



**SUCUKLARDA ULTRASON DESTEKLİ NİTRİT/NİTRAT
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU VE HPLC İLE TAYİNİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Fatih GÜRDAL

Danışman
Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Haziran 2023

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SUCUKLARDA ULTRASON DESTEKLİ NİTRİT/NİTRAT
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU VE HPLC İLE TAYİNİ

Fatih GÜRDAL

Danışman
Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Haziran 2023

TEZ ONAY SAYFASI

Fatih GÜRDAL tarafından hazırlanan “Sucuklarda Ultrason Destekli Nitrit/Nitrat Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve HPLC ile Tayini” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 13 / 06 / 2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

Başkan : Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK
Afyon Kocatepe Üni. Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Gökhan AKARCA
Afyon Kocatepe Üni. Mühendislik Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Rasim Alper ORAL
Bursa Teknik Üni. Mühendislik Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13 / 06 / 2023

Fatih GÜRDAL

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**SUCUKLARDA ULTRASON DESTEKLİ NİTRİT/NİTRAT
EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU VE HPLC İLE TAYİNİ**

Fatih GÜRDAL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

Bu araştırmada, sucuk ve ısıtıl işlem görmüş sucukta nitrit ve nitrat katkı maddelerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile miktar tayini için kullanılan metot prosedürü ultrason destekli ekstraksiyon ile optimize edilmiştir. Optimize edilen metot ile koruyucu içermediği bilinen sucuk ve ısıtıl işlem görmüş sucuk nitrit ve nitrat ile zenginleştirilerek validasyon (geçerli kılma) ve ölçüm belirsizliği çalışmaları yapılmıştır.

Validasyonda, seçicilik/spesifiklik, tespit limiti, ölçüm limiti, ölçüm aralığı/doğrusallık, tekrarlanabilirlik, tekrarüretilebilirlik, geri kazanım ve sağlamlık parametreleri çalışılmıştır. Yapılan validasyon ve ölçüm belirsizliği çalışmaları sonucunda; ölçüm limiti nitrit için 7 ppm ve nitrat için 12 ppm, geri kazanım oranı nitrit için % 88,03 ve nitrat için % 89,45, genişletilmiş belirsizlik sonuçları her ikisi için de 0,20 olarak bulunmuştur. Validasyon sonucu elde edilen analiz sonuçları istatistiksel testlerle karşılaştırılmış ve uygun olarak değerlendirilmiştir.

2023, x + 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sucuk, Nitrit, Nitrat, Ultrason, Validasyon

ABSTRACT
M.Sc. Thesis

OPTIMIZATION OF ULTRASOUND ASSISTED NITRITE/NITRATE
EXTRACTION IN SOUDJOUKS AND DETERMINATION BY HPLC

Fatih GÜRDAL

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Ramazan ŞEVİK

In this study, the method procedure used for the quantification of nitrite and nitrate additives in soudjouk and heat-treated soudjouk by high-performance liquid chromatography was optimized by ultrasound-assisted extraction. With the optimized method, soudjouk and heat-treated soudjouk known to be free of preservatives were enriched with nitrite and nitrate, validation and measurement uncertainty studies were carried out.

In validation, selectivity/specificity, limit of detection, limit of quantification, range/linearity, repeatability, reproducibility, recovery and robustness/ruggedness parameters were studied. As a result of the validation and measurement uncertainty studies; The limit of quantification was 7 ppm for nitrite and 12 ppm for nitrate, the recovery rate was 88.03% for nitrite and 89.45% for nitrate, and the expanded uncertainty results were 0.20 for both. Analysis results obtained as a result of validation were compared with statistical tests and evaluated as appropriate.

2023, x + 82 pages

Keywords: Soudjouk, Nitrite, Nitrate, Ultrasound, Validation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bana bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, değerli görüşleri ile katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK ve tez yazım aşamasındaki öneri ve eleştirileri ile yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Gökhan AKARCA ile bölüm hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimine başlama konusunda beni teşvik eden Afyonkarahisar Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünün değerli müdürü Sayın Murat KUZKALE ve değerli müdür yardımcısı Sayın Ahmet YILDIRIM ile analiz çalışmalarında yardımını ve desteğini eksik etmeyen, zamanlarını benimle paylaşan değerli çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmamda olduğu gibi bana her konuda destek olan ve motive eden, ihtiyaç duyduğum her an bana zaman ayıran değerli arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen, haklarını ödeyemeyeceğim kıymetli aileme,

Beni her zaman destekleyen ve anlayışla karşılayan, varlıklarıyla bana güç veren ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim kıymetli eşim Biyoloji Öğretmeni Aslı GÜRDAL, kızlarım Berra Gül, Beray Nur ve oğlum Ramazan Berkay'a çok teşekkür ederim.

Fatih GÜRDAL

Afyonkarahisar 2023

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1 Sucuk Tanımı ve Çeşitleri.....	5
2.2 Sucuk Üretimi ve Fermantasyon Sürecinde Meydana Gelen Değişimler	5
2.3 Nitrit ve Nitrat Katkı Maddelerinin Et Ürünlerinde Kullanım Nedenleri	7
2.3.1 Antimikrobiyal Etkisi.....	9
2.3.2 Renk Üzerine Etkisi	11
2.3.3 Antioksidan Etkisi.....	15
2.3.4 Lezzet, Tat ve Aroma Üzerine Etkisi.....	16
2.4 Nitrozaminler ve Oluşumuna Etki Eden Faktörler	16
2.5 Nitrit ve Nitratın Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri	18
2.6 Nitrit ve Nitratın Et Ürünlerinde Kullanımı İle İlgili Yasal Sınırlamalar ve Alternatif Arayışlar	23
2.7 Ultrason Destekli Ekstraksiyon	26
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1 Materyal	28
3.2 Metot.....	28
3.2.1 Mobil Faz Çözeltilisinin Hazırlanması.....	28
3.2.2 Standartların Hazırlanması	29
3.2.3 Kromatografik Şartlar ve Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması	29
3.2.4 Sucukta Nitrit-Nitrat Analizi.....	30
3.2.5 Validasyon.....	30
3.2.6 Ölçüm Belirsizliği	31
3.2.7 İstatistiksel Analizler ve Değerlendirmeler.....	31
4. BULGULAR	33
4.1 Ultrason Destekli Ekstraksiyon Optimizasyonu	33

4.2 Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)	34
4.3 Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti (LOD ve LOQ)	35
4.4 Ölçüm Aralığı/Doğrusallık (Range/Linearity)	37
4.5 Tekrarlanabilirlik (Repeatability)	38
4.6 Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik (Reproducibility)	46
4.7 Geri kazanım (Recovery)	51
4.8 Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)	54
4.9 Ölçüm Belirsizliği	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
5.1 Tartışma	59
5.2 Sonuç	61
6. KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	72
EKLER	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
Fe ⁺²	Ferro demir
Fe ⁺³	Ferrik demir
g	Gram
H ⁺	Hidrojen iyonu
HCl	Hidroklorik Asit
HNO ₂	Nitröz asit
HNO ₃	Nitrik Asit
H ₂ O	Su molekülü
k	Kapsama Faktörü
kg	Kilogram
kHz	Kilohertz
KNO ₂	Potasyum Nitrit
KNO ₃	Potasyum Nitrat
L	Litre
Mb	Myoglobin
mg	Miligram
MHz	Megahertz
mL	Mililitre
N ₂	Azot
NaNO ₂	Sodyum Nitrit
NaNO ₃	Sodyum Nitrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NO ⁻	Azot monoksit
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
N ₂ O ₃	Dinitrojen Trioksit
NO-Mb	Nitrosomyoglobin
NO-Mc	Nitrosohemokrom
NO-metMb	Nitrosometmyoglobin
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
pH	Power of Hydrogen
ppm	Milyonda bir
r	Korelasyon Katsayısı
W	Watt
W/m ²	Watt/metrekaire
Ws/m ³	Watt saniye/metreküp
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Derece santigrat
%	Yüzde

Kısaltmalar

ADI	Acceptable Daily Intake
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ATP	Adenozin Trifosfat
DAD	Diode Array Detector
DENA	Dietilnitrosamin
DMNA	N-Dimetilnitrosamin
EC	European Commission
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FSANZ	Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları
GK	Geri Kazanım
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı
I.İ.G.	Isıl İşlem Görmüş
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesi
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
max	Maksimum
min	Minimum
MÖ	Milattan Önce
NMKL	Gıda Analizleri Alanında İskandinav Ülkeleri Birliği
ORT	Ortalama
PRSD	Horwitz eşitliğinden hesaplanan relatif standart sapma
PVDF	Poliviniliden Florür
RSD	Relatif Standart Sapma
SD	Standart Sapma
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TS	Türk Standartları
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WOF	Warmed Over Flavour

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1	Kürleme işlemindeki nitrosomyoglobin oluşumu için reaksiyon (Doğan 2022).	12
Şekil 2.2	Et ve et ürünlerinde tipik pembemsi renk oluşumu (Doğan 2022).	12
Şekil 2.3	Nitrosomyoglobin ve Nitrosohemokrom oluşum için reaksiyonlar (Doğan 2022).	13
Şekil 2.4	Kürlenmiş et ve et ürünlerinde ürüne özgü karakteristik renk oluşumu için reaksiyonlar (Doğan 2022).	13
Şekil 2.5	Nitrozaminlerin oluşumu için kimyasal reaksiyonlar (M/M^+ geçiş iyonlarıdır) (Honikel 2008).	18
Şekil 4.1	Ultrason bekleme süresine göre değişen nitrit miktarı grafiği.	33
Şekil 4.2	Ultrason bekleme süresine göre değişen nitrat miktarı grafiği.	34
Şekil 4.3	Nitrit ve nitrat standartlarının HPLC kromatogramı.	34
Şekil 4.4	Nitrit ve nitrat ile zenginleştirilmiş kör numune HPLC kromatogramı.	35
Şekil 4.5	Tespit ve ölçüm limiti çalışması örnek HPLC kromatogramı.	35
Şekil 4.6	Nitrit kalibrasyon grafiği.	38
Şekil 4.7	Nitrat kalibrasyon grafiği.	38
Şekil 4.8	Tekrarlanabilirlik 20 ppm (orta konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.	39
Şekil 4.9	Tekrarlanabilirlik 200 ppm (yüksek konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.	39
Şekil 4.10	Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik 20 ppm (orta konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.	46
Şekil 4.11	Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik 200 ppm (yüksek konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.	47
Şekil 4.12	Belirsizlik bileşenleri.	57
Şekil 4.13	Nitrit belirsizlik bileşenleri grafiği.	58
Şekil 4.14	Nitrat belirsizlik bileşenleri grafiği.	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre ısıtıl işlem görmüş et ürünlerinde izin verilen maksimum nitrit miktarları (TGK 2013).	24
Çizelge 2.2 Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre ısıtıl işlem görmemiş et ürünlerinde izin verilen maksimum nitrit ve nitrat miktarları (TGK 2013).	25
Çizelge 4.1 Ultrasonik su banyosunda bekletme süreleri ve sonuçları.	33
Çizelge 4.2 Nitrit tespit ve ölçüm limiti (7 ppm) sonuçları.....	36
Çizelge 4.3 Nitrat tespit ve ölçüm limiti (12 ppm) sonuçları.	36
Çizelge 4.4 Nitrit ve nitrat lineer ölçüm sonuçları.	37
Çizelge 4.5 Tekrarlanabilirlik nitrit sonuçları 7 ppm (düşük konsantrasyon).....	40
Çizelge 4.6 Tekrarlanabilirlik nitrit sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).	41
Çizelge 4.7 Tekrarlanabilirlik nitrit sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).	42
Çizelge 4.8 Tekrarlanabilirlik nitrit tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri..	42
Çizelge 4.9 Tekrarlanabilirlik nitrat sonuçları 12 ppm (düşük konsantrasyon).	43
Çizelge 4.10 Tekrarlanabilirlik nitrat sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).	44
Çizelge 4.11 Tekrarlanabilirlik nitrat sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).	45
Çizelge 4.12 Tekrarlanabilirlik nitrat tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.	45
Çizelge 4.13 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrit sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).	47
Çizelge 4.14 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrit sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).	48
Çizelge 4.15 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrit tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.	48
Çizelge 4.16 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrat sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).	49
Çizelge 4.17 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrat sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).	50
Çizelge 4.18 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrat tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.	50
Çizelge 4.19 Nitrit 7 ppm (düşük konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.	51
Çizelge 4.20 Nitrit 20 ppm (orta konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.	52
Çizelge 4.21 Nitrit 200 ppm (yüksek konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.	52
Çizelge 4.22 Nitrit tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi....	52
Çizelge 4.23 Nitrat 12 ppm (düşük konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.....	53

Çizelge 4.24 Nitrat 20 ppm (orta konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.....	53
Çizelge 4.25 Nitrat 200 ppm (yüksek konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.....	54
Çizelge 4.26 Nitrat tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi... 54	
Çizelge 4.27 Sağlamlık parametreleri.	54
Çizelge 4.28 Nitrit Youden kısmi faktöriyel (7 faktörlü) sağlamlık testi deney deseni ve sonuçları.....	55
Çizelge 4.29 Nitrat Youden kısmi faktöriyel (7 faktörlü) sağlamlık testi deney deseni ve sonuçları.....	55
Çizelge 4.30 Nitrit sağlamlık değerlendirmesi.....	56
Çizelge 4.31 Nitrat sağlamlık değerlendirmesi.	56
Çizelge 4.32 Nitrit-Nitrat tekrarlanabilirlik belirsizlikleri.	57
Çizelge 4.33 Nitrit-Nitrat laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik belirsizlikleri.	57
Çizelge 4.34 Nitrit-Nitrat geri kazanımdan gelen relatif belirsizlikleri.	57
Çizelge 4.35 Nitrit-Nitrat kalibrasyondan gelen relatif belirsizlikleri.	57
Çizelge 4.36 Nitrit belirsizlik sonuçları.	58
Çizelge 4.37 Nitrat belirsizlik sonuçları.....	58

1. GİRİŞ

Dünya nüfusu arttıkça gıda ihtiyacı da her geçen gün artmaktadır. Zamanla et, insan sağlığının ve dengeli beslenmenin vazgeçilmez bir besin bileşeni haline gelmiş, bu da et ve et ürünleri talebinin artmasına neden olmuştur. Türkiye'de nüfusun hızlı artışı nedeniyle insanların sağlıklı ve dengeli beslenmesi için et ve et ürünlerinin üretimi ve tüketimi büyük önem taşımaktadır (Demirkol 2019).

Sağlığı korumak ve hastalıkları önlemek için sağlıklı ve dengeli beslenmek şarttır (Uz 2008). Bunun için günlük protein ihtiyacının %40-50 kadarı hayvansal ürünlerden karşılanmalıdır. Et ve et ürünleri, hayvansal protein kaynaklarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Et, büyüme, hayatta kalma ve insanın fizyolojik fonksiyonları için gerekli tüm aminoasitleri bol miktarda ve çeşitlilikte içeren önemli bir gıda ürünüdür (Yaylak vd. 2010). Et, biyolojik değeri yüksek B vitaminleri, proteinler ve mineraller açısından önemli bir kaynaktır ve besleyici özellikleri nedeniyle sağlıklı beslenebilmenin önemli bir kaynağıdır. Bunun için et ürünleri tüketmek sağlık için büyük önem taşımaktadır (Özbay Doğu ve Sarıçoban 2015).

Et, yüksek su aktivitesi nedeniyle çabuk bozulan bir üründür (Candan ve Bağdatlı 2018). Et ürünleri; çeşitli baharat ve katkı maddelerinin eklenmesi ile özel bir tat kazandırıldığı ve raf ömrü daha uzun olduğu için taze etten daha çok tercih edilir (Ulusoy 2007).

Bilim ve teknolojinin gelişmesine paralel olarak et endüstrisinde de ilerlemeler kaydedilmiştir. Aynı zamanda et tüketimi artmış ve üretilen etin çoğunluğu et ürünlerini üretmek için kullanılmıştır. Besin kaynağı olarak önemli olan et, taze tüketimlerinin yanı sıra çeşitli tat ve aroma özelliklerini elde etmek için çeşitli teknolojik işlemlerden geçirilen ürünler şeklinde de tüketilmektedirler. Ülkemizde özellikle tüketimi yüksek olan et ürünleri arasında fermente sucuk, pastırma, salam ve sosis yer almaktadır (Erdoğrul ve Ergün 2005).

Et ve et ürünlerinin üretimi ve depolanması sırasında hijyen koşullarına uyulmaması, insan sağlığını doğrudan etkileyebilecek patojenik mikroorganizmaların bulaşmasına ve

çoğalmasına ve bunun sonucunda enfeksiyona veya gıda zehirlenmelerine yol açabilmektedir (Sezgin 2013).

Besin değeri yüksek ve protein açısından zengin olan kırmızı et, sağlıklı ve/veya uygun saklama koşullarında saklanmadığı takdirde kolayca bozulmakta ve kısa ömürlü bir ürün haline gelmektedir. Etin dayanıklılığını artırmak için fermentasyon işlemi, su aktivitesini azaltmak için işlemler ve tuz ilavesi bir araya gelerek etkili bir koruma sağlar (Bilge 2010).

Fermentasyon, gıdanın muhafazasını sağlayarak gıdanın besin değerini artıran doğal bir yöntemdir (Kabak ve Dobson 2011). Eski zamanlardan beri geleneksel fermentasyona ek olarak kurutma, tütsüleme ve tuzlama gibi işlemler gıdaların saklanması ve tüketilmesi için kullanılmıştır (Helvacıoğlu 2020). Tarih öncesi çağlardan beri et, deniz ürünleri ve sebzeleri korumak için tuzlama yöntemi kullanılmıştır. Antik çağlarda tuzlayarak muhafaza önemli bir muhafaza yöntemi olarak kabul ediliyordu. Et kürlenme, su aktivitesini azaltmak için dokulardaki nemi uzaklaştırmak ve böylece mikrobiyal bozulmayı önlemek için taze et parçalarına tuz eklenmesidir (Palamutoğlu ve Sarıçoban 2012).

Gıda endüstrisinde gıda katkı maddeleri kullanmak önem teşkil etmektedir. Bu kimyasallar sadece gıdanın bozulmadan kalma süresini uzatmaya yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda tadı ve rengi iyileştirmeye ve besin değerini korumaya da yardımcı olur (Ata 2010). Et ve et ürünlerinde mikrobiyal tehlikeleri azaltmak veya ortadan kaldırmak, raf ömrünü artırmak, duysal ve kalite özelliklerini iyileştirmek ve geliştirme amacıyla üretimin prosesinin farklı aşamalarında tuz, sorbatlar, nitratlar ve nitritler gibi kimyasallar, N₂ ve CO₂ benzeri gazlar, starter kültürler, bakteriyosinler ve antibiyotikler gibi çeşitli katkı maddeleri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hampikyan 2006).

Nitrit ve nitrat gibi katkı maddeleri ürüne istenilen tat ve rengi vermesinin yanında antimikrobiyal özelliğinden dolayı bazı bakterileri yok etmek için de kullanılmaktadır. Bu tuzların faydalarına rağmen fermente et ürünlerinde limitleri aşan seviyelerde ve kontrolsüz kullanılması sağlığı etkileyebilecek risklere yol açabilmektedir (Büyükdal vd. 2016). Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda nitrat ve nitritlerin olumsuz etkileri giderek artmaktadır. Et ve et ürünleri teknolojisi ile üretilen nihai

ürünlerdeki kalıntı nitritin, amidler ve aminlerle reaksiyona girdiği için kanserojenik risk oluşturmaktadır. Bu nedenle nitrat ve nitritlerin kullanımı tüm dünyada yasalar çerçevesinde kısıtlanmıştır (Ruiz-Capillas vd. 2007). Uluslararası gıda güvenliği kuruluşları, gıdalarda kullanılan nitrat ve nitrit miktarının azaltılmasını tavsiye etmektedir (Bakhtiary vd. 2018).

Yapılan araştırmalar, et ve et ürünlerinde bulunan nitrat ve nitritlerin sıklık, doz ve vücuda giriş şekline göre akut ve kronik zehirlenmelere yol açabildiğini, insan sağlığını tehdit ettiğini ve pişirme ve sindirimdeki diğer bileşenlerle birlikte etkileşimler yoluyla kanserojen formlar oluşturduğunu göstermiştir. Dünya genelinde yasal olarak kısıtlanan bu katkı maddelerinin sağlığa etkileri tüketiciler tarafından olumsuz olarak görülmekte ve doğal katkı maddeleri içeren et ürünlerine talep artmaktadır (Yıldız Turp ve Sucu 2016). Bu nedenle ana eğilim, et ürünlerinde nitrit ve nitrat seviyelerinin düşürülmesidir (Perea-Sanz vd. 2018).

Ülkemizde satılan kürlenmiş etler üzerinde yapılan bazı araştırmalarda, sucuk, salam ve sosis benzeri ürünlerde kalıntı nitratın yasal olarak belirlenen seviyelerin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Öztürk vd. 2015). Bu nedenle gıdaların içerebileceği maksimum nitrat ve nitrit seviyeleri ile ilgili olarak diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de yasal düzenleme mevcuttur. Gıdalarda, hem ham maddelerde hem de işlenmiş ürünlerde nitrat ve nitrit düzeylerinin tespit edilmesi önemlidir (Özdestan ve Üren 2010).

Et ürünlerinde nitrat ve nitritlerin yerini alabilecek birçok bileşik üzerinde çalışılmış ancak şu ana kadar bu bileşiklerin fonksiyonlarını yerine getirebilecek hiçbir madde bulunamamıştır (Gökalp 1985). Bu nedenle, nitratlar ve nitritler et endüstrisinde hala yaygın olarak kullanılan katkı maddeleridir. Ancak et ürünlerinde kullanım miktarları ve kalıntı düzeyleri kontrol edilmelidir (Candan ve Bağdatlı 2018). Ayrıca toplumun kansere karşı tedbirler konusunda bilinçlendirilmesi önem teşkil etmektedir. Nitrozo bileşiklere maruz kalmayı azaltmak için antioksidanların bilinçli kullanımı da sağlanmalıdır (Çakmak vd. 2009).

Kontrollü üretim ile üretim sonrası denetimler, kanıtlanmış olumsuz sağlık etkileri olan bu bileşiklerin kullanımı ve kalıntı miktarları açısından önemlidir (Öztürk vd. 2015).

Kalıntı nitrit miktarını azaltmak için üreticilerin bilinçlendirilmesi ve gıda kodeksinde kalıntı nitrit miktarı için getirilen sınır değerlere uyulması halk sağlığı açısından önem taşımaktadır (Doğu vd. 2002).

Bu çalışmanın amacı HPLC ile sucuklardaki kalıntı nitrit-nitrat düzeylerinin tayini için kullanılan metodun ultrason destekli ekstraksiyon ile optimize edilmesi ve validasyonunun yapılmasıdır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Sucuk Tanımı ve Çeşitleri

Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et ürünleri Tebliğinde, “Sucuk: Büyükbaş ve/veya küçükbaş hayvan karkas etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtılmış işlem uygulanmamış fermente et ürününü ifade eder” denilmektedir (TGK 2018/52).

Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et ürünleri Tebliğinde, “Isıtılmış sucuk: Büyükbaş ve/veya küçükbaş hayvan karkas etlerinin ve yağlarının veya kanatlı hayvan karkas etleri ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermentasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıtılmış işlem uygulanmış et ürününü ifade eder” denilmektedir (TGK 2018/52).

Türk Standartlar Enstitüsü, TS-1070’te, Türk sucuğu “Büyükbaş ve küçükbaş hayvan etlerinin, yağ, kemik, tendo, fasia, kıkırdak, lenf yumruları ile büyük sinir ve damarlarından ayrıldıktan sonra kıyma makinası veya kuterden çekilerek içine tuz, kırmızıbiber, karabiber, kimyon hâkim olmak üzere çeşitli baharat, çeşni maddeleri, starter kültürlerden bir veya birkaçı, gövde yağı, iç yağı, kuyruk yağı, böbrek yağı, böbrek etrafı yağı ile mevzuatında katılmasına izin verilen katkı maddelerinden bir veya bir kaçının karıştırılıp, kılıflara doldurularak fermentasyona tabi tutulan ısıtılmış işlem görmemiş geleneksel et ürünü” şeklinde tarif edilmiştir (TS 1070).

2.2 Sucuk Üretimi ve Fermentasyon Sürecinde Meydana Gelen Değişimler

Her ülkenin kendine has tadı ve aroması olan fermente et ürünleri vardır. Fermente et ürünlerinden en yaygın olanı, bölgesel olarak farklı bir tarife göre yapılan sucuklardır. Fermente et ürünleri denilince Türkiye’de akla ilk gelen geleneksel Türk sucuğudur (Geçgel vd. 2016). Farklı şekillerde üretilen ve Dünya çapında farklı isimlerle anılan

sucuk, geçmişten günümüze ülkemizde en çok tüketilen et ürünlerinden biridir (Toptancı ve Ercoşkun 2017).

Sucuk ilk defa Divan-ı Lügat'ı Türk'te kullanılmıştır. Divan-ı Lügat'ı Türk'e göre sucuk; koyun bağırsağına doldurulmuş olan et, baharat karışımıdır (Ercoşkun ve Özkal 2011). Sucuk; etin dayanıklılığını arttırma ve daha uzun süre dayanma ihtiyacından doğan, değerli ve hazırlaması kolay bir et konservesidir (Kahya 1973). Sucuk, koyun, sığır ve/veya manda eti, kuyruk yağı, tuz, şeker, sarımsak, karabiber, kırmızı biber, kimyon, tarçın gibi baharatlar ile nitrit ve nitrat gibi koruyucuların karışımından yapılır (Yılmaz 2019).

Etin kalitesi sucuk üretiminde en önemli noktalardan biridir. Kaliteli sucuk üretmek için kullanılan etin miyoglobininin yüksek olması, pH değerinin ise 5,4 ile 5,8 arasında olması gerekmektedir (İpek 2019).

Dünyada 1000'den fazla et ürünü olmasına rağmen, kütleme işlemine tabi tutulmuş fermente sucuklar damak zevkimize uygunluğu nedeniyle ülkemizde en yaygın ve en çok tüketilen et ürünleridir (Özdemir 2018). Sucuk üretimi, Türkiye ve Almanya ile birlikte Akdeniz ülkelerinde de et endüstrisi için önemli bir yere sahiptir (Beriaın vd. 2000).

Geleneksel Türk sucuğu, et ve hayvansal yağın kıyma haline getirilmesi, baharat ve diğer katkıların eklenmesi ile oluşan hamurun küçükbaş/büyükbaş hayvan bağırsaklarından elde edilen veya bunun için yapılmış yapay bir kılıfa doldurularak fermentasyon ve belirli bir sıcaklık ve bağıl nem koşullarında kurutulması (olgunlaştırma) ile üretilen fermente bir et ürünüdür (Ustaoğlu 2011).

Fermentasyon, genel olarak et ürünlerinin muhafazası ve kalitesi için kullanılan geleneksel bir yöntemdir (Temizgül 2021). Et ürünlerine tuz, nitrit veya nitrat gibi katkı maddeleri ve çeşitli baharatlar katılarak ürünün tadı, rengi, aroması, lezzeti ve dokusu ile etin raf ömrü iyileştirilebilir. Su aktivitesine bağlı olarak bozulması kolay bir gıda maddesi olduğundan bu katkı maddeleri kullanılarak dayanıklılığının artırılması hedeflenmektedir (Toldra ve Reig 2011). Sucukların fermentasyonu sırasında, ürünün belirli bir tat, aroma ve kıvamının oluşmasını sağlayan çeşitli fiziksel, biyokimyasal ve

mikrobiyolojik reaksiyonlar meydana gelir. Özellikle proteinler ve yağlar parçalandığında ortaya çıkan ürünler, fermente sucuğun eşsiz lezzetine büyük katkı sağlar (Coşkun 2019). Fermantasyon sürecinde üründe meydana gelen değişiklikler, sucuğun farklı fonksiyonel ve duyuşsal özelliklerini belirleyerek mikrobiyal koruma sağlar (Kumar vd. 2017).

Fermente sucuk üretimi mikroorganizmalara dayanmaktadır. Et ürünlerinde tanımlanan mikrobiyal çeşitlilik, ürünlerin mikrobiyal kalitesini yansıtır. Kaliteli et ürünlerinde her zaman istenen mikroorganizmalar baskındır. Gereken teknolojik ve hijyen kurallarına uyulmamasından dolayı ürünlerde istenmeyen mikroorganizma gelişimi ürün kalitesinin bozulmasına ve gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir. Fermente sucuklarda olgunlaşmanın göstergesi olan renk, tat, aroma ve kıvam bazı mikroorganizmaların enzimlerinin oluşturduğu biyokimyasal etkileşimler sonucunda gelişir. Yağların bileşimi de aromanın oluşmasında önemli bir rol oynar (Erdoğrul ve Ergün 2005).

2.3 Nitrit ve Nitrat Katkı Maddelerinin Et Ürünlerinde Kullanım Nedenleri

Nitritler ve nitratlar, insan ve hayvan kaynaklı organik maddelerin ayrışmasından kaynaklanan bileşiklerdir (Öztürk vd. 2015). Nitratlar ve nitritler, azotlu bileşikler grubundan maddelerdir. Nitratlar bitkilerde, suda ve toprakta doğal olarak sodyum nitrat olarak ve küçük miktarlarda potasyum nitrat olarak bulunur. Et ve et ürünleri muhafazasında en çok sodyum nitrit (NaNO_2) ve potasyum nitrit (KNO_2) ile sodyum nitrat (NaNO_3) ve potasyum nitrat (KNO_3) katkı maddeleri kullanılır (Karaca 2020).

Kırmızı et ve beyaz etin kürlenmesi, günümüzde hala kullanılan en eski gıda muhafaza yöntemlerinden biridir. Soğutma sistemlerinin geliştirilmesinden önce balık ve etin muhafazası için bozulmayı önlemenin etkili yolları aranmıştır. Etlerin tuzlanarak muhafazası, MÖ 3000 yıllarına kadar uzanan eski bir yöntemdir. Antik çağda tuz, tuz göletlerinden, deniz suyundaki suyun buharlaşmasından veya doğrudan madenlerden tuz kristalleri şeklinde çıkarılıyordu. Zamanla sodyum/potasyum nitrat veya nitritin bu tuzlara bulaştığı ve muhafaza sürecini doğrudan etkilediği gözlemlenmiştir. Bu bulaşların kürlenme sürecinin önemli bileşenleri olduğu ortaya çıkmıştır. Nitrat tuzu, nitrite (NO_2) ve ardından nitrik okside (NO) dönüşür ve kurutulmuş ete rengini ve aromasını veren nitrozomyoglobin oluşur (Karaca 2020).

Kürleme işlemi, et ürünlerinin raf ömrünü ve dayanıklılığını artırmak için en çok kullanılan yöntemlerdendir. Kürleme, ürünün cinsine göre tuz, nitrit ve nitrat gibi katkı maddeleri ve çeşitli baharatlar katılarak ürünün rengini, dokusunu, tadını, aromasını ve ağızda bıraktığı hissi iyileştirmek ve raf ömrünü uzatmak için tasarlanmış bir süreçtir (Candan ve Bağdatlı 2018).

İşlenmiş et ürünleri üzerinde olumlu etkisi olan nitrit ve nitrat bileşikleri 1926'dan beri kullanılmaktadır. 1950'li yıllarda nitrit ve nitratların kullanımının gün geçtikçe artması ile et endüstrisinde kullanılmaları yasallaştırılmıştır (Şanlı ve Kaya 1988).

Nitrat genellikle fermente et ürünlerinde kullanılırken nitrit ısıl işlem görmüş et ürünlerinde kullanılmaktadır (Karaca 2020). 20. yüzyılın başlarında daha hızlı olgunlaşmayı sağlayan nitrit, kimyasal bileşiminin bilinmesi ve et ürünleri üretimindeki artış nedeniyle nitrattan daha fazla önem kazanmıştır. Günümüzde nitratlar, yavaş bir olgunlaşma süreci gerektiren kuru kürlenmiş jambon veya sucukta kullanılmaktadır (Ustaoğlu 2011).

Et ürünleri endüstrisinde nitrit gibi pek çok etkiye sahip bir katkı maddesi henüz bilinmemektedir (Karaca 2020). Nitritler oldukça aktif kimyasallardır ve biyolojik olarak karmaşık et ürünlerinde birçok reaksiyonda yer alırlar. Çoğu sucuğa kürleme maddesi olarak sodyum nitrit eklenir. Ülkemizde yapılan sucuklarda ağırlıklı olarak doğal fermentasyon uygulanmaktadır. Fermentasyon aşamasında laktik asit üreten bakteriler (LAB), diğer istenilmeyen bakterilerin üremesini ve buna bağlı toksin üretimini kontrol etmede çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bu süreçte patojenik bakterileri baskılamak her zaman mümkün olmamaktadır. *Listeria*, *Salmonella* ve *E. coli* O157:H7 gibi bazı aside dirençli patojenler bu koşullar altında hayatta kalabilir. Gıdalara nitritlerin eklenmesi bu patojenlerin gelişimini önlemektedir (Özdestan ve Üren 2010).

Nitrit ısıya dayanıklı değilken kararlı bir yapıya sahip olan nitrat ısıya dayanıklıdır. Gıda sisteminin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak nitritlerin varlığında karmaşık reaksiyonlar meydana gelir. Nitritler indirgeyici ve yükseltgeyici maddelerdir ve organik maddelerle çok aktif reaksiyona girerler (Ustaoğlu 2011). Nitrit oldukça reaktif olduğundan, et sistemlerinin birçok bileşeniyle etkileşime girebilir veya bu bileşenlere

bağlanabilir. Isı etkisi ile ısıl işlem görmüş et ürünlerinde nitritin reaktivitesi artar. Nitrit iyonu özellikle pH 7'nin altında daha reaktiftir; amino asitler, aminler, sülfürhidriller, fenolik bileşikler, miyoglobin benzeri çeşitli et bileşenlerinin yanı sıra askorbik asit ve indirgeyici maddelerle etkileşime girebilir. Ayrıca nitrit, lipid oksidasyonunu önleyerek oksidatif stabiliteyi düzenleyebilir (Berardo vd. 2016). Nitrit, et ürünlerinin üretiminde birçok işleve hizmet eder. Bu işlevler arasında nitrik okside indirgenmesi, tat iyileştirme ve renk geliştirme tüketici kabulü açısından en önemli faktörlerdir (Sindelar ve Milkowski 2011).

Nitratlar pasif koruyuculardır ve uzun olgunlaşma süreci gerektiren et ürünlerinde kullanılabilir. Bu nedenle et ürünlerinin kürlenme işlemindeki reaksiyonların oluşabilmesi için nitratların daha reaktif olan nitritlere indirgenmesi gerekir (Terns vd. 2011). Bu işlem ette bulunan veya nitrat redüktaz aktivitesine sahip bakteri ilavesiyle oluşabilmektedir (Gray vd. 1981).

Nitrat ve nitritler, değişik nedenlerle et ürünlerine katılmaktadır. Bunlar, et ürünlerinin kırmızı rengini stabilize etmek, lipid oksidasyonunu önleyerek oksidatif acılaşmayı engellemek ve böylece oksidatif stabiliteyi destekleyerek etin tat ve lezzetinin bozulmasını önlemek, patojen mikroorganizmaların ve özellikle *Clostridium botulinum* gibi patojenleri etkisiz hale getirmektir (Dilek 2022).

2.3.1 Antimikrobiyal Etkisi

Gıdalarda patojen mikroorganizmaların gelişimini önlemek için bazı antimikrobiyal katkı maddeleri kullanılmaktadır (Hampikyan ve Çolak 2007). Et ürünlerindeki en önemli antimikrobiyal katkı maddeleri nitrat (NO_3^-) ve nitritlerdir (NO_2^-). En yaygın kullanılan nitrat ve nitritler sodyum nitrat (NaNO_3) ve sodyum nitrittir (NaNO_2) (Gökalp vd. 2010).

Nitrat tuzu inerttir. Önce nitrite dönüşür ve ardından etin kalitesi ve güvenliği üzerinde olumlu bir etkisi olmaktadır (Özdemir 2018). Nitritlerin antimikrobiyal etkisi nitratlardan çok daha yüksektir (Kurt 2006). Nitritin bakteriyostatik ve bakterisit etkisi vardır (Sindelar ve Milkowski 2011).

Nitritin tek veya başka tuzlarla kombinasyon halinde kullanılması, bazı aerobik/anaerobik mikroorganizmanın gelişmesini engeller (Alahakoon vd. 2015). Nitrit, Gram-negatif bakterilere Gram-pozitif bakterilerden daha az antibakteriyel özellik gösterir (Pichner vd. 2006). Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde önemli bir antimikrobiyal etkiye sahip olan nitrit, maya ve küflere karşı etkisizdir (Öztürk vd. 2015).

Nitritlerin antibakteriyel özelliklerini pH, oksijen ve diğer gıda bileşenleri gibi faktörler etkiler. Nitritler bakterilerin üremesine, metabolik enzimleri engelleyerek, oksijen alımlarını azaltarak ve proton değişimlerine müdahale ederek engel olur (Alahakoon vd. 2015). Ayrıca, sucuklardaki nitritin antimikrobiyal etkisinin büyük bir kısmı, nitrik oksit reaksiyon dizisiyle gerçekleşmektedir. Nitrik oksit ile demirin bağlanması, metabolizma ve bakteri üremesi için ihtiyaç olan demirin valığını kısıtlar (Sebranek ve Bacus 2007). Nitrik oksitin demire bağlanması ayrıca mikroorganizmaların metabolizmasını ve gelişimleri için gerekli enzimlerin fonksiyonlarını bozar (Karaca 2020). Demir ve sülfat içeren enzimlere sahip mikroorganizmalar, nitritin bu enzimlerle reaksiyona girmesiyle etkisiz hale getirilebilir (Cammack vd. 1999).

Kürlenmiş et ürünlerinde kullanılan nitritler için bilinen en önemli özellik *Cl. botulinum* sporlarının oluşumunun engellemesi ve botulizmin kontrol edilmesidir (Yıldız Turp ve Sucu 2016). Özellikle vakumlu et ürünlerinde nitritlerin toksin oluşturan patojen *Cl. botulinum* ve bunların sporları üzerinde inhibitör etkisi vardır (Öztürk vd. 2015). Nitritin antimikrobiyal etki gösterdiği diğer patojen mikroorganizmalar *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Cl. perfringens* ve *S. aureus*'tur (Pradhan vd. 2009).

C. botulinum'u etkisiz hale getirmek için gereken nitrit dozunun 150 ppm olduğu bildirilmektedir (Öztan vd. 1991). Ayrıca, pH'sı 5.7-6.0 olan bir üründe 200 mg/kg sodyum nitrit düzeyi *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* ve *Escherichia* gibi bakterilerin üremesini engellemiştir (Özdestan ve Üren 2010).

Nitritin antimikrobiyal etkisi, yüksek ısıl işlemle büyük ölçüde artmaktadır. Isıl işlem görmüş gıdalarda nitritlerin varlığı, perigo faktör adı verilen bileşiklerin oluşması sonucu antimikrobiyal aktiviteyi yaklaşık on kat artırır (Kurt 2006).

2.3.2 Renk Üzerine Etkisi

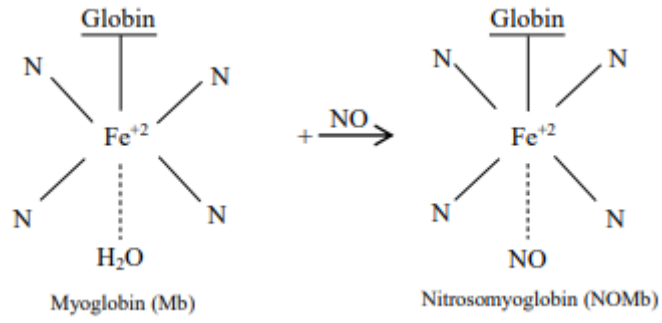
Tüketiciler et ürünlerini tercih ederken ürünün rengine önem vermektedir. Et ürünlerinde kür ajanı olarak en önemli katkı maddeleri nitrat ve nitrit tuzlarıdır (Yalçın vd. 2012). Tuzun renk üzerindeki istenmeyen etkilerini önlemek için nitrat ve nitritler kullanılır. Et ürünlerinde taze etin doğal renginin sağlanması amaçlanmaktadır (Vural ve Öztan 1992).

Nitrat ve nitritler et ürünlerinde uzun zamandan beri kullanılmaktadır. 20. yüzyılda yapılan araştırmalarda, etin tuzlanması ile elde edilen ürünlerde arzu edilen kırmızı rengi geliştirmek için tuzun tek başına yetersiz olduğu ve doğal yollarla tuzla kontamine olan sodyum nitrat ve potasyum nitratın istenen rengin gelişimini iyileştirmede etkili olduğu bulunmuştur (Palamutoğlu ve Sarıçoban 2012).

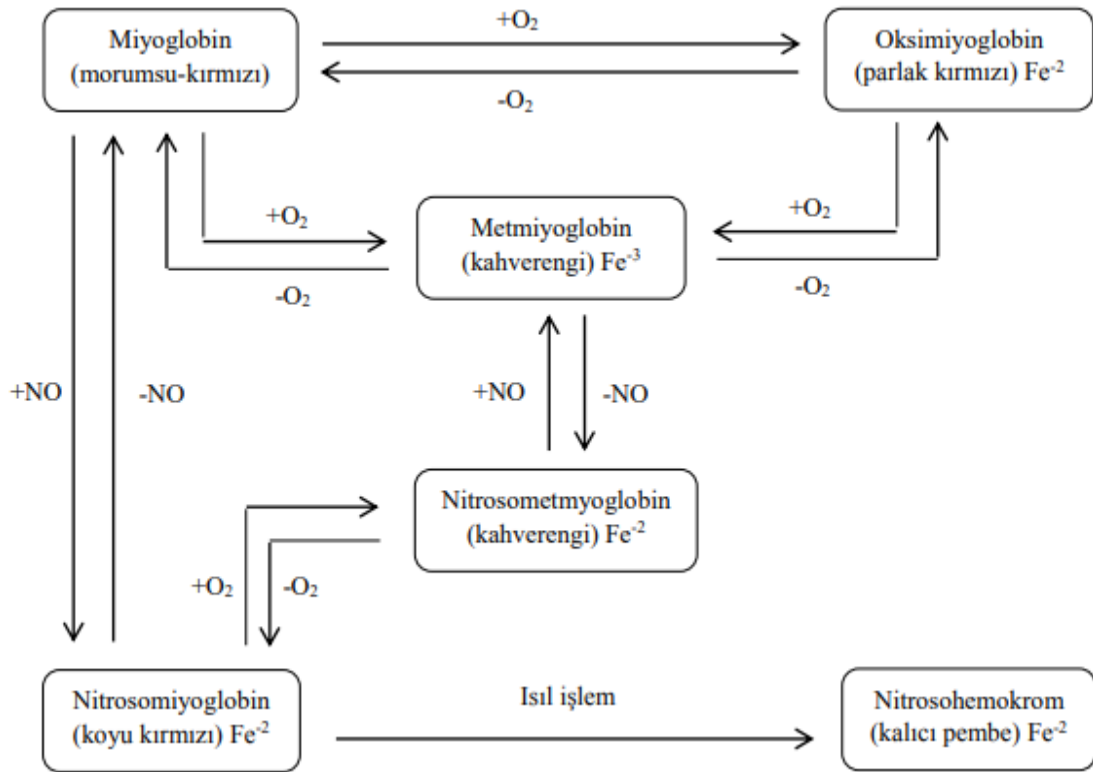
Etin renginden sorumlu ana pigment miyoglobindir. Bununla birlikte, miyoglobinin kararlı bir bileşik değildir (Wirth 1986). Sadece et ve et ürünlerini tuzlamak, ete rengini veren miyoglobinin oksidasyonunu engellemez. Miyoglobin ya da oksimiyoglobin hemen metmiyoglobine oksitlenmektedir (Karaca 2020).

Kürleme, renk stabilizatörleri olarak bilinen nitrit veya nitratların sodyum veya potasyum tuzları kullanılıp etin renginin kalıcı bir et rengine dönüştürüldüğü süreçtir. Kürleme sürecinde renk gelişimi ve kalıcılığı önemlidir. Renk oluşumu, ete rengini veren miyoglobinin kürleme maddesi ilavesi ile nitrozomiyoglobine dönüştürülmesidir. Rengin kalıcılığı ise, renk oluşumunun etin tüm renklendirici pigmentlerine kadar uzanması ve ürünün raf ömrü boyunca rengin değişmeden kalmasıdır (Kuyumcu ve Yurttagül 2000).

Oldukça aktif bir kimyasal olan nitrit, miyoglobini metmiyoglobine okside eder ve onu NO'e indirger. Demir iyonu (Fe^{+3}) NO'e bağlanır ve nitrozo metmiyoglobini (NO-metMb) oluşturur. NO-Mb, normalde ette bulunan bileşiklerin indirgenmesiyle Fe^{+3} 'ün ferroz demire (Fe^{+2}) indirgenmesi sonucu oluşur (Song vd. 2015). Kürleme işlemindeki nitrosomiyoglobin oluşumu için reaksiyon Şekil 2.1'de, et ve et ürünlerinde tipik pembemsi renk oluşumu Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

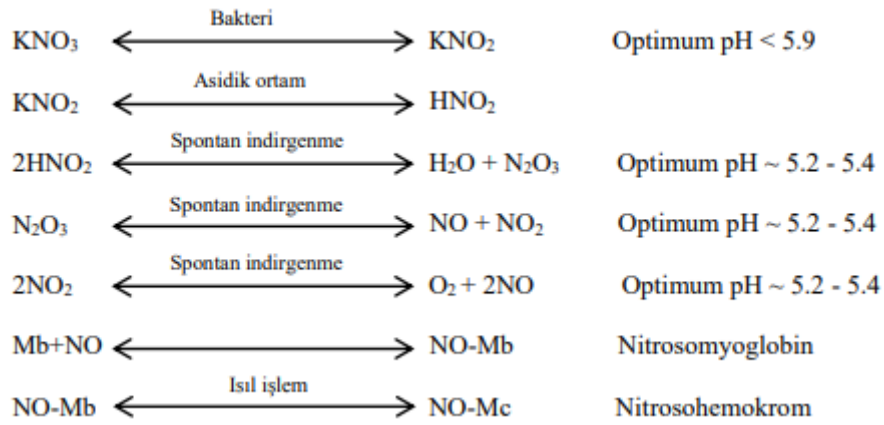


Şekil 2.1 Kütleme işlemindeki nitrosomyoglobin oluşumu için reaksiyon (Doğan 2022).

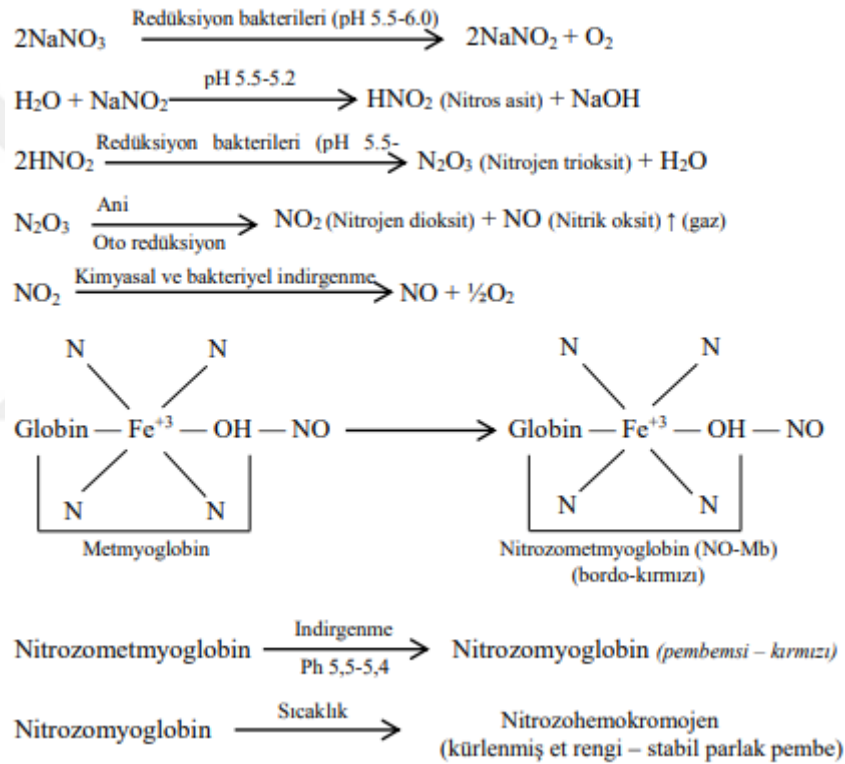


Şekil 2.2 Et ve et ürünlerinde tipik pembemsi renk oluşumu (Doğan 2022).

Nitrosomiyoglobin ve Nitrosohemokrom oluşum için reaksiyonlar Şekil 2.3'te, kürlenmiş et ve et ürünlerinde ürüne özgü karakteristik renk oluşumu için reaksiyonlar Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

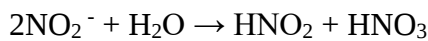


Şekil 2.3 Nitrosomiyoglobin ve Nitrosohemokrom oluşum için reaksiyonlar (Doğan 2022).



Şekil 2.4 Kürlenmiş et ve et ürünlerinde ürüne özgü karakteristik renk oluşumu için reaksiyonlar (Doğan 2022).

Reaksiyonlar sırasında üretilen nitrojen dioksit ayrıca aşağıdaki su ile girdiği reaksiyon yoluyla azot monoksit döngüsüne geri dönen nitroz asit ve nitrik asidi oluşturur daha sonra nitrik asit nitrata ayrışır:



$\text{HNO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$ Nitritlerin katıldığı bu reaksiyonlar dizisi nedeniyle, renk pigmentlerinin oluşumuna ek olarak nitratlar da oluşabilir. Bu reaksiyon, işlenmiş

gıdalardaki nitratların varlığını açıklar. Bu nedenle et ürünleri formülasyona eklenmeyen nitratlar içerebilmektedir (Öztürk vd. 2015).

Nitrit ve nitratlar etin kırmızı rengini korumak için kullanılır. Nitrat ve nitritlerin et ürünlerinde kullanılmasının temel nedeni ürüne pembemsi kırmızı bir renk vermektir. Ortamda sadece nitratlar bulunduğunda nitrit formuna indirgenmeleri gerekir. Bu sebeple ortamda nitrat indirgeyen mikroorganizmaların (stafilokok ve mikrokok) varlığı esastır (Öztañ vd. 1991).

Et ürünlerinin rengi, renk pigmentleri ve kürlenme maddelerinin etkileşimi ile oluşur. Miyogloblin taze etteki en önemli renk pigmentidir. Hemoglobin ve stokrom gibi pigmentlerin çok az etkisi vardır veya hiç etkisi yoktur. Kürlenme sürecinde miyogloblin, nitrat ve nitrit tuzlarının ayrışma ürünü olan nitrik oksit ile birleşerek rengin oluşmasında ana bileşen olan nitrozomyoglobini oluşturur. Nitrosomyoglobin (nitrosylmyoglobin), fermente sucuk ve pastırma gibi ısıt işlem uygulanmamış et ürünlerinde oluşan tipik bir renklendirici maddedir (Vural ve Öztañ 1992). Isıt işlem uygulanmamış et ürünlerinin rengi parlak kırmızıdır (Yıldız Turp ve Sucu 2016).

Kürlenmiş ette pH'a bağılı olarak ısıt işlem, miyogloblinin protein kısmını denatüre eder ve daha kararlı ve renk sabitleyici olan açık pembe renkli nitrozohemokromojen pigmenti oluşturur. Isıt işlem uygulanmış et ürünlerine Nitrozohemokromojen pigmenti, istenilen pembe rengi kazandırır, ancak ışıık ve oksijen hassasiyeti çok yüksektir. Bu nedenle et ürünleri, mat ve ışıık geçirmeyen ambalaj malzemelerine yerleştirilerek en hızlı şekilde vakumlanarak paketlenir. Isıt işlem uygulanmış ürünlerde istenilen rengi elde etmek için 2 ila 14 mg/kg nitrit kullanılması yeterlidir. Ancak oluşturulan rengin depolama boyunca tutarlı kalması için yeterli olmadığı ve rengin zamanla solduğı belirtilmiştir (Karaca 2020). Isıt işlem uygulanmış et ürünlerinde 40-50 mg/kg nitrit kullanılması rengin homojen dağılımını sağlar (Sebranek ve Bacus 2007).

Kürleme işleminin sonunda nitrozomyoglobinin (NOMb) dönüşümü %30-40'tır. Kürlenme işlemi uygulanan et ürünlerine eklenen tüm nitrat veya nitritler miyoglobline bağlanmaz veya aşırı nitrit ve nitrat kullanımı üründe kalıntı nitrit oluşumuna neden olur (Candan ve Bağıdatlı 2018).

2.3.3 Antioksidan Etkisi

Et ürünlerinin bozulmasında mikroorganizmaların gelişmesi ve kimyasal reaksiyonlar etkilidir. Oksidatif acılaşma olarak da adlandırılan lipit oksidasyonu, en yaygın kimyasal değişimdir (Karakaya vd. 2011). Lipit oksidasyonu, depolama ve işleme sırasında et ve et ürünlerinin kalitesini ve kabul edilebilirliğini sınırlayan önemli bir faktördür (Falowo vd. 2014). Yağlarda sadece oksidasyon reaksiyonları meydana gelmez, aynı zamanda serbest radikaller et ürünlerinde bulunan pigmentler, proteinler, karbonhidratlar ve vitaminlerle de etkileşime girer; bu da istenmeyen renk değişimlerine, istenmeyen tat oluşmasına, su kaybına, dokuda bozulmaya, besin değerinin azalmasına, kısa raf ömrüne ve hepsinden önemlisi toksik bileşiklerin oluşumuna yol açar (Şimşek 2015).

Antioksidan özelliklerinden dolayı nitrat ve nitritler, et ürünlerinde lipit oksidasyonundan kaynaklanan acılaşmayı önemli ölçüde önleyebilmektedir (Morrissey ve Tichivangana 1985). Ek olarak, nitrit, etteki güçlü antioksidan özelliklerinden dolayı, ısıtılardan sonra kürlenmiş ürünlerde oksidatif lezzet (Warmed Over Flavour, WOF) oluşmasını engeller (Shahidi ve Pegg 1992).

Nitritin indirgenmesi esnasında oluşan nitrik oksit, radikalleri tutma görevi görür ve antioksidan etki gösterir. NO'nin en önemli antioksidan özelliği, et pigmentindeki hem demirinin bağlanması ve stabilizasyonundan ve pişirme sırasında lipid oksidasyonu için güçlü bir katalizör olan serbest demirin indirgenmesinden kaynaklanmaktadır (Parthasarathy ve Bryan 2012). NO'nin acılaşmayı önleme üzerindeki etkisinin, renk oluşumunda meydana gelen reaksiyonlara benzer olduğu düşünülmektedir. Ette bulunan Fe^{+3} oksidatif bileşik, yağ oksidasyonunu uyarır. Kütleme işlemi uygulanmış et ürünlerinde nitrik oksitin miyoglobinin ile etkileşimi, renk pigmentindeki demiri indirgenmiş Fe^{+2} halinde koruyarak lipid oksidasyonunu önler (Candan ve Bağdatlı 2018).

Et ürünü formülasyonlarında kullanılan nitritlerin lipid oksidasyonu üzerindeki etkisi çeşitli yaklaşımlarla açıklanmıştır:

- 1) Nitrit veya nitrik oksit, demirin şelatlanması veya lipid peroksil radikalleri ile etkileşimi yoluyla radikal olmayan ürünler oluşturur; bu, lipid oksidasyonuna ve oksidasyonun önlenmesine yol açan reaksiyon zincirinin bozulmasına yol açar.
- 2) Nitritler, antioksidan özelliğini serbest radikalleri yakalayabilen ve nitrozo- ve nitrozil- bileşikleri oluşturarak gösterir.
- 3) Nitritler oksidasyonu doymamış yağları doku zarları boyunca stabilize ederek engeller (Öztürk vd. 2015).

2.3.4 Lezzet, Tat ve Aroma Üzerine Etkisi

Nitrit ve nitratların kürlenme işlemi uygulanmış et ürünlerinde kullanımının kendine has lezzet ve aromaların gelişiminde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Reaksiyonlardan kaynaklanan spesifik bileşenler henüz tam olarak tanımlanamamıştır (Sindelar ve Milkowski 2011).

Nitritlerin pişmiş et ve et ürünlerinin tadı üzerindeki olumlu etkisinin WOF (yeniden ısıtma sonucu oluşan oksidatif lezzet) oluşumundan kaynaklandığı belirtilmektedir (Öztürk vd. 2015). Nitritler, lipid oksidasyonunu engelleyerek karakteristik kürlenme lezzetinin oluşmasına neden olur (Ustaoglu 2011). Nitratların et ürünlerinde kullanılmasının tat ve aromayı arttırdığı ve organoleptik özellikleri geliştirmeye yardımcı olduğu bilinmektedir (Sanz vd. 1998).

Taze veya dondurulmuş etlerde bulunan oksidasyon ürünlerinin kürlenmiş etlerde oluşmaması, bu ürünlerin farklı tatlarının nedeni olarak öne sürülmüştür. Lezzet gelişimi için nitritin kürlenmiş et ürünlerinde 20-40 ppm aralığında yeterli olduğu bildirilmiştir (Rincon vd. 2008). Bir diğer çalışmada ise, kürlenme işlemi uygulanan et ürünlerinde karakteristik lezzetin oluşumu için 50 ppm nitrit seviyesinin yeterli olduğunu bildirilmiştir (Turkal ve Doğruer 2020).

2.4 Nitrozaminler ve Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Nitrit, tüketicilerin en çok çekindiği gıda katkı maddelerinden biridir (Demirkol 2019). Proteinler ve aminoasitler, kürlenmiş et ürünlerinde nitritlerle reaksiyona girerek nitrozaminleri oluşturan ana bileşenlerdir (Ustaoglu 2011).

Fermente ve emülsifiye et ürünlerinde üretimden tüketime kadar oluşabilen biyogen aminler sağlığa zararlıdır ve kalıntı nitritlerle oluşturdukları kanserojenik nitrozaminler son derece tehlikelidir (Yalçın vd. 2012). Nitrozaminler aynı zamanda mutajenik ve teratojenik etkiye sahiptir (Wirth 1985). Güçlü kanserojen etkiye sahip olan nitrozaminler, et ürünlerinde büyük miktarlarda kullanılan nitratların bakteriler tarafından indirgenmesi veya gıdalardaki sekonder ve tersiyer aminlerin nitritlerle düşük pH ve yüksek sıcaklıkta reaksiyona girmesiyle oluşur (Sezer vd. 2013; Kerimoğlu ve Serdaroğlu 2020). pH'nın 5.5'in üzerinde olduğu durumlarda nitratlar bakterilerin gelişimi ile nitrite dönüşür, nitritler ise nitrozaminlerin oluşmasına neden olur (Prasad ve Chetty 2008).

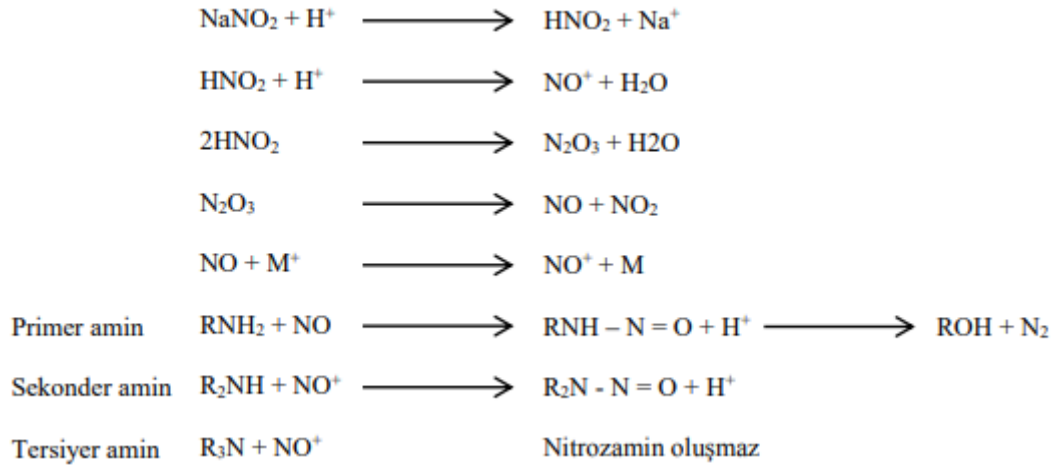
Et ürünlerinde dimetilamin, di-n-propilamin, 2-feniletilamin, trimetilamin, izopropilamin ve n-propilamin vb. aminlerin olduğu belirlenmiştir (Candan ve Bağdatlı 2018). Proteinlerin parçalanma metabolitlerinden oluşan sekonder aminler, nitritlerle birleşerek nitrozaminleri oluşturur. Bakterilerin, pH ve sıcaklığın (100-185°C) nitrozamin oluşumunda önemli etkisi vardır. Birçok araştırmacı, nitrozaminin midede uygun fizyolojik koşullar altında kimyasal bir reaksiyon veya bakterilerin aktivitesi ile oluştuğunu bildirmişlerdir (Bayraktar vd. 1998). Genel olarak kürlenme işlemi uygulanan etlerin pH'sı, dietilnitrozamin ve dimetillerin oluşması için pek uygun olmamaktadır. Fakat kürlenme işlemi uygulanmış et ürünlerinin, kızartma işlemi gibi yüksek sıcaklıklarda, nitrosoprolidin oluşması beklenmelidir (Palamutoğlu ve Sarıçoban 2012). Gıdalarda N-nitrozamin oluşmasında pişirme yöntemi, ısı ve süre en önemli faktörlerdendir. En yüksek nitrozamin konsantrasyonlarına kızartma ile pişirilen etlerde ulaşıldığı bulunmuştur (Çakmak vd. 2009).

Nitrozaminlerin oluşumu için mikrobiyal çeşitlilik, ortamın sıcaklığı, pişirme şekli, pişirme süresi, kalıntı nitrit konsantrasyonu, tuz miktarı ve pH gibi faktörler etkilidir. Ayrıca aminlerin ve nitritlerin N-nitrozamin oluşturması, aminlerin doğasına, nitrit/amin oranına, reaktiflerin konsantrasyonuna ve ortamdaki bazı inorganik iyonların varlığına bağlıdır (Özdemir 2018). Kalıntı nitrit miktarı ile beraber kullanılan katkılar, etin yağ içeriği ve kalitesi, ısı uygulamasının şekli, paketlenme şekli, saklama ve olgunlaştırma koşulları nitrozamin oluşumunda etkili olan faktörlerdir (Herrmann vd. 2015). Ayrıca ortamda bulunan bileşikler ve iyonlar nitrozaminlerin oluşumunu

etkileyebilir. Örneğin; C vitamini, alfa-tokoferol ve eritorbik asit nitrozamin oluşumunu engellerken, tiyosiyanat iyonu oluşumu hızlandırır (Sucu 2018).

Kürleme prosesi esnasında ortamın pH'ı düşük olduğu durumda kalıntı nitrit, ortamda bulunan sekonder amin ve tersiyer aminler ile birlikte, azot oksit veya azot dioksit ile elektrofilik yer değiştirme reaksiyonlarına girer ve bu da Dietilnitrosamin (DNA) veya N-Dimetilnitrosamin (DMNA) gibi kanserojenik bileşiklerin oluşumuna neden olur (Candan ve Bağdatlı 2018).

Asidik bir ortamda nitrit, nitroz aside (HNO_2) yükseltgenmektedir. Sekonder aminler ve nitrit oksit arasındaki reaksiyon yalnızca çok düşük pH'ta ($\text{pH} \sim 3$) mümkündür. Kalıntı nitritler kürleme işlemi uygulanmış et ürünlerinin tüketiminden sonra midenin özsuyla reaksiyona girer. Uygun koşullara bağlı olarak midede N-nitrozaminler oluşur. İşlem sırasında oluşan nitrozaminler kolon kanserine sebep olmaktadır (Oostindjer vd. 2014). Nitrozaminlerin kabul edilebilir limitlerin üzerinde alındığında insan sağlığına etkilerini ve oluşum mekanizmalarını araştıran birçok çalışma bulunmaktadır (Gökalp 1985). Nitrozaminlerin oluşumu için kimyasal reaksiyonlar Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Nitrozaminlerin oluşumu için kimyasal reaksiyonlar (M/M^+ geçiş iyonlarıdır) (Honikel 2008).

2.5 Nitrit ve Nitratın Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri

Nitrit ve nitrat katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle gıdalarda belirli dozların üzerinde bulunmaları istenmeyen bir durumdur (Unnikrishnan

vd. 2013). Et ürünlerinde nitrat ve nitritlerin az kullanılması bazı olumsuz renk değişimlerine ve mikrobiyal bozulmalara, fazlalıkları ise kalıntı nitrit miktarının artmasına ve nitrozamin oluşumuna neden olur (Erulaş 2010). 1980'lerin başından beri nitrozaminlerin insanlar ve hayvanlar için kanserojen olduğu bilinmektedir (Bryan 2006). Bu nedenle nitrat ve nitritlerin eklenmesi, salam, sosis ve sucuk gibi et ürünlerinin üretimi için önemlidir. Nitratlar ve nitritler yüksek miktarlarda alınır, tüketiciler akut veya kronik zehirlenmelere maruz kalabilir (Servi 1991).

Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalar sayesinde nitrit ve nitratların olumsuz etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Et ürünleri üretim teknolojisinde, aminler ve amidlerle reaksiyona girerek kanserojen riskler oluşturması nedeniyle nihai üründe oluşan kalıntı nitrit miktarı çok önemlidir. Bu sebeple et endüstrisinde kullanılan nitrit ve nitrat seviyelerinin düşürülmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Ruiz-Capillas vd. 2007). Uzun yıllardır kürlleme işlemi uygulanmış et ürünlerindeki nitrit kalıntısı, N-nitrozo bileşikler ile kanser arasındaki ilişki araştırılmaktadır (Cassens 1997). Nitrit ve nitratların gıdalarla alınmasının kanserle ilişkilendirilmesine rağmen, bu bileşenlerin kendi başlarına kanserojen etkiye sahip olmadığı ve ısı uygulaması ile hazırlama ve sindirim esnasında diğer bazı bileşenlerle etkileşimleri sonucu kanserojenik etkiye neden olan maddeler meydana gelebileceği bildirilmiştir (Bedale vd. 2016).

Yüksek düzeyde nitrat ve nitrit kalıntısı içeren gıda maddeleri, tüketici için akut veya kronik zehirlenme riski oluşturur. Nitritlerin (NO_2^-) nitratlardan (NO_3^-) 10 kat, potasyum nitrat tuzlarının ise sodyum tuzlarından daha toksik olduğu bildirilmiştir (Erulaş 2010). Vücuda küçük dozlarda giren nitrat ve nitritlerin insan vücudu üzerinde olumsuz bir etkisi yoktur. Ancak çok fazla nitrat ve nitrit alınır veya gıdaya eklenirse, gerek gıdada gerekse insan vücudunda N-nitrozo bileşiklerinin oluşmasına neden olarak toksik veya kanserojenik etkiye neden olabilir. Güvenli sodyum nitrat ve potasyum nitrat miktarı insan vücut ağırlığının kilogramı başına 5 mg ve sodyum nitrit ve potasyum nitrit miktarı 0,4 mg olması gerektiği Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir. Böylece 70 kg vücut ağırlığına sahip bir kişinin tüketebileceği güvenli günlük doz 350 mg sodyum nitrat ve 28 mg sodyum nitrittir (Gökalp 1983). İnsanlar için öldürücü dozlar 80-800 mg nitrat/kg vücut ağırlığı ve 33-250 mg nitrit/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Öztürk vd. 2015).

Nitrat; çeşitli besinlerle insan ve hayvan vücuduna girdikten sonra midede mikroorganizmalar tarafından nitrit ve amonyağa indirgenir. Fazla nitrat, midede biriken nitrit ve amonyak ile birlikte emilir ve kana karışır (Parsons 1978). Genel olarak nitratların insan tüketimi için güvenli olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte, son araştırmalar nitratların ağız boşluğunda nitritlere indirgendiğini göstermektedir. Nitratlar normalde bağırsakta emilir, ancak bazı nitratlar tükürük bezleri tarafından ağız boşluğunda nitrite indirgenir. Bu şekilde oluşan nitrit çok düşüktür ve nitrit zehirlenmesine neden olmaz. Ancak diğer bazı zararlı reaksiyonların oluşmasına yol açar (Candan ve Bağdatlı 2018).

Vücuda çok miktarda nitrit ve nitrat girdiğinde birçok sağlık sorununa neden olur. Organik azotun biyokimyasal oksidasyonu sonucu nitrat oluşur. Nitrat iyonlarının doğrudan toksik etkisi yoktur. Bakteriler tarafından gerçekleştirilen nitrat redüktaz aktivitesi ile nitrat, zararlı nitrite dönüştürülür. Vücuda giren nitratın büyük bir bölümü dışkı ile hızlıca atılır ve bir kısmı da tükürük bezine taşınır ve ağız boşluğunda salgılanır. Burada ağızdaki bakteriler onu nitrite indirger ve yutulduğunda mideye geçer. Ortamda nitrit olduğunda, gıda sistemindeki fizikokimyasal özelliklere bağlı olarak bir takım karmaşık reaksiyonlar gerçekleşir. Nitrit, indirgeyici ve yükseltgeyici bir maddedir, organik maddelerle çok aktif bir şekilde reaksiyona girer ve ısıya dayanıklı değildir. Nitratın en önemli halk sağlığı yönü, nitrat ve mide kanseri arasındaki bağlantıdır (Erdoğan 2014). N-nitrozo bileşiklerinin oluşumu, kolorektal kanser başta olmak üzere belirli kanser türleri riskini artırabilir (Yıldız Turp ve Sucu 2016).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir yan kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın yayınladığı monograflarda endüstride kullandığı maddelerden hangilerinin kansere neden olduğu açıklanmaktadır. Bu monograflar hazırlanmadan önce bilim dünyasında yapılan tüm çalışmalar gözden geçirilmektedir. Sonuçlar yorumlandıktan sonra insan hayatında kansere neden olanlar endüstriyel olarak sınıflandırılır. Buna göre, zararlı maddeler beş gruba ayrılmaktadır:

Grup 1: İnsanlar için kanserojen olan maddeler

Grup 2A: İnsanlar için büyük olasılıkla kanserojen olan maddeler

Grup 2B: İnsanlar için olasılıkla kanserojen olan maddeler

Grup 3: İnsanlar için kanserojen olarak sınıflandırılmayan maddeler

Grup 4: İnsanlar için kanserojen olma ihtimali olmayan maddeler (Özdemir 2018).

2010 yılında Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC), nitrit ve nitratları değerlendirmiş ve bunları insanlar için Grup 2A (muhtemelen kanserojen) olarak sınıflandırmıştır. Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı'nın 2015 tarihli bir raporunda, kırmızı et ürünleri tüketiminin kolon kanseri, pankreatit ve prostat kanseri ile bağlantılı olduğu ve bu nedenle grup 2A (insanlar için muhtemelen kanserojen) olarak sınıflandırıldığı belirtilmiştir. Ayrıca aynı raporda günde 50 gram işlenmiş kırmızı et yemenin kolon kanseri riskini %18 artırdığı, bu nedenle işlenmiş kırmızı etin Grup 1 (insanlar için kanserojen) olarak sınıflandırıldığı belirtilmektedir. 2017 yılında Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), nitratları yeniden değerlendirerek şu ana kadar ki bilimsel kanıtların mevcut kabul edilebilir günlük alım (ADI) seviyelerini düşürmek için yetersiz olduğunu belirtmiştir. Nitritle ilgili değerlendirmesinde, epidemiyolojik çalışmalarda gıdalarda bulunan nitrit ile gastrik kanserler ve işlenmiş et ürünlerinin nitrit ve nitrat varlığı ile kolon kanserleri arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar bulunduğu belirtilmiştir (Gültekin ve Akın 2019).

İnsan vücudunda nitrozaminler karaciğer, akciğerler, pankreas, böbrekler, mesane, yemek borusu ve dil gibi bazı organlarda tümör oluşumuna sebep olabilmektedir (Demirkol 2019). Nitritlerin özellikle sekonder aminler ve diğer bazı azotlu maddelerle reaksiyona girmesi ve N-nitrozaminlerin oluşması ve bu bileşiklerin karaciğer, akciğer, böbrek, gırtlak, mide ve pankreas kanserlerinin gelişiminde rol oynadığı öne sürülmüştür (Öztürk vd. 2015). 13 farklı çalışmanın sonuçları, günde 25 g kavrulmuş kırmızı et tüketmenin kolon kanseri riskini %49, günde 100 g kavrulmamış et tüketmenin ise sadece %12-17 oranında artırdığını göstermiştir (Çakmak vd. 2009).

Klasik akut nitrit/nitrat zehirlenmesi, kandaki nitrit seviyesinin yeterli düzeye ulaşması ve anoksiye (dokularda oksijen eksikliği) neden olması sonucu oluşur. Nitratlar, sindirim sisteminde mikroorganizmaların etkisiyle nitrite dönüşür ve vücudun savunmasını baskılar. Beyin damar dokularında veya akciğerlerde, kalpte, karaciğerde, böbreklerde ve testislerde nitrit seviyeleri uygun seviyelere ulaştığında nitrit zehirlenmesi, meydana gelir. Nitrit ve nitratlara uzun süre maruz kalmak, söz konusu dokuların ciddi şekilde tahrip olmasına yol açabilir (Ata 2010).

Vücuda çeşitli gıdalarla alınan nitrat ve nitritlerin miktar ve kimyasal bileşimlerine bağlı olarak insanlarda ve hayvanlarda akut ya da kronik zehirlenmeler görülebilmektedir.

Akut zehirlenmelerde nitrit toksik etkisini, hemoglobinin methemoglobine dönüşmesi ile gösterir ve nitrit iyonu damarlardaki düz kasların genişlemesine neden olarak sistemik arteriyel kan basıncının düşmesine, dolaşım bozuklukları ve şoka sebep olabilmektedir. Ayrıca nitratlar ve nitritler, kanserojen etkileri olan N-nitrozo bileşiklerinin öncü maddeleridir (Sancak vd. 2008).

Vücuda çeşitli yollardan giren nitrat konsantrasyonu 45 mg/L'den fazla ise bu durum 6 aylıktan küçük bebeklerin nitrat ile zehirlenmesine yol açabilmektedir. Mide asitleri bebeklerde altıncı aydan sonra oluşmaktadır. Midede nitrat nitrite indirgenir ve gastrointestinal sistemde oluşan nitritler kandaki hemoglobinle etkileşime girerek methemoglobini oluşturur. Aynı zamanda hemoglobindeki demir Fe^{3+} 'e yükseltgenirken kan oksijen taşıma yeteneğini kaybeder ve bebekler boğularak ölebilmektedir. Sonuç olarak, bebeklerde “mavi bebek sendromu” olarak bilinen methemoglobinemi oluşur. İlerleyen yaşlarda midedeki asitliğin artması nedeniyle bu etki ortadan kalkar (Erdoğan 2014). Methemoglobin yetişkinlerde methemoglobin redüktaz enzimi tarafından tamamen hemoglobine dönüştürülebilmektedir (Yıldız Turp ve Sucu 2016). Ancak bazı çalışmalar methemoglobineminin erişkinlerde de bulunabileceğini göstermektedir (Chan 2011).

İkinci tip zehirlenme, oluşan nitrozaminlerin neden olduğu kronik nitrit zehirlenmesidir. Nitritler, nitrozaminlerin oluşmasına sebep olur ve nitrozaminler potansiyel kanserojen, mutajenik ve/veya teratojeniktir (Connolly ve Paul 2001). Akut nitrat zehirlenmesi çok nadirdir. Çoğu durumda, bulgular nitratın nitrita indirgenmesinden kaynaklanır. 8 ile 15 g sodyum veya potasyum nitrat alan yetişkinler, ani başlayan şiddetli gastroenterit, idrarda ve dışkıda kan, karın ağrısı ve yorgunluk yaşayabilir. Nitratların tersine, akut nitritin toksik etkisi yaygındır ve bununla ilişkili çok fazla ölümlerin olduğu bildirilmiştir. Bu genellikle yanlışlıkla sodyum nitrit alımından veya kontrolsüz sodyum nitrit kullanımından kaynaklanmaktadır (Özdestan ve Üren 2010).

Son yıllarda nüfus ve endüstriyel büyümeye bağlı olarak sulardaki nitrit ve nitrat potansiyeli ve miktarı artmıştır (Ağaoğlu vd. 2007). Nitrat içeriği 20 ppm'den fazla olan içme suyunun uzun süreli tüketilmesi yetişkin insanlarda akut veya kronik zehirlenmelere yol açabilir (Öztürk vd. 2015).

Bu nedenle insan ve hayvan sağlığını korumak için gıdalarda özellikle et ürünlerinde, hayvan yemi ve içme ve kullanma sularında nitrit ve nitrat tayini yapmak çok önemli ve gereklidir (Erdoğan 2014).

2.6 Nitrit ve Nitratın Et Ürünlerinde Kullanımı İle İlgili Yasal Sınırlamalar ve Alternatif Arayışlar

Et ürünlerine olgunlaştırma sırasında eklenen nitrat ve nitritlerin çoğu parçalanır ve diğeri bazı kimyasal bileşiklere dönüşür. Sucuk ve pastırma gibi işlenmiş et ürünlerinin üretim prosesinde kullanılan nitrit ve nitratların bir takım olumsuz etkileri nedeniyle kısıtlanması ve sürekli izlenmesi gerekmektedir (Sancak vd. 2008). İşlenmiş et ürünlerinde nitrat ve nitrit kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir ve birçok ülkede yasalarla düzenlenmiştir. Nitrat ve nitritin et ürünlerine eklenmesi kanserojenik N-nitrozo bileşiklerinin oluşumuna yol açtığından, bazı ülkelerde yasaklanmış ve bazı ülkelerde ciddi şekilde kısıtlanmıştır (Ustaoglu 2011).

Nitrit, bir üründe bulunan insan tüketimi için onaylanmış tek toksik maddedir (Erdoğan 2014). Et ürünlerine doğrudan eklenmesi ve saf nitritin gıda işleme tesislerinde bulundurulması çoğu ülkede yasaklanmıştır (Candan ve Bağdatlı 2018). 1970'lerin sonlarında, işlenmiş etlerde nitrozaminleri azaltmak için bir gıda katkı maddesi olarak sodyum nitrit kullanımının yasaklanması tartışılmıştır. Sodyum nitrit yasağı, gıdalarda nitrozamin oluşumunu önlemeyi amaçlamaktadır. Diğeri taraftan olası gıda kaynaklı botulizm riskinin artması gündeme gelmiştir. *Clostridium botulinum* gelişimi ve toksinlerinin oluşumunu önlemek için gerekli olan sodyum nitritin minimum seviyesi 120 ppm olarak sınırlandırılmasıyla bu sorun çözülmüştür (Özdemir 2018). Nitratlar ve nitritler et ve et ürünlerinde önemli katkı maddeleridir. Bununla birlikte, bazı ülkelerde (Norveç gibi), nitrat ve nitritlerin öngörülen dozu aşan miktarlarda ilave edilmeleri halinde meydana gelebilecek yan etkilerden kaçınmak için kullanılması tamamen yasaklanmıştır. Ayrıca diğeri ülkelerde belirli bir dozda kullanımına izin verilmektedir (Özcan vd. 1991).

Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA)'ne göre yetişkin insanlar için önerilen maksimum günlük alım miktarı (ADI), insan vücut ağırlığının her kg'ı için 3,7 ppm nitrat ve 0,06 ppm nitrit olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, 60 kg ağırlığa sahip bir

yetişkinin günlük nitrat alım dozu 222 mg'ı ve nitrit alım dozu ise 3.6 mg'ı geçmemelidir (Çakmak vd. 2009).

Et ürünlerinin cinsi ve üretimi yapılan ülkeye göre kullanımına müsaade edilen nitrit ve nitrat miktarı, farklılık göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kıyılmış ürünlerde izin verilen maksimum sodyum nitrit seviyesi 156 mg/kg ve sodyum nitrat ise 1718 mg/kg olarak düzenlenmiştir (Yıldız Turp ve Sucu 2016). Kürlenmiş ve kurutulmuş etlerde Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları (FSANZ; 2007-2008)'na göre, en fazla 125 mg/kg nitrite ve 500 mg/kg nitrata izin verilmiştir (Ustaoglu 2011). Avrupa'da bazı ürünlere sodyum nitrat (E251) ve potasyum nitrat (E252) tek başına veya kombinasyon halinde eklenir ve potasyum nitrat (E249) ile sodyum nitrit (E250) tuzla karıştırılmış olarak kullanılmaktadır. Kararsız yapısı nedeniyle nitratlar nitrite dönüşür ve antimikrobiyal etki nitritlerden kaynaklanmaktadır. Ancak n-nitrozo bileşiklerinin potansiyel kanserojen etkilerinin tespit edilmesinden sonra birçok ülkede nitratların artık kullanılmadığı bildirilmiştir. Nitrit ise bazı ürünlere kürleme maddesi olarak, genellikle 80-120 ppm oranında eklenir (Gökmen 2010).

Avrupa Birliği'nde izin verilen nitrit ve nitrat seviyeleri, Avrupa Komisyonu Yönergesi (2006/52/EC) ile belirlenmiştir (Yıldız Turp ve Sucu 2016). Yönergeye göre izin verilen maksimum miktar, kurutulmuş fermente et ürünlerinde nitrat ve nitrit için 150 ppm ve uzun olgunlaşma süresi olan ve nitrit içermeyen ürünlerde nitrat için 250 mg/kg'dır (Grasso vd. 2014). Ülkemizde nitrit ve nitratın et ürünleri üretiminde kullanılması mevzuat çerçevesinde ciddi şekilde kısıtlanmıştır (Turkal ve Doğruer 2020). Isıl işlem görmüş et ürünleri için yasal sınırlama Çizelge 2.1, ısıl işlem görmemiş et ürünleri için yasal sınırlama Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre ısıl işlem görmüş et ürünlerinde izin verilen maksimum nitrit miktarları (TGK 2013).

E – kodu	Adı	Maksimum miktar (mg/L veya mg/kg)	Dipnotlar	Sınırlamalar/istisnalar
E 249-250	Nitritler	150	(7)(59)	sterilize et ürünleri hariç (Fo>3,00) kavurma hariç
E 249-250	Nitritler	100	(7)(58)(59)	sadece sterilize et ürünleri (Fo>3,00)

Çizelge 2.2 Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre ısıtıl işlem görmemiş et ürünlerinde izin verilen maksimum nitrit ve nitrat miktarları (TGK 2013).

E – kodu	Adı	Maksimum miktar (mg/L veya mg/kg)	Dipnotlar	Sınırlamalar/istisnalar
E 249-250	Nitritler	150	(7)	
E 251-252	Nitratlar	150	(7)	

(7): Üretim sırasında eklenebilecek maksimum miktar, NaNO₂ veya NaNO₃ cinsinden ifade edilir.

(58): Fo değeri 3; 121°C'de 3 dakika ısıtmaya eşdeğerdir (Her 1000 metal esaslı kutudaki bir milyar bakteri sporu yükünün bir spora azaltılması).

(59): Düşük asitli ortamlarda, nitritin doğal olarak nitrata dönüşmesi nedeniyle bazı ısıtıl işlem uygulanmış et ürünlerinde nitrat bulunabilir (TGK 2013).

Et ürünlerinde nitritlerin geniş aktivitesini sağlayabilecek hiçbir katkı maddesi keşfedilmemiştir. Bu nedenle et ürünlerinde nitritler ikame olabilecek daha doğal katkı maddeleri, mikrobiyal katkılar ve organik asitlerin yanı sıra mevcut teknolojik araştırmalar olası araştırma yöntemleridir (Sucu 2018).

Şimdiye kadar gıda endüstrisinde nitrat ve nitritlerin yerini alabilecek ve tüm özelliklerini yerine getirebilecek bir çözüm bulunamamıştır. Et ve et ürünlerinde bulunan nitrat ve nitritler daha önce de belirtildiği gibi farklı işlevler yerine getirir. Fakat et üretiminde nihai üründe oluşan kalıntı nitrit, amidler ve aminlerle etkileşime girdiğinde kanserojenik maddelerin oluşması riski çok yüksektir (Ruiz-Capillas vd. 2007). Bu sebeple et ürünlerinde oluşan nitritin kalıntı düzeyi çok önemlidir. Nitrat ve nitritlerin sağlık yönünden tehlike oluşturmaması için kullanımlarını azaltacak veya nihai ürünlerdeki kalıntı miktarını azaltacak yöntemler geliştirilmelidir. Bu konuda yapılan araştırmalara bakıldığında, mikroorganizmaların kullanımıyla kalıntı nitrit miktarının azaltılması, nitrat bakımından zengin sebze sularının kullanılmasıyla kalıntı nitritin azaltılması ve alternatif bileşenler, doğal antioksidanlar ya da ışınlama, yüksek basınç teknolojisi vb. teknolojik yöntemlerle nitrit kalıntı miktarının azaltılması konularının incelendiği görülmektedir (Karaca, 2020).

Gıdalarla birlikte alınan nitritler, tükürük veya hafif mide asitliği ile kanserojen nitrozaminlere dönüşmektedir. Beraberinde C vitamini alınması ile bu dönüşüm engellenmektedir (Furst 2002). Bir antioksidan olan askorbik asit, et ürünlerinde kullanılan nitrat ve nitritler ile ette bulunan serbest amin bileşiklerinin etkileşimi sonucu oluşan kanserojen bileşik olan nitrozaminlerin oluşumunu engellemek için

kullanılmaktadır. Nitritlerin aminlerle reaksiyona girmesini C vitamini engellemektedir. Kürleme prosesinde C vitamini ve tuzlarının kullanılması ile nitritin 1/3 oranında azaltılabileceği bildirilmiştir ( zdemir 2018).

2.7 Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrason, katılarda, sıvılarda ve gazlarda 20 kHz'den daha yüksek frekansta yayılan ve insan kulağı tarafından duyulamayan ses dalgaları olup saniyede 20.000 veya daha çok ses dalgası ile enerji üretme işlemidir (şengül vd. 2009). Ses dalgalarının bitişik iki tepe noktası arasındaki mesafe dalga boyu (λ) olarak tanımlanmaktadır. 1 saniyede meydana gelen ses titreşimlerinin sayısı veya bir noktadan geçen salınım Frekans (f) denilmekte olup ölçü birimi Hertz (Hz)'dir. Ses dalgalarının gücünü belirleyen genlik (A), ses dalgalarının yüksekliği olarak ifade edilmekte olup ses dalgasındaki enerji ile genliğin karesi doğru orantılıdır (Dinçer ve Topuz 2018). Tipik olarak, ultrasonik uygulamalarda 20 kHz ile 10 MHz arasındaki frekanslar kullanılır (Sayın ve Tamer 2014). Ultrasonik destekli ekstraksiyonda ise genellikle 20 ile 100 kHz arasındaki frekanslar kullanılır (Dedebaş vd. 2021). Ultrason yüksek enerjili titreşimler üreten manyetik sıkıştırmalı dönüştürücülerle (transducer) ya da basınç elektrilri (piezoelektrik) ile üretilir. Ses gücü (W), ses yoğunluğu (W/m^2) ve ses enerjisi yoğunluğu ise (Ws/m^3) şeklinde tanımlanmaktadır (Yüksel 2013).

Ses enerjisi ortama nüfuz edip sürekli dalga benzeri bir hareket oluşturduğuunda boylamasına dalgalar oluşturur ve bu durum ortamdaki parçacıklarda sıkışma ve gevmeye neden olur. Yayılan ses dalgasının boyutuna ve frekansa bağlı olarak gerçekleşebilen bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal etkiler ultrasonun çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilmesini sağlar (Sayın ve Tamer 2014). Kavitasyon bu etkilerin en  emlisidir. Kavitasyonda, ses dalgasının bir sıvı içerisinden geçmesi sırasında basıncının azaldığı bölgelerde moleküller arası mesafenin normalden fazla artması ile kabarcık oluşur. Ses dalgalarının sürekliliği ortamdaki kabarcıkların kademeli olarak büyümesine ve salınmasına neden olur. Kabarcıklar en sonunda artık daha da fazla enerji absorbe edemeyecek hacme ulaştığında ise içeri doğru sönümlenir (Tüfekçi ve  zkal 2015). Katı maddenin yüzeyindeki kabarcıkların çökmesi sonucu ortamın sıcaklık ve basıncının artması mikrojetlerin oluşmasına neden olur. Mikrojetler,

katı madde yüzeyinde soyulmalara, erozyona, hücre duvarının bozulmasına ve içeriğinin dışına sızmasına sebep olmaktadır (Şengül ve Topdaş 2019).

Ultrasonik etki hücre duvarlarının mekanik olarak parçalanmasını ve maddenin transferini sağlar. Hücre duvarı yıkıldığında hücre içine ait sıvı ekstrakt kolaylıkla hücre dışına çıkabilir. Ultrason ile hücre duvarı zarar gördüğü için bu yöntem kullanılarak yapılan ekstraksiyon çok daha hızlıdır (Alifakı vd. 2018). Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde; geleneksel termal yöntemlere ek olarak ultrasonik işlem tarafından oluşturulan akustik kavitasyon kuvveti etkisiyle kütle aktarımı artırılmaktadır. Patlayıcı kabarcıkların oluşturduğu yüksek kayma derecesi ile hücre duvarları zarar görmekte ve hücre içi bileşenler çözücüye geçmektedir (Dedebaş vd. 2021).

Ultrasonik ekstraksiyon sistemi kullanımı kolay, ucuz ve verimli olduğu için geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre iyi bir alternatiftir. Katı-sıvı ekstraksiyonunda ultrason kullanmanın başlıca faydaları, hızlı kinetik ve artan verimliliklerdir. Ekstrakt kalitesi ultrason kullanımı ile artar. Buna ek olarak ultrason düşük sıcaklıklarda dahi etkin bir şekilde kullanılabildiği için sıcaklığa karşı hassas malzemelerin ekstraksiyonunu sağlar (Tavman vd. 2009). Ekstraksiyon verimliliğinin, ultrason destekli ekstraksiyon ile %50'ye kadar arttığı tespit edilmiştir (Kumcuoğlu vd. 2011). Genel olarak, ultrasonik işlemde en yüksek ekstraksiyon verimliliği, ultrason gücünü artırarak, çözücü-katı temasını artırmak için gıdanın nem içeriğini azaltarak ve ekstraksiyon süresinin kısılmasını sağlayacak şekilde sıcaklığını ayarlayarak elde edilebilir. Sıcaklığın belirli bir seviyeye kadar çıkarılması ekstraksiyon verimliliğini artırır. Bu etki kavitasyon sırasında oluşan kabarcık sayısında artışa, çözücünün katı ile temas yüzeyinin geniş olmasına, çözücünün difüzyonunda artışa ve sonuç olarak istenilen bileşiklerin hücreden dışarı çıkışında ve çözünürlüklerinde artışa neden olmaktadır (Şengül ve Topdaş 2019). Ultrason ekstraksiyon da dahil olmak üzere gıda endüstrisinde çok çeşitli işlemler için kullanılan bir yöntemdir (Açı vd. 2014). Ultrasonik yöntemler nispeten ucuz, kısa ekstraksiyon süresi, organik solvent kullanımının az olması gibi nedenlerle ekonomik yöntemlerdir (Dedebaş vd. 2021).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

Validasyon çalışması için nitrit-nitrat içermeyen sucuk ve ısıtılmış sucuk (I.İ.G.Sucuk) numuneleri sucuk üretimi yapan bir işletmeden temin edilmiştir.

Bu araştırmada, Agilent 1200 Diode Array Detector (DAD) dedektörlü HPLC, Waters HPLC kolonu (IC Pak Anion HC 4,6mm*150mm), Elma E30H ultrasonik su banyosu, Hach Lange Sension 3 pH metre, HPLC Saflıkta Ultra saf su, Supelco Asetonitril, Sigma Aldrich Gliserol (87'lik), Sigma Aldrich Lityum Hidroksit Monohidrat, Merck Borik Asit, Aldrich Glukonik Asit Çözeltisi (kütlece %50'lik), Merck HCl (36%'lık) analitik saflıkta ürünler, 0,20 µm'lik Millipore hidrofilik nylon membran filtre, ve 0,45 µm'lik Millipore PVDF membran filtre kullanılmıştır.

3.2 Metot

Nitrit-nitrat tayini için kullanılan NMKL No:165, 2000 metodu, ultrason destekli ekstraksiyon ile optimize edilmiş ve DAD dedektörlü HPLC'de okutma yapılarak modifiye edilmiştir. Kullanılan yöntem, ultrason destekli sıcak su ekstraksiyonundan elde edilen sulu çözeltinin diğer yabancı maddelerden arındırılmak için asetonitril ile muamele edildikten sonra nitrit ve nitrat içeriğinin HPLC cihazı ile 205 nm dalga boyunda DAD dedektörü ile belirlenmesi prensibine dayanmaktadır.

3.2.1 Mobil Faz Çözeltisinin Hazırlanması

HCl 1,8mol/l: 15 mL HCl (37%'lik), 100 mL balon jodede hacme su ile tamamlanmıştır. HCl 0,1mol/l: 1,8mol/l HCl'den 5 mL alınıp 100 mL balon jodede hacme su ile tamamlanmıştır. Lityum Borat Glukonat Buffer Çözeltisi hazırlamak için 1000 mL'lik balon joje içerisine; 500 mL Ultra saf su (HPLC Saflıkta), 34 g Borik Asit (kütlece %99'luk), 19,6 mL Glukonik Asit Çözeltisi (Kütlece 50 g/100 mL), 19,26 g Lityum Hidroksit Monohidrat ve 125 mL Gliserol konulup iyice karıştırılmıştır. Tamamen homojen bir ortam oluştuktan sonra su ile çizgisine tamamlanmıştır. Hazırlama

sırasında çeker ocak altında çalışıldı ve gözlük, maske, eldiven kullanılmıştır (Anonim 2000).

Mobil Faz: 2000 mL'lik balon joje içerisine; 1000 mL su, 34 mL Lityum Borat Glukonat Buffer Çözeltisi ve 250 mL Asetonitril (HPLC Saflıkta) konularak kuvvetlice karıştırılmıştır. Su ile çizgisine tamamlandıktan sonra 1,8mol/l ve 0,1mol/l HCl çözeltileri kullanılarak pH $6,5 \pm 0,1$ 'e ayarlanmıştır (pH ayarlama işlemi sırasında pH 8 civarlarından sonra düşüş işlemi çok hızlı gerçekleştiğinden, yaklaşık 9,5 pH ile başlanan işlemde pH 8 civarına kadar ayarlama ilk olarak 1,8mol/l HCl ile yapılmıştır sonra 0,1mol/l HCl ile 6,5 e ayarlanmıştır). pH ayarlandıktan sonra mobil faz süzme düzeneği ile 0,20 µm membran filtresinden süzölmüştür (Anonim 2000).

3.2.2 Standartların Hazırlanması

Standartlar hazır sıvı çözeltilerden 1000 ppm'lik nitrit ve nitrat ana stok çözeltilerinden 1'er ml alınarak 10 ml'lik balon joje içerisine konuldu ve su ile çizgisine tamamlanarak 100 ppm'lik ara stok çözeltisi mix olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 100 ppm'lik ara stok çözeltisinden 1 ml alınıp 10 ml'lik balon joje içerisine konulmuş ve su ile çizgisine tamamlanarak 10 ppm'lik ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra ara stok çözeltileri kullanılarak 1,3,5,10 ve 20 ppm'lik standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standartların ışıktan korunması için amber renkli viallerde saklanmıştır (Anonim 2000).

3.2.3 Kromatografik Şartlar ve Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kolon: IC Pak Anion HC 4,6mm*150mm

Dedektör: DAD dedektörü (UV tarayıcı açık olarak ayarlandı) (205 nm dalga boyu)

Akış hızı: 1 ml/dakika

Kolon sıcaklığı: 25°C

Enjeksiyon hacmi: 100µL

Alıkoyma süresi: Yaklaşık olarak Nitrit: 13 dakika, Nitrat:21 dakika

5 Noktalı bir kalibrasyon hazırlamak için ara stoklardan bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan her bir standart konsantrasyonu için HPLC cihazında DAD dedektörü ile 3 okuma yapılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Anonim 2000).

3.2.4 Sucukta Nitrit-Nitrat Analizi

Numuneleri homojen hale getirmek için iki kez kıyma makinesinden geçirilmiştir. 10 mg hassasiyetle yaklaşık 10 g numune tartılmıştır. Tartılan numuneler geniş ağızlı bir erlene alınarak üzerine 50-60°C’de 50 ml saf su ilave edilmiştir. 5 dakika ultrasonik su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra erlen içeriği 200 ml’lik balon joje içerisine huni yardımıyla alınmıştır. Erlen ve huni yıkatarak balon joje içerisine alınmıştır. Sonra üzerine 50 ml Asetonitril eklenerek kuvvetle karıştırılmıştır. Daha sonra balon joje su ile çizgisine tamamlanmıştır. Ardından ekstrakt kaba filtre kâğıdı ile süzülerek süzüntü hafifçe karıştırılıp 0,45 µm’lik membran filtreden geçirilmiş ve 1,5 ml’lik vialle alındıktan sonra HPLC’de okutulmuştur. Başlangıçta 10 g numune tartıp 200 ml balon jodede hazırladığımız için HPLC cihazına seyreltme faktörü olarak 20 girilmiş ve sonuçlar iyon cinsinden ppm olarak okunmuştur (Anonim 2000).

Gerek ekstraksiyon gerekse mobil fazda bulunan sudan kaynaklanan nitrit-nitrat miktarlarının belirlenmesi için tüm şartlar aynı olmak üzere numune yerine ultra saf su kullanılarak analiz yapılmış ve hazırlanan kör numunede nitrit ve nitrat kontaminasyonu olup olmadığından emin olmak için kontrol edilmiştir. Kör numunede nitrit ve nitrat tespit edilirse analiz sonucundan çıkarılarak numunedeki gerçek değer bulunmuş olur.

3.2.5 Validasyon

Bu metodun validasyon (geçerli kılma) çalışması, aşağıdaki parametreler gözönüne alınarak yapılmıştır;

- Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)
- Tespit Limiti (LOD- Limit of Detection) ve Ölçüm Limiti (LOQ- Limit of Quantification)
- Ölçüm Aralığı/Doğrusallık (Range/Linearity)
- Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
- Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik (Reproducibility)
- Geri kazanım (Recovery)
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)

3.2.6 Ölçüm Belirsizliği

Uygulanan analiz metodunun belirsizlik bileşenleri aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır;

- Tekrarlanabilirlikten gelen belirsizlik
- Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlikten gelen belirsizlik
- Geri Kazanımdan gelen belirsizlik
- Kalibrasyondan gelen belirsizlik

3.2.7 İstatistiksel Analizler ve Değerlendirmeler

Tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik parametrelerinde elde edilen her bir çalışma seti içinde sapan değerlerin bulunup bulunmadığının istatistiksel kontrolü için Grubb's testi kullanılmıştır. Grubb's testi hesaplamaları (Anonim 2018a; EURACHEM Guide 2014) kaynaklarında anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Bu çalışmadaki analiz sonuçlarını karşılaştırmak için F ve t istatistiksel testleri kullanılmıştır. İki standart sapma arasındaki farkın önemli olup olmadığı F-Testi, elde edilen sonuçlar arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-Testi ile kontrol edilmiştir. İlgili hesaplamalar (Anonim 2018a; EURACHEM Guide 2014) kaynaklarında belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Sağlamlık çalışması için belirlenen metot parametrelerinden sapmaların analiz sonuçlarını nasıl etkilediğini incelemek için Youden İstatistiği kullanılmıştır. Sağlamlık çalışmasında, 7 faktörlü Youden deseni oluşturularak elde edilen veriler tekrarüretilebilirlik standart sapmasına göre değerlendirilmiştir. İlgili hesaplama ve değerlendirmeler (Anonim 2018a; EURACHEM Guide 2014) kaynaklarına göre yapılmıştır.

Tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için Tekrarlanabilirlik relatif standart sapma ve Horwitz eşitliğinden hesaplanan relatif standart sapma (PRSD) değerleri, Laboratuvar içi tekrarüretilebilirliğin değerlendirilmesi için Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik relatif standart sapma ve Horwitz eşitliğinden hesaplanan relatif standart sapma (PRSD)

değerleri ile tespit ve ölçüm limiti hesaplamaları (Anonim 2018a; EURACHEM Guide 2014) kaynaklarındaki formüllere göre hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır.

Geri kazanım çalışmasındaki geri kazanım oranlarının hesaplanması (Anonim 2018a)'e göre yapılmış ve (AOAC 2016)'da belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir. Buna göre kontrolde; geri kazanım kabul aralığı düşük konsantrasyon 7 ve 12 ppm için %80-%110; orta konsantrasyon 20 ppm için %80-%110 aralığı; 200 ppm yüksek konsantrasyon için %90-%107 aralığı kabul edilmiştir.

Lineerlik (Doğrusallık) çalışmasında elde edilen test sonuçları regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bunun için korelasyon katsayıları (r) (Anonim 2018a)'ya göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

Ölçüm belirsizliği bileşenleri ve birleştirilmiş standart belirsizlik ile genişletilmiş belirsizlik hesaplamaları (Anonim 2018b; EURACHEM/CITAC Guide 2012) kaynaklarında belirtilen formüllere göre yapılmıştır.

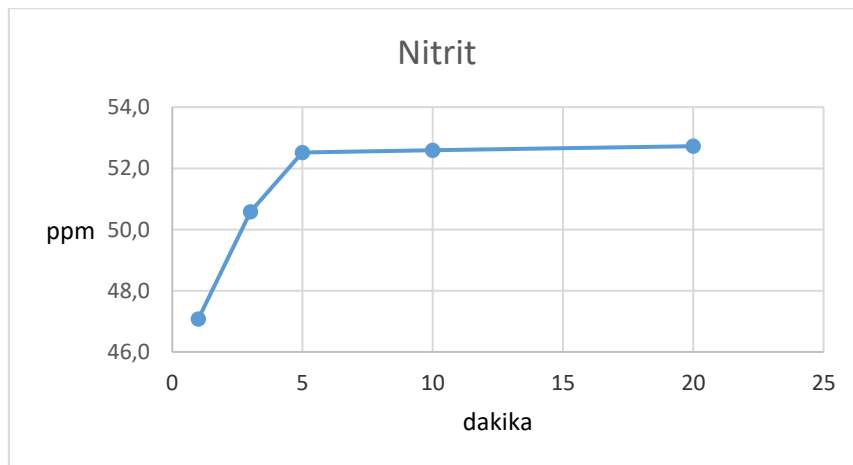
4. BULGULAR

4.1 Ultrason Destekli Ekstraksiyon Optimizasyonu

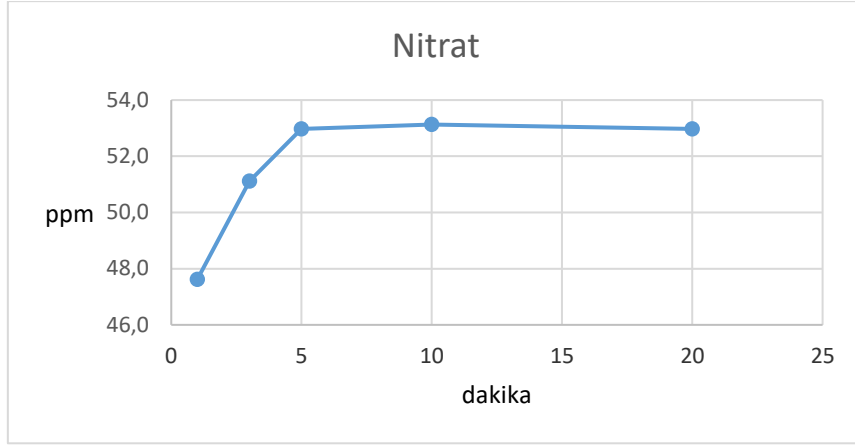
Validasyon çalışması için kullanılan nitrit-nitrat içermeyen sucuk numunesine 60 ppm spike yapılarak zenginleştirilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon aşamasında homojenizatör yerine ultrasonik su banyosu kullanılmıştır. Optimizasyon için metodun ultrasonik su banyosunda bekletme süreleri 1, 3, 5, 10 ve 20 dk olacak şekilde analiz tamamlanmış ve ekstraktlar HPLC cihazında okutularak en uygun ultrasonik su banyosunda bekletme süresi tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ultrasonik su banyosunda 5 dk bekletilerek bulunan sonuçların yapılan çalışmada plato noktası olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1’de, ultrason bekleme süresine göre değişen nitrit ve nitrat miktarı grafikleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Ultrasonik su banyosunda bekletme süreleri ve sonuçları.

Ultrasonik Su Banyosunda		Nitrit (ppm)			Nitrat (ppm)		
Bekletme Süresi (dakika)							
(dakika)		1.ölçüm	2.ölçüm	ortalama	1.ölçüm	2.ölçüm	ortalama
1		47,12	47,04	47,08	47,75	47,50	47,62
3		50,23	50,93	50,58	50,72	51,52	51,12
5		52,63	52,42	52,52	53,20	52,76	52,98
10		52,68	52,50	52,59	53,25	53,01	53,13
20		52,69	52,76	52,72	53,06	52,88	52,97



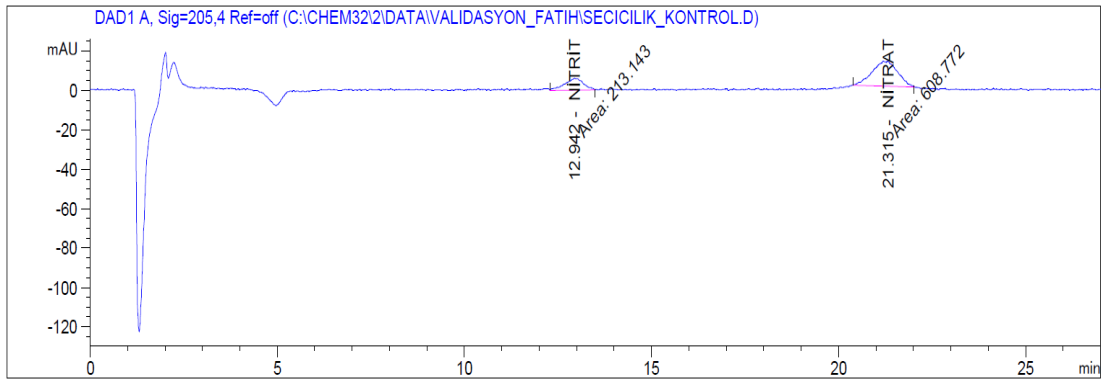
Şekil 4.1 Ultrason bekleme süresine göre değişen nitrit miktarı grafiği.



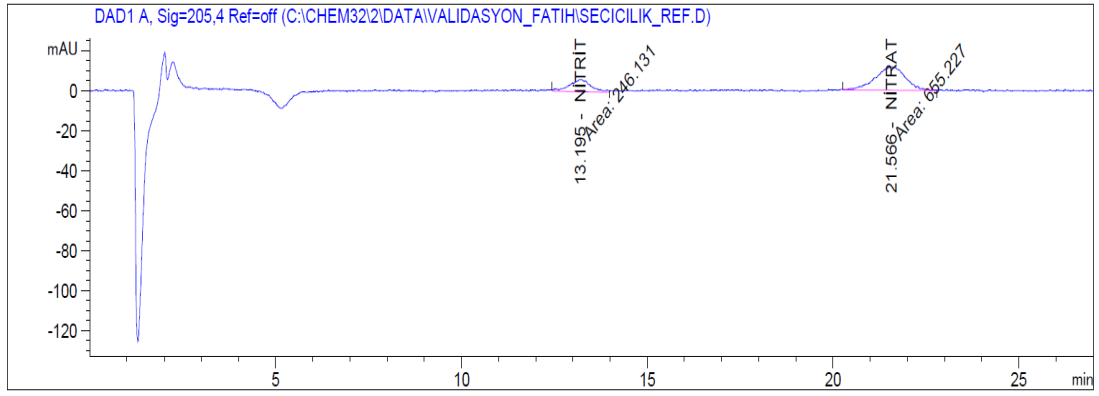
Şekil 4.2 Ultrason bekleme süresine göre değişen nitrat miktarı grafiği.

4.2 Seçicilik (Selectivity)/Spesifiklik (Specificity)

Seçicilik ve Spesifiklik için 2 ayrı çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada kontrol numunesi olarak nitrit ve nitrat standartları mix yapılarak cihaza verilmiştir. Nitrit (NO_2^-) iyon pikinin alıkonma zamanı 12,942 dakika, nitrat (NO_3^-) iyon pikinin alıkonma zamanı 21,315 dakika olarak tespit edilmiştir. İkinci çalışma ise kör numune nitrit ve nitrat ile zenginleştirilerek yapılmış olup nitrit (NO_2^-) iyon pikinin alıkonma zamanı 13,195 dakika, nitrat (NO_3^-) iyon pikinin alıkonma zamanı 21,566 dakika olarak tespit edilmiştir. İlk çalışmaya ait HPLC kromatogramı Şekil 4.3'te, ikinci çalışmaya ait HPLC kromatogramı Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



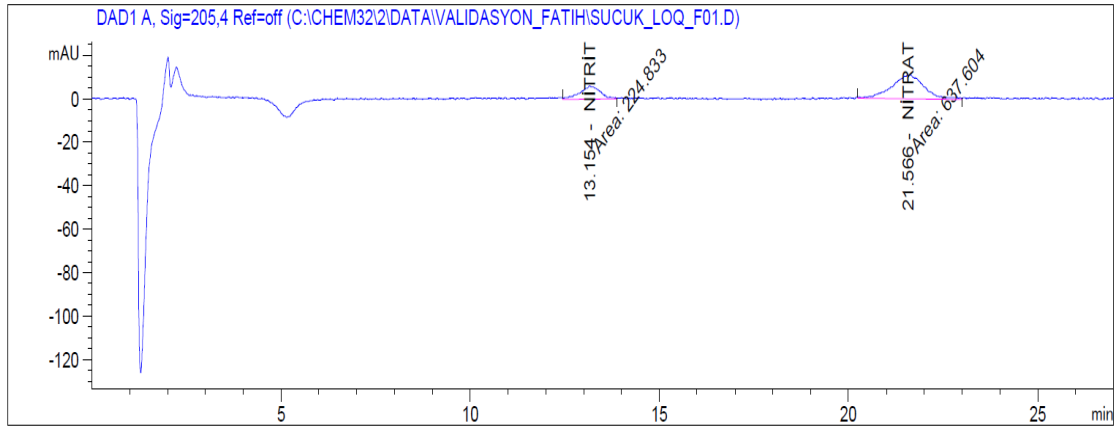
Şekil 4.3 Nitrit ve nitrat standartlarının HPLC kromatogramı.



Şekil 4.4 Nitrit ve nitrat ile zenginleştirilmiş kör numune HPLC kromatogramı.

4.3 Tespit Limiti ve Ölçüm Limiti (LOD ve LOQ)

Tespit ve ölçüm limiti için görülebilen en düşük düzeyde (Nitrit:7 ppm, Nitrat:12 ppm) zenginleştirilmiş sucuk ve ısıl işlem görmüş sucuk numunelerinde her bir matriks ve her analist için 10 tekrarlı bağımsız çalışma olmak üzere toplam 40 çalışma yapılmıştır. Tespit ve ölçüm limiti çalışmasına ait örnek HPLC kromatogramı Şekil 4.5'te gösterilmiş, nitrit ve nitrat tespit ve ölçüm limiti sonuçları Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Tespit ve ölçüm limiti çalışması örnek HPLC kromatogramı.

Çizelge 4.2 Nitrit tespit ve ölçüm limiti (7 ppm) sonuçları.

Numune	Nitrit			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	5,79	5,62	6,15	5,71
2	6,08	6,15	6,88	5,68
3	5,74	5,64	5,89	6,12
4	6,81	6,33	6,23	6,57
5	5,85	5,80	5,79	6,22
6	6,21	5,90	5,67	6,94
7	5,61	6,33	6,09	5,83
8	5,82	5,68	6,71	5,87
9	5,75	6,67	6,11	6,18
10	6,96	6,10	5,81	5,67
ORT	6,06	6,02	6,13	6,08
SD	0,47	0,35	0,39	0,42
En Kötü Durum (RSD)	0,47			
LOD (SD*3)	1,40			
LOQ (SD*10)	4,68			

Çizelge 4.3 Nitrat tespit ve ölçüm limiti (12 ppm) sonuçları.

Numune	Nitrat			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	9,65	10,29	10,54	9,81
2	10,08	10,46	10,07	9,93
3	9,72	10,55	10,40	10,91
4	10,27	11,15	9,88	10,60
5	9,66	9,61	9,88	11,43
6	11,73	10,04	9,67	10,18
7	10,48	10,43	11,13	9,99
8	10,47	10,02	11,06	11,26
9	9,78	10,18	9,92	9,80
10	10,99	9,74	10,06	10,77
ORT	10,28	10,25	10,26	10,47
SD	0,67	0,44	0,51	0,61
En Kötü Durum (RSD)	0,67			
LOD (SD*3)	2,01			
LOQ (SD*10)	6,72			

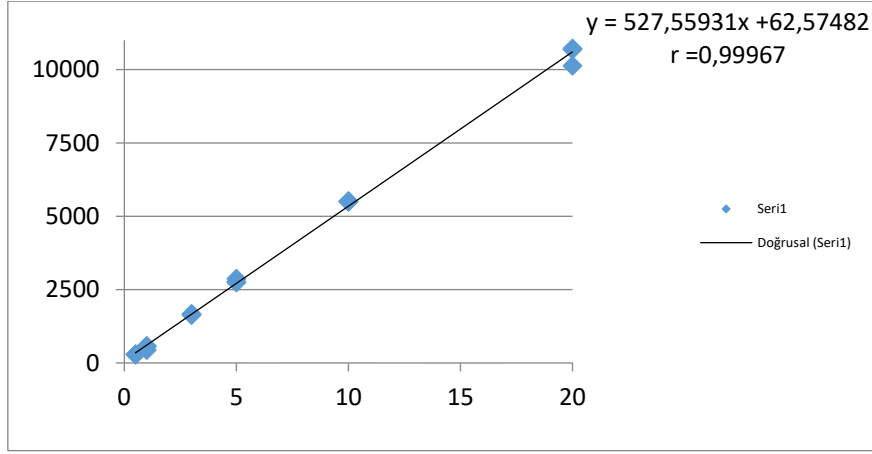
4.4 Ölçüm Aralığı/Doğrusallık (Range/Linearity)

Lineer ölçüm aralığını belirlemek için 6 farklı konsantrasyonda nitrit ve nitrat standardı hazırlanmış ve her bir konsantrasyon 3'er defa cihaza enjekte edilerek cihaz kalibrasyonu yapılmıştır. Daha sonra nitrit ve nitrat için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

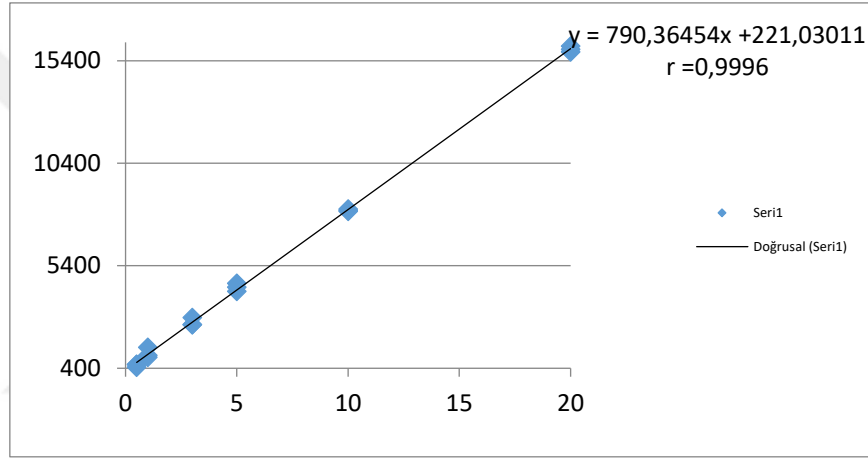
Elde edilen lineer ölçüm sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Nitrit kalibrasyon grafiği Şekil 4.6'da, nitrat kalibrasyon grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Nitrit ve nitrat lineer ölçüm sonuçları.

Nitrit		Nitrat	
Konsantrasyon ppm	Alan	Konsantrasyon ppm	Alan
0,5	281,73	0,5	450,33
0,5	285,42	0,5	602,62
0,5	299,48	0,5	573,11
1,0	560,29	1,0	1034,16
1,0	437,91	1,0	1422,35
1,0	581,77	1,0	943,06
3,0	1638,95	3,0	2875,69
3,0	1641,42	3,0	2528,23
3,0	1672,49	3,0	2534,82
5,0	2734,76	5,0	4365,12
5,0	2876,00	5,0	4546,37
5,0	2775,23	5,0	4158,14
10,0	5489,10	10,0	8165,32
10,0	5514,98	10,0	8107,06
10,0	5510,21	10,0	8064,99
20,0	10127,50	20,0	15841,40
20,0	10685,80	20,0	15969,30
20,0	10716,60	20,0	16117,80



Şekil 4.6 Nitrit kalibrasyon grafiği.



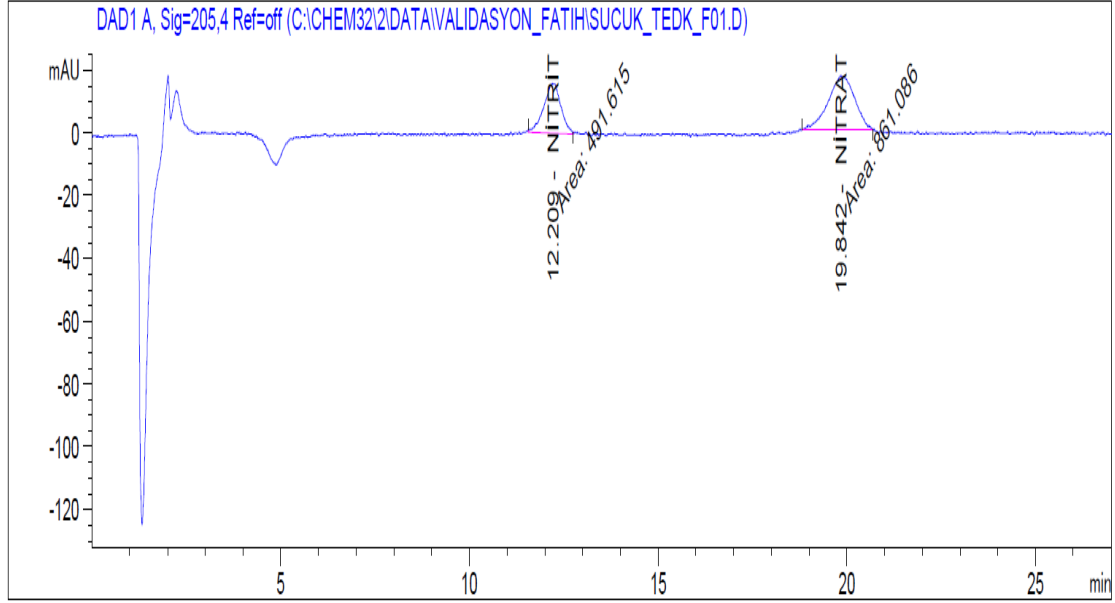
Şekil 4.7 Nitrat kalibrasyon grafiği.

4.5 Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

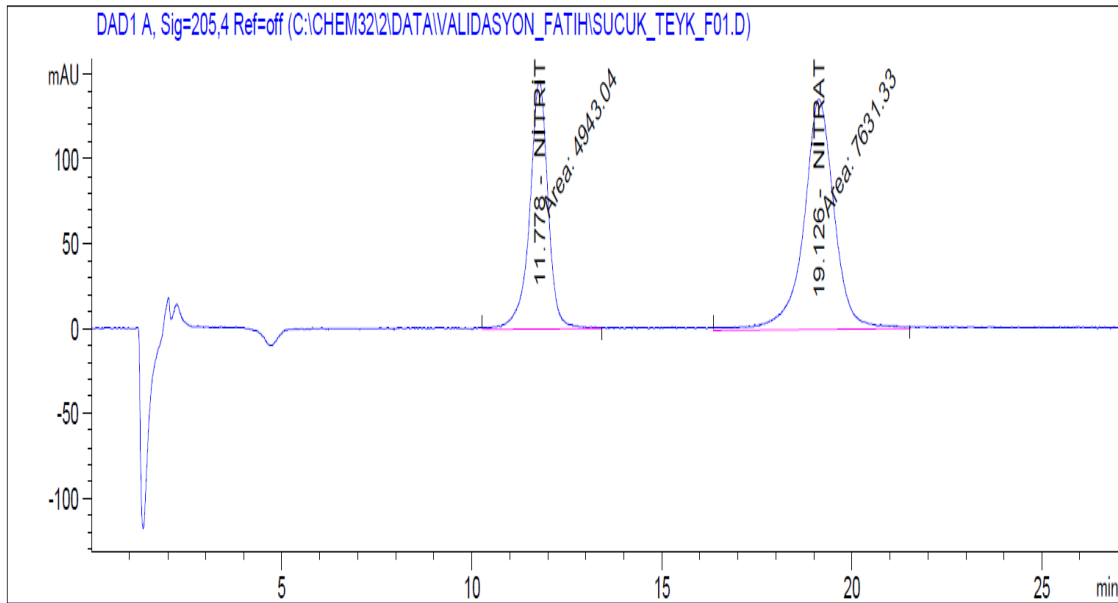
Tekrarlanabilirlik çalışması için içerisinde nitrit ve nitrat tespit edilmemiş sucuk ve ısıtılmış işlem görmüş sucuk numunelerinde düşük konsantrasyonda 7 ppm nitrit ve 12 ppm nitrat; orta ve yüksek konsantrasyonlarda 20 ppm ve 200 ppm nitrit ve nitrat içerecek şekilde zenginleştirilme yapılmıştır. Metoda uygun şekilde analiz edilen numunelere ait sonuçlar aşağıdadır. Tekraredilebilirlik çalışması üç farklı konsantrasyonda (düşük konsantrasyon LOD-LOQ çalışmasından elde edilmiştir) iki analist tarafından 6 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Tekrarlanabilirlik orta ve yüksek konsantrasyon nitrit-nitrat HPLC kromatogram örnekleri sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Tekrarlanabilirlik düşük

konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.5'te, orta konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.6'da, yüksek konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.7'de, nitrit tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri Çizelge 4.8'de, düşük konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.9'da, orta konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.10'da, yüksek konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.11'de, nitrat tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.8 Tekrarlanabilirlik 20 ppm (orta konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.



Şekil 4.9 Tekrarlanabilirlik 200 ppm (yüksek konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.

Çizelge 4.5 Tekrarlanabilirlik nitrit sonuçları 7 ppm (düşük konsantrasyon).

Numune	Nitrit			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	5,79	5,62	6,15	5,71
2	6,08	6,15	6,88	5,68
3	5,74	5,64	5,89	6,12
4	6,81	6,33	6,23	6,57
5	5,85	5,80	5,79	6,22
6	6,21	5,90	5,67	6,94
7	5,61	6,33	6,09	5,83
8	5,82	5,68	6,71	5,87
9	5,75	6,67	6,11	6,18
10	6,96	6,10	5,81	5,67
ORT	6,06	6,02	6,13	6,08
SD	0,47	0,35	0,39	0,42
Min	5,61	5,62	5,67	5,67
Max	6,96	6,67	6,88	6,94
GL	0,97	1,14	1,19	0,96
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,91	1,84	1,90	2,06
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	2,18	2,18	2,18	2,18
n	10	10	10	10
Decimal C	7,00E-06	7,00E-06	7,00E-06	7,00E-06
PRSD	11,94	11,94	11,94	11,94
0,67* PRSD	8,00	8,00	8,00	8,00
%RSD	7,71	5,87	6,40	6,91
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,077	0,059	0,064	0,069

Çizelge 4.6 Tekrarlanabilirlik nitrit sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).

Numune	Nitrit			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	16,31	17,69	16,95	16,19
2	17,09	16,95	16,27	17,46
3	16,64	18,08	16,75	18,15
4	16,43	16,04	18,88	17,06
5	16,02	17,44	16,51	18,65
6	16,61	18,36	17,63	16,36
ORT	16,52	17,43	17,16	17,31
SD	0,36	0,84	0,96	0,98
Min	16,02	16,04	16,27	16,19
Max	17,09	18,36	18,88	18,65
GL	1,38	1,65	0,94	1,15
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,59	1,11	1,79	1,37
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,82	1,82	1,82	1,82
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05
PRSD	10,19	10,19	10,19	10,19
0,67* PRSD	6,83	6,83	6,83	6,83
%RSD	2,20	4,82	5,60	5,63
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,022	0,048	0,056	0,056

Çizelge 4.7 Tekrarlanabilirlik nitrit sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).

Numune	Nitrit			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	182,78	183,81	184,56	180,50
2	185,79	191,46	185,02	187,29
3	187,05	182,38	181,15	182,98
4	191,45	188,53	191,23	184,11
5	194,16	180,64	182,55	183,70
6	182,70	181,44	189,77	181,19
ORT	187,32	184,71	185,71	183,30
SD	4,65	4,33	3,99	2,41
Min	182,70	180,64	181,15	180,50
Max	194,16	191,46	191,23	187,29
GL	0,99	0,94	1,14	1,16
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,47	1,56	1,38	1,66
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,82	1,82	1,82	1,82
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04
PRSD	7,21	7,21	7,21	7,21
0,67* PRSD	4,83	4,83	4,83	4,83
%RSD	2,48	2,34	2,15	1,32
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,025	0,023	0,021	0,013

Çizelge 4.8 Tekrarlanabilirlik nitrit tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.

RSD Birleşik	0,054
En Kötü Durum (RSD)	0,077

Çizelge 4.9 Tekrarlanabilirlik nitrat sonuçları 12 ppm (düşük konsantrasyon).

Numune	Nitrat			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	9,65	10,29	10,54	9,81
2	10,08	10,46	10,07	9,93
3	9,72	10,55	10,40	10,91
4	10,27	11,15	9,88	10,60
5	9,66	9,61	9,88	11,43
6	11,73	10,04	9,67	10,18
7	10,48	10,43	11,13	9,99
8	10,47	10,02	11,06	11,26
9	9,78	10,18	9,92	9,80
10	10,99	9,74	10,06	10,77
ORT	10,28	10,25	10,26	10,47
SD	0,67	0,44	0,51	0,61
Min	9,65	9,61	9,67	9,80
Max	11,73	11,15	11,13	11,43
GL	0,95	1,45	1,16	1,10
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	2,15	2,05	1,72	1,58
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	2,18	2,18	2,18	2,18
n	10	10	10	10
Decimal C	1,20E-05	1,20E-05	1,20E-05	1,20E-05
PRSD	11,01	11,01	11,01	11,01
0,67* PRSD	7,37	7,37	7,37	7,37
%RSD	6,53	4,31	4,94	5,81
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,065	0,043	0,049	0,058

Çizelge 4.10 Tekrarlanabilirlik nitrat sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).

Numune	Nitrat			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	16,76	18,80	18,03	19,30
2	17,78	18,36	16,20	16,79
3	16,91	19,44	18,29	17,28
4	18,28	16,90	18,35	17,19
5	17,48	17,63	18,52	17,95
6	19,36	20,14	17,03	19,46
ORT	17,76	18,55	17,73	18,00
SD	0,96	1,18	0,92	1,14
Min	16,76	16,90	16,20	16,79
Max	19,36	20,14	18,52	19,46
GL	1,04	1,39	1,67	1,06
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,66	1,35	0,85	1,29
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,82	1,82	1,82	1,82
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05
PRSD	10,19	10,19	10,19	10,19
0,67* PRSD	6,83	6,83	6,83	6,83
%RSD	5,42	6,38	5,20	6,33
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,054	0,064	0,052	0,063

Çizelge 4.11 Tekrarlanabilirlik nitrat sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).

Numune	Nitrat			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	180,99	188,69	189,48	181,82
2	186,60	196,89	187,52	185,19
3	191,02	182,91	189,02	199,05
4	188,53	193,82	195,37	184,26
5	192,26	199,81	188,92	196,35
6	180,23	185,22	192,42	187,22
ORT	186,60	191,23	190,45	188,98
SD	5,05	6,70	2,90	7,03
Min	180,23	182,91	187,52	181,82
Max	192,26	199,81	195,37	199,05
GL	1,26	1,24	1,01	1,02
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,12	1,28	1,70	1,43
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,82	1,82	1,82	1,82
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04
PRSD	7,21	7,21	7,21	7,21
0,67* PRSD	4,83	4,83	4,83	4,83
%RSD	2,70	3,50	1,52	3,72
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,027	0,035	0,015	0,037

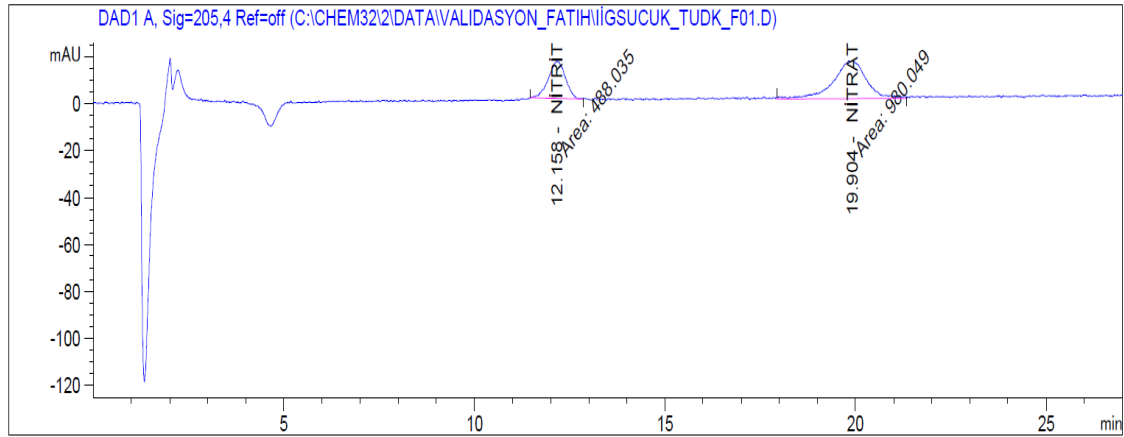
Çizelge 4.12 Tekrarlanabilirlik nitrat tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.

RSD Birleşik	0,051
En Kötü Durum (RSD)	0,065

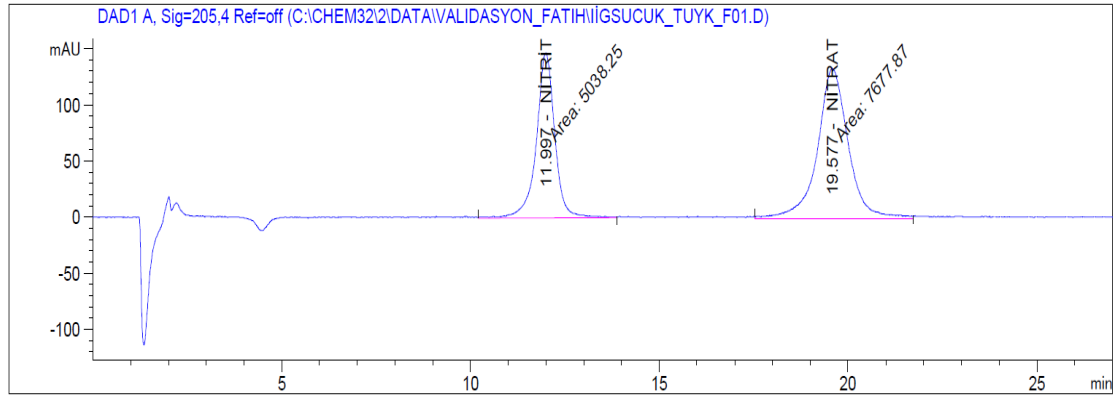
4.6 Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik (Reproducibility)

Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışması için içerisinde nitrit ve nitrat tespit edilmemiş sucuk ve ısıt işlem görmüş sucuk numunelerinde 20 ppm ve 200 ppm nitrit ve nitrat içerecek şekilde zenginleştirilme yapılmıştır. Metoda uygun şekilde analiz edilen numunelere ait sonuçlar aşağıdadır. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışması iki farklı konsantrasyonda iki analist tarafından farklı günlerde 6 tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait 6 nolu enjeksiyonlar tekrarüretilebilirlik çalışmasının ilk çalışmasını oluşturmaktadır.

Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik orta ve yüksek konsantrasyon nitrit-nitrat HPLC kromatogram örnekleri sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik orta konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.13’te, yüksek konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.14’te, nitrit tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri Çizelge 4.15’te, orta konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.16’da, yüksek konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.17’de, nitrat tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri Çizelge 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.10 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik 20 ppm (orta konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.



Şekil 4.11 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik 200 ppm (yüksek konsantrasyon) nitrit-nitrat örnek HPLC kromatogramı.

Çizelge 4.13 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrit sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).

Numune	Nitrit			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	16,61	18,36	17,63	16,36
2	18,08	18,20	16,13	17,34
3	16,05	16,90	17,98	16,25
4	18,77	18,42	19,24	16,64
5	16,43	16,50	17,46	18,32
6	17,28	17,21	16,87	18,15
ORT	17,20	17,60	17,55	17,18
SD	1,05	0,83	1,05	0,90
Min	16,05	16,50	16,13	16,25
Max	18,77	18,42	19,24	18,32
GL	1,10	1,32	1,35	1,02
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,49	0,99	1,60	1,26
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,82	1,82	1,82	1,82
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05
PRSD	10,19	10,19	10,19	10,19
0,67* PRSD	6,83	6,83	6,83	6,83
%RSD	6,10	4,73	6,00	5,25
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,061	0,047	0,060	0,053

Çizelge 4.14 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrit sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).

Numune	Nitrit			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	182,70	181,44	189,77	181,19
2	190,09	184,48	184,57	185,75
3	183,88	187,37	184,78	189,83
4	183,74	183,44	188,63	183,90
5	186,86	182,66	180,70	180,70
6	181,47	192,63	182,77	182,15
ORT	184,79	185,34	185,20	183,92
SD	3,15	4,10	3,45	3,44
Min	181,47	181,44	180,70	180,70
Max	190,09	192,63	189,77	189,83
GL	1,05	0,95	1,31	0,94
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,68	1,78	1,33	1,72
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,82	1,82	1,82	1,82
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04
PRSD	7,21	7,21	7,21	7,21
0,67* PRSD	4,83	4,83	4,83	4,83
%RSD	1,70	2,21	1,86	1,87
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,017	0,022	0,019	0,019

Çizelge 4.15 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrit tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.

RSD Birleşik	0,042
En Kötü Durum (RSD)	0,061

Çizelge 4.16 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrat sonuçları 20 ppm (orta konsantrasyon).

Numune	Nitrat			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	19,36	20,14	17,03	19,46
2	16,69	18,65	19,21	19,93
3	18,17	17,68	16,29	17,38
4	17,47	19,45	18,71	18,86
5	17,55	17,19	17,99	17,01
6	18,22	17,24	16,99	19,73
ORT	17,91	18,39	17,70	18,73
SD	0,90	1,23	1,12	1,25
Min	16,69	17,19	16,29	17,01
Max	19,36	20,14	19,21	19,93
GL	1,352	0,981	1,254	1,376
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,607	1,426	1,340	0,965
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,822	1,822	1,822	1,822
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05	2,00E-05
PRSD	10,19	10,19	10,19	10,19
0,67* PRSD	6,83	6,83	6,83	6,83
%RSD	5,05	6,68	6,35	6,66
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,051	0,067	0,063	0,067

Çizelge 4.17 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrat sonuçları 200 ppm (yüksek konsantrasyon).

Numune	Nitrat			
	I. Analist		II. Analist	
	Sucuk	I.İ.G.Sucuk	Sucuk	I.İ.G.Sucuk
1	180,23	185,22	192,42	187,22
2	182,73	195,23	182,13	198,32
3	182,09	200,25	193,89	185,77
4	187,91	190,53	188,69	192,01
5	194,01	194,85	189,35	187,68
6	198,74	196,22	185,38	186,58
ORT	187,62	193,72	188,64	189,60
SD	7,40	5,19	4,37	4,80
Min	180,23	185,22	182,13	185,77
Max	198,74	200,25	193,89	198,32
GL	0,999	1,636	1,491	0,798
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
GH	1,503	1,258	1,202	1,819
Grubb's Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
Grubb's Ölçütü	1,822	1,822	1,822	1,822
n	6	6	6	6
Decimal C	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04	2,00E-04
PRSD	7,21	7,21	7,21	7,21
0,67* PRSD	4,83	4,83	4,83	4,83
%RSD	3,94	2,68	2,32	2,53
Değerlendirme	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun
RSD	0,039	0,027	0,023	0,025

Çizelge 4.18 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik nitrat tüm konsantrasyon sonuçları için RSD değerleri.

RSD Birleşik	0,049
En Kötü Durum (RSD)	0,067

4.7 Geri kazanım (Recovery)

Geri kazanım hesaplamaları için LOD-LOQ ve Tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen nitrit-nitrat sonuçları kullanılmıştır.

Geri Kazanım düşük konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.19’da, orta konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.20’de, yüksek konsantrasyon nitrit sonuçları Çizelge 4.21’de, nitrit tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi Çizelge 4.22’de, düşük konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.23’de, orta konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.24’te, yüksek konsantrasyon nitrat sonuçları Çizelge 4.25’te, nitrat tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi Çizelge 4.26’da verilmiştir.

Çizelge 4.19 Nitrit 7 ppm (düşük konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.

Nitrit								
Kabul Kriteri (%GK)	I. Analist				II. Analist			
	Sucuk		I.İ.G.Sucuk		Sucuk		I.İ.G.Sucuk	
	Min	80	Max	110	Min	80	Max	110
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	82,70	Uygun	80,30	Uygun	87,88	Uygun	81,54	Uygun
2	86,90	Uygun	87,83	Uygun	98,25	Uygun	81,11	Uygun
3	82,06	Uygun	80,61	Uygun	84,19	Uygun	87,42	Uygun
4	97,35	Uygun	90,43	Uygun	88,97	Uygun	93,84	Uygun
5	83,64	Uygun	82,85	Uygun	82,77	Uygun	88,92	Uygun
6	88,68	Uygun	84,33	Uygun	80,95	Uygun	99,19	Uygun
7	80,14	Uygun	90,44	Uygun	87,03	Uygun	83,27	Uygun
8	83,16	Uygun	81,08	Uygun	95,80	Uygun	83,84	Uygun
9	82,19	Uygun	95,35	Uygun	87,33	Uygun	88,34	Uygun
10	99,41	Uygun	87,18	Uygun	83,02	Uygun	81,06	Uygun

Çizelge 4.20 Nitrit 20 ppm (orta konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.

Nitrit								
Kabul Kriteri (%GK)	I. Analist				II. Analist			
	Sucuk		I.İ.G.Sucuk		Sucuk		I.İ.G.Sucuk	
	Min	80	Max	110	Min	80	Max	110
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	81,53	Uygun	88,44	Uygun	84,73	Uygun	80,93	Uygun
2	85,47	Uygun	84,77	Uygun	81,33	Uygun	87,28	Uygun
3	83,19	Uygun	90,42	Uygun	83,74	Uygun	90,76	Uygun
4	82,14	Uygun	80,18	Uygun	94,41	Uygun	85,29	Uygun
5	80,08	Uygun	87,21	Uygun	82,56	Uygun	93,24	Uygun
6	83,05	Uygun	91,81	Uygun	88,16	Uygun	81,79	Uygun

Çizelge 4.21 Nitrit 200 ppm (yüksek konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.

Nitrit								
Kabul Kriteri (%GK)	I. Analist				II. Analist			
	Sucuk		I.İ.G.Sucuk		Sucuk		I.İ.G.Sucuk	
	Min	90	Max	107	Min	90	Max	107
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	91,39	Uygun	91,91	Uygun	92,28	Uygun	90,25	Uygun
2	92,90	Uygun	95,73	Uygun	92,51	Uygun	93,65	Uygun
3	93,52	Uygun	91,19	Uygun	90,57	Uygun	91,49	Uygun
4	95,72	Uygun	94,26	Uygun	95,61	Uygun	92,05	Uygun
5	97,08	Uygun	90,32	Uygun	91,27	Uygun	91,85	Uygun
6	91,35	Uygun	90,72	Uygun	94,89	Uygun	90,60	Uygun

Çizelge 4.22 Nitrit tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi.

Standart belirsizlik	ORT	88,03
	SD	5,34
	n	88
	$u(x)=Sd/karekök(n)$	0,569
	t testi	21,036
	t ölçütü	1,988
	Relatif belirsizlik	0,006
t testi>t ölçütü olduğu için		Sistematik Hata vardır

Çizelge 4.23 Nitrat 12 ppm (düşük konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.

Nitrat								
Kabul Kriteri (%GK)	I. Analist				II. Analist			
	Sucuk		I.İ.G.Sucuk		Sucuk		I.İ.G.Sucuk	
	Min	80	Max	110	Min	80	Max	110
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	80,39	Uygun	85,71	Uygun	87,84	Uygun	81,76	Uygun
2	83,98	Uygun	87,19	Uygun	83,90	Uygun	82,74	Uygun
3	80,96	Uygun	87,92	Uygun	86,66	Uygun	90,89	Uygun
4	85,57	Uygun	92,92	Uygun	82,34	Uygun	88,35	Uygun
5	80,51	Uygun	80,04	Uygun	82,35	Uygun	95,23	Uygun
6	97,72	Uygun	83,68	Uygun	80,61	Uygun	84,85	Uygun
7	87,36	Uygun	86,90	Uygun	92,76	Uygun	83,27	Uygun
8	87,26	Uygun	83,50	Uygun	92,14	Uygun	93,83	Uygun
9	81,53	Uygun	84,84	Uygun	82,65	Uygun	81,68	Uygun
10	91,56	Uygun	81,17	Uygun	83,85	Uygun	89,75	Uygun

Çizelge 4.24 Nitrat 20 ppm (orta konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.

Nitrat								
Kabul Kriteri (%GK)	I. Analist				II. Analist			
	Sucuk		I.İ.G.Sucuk		Sucuk		I.İ.G.Sucuk	
	Min	80	Max	110	Min	80	Max	110
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	83,82	Uygun	94,02	Uygun	90,14	Uygun	96,51	Uygun
2	88,92	Uygun	91,78	Uygun	80,98	Uygun	83,95	Uygun
3	84,54	Uygun	97,18	Uygun	91,44	Uygun	86,38	Uygun
4	91,41	Uygun	84,50	Uygun	91,73	Uygun	85,97	Uygun
5	87,41	Uygun	88,16	Uygun	92,60	Uygun	89,74	Uygun
6	96,82	Uygun	100,71	Uygun	85,13	Uygun	97,32	Uygun

Çizelge 4.25 Nitrat 200 ppm (yüksek konsantrasyon) geri kazanım sonuçları.

Kabul Kriteri (%GK)	Nitrat							
	I. Analist				II. Analist			
	Sucuk		I.İ.G.Sucuk		Sucuk		I.İ.G.Sucuk	
	Min	90	Max	107	Min	90	Max	107
Numune	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk	% GK	Uygunluk
1	90,49	Uygun	94,35	Uygun	94,74	Uygun	90,91	Uygun
2	93,30	Uygun	98,45	Uygun	93,76	Uygun	92,60	Uygun
3	95,51	Uygun	91,45	Uygun	94,51	Uygun	99,53	Uygun
4	94,27	Uygun	96,91	Uygun	97,68	Uygun	92,13	Uygun
5	96,13	Uygun	99,91	Uygun	94,46	Uygun	98,18	Uygun
6	90,11	Uygun	92,61	Uygun	96,21	Uygun	93,61	Uygun

Çizelge 4.26 Nitrat tüm konsantrasyonlar ortalama geri kazanım sonuçları ve t testi.

Standart belirsizlik	ORT	89,45
	SD	5,64
	n	88
	$u(x)=Sd/karekök(n)$	0,601
	t testi	17,556
	t ölçütü	1,988
	Relatif belirsizlik	0,0067
t testi>t ölçütü olduğu için		Sistemik Hata vardır

4.8 Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)

Bu çalışma yapılırken ön araştırma çalışmaları, analiz ön aşaması, ekstraksiyon süreci ve analize etki eden faktörlerden Çizelge 4.27’de belirtilen parametreler seçilmiştir.

Çizelge 4.27 Sağlamlık parametreleri.

Parametreler	Ana Metot Değerleri		Değişen Metot Değerleri	
Numune Miktarı	A	10 g	a	5 g
İlave Su Sıcaklığı	B	50 °C	b	55 °C
Ultrasonik Su Banyosu Süresi	C	5 dk	c	6 dk
Ultrasonik Su Banyosu Sıcaklığı	D	45 °C	d	50 °C
İlave Asetonitril Miktarı	E	50 ml	e	55 ml
Kolon Akış Hızı	F	1 ml/dk	f	0,8 ml/dk
Kolon Sıcaklığı	G	25 °C	g	30 °C

Çizelge 4.27’de gösterildiği gibi 7 parametrede değişiklikler yapılarak her Sucuk numunesine 20 ppm nitrit ve nitrat ile kirletme uygulanarak iki tekrarlı analiz sonuçları elde edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları ile Çizelge 4.28 ve Çizelge 4.29’da gösterilen Youden deney desenleri oluşturulmuştur. Nitrit ve nitrat sağlamlık değerlendirmelerine ait veriler Çizelge 4.30 ve Çizelge 4.31’de verilmiştir.

Çizelge 4.28 Nitrit Youden kısmi faktöriyel (7 faktörlü) sağlamlık testi deney deseni ve sonuçları.

Parametre Değer	Test No							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A-a	A	A	A	A	a	a	a	a
B-b	B	B	b	b	B	B	b	b
C-c	C	c	C	c	C	c	C	c
D-d	D	D	d	d	d	d	D	D
E-e	E	e	E	e	e	E	e	E
F-f	F	f	f	F	F	f	f	F
G-g	G	g	g	G	g	G	G	g
Birinci Analiz Sonucu (µg/kg)	20,76	19,52	20,72	19,36	20,56	20,64	19,24	20,64
İkinci Analiz Sonucu (µg/kg)	19,76	21,08	18,96	20,72	19,48	19,96	21,16	19,80
Ortalama (µg/kg)	20,26	20,30	19,84	20,04	20,02	20,30	20,20	20,22

Çizelge 4.29 Nitrat Youden kısmi faktöriyel (7 faktörlü) sağlamlık testi deney deseni ve sonuçları.

Parametre Değer	Test No							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A-a	A	A	A	A	a	a	a	a
B-b	B	B	b	b	B	B	b	b
C-c	C	c	C	c	C	c	C	c
D-d	D	D	d	d	d	d	D	D
E-e	E	e	E	e	e	E	e	E
F-f	F	f	f	F	F	f	f	F
G-g	G	g	g	G	g	G	G	g
Birinci Analiz Sonucu (µg/kg)	18,76	20,76	19,76	20,52	21,84	18,44	20,44	21,56
İkinci Analiz Sonucu (µg/kg)	20,88	19,00	20,28	19,88	18,24	21,28	19,08	18,84
Ortalama (µg/kg)	19,82	19,88	20,02	20,20	20,04	19,86	19,76	20,20

Çizelge 4.30 Nitrit sağlamlık değerlendirmesi.

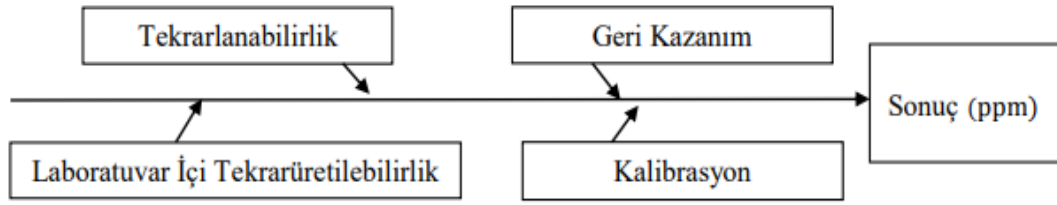
Parametre Değer	Fark (Di)	Farkların Karesi (Di ²)	SD	Değerlendirme
A-a	-0,30	0,09	0,16	Değişiklik Önemli Değil
B-b	0,58	0,34	0,31	Değişiklik Önemli Değil
C-c	-0,54	0,29	0,29	Değişiklik Önemli Değil
D-d	0,78	0,61	0,42	Değişiklik Önemli Değil
E-e	0,06	0,00	0,03	Değişiklik Önemli Değil
F-f	-0,10	0,01	0,05	Değişiklik Önemli Değil
G-g	0,42	0,18	0,22	Değişiklik Önemli Değil
Sucuk laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik - Sbirleşik			1,05	

Çizelge 4.31 Nitrat sağlamlık değerlendirmesi.

Parametre Değer	Fark (Di)	Farkların Karesi (Di ²)	SD	Değerlendirme
A-a	0,06	0,00	0,03	Değişiklik Önemli Değil
B-b	-0,58	0,34	0,31	Değişiklik Önemli Değil
C-c	-0,50	0,25	0,27	Değişiklik Önemli Değil
D-d	-0,46	0,21	0,25	Değişiklik Önemli Değil
E-e	0,02	0,00	0,01	Değişiklik Önemli Değil
F-f	0,74	0,55	0,40	Değişiklik Önemli Değil
G-g	-0,50	0,25	0,27	Değişiklik Önemli Değil
Sucuk laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik - Sbirleşik			1,02	

4.9 Ölçüm Belirsizliği

Uygulanan analiz metodunun belirsizlik bileşenleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Nitrit ve nitrat için hesaplanan tekrarlanabilirlik belirsizlikleri Çizelge 4.32’de, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik belirsizlikleri Çizelge 4.33’te, geri kazanımdan gelen relatif belirsizlikleri Çizelge 4.34’te, kalibrasyondan gelen relatif belirsizlikleri Çizelge 4.35’te verilmiştir. Nitrit belirsizlik bileşenleri grafiği Şekil 4.13’te, nitrat belirsizlik bileşenleri grafiği Şekil 4.14’te gösterilmiştir. Hesaplanan nitrit ve nitrat belirsizlik sonuçları ise sırasıyla Çizelge 4.36 ve 4.37’de verilmiştir.



Şekil 4.12 Belirsizlik bileşenleri.

Çizelge 4.32 Nitrit-Nitrat tekrarlanabilirlik belirsizlikleri.

Tekrarlanabilirlik Belirsizlikleri		
Nitrit	RSD Birleşik	0,054
	En Kötü Durum (RSD)	0,077
Nitrat	RSD Birleşik	0,051
	En Kötü Durum (RSD)	0,065

Çizelge 4.33 Nitrit-Nitrat laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik belirsizlikleri.

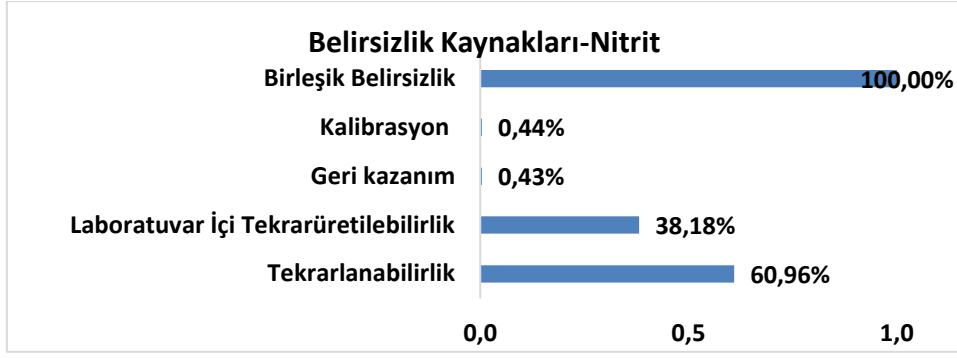
Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik Belirsizliği		
Nitrit	RSD Birleşik	0,042
	En Kötü Durum (RSD)	0,061
Nitrat	RSD Birleşik	0,049
	En Kötü Durum (RSD)	0,067

Çizelge 4.34 Nitrit-Nitrat geri kazanımdan gelen relatif belirsizlikleri.

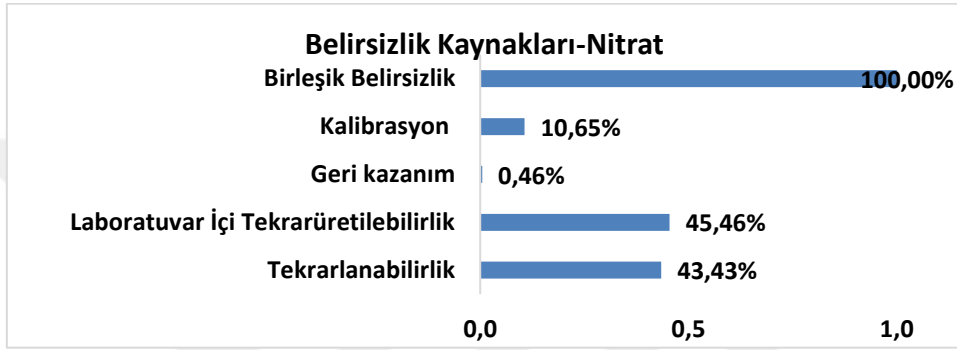
Geri Kazanımdan Gelen Relatif Belirsizlik		
Nitrit	Relatif belirsizlik	0,006
Nitrat	Relatif belirsizlik	0,007

Çizelge 4.35 Nitrit-Nitrat kalibrasyondan gelen relatif belirsizlikleri.

Kalibrasyondan Gelen Belirsizlik		
Nitrit	Relatif belirsizlik	0,007
Nitrat	Relatif belirsizlik	0,032



Şekil 4.13 Nitrit belirsizlik bileşenleri grafiği.



Şekil 4.14 Nitrat belirsizlik bileşenleri grafiği.

Çizelge 4.36 Nitrit belirsizlik sonuçları.

Belirsizlik bileşenleri	Nitrit-Toplam Belirsizlik ve Belirsizlik Bütçesi
Tekrarlanabilirlik	0,077
Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik	0,061
Geri kazanım	0,006
Kalibrasyon	0,007
Birleşik Belirsizlik	0,099
Genişletilmiş Bel.	0,20 k=2 %95 güven aralığında verilmiştir.
Genişletilmiş Bel. (%)	19,75

Çizelge 4.37 Nitrat belirsizlik sonuçları.

Belirsizlik bileşenleri	Nitrat-Toplam Belirsizlik ve Belirsizlik Bütçesi
Tekrarlanabilirlik	0,065
Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik	0,067
Geri kazanım	0,007
Kalibrasyon	0,032
Birleşik Belirsizlik	0,099
Genişletilmiş Bel.	0,20 k=2 %95 güven aralığında verilmiştir.
Genişletilmiş Bel. (%)	19,82

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Tartışma

Metodun numunede girişim oluşturabilecek diğer analitlerin, matrikslerin ve potansiyel olarak girişim yapabilecek materyallerin varlığında hedef analiti doğru olarak tanımlama ve ölçebilme kabiliyeti ve diğer maddelerden ayırt etme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla yapılan seçicilik ve spesifiklik çalışmalarındaki kromatogramlar incelendiğinde piklerin birbirinden iyi ayrıldığı ve hedef analitlere girişim oluşturabilecek herhangi bir pik olmadığı görülmüştür.

(Anonim 2018a; EURACHEM Guide 2014) kaynaklarına göre hesaplanan LOQ değerleri teorik değerlerdir ve bu değerler spike seviyesinden farklı olduğu için uygulanabilir LOQ değeri olarak spike seviyesi (Nitrit 7 ppm; Nitrat 12 ppm) alınmıştır.

Analitin konsantrasyonu ile orantılı test sonuçları elde etme yeteneğini belirleme amacıyla yapılan Lineerlik (Doğrusallık) çalışmaları sonucunda nitrit için 0,99967, nitrat için 0,99960 korelasyon katsayıları (r) elde edilmiştir. Her ikisi de 0,99'dan yüksek olduğu için uygun olarak değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışması ile ilgili F ve t testi sonuçları EK. 1'de, Grubb's testi sonuçları ise 4.5 Tekrarlanabilirlik (Repeatability) bölümünde gösterilmiştir. Tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen tüm analiz sonuçları Grubb's testine göre uygun olup sapan değer bulunmamaktadır. Tekrarlanabilirlik verileri ile yapılan F-Testi sonuçlarının tümünde; F değeri F Kritik iki-uçlu değerinden küçük olduğu için veri grupları ve kişiler arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir kesinlik farkı bulunmamaktadır. Yine aynı şekilde Tekrarlanabilirlik verileri ile yapılan t-Testi sonuçlarının tümünde; t Stat değeri t Kritik iki-uçlu değerinden küçük olduğu için veri grupları ve kişiler arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir kesinlik farkı bulunmadığından yapılan çalışma uygun olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi; tekrarlanabilirlik çalışmasında hesaplanan relatif standart sapma (%RSD) değerlerinin Horwitz eşitliğinden hesaplanan relatif standart sapma (PRSD) değerleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. %RSD değerleri PRSD değerlerinden küçük olduğu için uygun olarak değerlendirilmiştir.

Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışması ile ilgili F ve t testi sonuçları EK. 2’de, Grubb’s testi sonuçları ise 4.6 Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik (Reproducibility) bölümünde verilmiştir. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik çalışmasında elde edilen tüm analiz sonuçları Grubb’s testine göre uygun olup sapan değer bulunmamaktadır. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik verileri ile yapılan F-Testi sonuçlarının tümünde; F değeri F Kritik iki-uçlu değerinden küçük olduğu için veri grupları ve kişiler arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir kesinlik farkı bulunmamaktadır. Yine aynı şekilde laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik verileri ile yapılan t-Testi sonuçlarının tümünde; t Stat değeri t Kritik iki-uçlu değerinden küçük olduğu için veri grupları ve kişiler arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir kesinlik farkı bulunmadığından yapılan çalışma uygun olarak değerlendirilmiştir. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirliğin değerlendirilmesi; hesaplanan relatif standart sapma (%RSD) değerlerinin Horwitz eşitliğinden hesaplanan relatif standart sapma (PRSD) değerleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. %RSD değerleri PRSD değerlerinden küçük olduğu için uygun olarak değerlendirilmiştir.

Geri Kazanım çalışması ile ilgili tüm test sonuçları 4.7 Geri kazanım (Recovery) bölümünde gösterilmiştir. Gerçeklik kontrolü için, (AOAC 2016)’ya göre düşük konsantrasyon 7-12 ppm için %80-%110; orta konsantrasyon 20 ppm için %80-%110; 200 ppm yüksek konsantrasyon için %90-%107 ortalama geri kazanım oranı aralıkları belirlenmiş ve tüm analiz sonuçlarının geri kazanım oranları bu geri kazanım oranı kriterlerine göre uygun olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda nitrit ve nitrat için hesaplanan geri kazanım oranları t-testi ile karşılaştırılmış ve her iki analit içinde t-testi sonucu t ölçütü sonucundan büyük olduğundan geri kazanım oranlarında sistematik hata olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle nitrit ve nitrat analiz sonuçlarında; nitrit için hesaplanan ortalama geri kazanım oranı % 88,03, nitrat için hesaplanan ortalama geri kazanım oranı % 89,45 göre düzeltme yapılması gerekmektedir.

Nitrit için sağlamlık çalışmasından elde edilen tüm standart sapmalar, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapmasından ($SD_{\text{Birleşik}} = 1,05159$) küçük olduğundan metot belirlenen parametreler açısından sağlam olarak değerlendirilmiştir. Yine aynı şekilde Nitrat için sağlamlık çalışmasından elde edilen tüm standart sapmalar, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapmasından ($SD_{\text{Birleşik}} = 1,02034$) küçük olduğundan metot belirlenen parametreler açısından sağlam olarak değerlendirilmiştir.

5.2 Sonuç

Yapılan çalışmalar sonucunda nitrit ve nitratın başarılı bir şekilde tespit edilebilmesi için kullanılan analitik metot, ultrason destekli ekstraksiyon ile optimize edilmiştir. Sonuç olarak sucuk ve ısıtılmış sucuklarda, mevzuatlar ile kullanımına yasal sınırlama getirilen nitrit ve nitrat katkı maddelerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile miktar tayininin validasyonu yapılmış ve ölçüm belirsizliği hesaplanmıştır.

Tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik değerlendirmeleri ile F ve t test sonuçlarının uygun olduğu ve geri kazanım oranları ile beraber geri kazanım kabul kriterleri ve % RSD kontrol ve değerlendirmelerine göre de sonuçların uygun olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan validasyon ve ölçüm belirsizliği çalışmaları sonucunda nitrit ve nitrat için sırasıyla geri kazanım oranları, 88,03% ve 89,45%, ölçüm limiti 7,0 ppm ve 12 ppm ve genişletilmiş belirsizlik oranları 20% olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ölçüm belirsizliği hesaplanmasında kullanılan tekrarlanabilirlik, laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik, geri kazanım ve kalibrasyon çalışmaları sonucu elde edilen en yüksek relatif standart sapma değerleri nitrit için sırasıyla 0,077; 0,061; 0,006; 0,007 ve nitrat için sırasıyla 0,065; 0,067; 0,007; 0,032 olarak tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, sucuk ve ısıtılmış sucuklar başta olmak üzere et ürünlerinde geniş bir kullanımı olan nitrit ve nitrat katkı maddelerinin tespit edilmesi ve miktar tayini için çalkalayıcı ile 30 dakika yerine ultrason destekli hızlı ekstraksiyon ile ekstraksiyon süresi 5 dakika olarak optimize edilmiş ve güvenilirliği validasyon ve ölçüm belirsizliği çalışmaları ile gösterilmiş bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır. Böylece sağlık açısından önemli etkileri olan bu katkı maddelerinin yasal sınırlamalara uygunluğunun değerlendirilmesi sürecinde denetleyici mekanizmalar için faydalı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Açu M, Yerlikaya O, Kınık Ö, 2014, Gıdalarda Isıl Olmayan Yeni Teknikler ve Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri, Gıda ve Yem Bilimi Teknoloji Dergisi, 14, 23-35.
- Ağaoğlu S, Alishanlı M, Alemdar S, Dede S, 2007, Van Bölgesi İçme ve Kullanma Sularında Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin Araştırılması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 18, 17-24.
- Alahakoon U A, Jayasena D D, Ramachandra S, Jo C, 2015, Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date, Trends in Food Science and Technology, 45, 37-49.
- Alifakı Y Ö, Şakıyan Ö, İşçi A, 2018, Gilaburu (*Viburnum Opulus L.*) Meyvesinden Fenolik Bileşiklerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu, Gıda, 43, 846-855.
- Anonim, 2000, NMKL No:165, Nordic Committee on Food Analysis.
- Anonim, 2012, TS 1070, Türk Sucuğu, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anonim, 2018a, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
- Anonim, 2018b, Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Ölçüm Belirsizliği Rehberi, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
- AOAC Official Methods of Analysis, 2016, Guidelines for Standard Method Performance Requirements, Appendix F, 1-18.
- Ata Ş, 2010, Biyolojik, gıda ve çevre örneklerindeki nitrit, nitrat, sekonder amin ve nitrozaminler, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 309s, Zonguldak.
- Bakhtiary F, Sayevand H R, Khaneghah A M, Haslberger A G, Hosseini H, 2018, Antibacterial efficacy of essential oils and sodium nitrite in vacuum processed beef fillet, Applied Food Biotechnology, 5, 1-10.
- Bayraktar N, Gökçe R, Ergün Ö, 1998, Gıdalarda nitrat ve nitrit kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkileri, Çevre Koruma Dergisi, 7, 28-30.
- Bedale W, Sindelar J J, Milkowski L A, 2016, Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks and evolving perceptions, Meat Science, 1-37.

- Berardo A, De Maere H, Stavropoulou D A, Rysman T, Leroy F, De Smet S, 2016, Effect of sodium ascorbate and sodium nitrite on protein and lipid oxidation in dry fermented sausages, *Meat Science*, 121, 359-364.
- Beriain M J, Chasco J, Lizaso G, 2000, Relationship between biochemical and sensory quality characteristics of different commercial brands of salchichon, *Food Control*, 11, 231-237.
- Bilge G, 2010, Sucukta Üretim Sırasında Meydana Gelen Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Değişmelere Üretim Sıcaklığının ve Starter Kültürün Etkisi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 118s, Ankara.
- Bryan N S, 2006, Nitrite in nitric oxide biology: Cause of consequence? A systems-based review, *Free Radical Biology & Medicine* 41, 691-701.
- Büyükcünal S, Şakar F, Turhan İ, Erginbaş Ç, Sandıkçı Altunatmaz S, Yılmaz Aksu F, Yılmaz Eker F, Kahraman T, 2016, Presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 and Nitrate-Nitrite Residue Levels in Turkish Traditional Fermented Meat Products (Sucuk and Pastırma), *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22, 233-236.
- Cammack R, Joannou C L, Cui X-Y, Martinez C T, Maraj S R, Hughes M N, 1999, Nitrite and Nitrosyl Compounds in Food Preservation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411, 475-488.
- Candan T, Bağdatlı A, 2018, Et ürünlerinde nitrit/nitrat azaltılmasına yönelik doğal uygulamalar, *Pamukkale Üni. Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 24, 1382-1387.
- Cassens R G, 1997, Composition and Safety of Cured Meats in the USA, *Food Chemistry*, 59, 561-566.
- Chan T Y K, 2011, Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia, *Toxicology Letters*, 200, 107–108.
- Connolly D, Paul B, 2001, Rapid determination of nitrate and nitrite in drinking water samples using ion-interaction liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 441, 53-62.
- Coşkun S, 2019, Fermente sucuk döner üretim olanaklarının araştırılması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 157s, Manisa.

- Çakmak Ö, İşleyen A, Usca A, 2009, N-Nitrozo Bileşikleri ve Halk Sağlığına Etkileri, TAF Preventive Medicine Bulletin, 8, 521-526.
- Dedebaş T, Çapar T D, Ekici L, Yalçın H, 2021, Yağlı Tohumlarda Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ve Avantajları, Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 21, 313-322.
- Demirkol D, 2019, Fermente sucuklarda nitrit yerine nisin kullanımının bazı gıda patojenleri üzerine etkileri, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 82s, Afyonkarahisar.
- Dilek N M, 2022, Pancardan (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) şekere nitrat ve nitrit içeriklerinin belirlenmesi ve sucuk üretiminde kürlenme ajanı olarak kullanılabilme imkânları, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 165s, Konya.
- Dinçer C, Topuz A, 2018, Meyve Suyu İşlemede Ultrases Kullanımı, Gıda, 43, 569-581.
- Doğan M, 2022, Salamalarda Farklı Miktarlarda Sodyum Nitrit Kullanılmasının Kalite Üzerine Etkisi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 126s, Bursa.
- Doğu M, Çon A H, Gökalp H Y, 2002, Afyon İlindeki Yüksek Kapasiteli Et İşletmelerinde Üretilen Sucukların Bazı Kalite Özelliklerinin Periyodik Olarak Belirlenmesi, Turkish Journal of Veterinary Animal Science, 26, 1-9.
- Ercoşkun H, Özkal S G, 2011, Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation, Food Control, 22, 165-172.
- Erdoğan A, 2014, Nitrit ve nitrat tayinine yönelik polimer membran temelli tek elektrotlu biyosensör sisteminin hazırlanması ve uygulamaları, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 232s, Malatya.
- Erdoğrul Ö, Ergün Ö, 2005, Kahramanmaraş Piyasasında Tüketilen Sucukların Bazı Fiziksel, Kimyasal, Duyusal ve Mikrobiyolojik Özellikleri, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 31, 55-65.
- Erulaş F A, 2010, Biyolojik sıvılarda iyon kromatografisi ile anyon tayini, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 70s, Elazığ.

- EURACHEM Guide, 2014, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, Second Edition, 1-62.
- EURACHEM/CITAC Guide, 2012, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third Edition, 1-133.
- Falowo A B, Fayemi P O, Muchenje V, 2014, Natural Antioxidants Against Lipid-protein Oxidative Deterioration in Meat and Meat Products, Food Research International, 64, 171-181.
- Furst A, 2002, Can nutrition affect chemical toxicity, International Journal of Toxicology, 21, 419-424.
- Geçgel Ü, Yılmaz İ, Ay A, Apaydın D, Dülger G Ç, 2016, Soğuk Pres Yağlar İlave Edilerek Üretilen Fermente Sucukların Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 13.
- Gökalp H Y, 1983, Et Ürünlerinde Nitrat, Nitrit Kullanımı ve Nitrit Zehirlenmesi, Gıda, 8, 239-243.
- Gökalp H Y, 1985, Et Ürünlerine Katılan Nitrat, Nitrit Miktarının Azaltılması, N-Nitrosamin Oluşum Reaksiyonlarının Engellenmesi ve Gıdalarda N-Nitrosaminlerin Saptanması, Gıda, 10, 161-167.
- Gökalp H Y, Kaya M, Zorba Ö, 2010, Et Ürünleri İşleme Mühendisliği, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 786, 203-239, Erzurum.
- Gökmen M, 2010, Türk sucuğu üretiminde kitosan kullanımı ve kalite üzerine etkileri, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 61s, Konya.
- Grasso S, Brunton N P, Lyng J G, Lalor F, Monahan F J, 2014, Healthy processed meat products-Regulatory, reformulation and consumer challenges, Trends in Food Science and Technology, 39, 4-17.
- Gray J I, McDonald B, Pearson M A, Marton I D, 1981, Role of Nitrite in Cured Meat Flavor, A Review, J. Food Prot. 44, 302-312.
- Gültekin F, Akın S, 2019 İşlenmiş Et Ürünleri ve Gıda Katkı Maddeleri, Akademik Platform Helal Yaşam Dergisi.

- Hampikyan H, 2006, Fermente sucuklarda nisin kullanımının *Listeria monocytogenes* üzerine etkileri, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 76s, İstanbul.
- Hampikyan H, Çolak H, 2007, Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6, 142-147.
- Helvacıoğlu Ş, 2020, Fermente sucukların bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalite kriterleri üzerine zerdeçalın etkisinin belirlenmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 89s, Afyonkarahisar.
- Herrmann S S, Granby K, Duedahl-Olesen L, 2015, Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages, Food Chemistry, 174, 516-526.
- Honikel K, 2008, The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, Meat Science, 78, 68-76.
- İpek G, 2019, Isıl işlem görmüş sucuk formülasyonlarında yer fıstığı yağı ve keten tohumu yağı kullanılarak hazırlanan O/W jel emülsiyonlarının (soğuk jelleşme) yağ girdisi olarak kullanımının ürün kalitesine etkilerinin araştırılması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 102s, İzmir.
- Kabak B, Dobson A D, 2011, An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51, 248-260.
- Kahya E, 1973, Ankara piyasasında satılan yerli sucukların hijyenik kalitesi üzerinde araştırmalar, Bornova Vet. Araşt. Enst. Derg, 14, 26-27.
- Karaca E, 2020, Et ve et ürünlerinde kullanılan ingredientlerin kalıntı nitrit seviyesi üzerine etkisi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dalı Doktora Tezi, 98s, Isparta.
- Karakaya M, Bayrak E, Ulusoy K, 2011, Use of Natural Antioxidants in Meat and Meat Products, Journal of Food Science and Engineering, 1, 1-10.
- Kerimoğlu B Ö, Serdaroğlu M, 2020, Residual nitrite content of heat-treated sucuk as affected by chard powder incorporation and processing, Gıda, 45, 825-835.

- Kumar P, Chatli M K, Verma A K, Mehta N, Malav O P, Kumar D, Sharma N, 2017, Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2844-2856.
- Kumcuoğlu S, Yılmaz T, Tavman Ş, 2011, Salça Üretim Atıklarından Ultrason Destekli Ekstraksiyon İşlemiyle Likopen Ekstraksiyonu, *Akademik Gıda*, 9, 23-28.
- Kurt Ş, 2006, Sucuğun bazı özellikleri ve biyojen amin oluşumu üzerinde fermentasyon süresi, nitrit seviyesi ve ısı işlem sıcaklığı etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 99s, Van.
- Kuyumcu A, Yurttagül M, 2000, Ankara Piyasasında Satılan Salam, Sucuk ve Sosislerin Nem, Yağ, Tuz, Kül ve Kalıntı Nitrat, Nitrit Miktarlarının Tayini Üzerine Bir Araştırma, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 29, 14-24.
- Morrissey P A, Tichivangana J Z, 1985, The antioxidant activities of nitrite and nitrosylmyoglobin in cooked meats, *Meat Science*, 14, 175-190.
- Oostindjer M, Alexander J, Amdam G V, Andersen G, Bryan N S, Chen D, ... Egelanddal B, 2014, The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective, *Meat Science*, 97, 583-596.
- Özbay Doğu S, Sarıçoban C, 2015, Et Kurutma Teknolojisi ve Dünyada Tüketilen Bazı Kurutulmuş Et Ürünleri, *Journal of Food and Health Science*, 1, 109-123.
- Özdemir S, 2018, Fermente sucuk üretiminde kereviz ve kuşburnu tozları kullanılarak sentetik nitrit miktarının azaltılabilme imkânlarının yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi, *Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 71s, Bolu
- Özdestan Ö, Üren A, 2010, Gıdalarda nitrat ve nitrit, *Akademik Gıda*, 8, 35-43.
- Öztan A, Vural H, Helvacı R, 1991, Sosis üretiminde nitrozomyoglobin ve kalıntı nitrit miktarlarını etkileyen faktörler, *Gıda*, 16, 117-121.
- Öztürk B, Serdaroğlu M, Ergezer H, 2015, Et ve Et Ürünlerinde Nitrit-Nitrat; Kullanım Avantajları, Yasal Sınırlamalar ve Güncel Alternatif Yaklaşımlar, *Akademik Gıda*, 13, 257-264.
- Palamutoğlu R, Sarıçoban C, 2012, Et ürünlerinde nitrat ve nitrite alternatif doğal kütleme maddeleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7, 46-58.

- Parsons M L, 1978, Is the nitrate drinking water standard unnecessarily low? Current research indicates that it is, *The American Journal of Medical Technology*, 44, 952-954.
- Parthasarathy D K, Bryan N S, 2012, Sodium nitrite: The “cure” for nitric oxide insufficiency, *Meat Science*, 92, 274-279.
- Perea-Sanz L, Montero R, Belloch C, Flores M, 2018, Nitrate reduction in the fermentation process of salt reduced dry sausages: Impact on microbial and physicochemical parameters and aroma profile, *International Journal of Food Microbiology*, 282, 84-91.
- Pichner R, Hechelmann H, Gareis M, Steinrueck H, 2006, Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) in conventionally and organically produced salami products, *Fleischwirtschaft*, 86, 112-114.
- Pradhan A K, Ivanek R, Gröhn Y T, Geornaras I, Sofos J N, Wiedmann M, 2009, Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in selected categories of deli meats: impact of lactate and diacetate on listeriosis cases and deaths, *Journal of Food Protection*, 72, 978-989.
- Prasad S, Chetty A A, 2008, Nitrate-N determination in leafy vegetables: Study of the effects of cooking and freezing, *Food Chemistry*, 106, 772-780.
- Rincon F, Martinez B, Perez-Olmos R, Berzosa A, 2008, The roles of pH extraction and colloidal protein solubility in the optimization of spectrophotometric nitrite determination in meat products via response surface methodology, *Meat Science*, 80, 744-752.
- Ruiz-Capillas C, Aller-Guiote P, Jimenez-Colmenero F, 2007, Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products, *Food Chemistry*, 101, 812-816.
- Sancak Y C, Ekici K, İşleyici Ö, 2008, Fermente Türk Sucuğu ve Pastırmalarda Kalıntı Nitrat ve Nitrit Düzeyleri, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 41-45.
- Sanz Y, Vila R, Toldra F, Flores J, 1998, Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages, *International Journal of Food Microbiology* 42, 213-217.

- Sayın L, Tamer C E, 2014, Yüksek Hidrostatik Basınç ve Ultrasonun Gıda Koruma Yöntemi Olarak Kullanımı, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 28, 83-93.
- Sebranek J G, Bacus J N, 2007, Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?, Meat Science, 77, 136-147.
- Servi K, 1991, Elazığ Bölgesinde Tüketime Sunulan Et ve Süt Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin Belirlenmesi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi, 68s, Elazığ.
- Sezer Ç, Öğün M, Güven A, 2013, Determination of some chemical characteristics of salami and sausage, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19, 69-72.
- Sezgin E, 2013, Aydın'da Tüketime Sunulan Kıyma ve Hamburger Köftelerde Escherichia coli O157:H7 Varlığının Araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 50s, Aydın.
- Shahidi F, Pegg R B, 1992, Nitrite-free meat curing systems: update and review, Food Chemistry, 43, 185-191.
- Sindelar J J, Milkowski A L, 2011, Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk/benefit of its use, American Meat Science Association White Paper Series, 3, 1-14.
- Song X, Cornforth D, Whittier D, Luo X, 2015, Nitrite spray treatment to promote red color stability of vacuum packaged beef, Meat Science, 99, 8-17.
- Sucu Ç, 2018, Sucuk Üretiminde Nitrit Alternatifi Olarak Sebze Unlarının Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 128s, İzmir.
- Şanlı Y, Kaya S, 1988, Ankara piyasasında satılan bazı işlenmiş et ürünlerinin nitrat ve nitrit içerikleri üzerine araştırmalar, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 35, 24-46.
- Şengül M, Başlar M, Erkaya T, Ertugay M F, 2009, Ultrasonik Homojenizasyon İşleminin Yoğurdun Su Tutma Kapasitesi Üzerine Etkisi, Gıda, 34, 219-222.

- Şengül M, Topdaş E F, 2019, Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Modern Teknikler ve Bu Teknikler Arasında Ultrason Yardımlı Ekstraksiyonun Yeri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50, 201-216.
- Şimsek A, 2015, Enkapsüle Edilmiş Fosfatların Tüketime Hazır Kıyma Döner Üretiminde Kullanılmasının Dönerin Raf Ömrü ve Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 155s, Isparta.
- Tavman Ş, Kumcuoğlu S, Akkaya Z, 2009, Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu, Gıda, 34, 175-182.
- Temizgül S, 2021, Sucukta nitrit içeriğinin azaltılmasında kombucha ekstraktının kullanım olanağı, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65 s, Ankara.
- Terns M J, Milkowski A L, Claus J R, Sindelar J J, 2011, Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages, Meat Science, 88, 454-461.
- Tüfekçi S, Özkal S G, 2015, Gıdaların Kurutulmasında Ultrases Kullanımı, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 21, 408-413.
- Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 2013, T.C. Resmi Gazete Tarihi: 30.06.2013, Sayı: 28693.
- Toldra F, Reig M, 2011, Innovations for healthier processed meats, Trends in Food Science & Technology, 22, 517-522.
- Toptancı İ, Ercoşkun H, 2017, Physicochemical and microbiological properties of sucuk produced with different heat treatment temperatures, Academic Food Journal, 15, 344-349.
- Turkal G, Doğruer Y, 2020, Et Ürünlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımı İle Alternatifleri / 2. Uluslararası Gıda Tarım ve Veteriner Bilimleri Kongresi, İKSAD Yayınları.
- Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2018/52), 2019, T.C. Resmi Gazete, 29.01.2019, 30670.
- Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, 2013, T.C. Resmi Gazete, 30.06.2013, 28693.

- Ulusoy H B, 2007, Kefir Kültürü İle Fermente Sucuk  retimi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 85s, İstanbul.
- Unnikrishnan B, Ru P L, Chen S M, Mani V, 2013, Nitrite determination at electrochemically synthesized polydiphenylamine-Pt composite modified glassy carbon electrode, Sensors and Actuators B: Chemical, 177, 887-892.
- Ustaoglu S, 2011, Et  r nlerinde nitrat ve nitrit tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 84s, İzmir.
- Uz A, 2008, Az Yağlı Sucuğun Renk ve Tekst r ne Buğday Kepeği İlavasının Etkisi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 87s, Ankara.
- Vural H,  ztan A, 1992, Fermente et ürünlerinde nitrosomyoglobin oluşumu ve etkileyen faktörler, Gıda, 17, 191-196.
- Wirth F, 1985, Frankfurter-type sausages, Water binding, fat binding, development of structure, Fleischwirtschaft, 65, 937-941.
- Wirth F, 1986, Curing-color formation and color retention in frankfurter-type sausages, Fleischwirtschaft, 66, 354-358.
- Yalçın H, Can   P, Türkoğlu M, 2012, Mersin İlinde Tüketime Sunulan Salam, Sosis ve Sucuklardaki Kalıntı Nitrat ve Nitrit Düzeylerinin Belirlenmesi, Gıda, 37, 33-37.
- Yaylak E, Taşkın T, Koyubenbe N ve Konca Y, 2010, İzmir İli  demiş İlçesinde Kırmızı Et Tüketim Davranışlarının Belirlenmesi  zerine Bir Araştırma, Hayvansal  retim, 51, 21-30.
- Yıldız Turp G, Sucu  , 2016, Et  r nlerinde Nitrat ve Nitrit Kullanımına Potansiyel Alternatif Yöntemler, Celal Bayar  ni. Fen Bilimleri Dergisi, 12, 231-242.
- Yılmaz M M, 2019, Fermente sucuktaki mikrobiyolojik, fizikokimyasal ve kimyasal değişimlere lactobacillus sakei ve pediococcus acidilactici koruyucu kültürlerinin etkisi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 111s, Ankara.
- Yüksel F, 2013, Gıda teknolojisinde ultrases uygulamaları, Gıda Teknolojileri Dergisi, 8, 29-38.

EKLER

EK 1. Tekrarlanabilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrit-Sucuk 7 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	6,063579	6,133217
Varyans	0,218635046	0,154181625
Gözlem	10	10
df	9	9
F	1,418035679	
P(F<=f) tek-uçlu	0,305608845	
F Kritik iki-uçlu	3,178893104	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 7 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	6,079775	6,022709
Varyans	0,17668345	0,1251576
Gözlem	10	10
df	9	9
F	1,411687786	
P(F<=f) tek-uçlu	0,307890927	
F Kritik iki-uçlu	3,178893104	

<i>Nitrit-Sucuk 7 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	6,063579	6,133217
Varyans	0,218635046	0,154181625
Gözlem	10	10
Birikimli Varyans	0,186408336	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	18	
t Stat	-0,360660539	
P(T<=t) tek-uçlu	0,361275515	
t Kritik tek-uçlu	1,734063607	
P(T<=t) iki-uçlu	0,722551031	
t Kritik iki-uçlu	2,10092204	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 7 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	6,022709	6,079775
Varyans	0,125157596	0,17668345
Gözlem	10	10
Birikimli Varyans	0,150920523	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	18	
t Stat	-0,328464383	
P(T<=t) tek-uçlu	0,373175462	
t Kritik tek-uçlu	1,734063607	
P(T<=t) iki-uçlu	0,746350924	
t Kritik iki-uçlu	2,10092204	

EK 1. (Devam) Tekrarlanabilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrat-Sucuk 12 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	10,282279	10,261162
Varyans	0,450952825	0,257384407
Gözlem	10	10
df	9	9
F	1,752059616	
P(F<=f) tek-uçlu	0,208087562	
F Kritik iki-uçlu	3,178893104	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 12 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	10,246559	10,468217
Varyans	0,195081763	0,369305128
Gözlem	10	10
df	9	9
F	0,528240061	
P(F<=f) tek-uçlu	0,177838748	
F Kritik iki-uçlu	0,314574906	

<i>Nitrat-Sucuk 12 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	10,282279	10,261162
Varyans	0,450952825	0,257384407
Gözlem	10	10
Birikimli Varyans	0,354168616	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	18	
t Stat	0,079343652	
P(T<=t) tek-uçlu	0,46881737	
t Kritik tek-uçlu	1,734063607	
P(T<=t) iki-uçlu	0,937634739	
t Kritik iki-uçlu	2,10092204	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 12 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	10,246559	10,468217
Varyans	0,195081763	0,369305128
Gözlem	10	10
Birikimli Varyans	0,282193446	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	18	
t Stat	-0,933028589	
P(T<=t) tek-uçlu	0,181576449	
t Kritik tek-uçlu	1,734063607	
P(T<=t) iki-uçlu	0,363152897	
t Kritik iki-uçlu	2,10092204	

EK 1. (Devam) Tekrarlanabilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrit-Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	16,51534333	17,164335
Varyans	0,131570129	0,924601093
Gözlem	6	6
df	5	5
F	0,142299344	
P(F<=f) tek-uçlu	0,025881257	
F Kritik iki-uçlu	0,1980069	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,42771167	17,30978333
Varyans	0,706695171	0,950823205
Gözlem	6	6
df	5	5
F	0,743245608	
P(F<=f) tek-uçlu	0,376331982	
F Kritik iki-uçlu	0,1980069	

<i>Nitrit-Sucuk 20 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	16,51534333	17,164335
Varyans	0,131570129	0,924601093
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	0,528085611	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	-1,546847788	
P(T<=t) tek-uçlu	0,0764688	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,1529376	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 20 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,42771167	17,30978333
Varyans	0,706695171	0,950823205
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	0,828759188	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,224369908	
P(T<=t) tek-uçlu	0,413493709	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,826987417	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 1. (Devam) Tekrarlanabilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrit-Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	187,3229567	185,7131817
Varyans	21,6358698	15,91254909
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,359673405	
P(F<=f) tek-uçlu	0,372115319	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	184,7098383	183,2966533
Varyans	18,74189023	5,824711515
Gözlem	6	6
df	5	5
F	3,217651239	
P(F<=f) tek-uçlu	0,112730549	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrit-Sucuk 200 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	187,3229567	185,7131817
Varyans	21,6358698	15,91254909
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	18,77420944	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,643494703	
P(T<=t) tek-uçlu	0,267190605	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,53438121	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 200 ppm t Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	184,7098383	183,2966533
Varyans	18,74189023	5,824711515
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	12,28330087	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,698396576	
P(T<=t) tek-uçlu	0,250423639	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,500847278	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 1. (Devam) Tekrarlanabilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrat-Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,764475	17,73402333
Varyans	0,928526758	0,850577138
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,091643211	
P(F<=f) tek-uçlu	0,462845226	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	18,54522167	17,99570667
Varyans	1,397889549	1,29570662
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,078862705	
P(F<=f) tek-uçlu	0,467822509	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-Sucuk 20 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,764475	17,73402333
Varyans	0,928526758	0,850577138
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	0,889551948	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,05592243	
P(T<=t) tek-uçlu	0,478252582	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,956505164	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 20 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	18,54522167	17,99570667
Varyans	1,397889549	1,29570662
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	1,346798085	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,820141775	
P(T<=t) tek-uçlu	0,215624978	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,431249956	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 1. (Devam) Tekrarlanabilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrat-Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	186,603455	190,45111
Varyans	25,4754274	8,399927598
Gözlem	6	6
df	5	5
F	3,032815117	
P(F<=f) tek-uçlu	0,124351052	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	188,9843767	191,2261367
Varyans	49,3602427	44,86118231
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,100288494	
P(F<=f) tek-uçlu	0,459514846	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-Sucuk 200 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	186,603455	190,45111
Varyans	25,4754274	8,399927598
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	16,9376775	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	-1,619309343	
P(T<=t) tek-uçlu	0,068224862	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,136449725	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 200 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	191,2261367	188,9843767
Varyans	44,86118231	49,3602427
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	47,11071251	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,565704856	
P(T<=t) tek-uçlu	0,292031929	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,584063858	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 2. Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrit-Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,551775	17,20398667
Varyans	1,109369455	1,102312174
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,006402253	
P(F<=f) tek-uçlu	0,497291484	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,177065	17,59905667
Varyans	0,814760555	0,693820134
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,174310913	
P(F<=f) tek-uçlu	0,432169456	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrit-Sucuk 20 ppm T testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,20398667	17,551775
Varyans	1,102312174	1,109369455
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	1,105840815	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	-0,572834715	
P(T<=t) tek-uçlu	0,289703992	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,579407984	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 20 ppm T testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,59905667	17,177065
Varyans	0,693820134	0,814760555
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	0,754290344	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,841579655	
P(T<=t) tek-uçlu	0,209846678	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,419693357	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 2. (Devam) Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrit-Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	185,2044713	184,79257
Varyans	11,87191567	9,925914734
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,196052554	
P(F<=f) tek-uçlu	0,42452266	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	185,3383967	183,9186833
Varyans	16,79855996	11,85213726
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,417344365	
P(F<=f) tek-uçlu	0,355627911	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrit-Sucuk 200 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	184,79257	185,2044713
Varyans	9,925914734	11,87191567
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	10,8989152	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	-0,216103693	
P(T<=t) tek-uçlu	0,416625683	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,833251366	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrit-I.İ.G.Sucuk 200 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	185,3383967	183,9186833
Varyans	16,79855996	11,85213726
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	14,32534861	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,64969375	
P(T<=t) tek-uçlu	0,265265023	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,530530047	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 2. (Devam) Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrat-Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,700975	17,9109083
Varyans	1,263367563	0,81882755
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,54289821	
P(F<=f) tek-uçlu	0,32288077	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 20 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	18,729565	18,39090333
Varyans	1,553744872	1,509919868
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,029024721	
P(F<=f) tek-uçlu	0,487858981	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-Sucuk 20 ppm T testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	17,91090833	17,700975
Varyans	0,818827551	1,26336756
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	1,041097557	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	0,356366043	
P(T<=t) tek-uçlu	0,36448531	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,72897062	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 20 ppm T testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	18,39090333	18,729565
Varyans	1,509919868	1,553744872
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	1,53183237	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	-0,473937472	
P(T<=t) tek-uçlu	0,322861277	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,645722553	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

EK 2. (Devam) Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik F ve t Testi.

<i>Nitrat-Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	187,6201433	188,6416083
Varyans	54,74662542	19,08879852
Gözlem	6	6
df	5	5
F	2,867997447	
P(F<=f) tek-uçlu	0,136151846	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 200 ppm F Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	193,71745	189,5984867
Varyans	26,97340363	23,00578738
Gözlem	6	6
df	5	5
F	1,172461659	
P(F<=f) tek-uçlu	0,432827739	
F Kritik iki-uçlu	5,050329058	

<i>Nitrat-Sucuk 200 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	187,6201433	188,6416083
Varyans	54,74662542	19,08879852
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	36,91771197	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	-0,291183478	
P(T<=t) tek-uçlu	0,388430597	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,776861195	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	

<i>Nitrat-I.İ.G.Sucuk 200 ppm T Testi</i>	<i>Değişken 1</i>	<i>Değişken 2</i>
Ortalama	193,71745	189,5984867
Varyans	26,97340363	23,00578738
Gözlem	6	6
Birikimli Varyans	24,98959551	
Öngörülen Ortalama Farkı	0	
df	10	
t Stat	1,427147759	
P(T<=t) tek-uçlu	0,092004013	
t Kritik tek-uçlu	1,812461123	
P(T<=t) iki-uçlu	0,184008026	
t Kritik iki-uçlu	2,228138852	