet :  $1.0 \times 10^{-9}$  (A/mm), çalışma elektrodu : stasyonier civa damla elektrod (SMDE), referans elektrod : Ag/AgCl, KCl (3M) elektrod, yardımcı elektrod : camsı karbon olarak belirlendi.

### 2.6. Yöntemin Tükürük Örneklerine Uygulanması

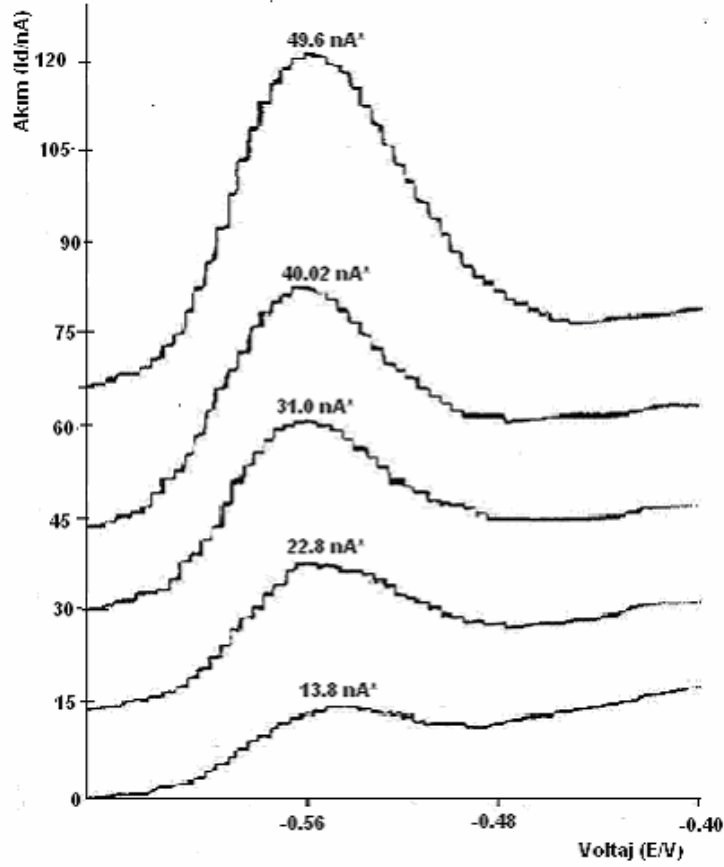
Sinterleşmiş Goache krozesinden vakumla süzölmüş olan taze tükürük örneğinden 0.5 mL alınarak 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve günlük olarak hazırlanmış olan belirteç çözeltisiyle

### Nitrite Determination by the Differential Pulse...

hacmine tamamlandı. Bu çözülden 10 dakika süreyle azot gazı geçirildikten sonra daha önceden belirlenen optimum çalışma koşullarında diferansiyel puls polarogramı alındı. Aynı çözeltinin üzerine 10 µg/mL nitrit iyonu içeren standart nitrit çözeltisinden 0.1 mL ilave edilerek polarogram alındı ve sonra 0.1 mL nitrit çözeltisi katılarak optimum çalışma koşullarında diferansiyel puls polarogram alındı. Standart katmalardaki pik akımı yükselme değerlerinin ortalaması ile örnekteki nitrit miktarları hesaplandı. Bu yöntemle aynı örnekten iki paralel çalışma yapılarak ortalama değerler esas alındı. Bu şekilde beş adet tükürük örneğinde standart katma yöntemi uygulanarak nitrit tayini yapıldı.

### 3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Toprakta ve kullanılan suni gübreler aracılığı ile özellikle toprakla yakın temastaki sebzelere ve içme suyu kaynaklarına geçen nitrat iyonu bakteriyolojik olarak nitrite dönüştüğü zaman insan sağlığı yönünden zararlı etkiler oluşturmaktadır. Nitrat ve nitrit iyonu belli oranlarda sucuk ve salam gibi işlenmiş et ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanıldıklarından bu iyonların tayini önem taşımaktadır.



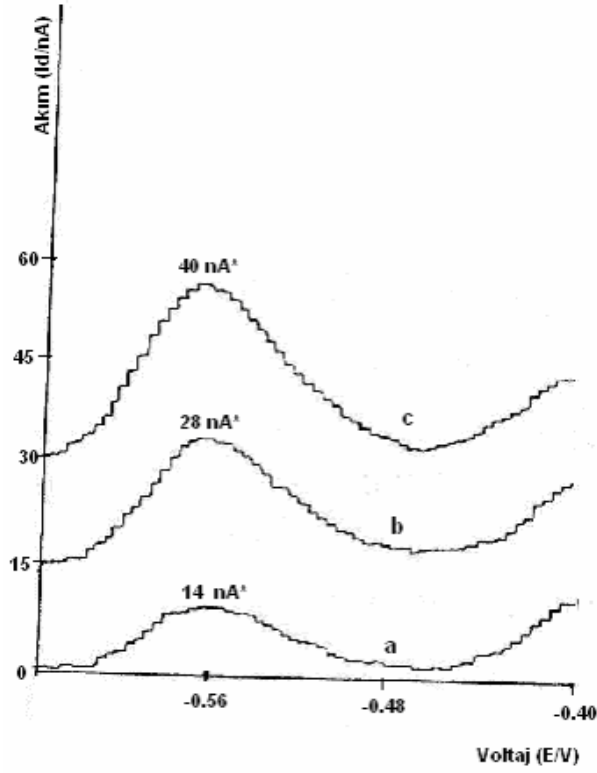
Şekil 1. 0.02-0.1 µg/mL konsantrasyon aralığında nitrit iyonunun diferansiyel puls polarogramları.

Bu çalışmada difenilaminin asitli ortamda nitrit iyonu ile difenilnitrozoamine donüşmesine ve oluşan difenilnitrozoaminin polarografik olarak indirgenmesine dayanan diferansiyel puls polarografik yöntemi için polarografik optimum koşullar incelendi ve yöntem insan tükürüğünde nitrit tayinine uygulandı. Çalışmada önce 0.04 µg/mL nitrit iyonu içeren sulu çözeltide diferansiyel puls polarogramın optimum koşulları belirlendi ve bu koşullarda son çözeltideki nitrit konsantrasyonu 0.02-0.1 µg/mL olacak şekilde ölçü eğrisi hazırlandı ve bu konsantrasyon aralığında nitrit iyonunun diferansiyel puls polarogramları elde edildi (Şekil 1). Diferansiyel puls polarografik yöntem insan tükürüğünde nitrit tayinine uygulandı. Tayin edilebilen en düşük miktar 4 ppb olarak belirlendi. Örnek biriktirilmesi uzunca bir zaman aldığından ve bekleme sonucu nitritin bozunma tehlikesi olduğundan, ayrıca matriks etkisini gidermek için standart katma yöntemi tercih edildi. Her bir örnekle iki kez standart katma yapılarak iki paralel çalışma yapıldı. Yöntem bu şekilde beş ayrı denekten toplanan tükürük örneklerine uygulandı. Elde edilen sonuçlar izelge 1’de ve bir tükürük örneğine ait polarogram Şekil 2’de görülmektedir. Difenilaminin nitrozolanmasına dayanan reaksiyon diferansiyel puls polarografik nitrit tayini için duyarlı ve hızlı bir yöntemde temel oluşturduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Bu yöntemde analiz süreleri kısa olup gerekli belirteçler kolayca elde edilebilir niteliktedir ve toksisiteleri nispeten azdır. Ön işlem olarak sadece vakumda yapılan süzme işleminin olması bir avantaj olarak değerlendirildi. Yaptığımız alışma bu konuda daha ileri araştırmalara temel oluşturacak niteliktedir.

Çizelge 1. Tükürük örneklerinde saptanan nitrit miktarları

Örnek No	Örnek (Akım Id) (nA)	Katılan NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> konsantrasyonu (µg/mL)	Standart Katılmış Örnek (Akım Id) (nA)	Saptanan NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> miktarı (µg/mL) *
1a	54	1	60	10.28
		2	75	
1b	54	1	70	10.28
		2	75	
2a	25	1	33	7.14
		2	39	
2b	25	1	31	7.14
		2	39	
3a	14	1	29	2.15
		2	40	
3b	14	1	28	2.15
		2	40	
4a	23	1	31	5.75
		2	39	
4b	23	1	31	5.75
		2	39	
5a	55	1	60	10.00
		2	77	
5b	55	1	70	10.00
		2	77	

\* Ölçülen değerler aynı tükürük örneğine uygulanan iki ayrı çalışmanın ortalamasıdır.



Şekil 2. Tükürük örneğine ait Diferansiyel Puls Polarogramlar (DPP)

- Tükürük örneğinin Diferansiyel Puls Polarogramı
- 1  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NO}_2^-$  ilave edilmiş tükürük örneğinin Diferansiyel Puls Polarogramı
- 2  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NO}_2^-$  ilave edilmiş tükürük örneğinin Diferansiyel Puls Polarogramı

\* Polarogramların akım (nA) değerleri akım=yükseklik x hassasiyet eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

#### KAYNAKLAR

- [1] Wolf, I.A. and Wasserman, A.E., "Nitrates and Nitrosamines.", Science, 177, 15-19, 1972.
- [2] Andrighetto, P., Carfiglio, T., Fornaiser, R., Tonellato, U., Electrophoresis, 21(12), 2384-2389, 2000.
- [3] Girotti, S., Feri, E.N., Fini, F., Ruffini, F., Budini, R., Analytical Letters, Vol. 32(11), 2217-2227, 1999.
- [4] Guevara, I., Iwonejko, J., Dembinsakiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Golabek, I., Bartus, S., Szczudlik, A., Malczewskamalec, M.Clinica Chimica Acta, Vol.274(2), 177-18, 1998.
- [5] Vanstaden, J. F., Makhafola, M., South African Journal of Chemistry, Vol.52(1), 49-54, 1999.

- [6] Aydın, A., Ercan, Ö., Taşcıoğlu, S., "A Novel Method for The Spectrophotometric Determination of Nitrite in Water", *Talanta*, 2005.
- [7] *Analisis*, Vol.26(9), 347-351, 1998.
- [8] Yordanov, N. D., Novakova, E., Lubenova, S., "Consecutive Estimation Of Nitrate And Nitrite Ions in Vegetables And Fruits By Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 437, 131-138, 2001.
- [9] Lu, C., Qu, F., Lin, J., Yamada, M., "Flow-İnjection Chemiluminescent Determination of Nitrite in Water Based on The Formation of Peroxynitrite from The Reaction of Nitrite And Hydrogen Peroxide", *Analytica Chimica Acta*, Vol.474, 107-114, 2002.
- [10] Buldini, P. L., Feri, B., "Differential Pulse Polarographic Determination Of Nitrate And Nitrite İn Nuclear Wastes.", *Microchim. Acta*. 1(1-2), 43-51, 1984.
- [11] Chen, L., Zi, V., "Methylene Blue for Determining Trace Nitrite by Polarography.", *Huanjing Huaxue*, 11(5), 77-80, 1992.
- [12] Lu, G., Yao, S., "Determination of Nitrite by Single Sweep Polarography.", *Anal.Lett.*, 22(7), 1743-1751, 1989.
- [13] Sulaiman, S. T., Akrawi, B. A., "Differential Pulse Polarographic Determination of Nitrite.", *Analyst*, 109(12), 1545-1547, 1984.
- [14] Fogg, A.G., Alonso, R. M., "Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltametric Method for The Determination of Nitrite at Ppb Levels After Diazotization of Aniline And Coupling With Azulene And Its Modification for The Determination of Aromatic Amines.", *Analyst*, 113(8), 1337-1138, 1988.
- [15] Wong., Li, K., "Determination of Nitrite Based On The Diazo Reaction Determination of Nitrite by The 2.5th Order Differential Electroanalysis.", *Fenxi Huaxue*, 18(1), 1-5, 1990.
- [16] Gao, Z., Wang, G., Zho, Z., "Determination of Trace Amounts of Nitrite by Single Sweep Polarography.", *Anal. Chim. Acta*, 230(1), 105-112, 1990.
- [17] Li, P., Zhao, Z., Gao, Z., "Polarographic Studies And Measurements of Nitrite in Cobalt (II)-Thiocyanate-Ascorbic Acid Solution.", *Electroanalysis*, 4(2), 199-206, 1992.
- [18] Mo, J., Jin, D., Pei, J., Zho, Z., "Single Sweep Polarographic Determination of Trace Nitrite in Ferrous And Ascorbic Acid Medium.", *Anal.Sci.*, 6(2), 251-255, 1990.
- [19] Polak, J., Janacek, L., Volke, J., "Determination of Nitrites by The Method of Differential Pulse Polarography After Previous Nitrosation of Diphenylamine.", *Chem.Listy.*, 83(7), 760-764, 1989.
- [20] Holak, W., Specchio, J. J., "Determination of Nitrite And Nitrate by Differential Pulse Polarography With Simultaneous Nitrogen Purging", *Anal.Chem.*, 64(11), 1313, 1992.