------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 1، ص60-83، 2013------

التقدير الطيفي للنتريت في نماذج مختلفة

عمار مسعود بلال **وعد الله عبد العزيز بشير**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

amar_iraqi@yahoo.com dwab52@yahoo.com

(تاريخ الاستلام 14/ 5 /2012 ؛ تاريخ القبول 18 /7 / 2012)

الملخص

تعتمد هذه الطريقة على تفاعل النتريت مع الميتا-نايترو انيلين في وسط حامضي لتكوين ملح الدايزونيوم المقابل الذي يقترن مع 1-نفثيل اثيلين ثنائي الامين لتكوين صبغة آزوية ذات لون ارجواني ذائبة في الماء ومستقرة وتعطي أعلى شدة امتصاص عند الطول الموجي 530 نانوميتر وأمكن تطبيق قانون بير في حدود تراكيز (0.04-1.0) جزء/مليون وبمعامل امتصاص مولاري مقداره (4.6×10^4) لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$ ودلالة ساندل (0.1) نانوغرام. سم$^{-2}$. وقد تم تطبيق الطريقة على تقدير كمية النتريت في اللحم المعلب وفي المياه والتربة.

الكلمات الدالة: تقدير النتريت، تفاعل الازوتة والاقتران، التقدير الطيفي، اللحم، الماء، التربة.

Photometric Assay of Nitrite in Various Samples

Ammar M. Bilal **Wadala A. Bashir**

Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The assay is based on the reaction of nitrite in acidic medium with m-nitroaniline to form the corresponding diazonium ion which is coupled with N-(1-naphthyl)ethylenediamine to form a stable purplish azo dye that shows maximum absorption at 530 nm. Beer's law is obeyed over the concentration range 0.04-1.0 ppm. The molar absorptivity is (4.6×10^4 l.mol^{-1}.cm^{-1}), and Sandell's sensitivity index of (0.1 ng. cm^{-2}). The proposed method has been applied to the determination of nitrite in meat, water and soil.

Keywords: Nitrite determination; Diazo-coupling reaction; Spectrophotometry; Meat; Water; soil.

المقدمة

مركبات النتروجين مهمة كونها تعد مغذيات ضرورية للكائنات الحية (Veena and Narayana, 2009)، ولكونها أكثر العناصر المتوفرة إذ أن حوالي 80% من الهواء الجوي الذي نستنشقه يحتوي على النتروجين كما يوجد أيضاً في خلايا الكائنات الحية وهو المكون الرئيس للبروتين (Kramer, 2000).

غالبا ما يوجد عنصر النتروجين بعدة أشكال إما بحالة حرة مثل غاز النتروجين (N_2) أو على شكل مركبات لا عضوية ايونية والتي أكثرها أهمية هي النترات (NO_3^-) والنتريت (NO_2^-) والامونيا (NH_3).

يستعمل النتريت بوصفه مادة حافظة لمنتوجات اللحوم والأسماك (Hassan *et al*., 2003). وهو إحدى الملوثات المنتشرة في المياه الطبيعية والفضلات من الأسمدة أو الإضافات المقصودة من النتريت للسيطرة على الصدأ أو لحماية منتوجات اللحوم (Habib, 2011). وان 80% من سرطان الإنسان مصدره من العوامل البيئية المقترنة بالطعام والماء والهواء (Karimzadeh *et al*., 2010). وتقدر الجرعة القاتلة للإنسان بمعدل (33-250) ملي غرام من النتريت لكل كيلو غرام من وزن الجسم (Hassan *et al*., 2003).

استخدمت طرائق عديدة لتقدير النتريت مثل الطرائق الطيفية إذ تم تقدير النتريت في نماذج من الماء والتربة تعتمد على تفاعل الازوتة بين النتريت ومجموعة الامين الأولية لصبغة الثايونين Thionin ذات الشحنة الموجبة بوجود حامض الكبريتيك ويلاحظ النقصان في الامتصاص للصبغة عند الطول الموجي 600 نانوميتر ويتناسب النقصان في الامتصاص مباشرة مع تركيز النتريت وتتحسن سرعة الازوتة بإضافة البروميد مما يؤدي إلى سرعة اكتمال التفاعل ويتبع قانون بير في مدى التركيز (0.025-0.5) مايكروغرام. مللتر$^{-1}$ من النتريت وكانت قيمة معامل الامتصاص المولاري (4.1×10^4) لتر. مول$^{-1}$. سم$^{-1}$ وحساسية الطريقة 1.1 نانوغرام. سم$^{-2}$ (Dayanada and Revanasiddappa, 2007).

وهناك طرائق طيفية كثيرة لتقدير النتريت والتي تعتمد على اختلاف نواتج ازوتة كريس، إذ ينتج من ذلك صبغة ازوية (azo dye) عند اقتران ملح الدايزونيوم مع أمين اروماتي او فينول. إن الظروف التجريبية يجب أن يكون مسيطراً عليها بدقة مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وطبيعة وتركيز الكواشف التي تؤثر على شدة اللون النهائي. فمثلا الطريقة اللونية التي تعتمد على تفاعل النتريت مع محلول من الـ (Sulphanilamide) و(N-NED) N-(1-naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride. إذ يقاس اللون الاحمر الناتج عند 538 نانوميتر (Zanardi *et al*., 2002).

اقترحت طريقة طيفية حركية لتقدير النتريت تستخدم cresyl violet perchlorate بوصفها كاشفاً كروموجينياً. تعتمد هذه الطريقة الجديدة على تفاعل النتريت مع cresyl violet perchlorate ليعطي مادة وسطية صفراء اللون تظهر أيضاً زيادة في الامتصاصية مع تزايد تركيز النتريت عند 409 نانوميتر ووسط

0.2-0.3 مول/لتر من H_2SO_4 . طبقت الطريقة بنجاح لتقدير النتريت في نماذج متنوعة من مياه المجاري والمياه الطبيعية (Gürkan *et al*., 2010).

وتم تقدير النتريت والنترات بالطرائق الكروماتوغرافية بشكل غير مباشر وذلك بربط تقنية الكروماتوغرافي الايوني (ion chromatography) مع مكشاف تفلور والاعتماد على اخماد تفلور التربتوفان في الطور المتحرك من قبل النتريت في النموذج. وكانت شدة اخماد الفلورة تتناسب مع تركيز النتريت والنترات في المدى (1-25) ملي غرام. لتر$^{-1}$ من النتريت و(3-65) ملي غرام. لتر$^{-1}$ من النترات وبلغ الخطأ النسبي 2.8% لمحلول يحتوي على 5 ملي غرام. لتر$^{-1}$ نتريت و10 ملي غرام. لتر$^{-1}$ نترات. تمتاز هذه التقنية المترابطة بالحساسية والسرعة والدقة ويمكن استخدامها في التقدير الكمي والنوعي للنتريت والنترات في التربة والمواد الغذائية(Stalikas *et al*., 2003).

وكذلك تمت دراسة تقدير النتريت باستخدام قطب لقياس ايون النتريت في الماء الصافي ويتكون القطب من طبقة من الكوبلت المرسب كهربائيا على قرص من النحاس (Φ=3.1) ملم ويستطيع القطب تقدير اقل كمية من النتريت بحدود (0.2) مايكرومول. لتر$^{-1}$ وبمدى تقدير مقداره (0.4-2) مايكرومول. لتر$^{-1}$ من النتريت (Soropogui *et al*., 2007).

تم في هذا البحث تطوير طريقة طيفية لتقدير النتريت اعتمادا على تفاعل الازوتة والاقتران وكانت شدة اللون الناتج تتناسب وكمية النتريت في المحلول.

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة:

1- جهاز Shimadzu UV – 160 recording spectrophotometer ذي الشعاع المزدوج مع خلايا زجاجية ذات مسار ضوئي مقداره (1) سم.

2- جهاز قياس الدالة الحامضية HANNA pH 211 Microprocessor pH meter.

3- حمام مائي من نوع Memmert 854 Schwa Bach.

المواد والمحاليل الكيميائية المستخدمة:

كانت المواد الكيمياوية المستخدمة على اعلى درجة من النقاوة المتوفرة.

المحلول الاحتياطي للنتريت (100 مايكروغرام. مللتر$^{-1}$)

تم وزن 0.015 غم من نتريت الصوديوم (BDH) وذوب في ماء مقطر ثم وضع في قنينة حجمية سعة 100 مللتر واكمل الحجم الى العلامة ونقل المحلول الى قنينة ذات لون داكن إذ تم حفظه بدرجة حرارة ~5°م ويكون هذا المحلول مستقرا لمدة شهر على الأكثر (Younis, 1998).

محاول النتريت العامل (10 مايكروغرام. مللتر$^{-1}$)

وضع 10 مللتر من المحلول المحضر أعلاه في قنينة حجمية سعة 100 مللتر وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى العلامة ثم نقل هذا المحلول إلى قنينة ذات لون داكن وحفظ بدرجة حرارة ~5°م ويكون هذا المحلول مستقرا لمدة ثلاثة شهور على الأكثر (Younis, 1998).

محاول عامل الاقتران (1-نفثيل ثنائي الامين ثنائي الهيدروكلوريد)(0.1%).

تم وزن (0.1) غم من [N-(1-naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride (N-NED)] (Molekula) وذوب بالماء المقطر ثم وضع في قنينة حجمية سعة 100 مللتر وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى العلامة ثم حفظ المحلول في قنينة داكنة ليكون مستقرا لمدة أسبوعين على الأكثر (Younis, 1998).

محاول ميتا-نايتروانيلين المتراكب (MNA) (0.04%)

تم وزن 0.04غم من ميتا-نايتروانيلين وذوب في 5 مللتر من الماء المقطر وسخن المحلول حتى أذيب معظم الامين ثم أضيف 21.2 مللتر من حامض الهيدروكلوريك المركز وأكمل الحجم إلى 100 مللتر في قنينة حجمية ذات سعة 100 مللتر ويكون هذا المحلول مستقرا لمدة لا تزيد عن ثلاثة ايام.

تحضير انموذج اللحم:

تم سحق 5 غم من الانموذج [bordon(brazil) pro.2011/5,exp.2013/5] لكي يكون النموذج متجانسا ثم نقل الى بيكر حجم 50 مللتر وأضيف إليه 10 مللتر من ماء ساخن (80°م) وتم تحريكه بقوة للحصول على تجانس اكبر نقل بعد ذلك المزيج الى بيكر سعة 250 مللتر واضيف اليه 70 مللتر من الماء المقطر الساخن ثم وضع البيكر المحتوي على المزيج في حمام بخاري لمدة ساعتين وبعد مضي الساعة الاولى من الزمن اضيف الى المزيج 1 مللتر من كلوريد الزئبقيك المشبع (1 غم من كلوريد الزئبقيك ذوب في 10 مللتر ماء مقطر) وبعد التبريد الى درجة حرارة المختبر رشح المحلول ونقل الى قنينة حجمية سعة 100 مللتر وأكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر.

واجريت الخطوات نفسها المذكورة في تحضير النموذج أعلاه على حجم 5 مللتر من الماء المقطر لاستخدامه كمحلول صوري (blank) (Younis, 1998).

تحضير أنموذج التربة

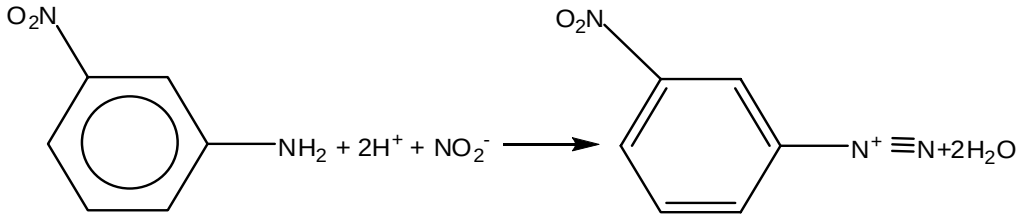
تم تحضير أنموذج التربة وذلك بوزن 0.5غم من النموذج (التربة المستخدمة في الحدائق أخذت من حي الخضراء) ثم وضع في بيكر سعة 50 مللتر، ثم أضيف إليه 4×5 مللتر (1% Na_2CO_3)، إذ رشح الناتج المستخلص بعد كل إضافة ووضع في قنينة حجمية سعة 25 مللتر وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى العلامة، ولتقدير النتريت أستخدم مباشرة 4 مللتر من المحلول المستخلص (Revanasiddappa *et al*., 2001).

النتائج و المناقشة

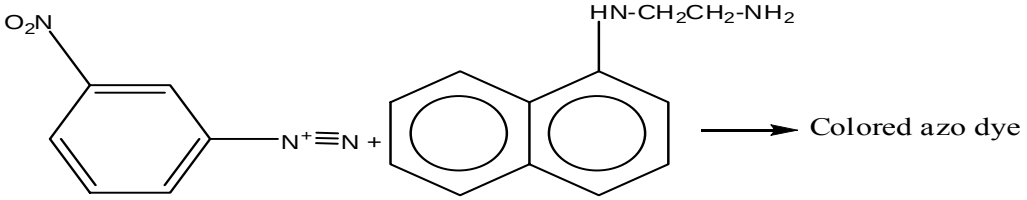
تم استخدام 10 مايكروغرام من النتريت في حجم نهائي مقداره 25 مللتر للتجارب اللاحقة.

مبدأ الطريقة:

يتفاعل النتريت مع ميتا-نايتروانيلين في وسط حامضي لتكوين ملح الدايزونيوم وكما في المعادلة الآتية:



ثم يقترن ملح الدايزونيوم مع الكاشف N-NED لتكوين صبغة ملونة:



ولوحظ أن شدة لون الصبغة المتكونة يعتمد على كمية النتريت الموجود أصلا في المحلول.

البحث عن الأمثل من الظروف التجريبية

تمت دراسة جميع العوامل التي تساهم في جعل الطريقة انسب ما تكون للتحليل الروتيني للنتريت في نماذج مختلفة.

تأثير كمية الحامض على الازوتة:

عند دراسة هذا التأثير، تم استخدام 1 مللتر من محلول النتريت والحاوي على 10 مايكروغرام منه ثم أضيف إليه 1 مللتر من محلول الامين (0.04%) ثم أضيف (0.5-7) مللتر من الحوامض المختلفة وأضيف 1 مللتر من محلول N-NED (0.1%) ثم اكمل الحجم الى 25 مللتر وقيست شدة الامتصاص عند الطول الموجي 530 نانوميتر مقابل المحلول الصوري لكل محلول. وتبين النتائج في الجدول (1) تأثير كميات مختلفة من الحوامض على ازوتة (m-nitroaniline) ومن ثم شدة لون الصبغة الناتجة.

الجدول 1: يبين تأثير كمية الحوامض المختلفة على شدة الامتصاص.

Acid solution used(0.5M)	Absorbance/ml of acid used for the diazotization reaction							
	0	0.5	1	2	3	4	5	7
HCl	0.001	0.365	0.403	0.420	0.425	0.428	0.430	0.430
H_3PO_4	0.002	0.086	0.100	0.136	0.156	0.105*	0.125	0.110
H_2SO_4	0.002	0.107	0.113	0.160	0.200	0.096*	0.103	0.161
CH_3COOH	0.001	0.029	0.038	0.055	0.074	0.057*	0.063	0.078

* وذلك لتغير لون الصبغة من الأرجواني إلى البرتقالي المصفر، وهذه الظاهرة غريبة إلى حد ما ولم نجد لها تفسير.

من خلال النتائج الملاحظة في الجدول (1) نجد ان حامض الهيدروكلوريك أعطى أفضل النتـائج مـن حيث الامتصاصية وكان لون الصبغة في جميع الكميات ارجوانياً ثم استخدم 5 مللتر من محلول 0.5 مولاري من حامض HCl. وكانت امتصاصية المحلول الصوري في الجدول أعلاه تساوي 0.000 تقريبا.

تأثير كمية الامين:

يبين الجدول الاتي تأثير كمية (MNA) m-nitroaniline على شدة امتصاص الصبغة الناتجـة وعنـد استخدام كميات مختلفة من النتريت.

الجدول 2: يبين تأثير كمية الامين على شدة الامتصاص.

mL of (MNA) (0.04%) soln.	Absorbance/µg of nitrite added							
	1	5	10	20	30	50	A_W^B	r^2 (Determination coefficient)
0.5	0.056	0.223	0.428	0.842	1.253	1.943	0.000	0.9894
1.0	0.049	0.227	0.425	0.835	1.263	2.071	0.000	0.9930
2.0	0.052	0.230	0.433	0.848	1.237	2.052	0.000	0.9922
3.0	0.050	0.222	0.430	0.863	1.238	2.066	0.000	0.9930
5.0	0.052	0.223	0.443	0.863	1.265	2.041	0.000	0.9922
7.0	0.050	0.224	0.431	0.847	1.283	2.060	0.000	0.9928

تم اختيار القيمة المثلى لكمية الكاشف MNA من الجدول (2) اعتمادا على قيمة معامـل التقـدير إذ أن أعلى قيمة لمعامل التقدير كانت عند استخدام (1 و 3 مللتر) من محلول 0.04% من الكاشف. وعليـه تـم استخدام 1 مللتر من محلول 0.04% من كاشف ميتا-نايتروانيلين في التجارب اللاحقة.

كما لوحظ ان امتصاصية المحلول الصوري ضد الماء المقطر عند الطول الموجي الأعظـم للمحلـول القياسي كانت 0.000 تقريبا.

تأثير كمية عامل الاقتران N-NED

في هذه الفقرة تمت دراسة تأثير كميات مختلفة من الـ N-NED مع كميات مختلفة مع النتريت علـى شدة امتصاص الصبغة المتكونة وكما مبين في الجدول (3).

الجدول 3: يبين تأثير كمية الـ N-NED على شدة الامتصاص.

mL of N-NED (0.1%) soln.	Absorbance/µg of nitrite added							
	1	5	10	20	30	50	A_W^B	r^2 (Determination coefficient)
0.5	0.049	0.222	0.444	0.853	1.269	2.073	0.000	0.9932
1.0	0.045	0.201	0.425	0.855	1.258	2.035	0.000	0.9944
2.0	0.050	0.222	0.434	0.856	1.260	2.055	0.000	0.9929
3.0	0.048	0.222	0.432	0.849	1.255	2.046	0.000	0.9929
5.0	0.053	0.219	0.434	0.856	1.251	2.063	0.000	0.9933

من خلال الجدول (3) تم اعتماد (1 مللتر) من محلول N-NED (0.1%) في التجارب اللاحقة لان قيم شدة الامتصاص في الصبغة الناتجة جيدة بالإضافة الى ذلك ان قيمة معامل التقدير جيدة أيضا.

تأثير المواد الفعالة سطحيا (Surfactants):

تضاف المادة الفعالة سطحيا عادة الى وسط التفاعل لزيادة شدة اللون وبالتالي تزداد حساسية الطريقـة ولذلك تم اختيار بعض عوامل الشد السطحي ومنها:

Sodium dodecyl sulphate (anionic surfactant, SDS).
Cetyltrimethylammonium bromide (cationic surfactant, CTAB).
Iso-Octylphenoxy polyethoxy ethanol (nonionic surfactant, Triton X-100).

والنتائج مبينة في الجدول (4).

الجدول 4: يبين تأثير عوامل الشد السطحي على شدة الامتصاص.

surfactant * (0.2%) soln.	Before addition of N-NED reagent	After addition of N-NED reagent	Notes
No surfactant	0.429	0.429	اللون الناتج ارجواني
SDS	0.399	0.411	اللون الناتج وردي
CTAB	0.252	0.257	اللون الناتج وردي-برتقالي
Triton X-100	0.229	0.224	اللون الناتج وردي-برتقالي

*تم اضافة 5 مللتر من المادة الفعالة سطحيا.

يتبين من الجدول المتقدم أن إضافة إي عامل من عوامل الشد السطحي المذكورة في الجدول أعلاه تقلل من شدة اللون وبالتالي تقلل الامتصاص وعليه لم يستخدم أي من عوامل الشد السطحي في التجارب اللاحقة.

تأثير الزمن:

تمت دراسة تأثير الزمن على تطور اللون وفترة استقراريته تحت الظروف المثلى التي تـم الحـصول عليها، والنتائج مبينة في الجدول (5).

الجدول 5: يوضح تأثير الزمن على كمية الصبغة الملونة.

Time (min)	Absorbance/µg of nitrite added			
	5	10	20	30
ADTMI**	0.216	0.420	0.752	1.230
5	0.217	0.419	0.831	1.227
10	0.218	0.419	0.829	1.228
20	0.218	0.418	0.830	1.230
45	0.217	0.418	0.830	1.202
60	0.214	0.410	0.828	1.193

** ADTMI= After dilution to the mark immediately.

من الجدول المتقدم يتبين أن التفاعل مستقر ولمدة تزيد على ساعة واحدة لذلك تم القياس بعد 5 دقـائق من إكمال القنينة الحجمية إلى العلامة بالماء المقطر.

الجدول 6: تأثير الزمن على التخفيف إلى الحجم النهائي (25 مللتر).

Time after Addition of D.W. (min)	A_B^S
ADTMI**	0.386
5	0.383
15	0.378
20*	0.377
30*	0.358

* حصول ترسيب للصبغة قبل إضافة الماء المقطر.

** ADTMI= After dilution to the mark immediately

من الجدول أعلاه يلاحظ انه تم الحصول على اعلى امتصاصية بعد التخفيف مباشرة، او بعد خمس إلى خمس عشر دقيقة.

الجدول 7 : تأثير الزمن على اضافة الكاشف (N-NED).

After addition of (N-NED) (min)	A_B^S
ADTMI**	0.386
5	0.384
10	0.383
15	0.384
20	0.388
30	0.386

** ADTMI= After dilution to the mark immediately

في الجدول المتقدم يلاحظ انه تم الحصول على امتصاصيات متقاربة في أزمان مختلفة، وهذا يدل على عدم وجود تأثير للزمن على إضافة كاشف (N-NED) لذلك يتم إضافة كاشف (N-NED) مباشرة والاعتماد عليها في التجارب اللاحقة.

تأثير كمية الامين المتراكب (m-nitroaniline + HCl):

بغية تسهيل طريقة العمل تم مزج الامين (ميتا-نايتروانيلين) مع حامض الهيدروكلوريك المحضر وفـق الطريقة المذكورة في (صفحة 4) او الثلاثة مواد سوية (ميتا-نايترو انيلين+حامض HCl+ N-NED) وكمـا مبين في الجدول (8) و(9).

الجدول 8: تأثير كمية الامين المتراكب (m-nitroaniline + HCl).

mL of composite m-nitroaniline (0.04%) solution	Absorbance/µg of nitrite added			
	5	10	20	r^2 (Determination coefficient)
0.5	0.211	0.416	0.839	0.9460
1.0	0.221	0.431	0.865	0.9434
2.0	0.224	0.432	0.832	0.9343
3.0	0.224	0.428	0.859	0.9396
4.0	0.235	0.428	0.820	0.9209

الجدول 9 : تأثير كمية الامين المتراكب (MNA+ HCl + N-NED).

mL of composite (0.04%)	Absorbance/µg of nitrite added				
	5	10	20	30	r^2(Determination coefficient)
0.5	0.028	0.068	0.210	0.447	0.8781
1.0	0.042	0.086	0.196	0.308	0.9832
2.0	0.055	0.103	0.220	0.348	0.9782
3.0	0.059	0.112	0.227	0.342	0.9774
4.0	0.059	0.115	0.231	0.386	0.9749

لوحظ من النتائج التجريبية أن مزج الامين مع حامض الهيدروكلوريك يعطي نفس النتائج كما لو ان كل محلول اضيف إلى محلول النتريت على حدة. في حين نجد ان مزج المواد الثلاثة في محلول واحد ادى إلـى خفض الامتصاص بمقدار الـ 6/1 تقريبا وهذا يعزى إلى سرعة استهلاك النتريت من قبل الكاشف N-NED اكثر منه في حالة m-nitroaniline (MNA). لذلك تم اعتماد مزج الامين مـع الحـامض فقـط للتجـارب اللاحقة، وبما يضمن الكميات المثلى لكل منهما. وتم استخدام 1 مللتر من محلـول الامـين المتراكـب فـي التجارب اللاحقة.

تسلسل الإضافة:

لغرض دراسة تأثير تغيير تسلسل الإضافات على امتصاص المعقد الناتج. اختير عدد من التسلسلات المختلفة في اضافة المحاليل ويمكن ملاحظة النتائج في الجدول (10).

الجدول 10: تأثير تسلسل الإضافة.

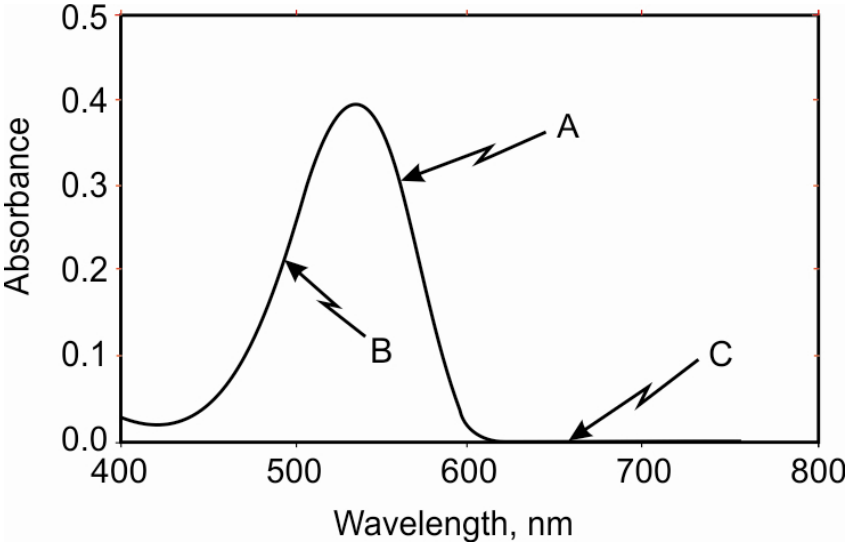
Notes	A_B^S	Order of addition
اللون الناتج ارجواني	0.421	Nitrite + composite + N-NED
اللون الناتج وردي فاتح	0.014	Nitrite + N-NED + composite
عديم اللون	0.012	N-NED +nitrite + composite
عديم اللون	0.011	N-NED + composite+ nitrite
اللون الناتج وردي فاتح	0.014	Composite + N-NED + nitrite

يلاحظ من نتائج الجدول (10) ان التسلسل الأول (المعتمد في التجارب السابقة) أعطى أعلى امتصاص للمعقد المتكون مقارنة مع بقية التسلسلات لذلك اعتمد التسلسل الأول في التجارب اللاحقة. وتبين النتائج أن فعالية الـ N-NED تجاه النتريت لتكوين مركب nitroso (والذي يكون خاملا تجاه الاقتران مع N-NED) هي أعلى من فعالية MNA تجاه النتريت لتكوين مركب الدايزونيوم.

أطياف الامتصاص:

عند إضافة كاشف الـ N-NED الى المحلول الحاوي على الامين المؤزوت وتحت الظروف المثالية التجريبية تتكون صبغة ازوية ذات لون ارجواني وتعطي اعلى شدة امتصاص عند الطول الموجي (530) نانوميتر مقارنة بالمحلول الصوري الذي لا يعطي امتصاص عند الطول الموجي المذكور.

والشكل (1) يبين طيف الامتصاص للصبغة الناتجة مقابل المحلول الصوري، وطيف الامتصاص للمحلول الصوري مقابل الماء المقطر، وطيف الامتصاص للصبغة الناتجة مقابل الماء المقطر، إذ تم استخدام الطول الموجي لأعلى شدة امتصاص (530) نانوميتر في التجارب اللاحقة.



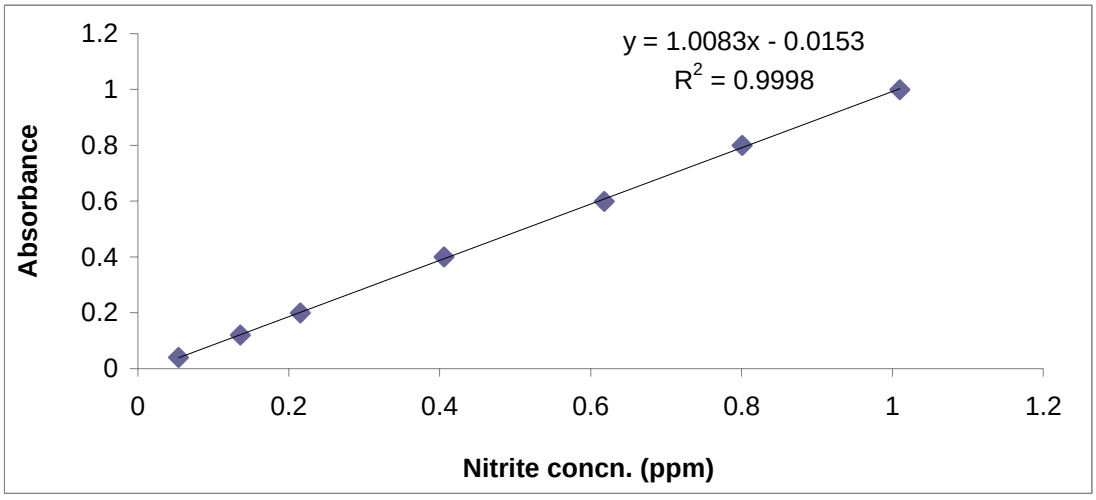
الشكل1: (A) طيف الامتصاص لـ (10 مايكروغرام نتريت/ 25 مللتر- معامل وفق الطريقـة المقترحـة) مقابل المحاول الصوري.

(B) طيف الامتصاص لـ (10 مايكروغرام نتريت/ 25 مللتر) مقابل الماء المقطر.

(C) طيف الامتصاص للمحاول الصوري مقابل الماء المقطر.

منحني المعايرة والطريقة المعتمدة:

تم نقل حجوم متزايدة من محاول النتريت القياسي (10 مايكروغرام/ مللتر) الى سلسلة مـن القنـاني الحجمية سعة 25 مللتر والتي تغطي المدى (0.25-70.0 مايكروغرام) من النتريت مـع 1 مللتـر مـن محاول MNA المتراكب ثم بعد ذلك اضيف 1 مللتر من الكاشف N-NED (0.1%) ومن ثم أكمـل الحجـم بالماء المقطر لحد العلامة. تمت قراءة الامتصاص للمحاليل ضد المحاول الصوري بعد 5 دقائق وعند الطول الموجي 530 نانوميتر والشكل (2) يمثل المنحني القياسي المستقيم لتقدير النتريت.



الشكل 2 : المنحني القياسي لتقدير النتريت بطريقة الازوتة والاقتران.

من خلال الشكل الذي حصلنا عليه يتبين ان قانون بير يكون ساريا عند مدى التركيز (0.04-1.0 جزء/مليون) ومعامل الامتصاص المولاري يساوي (4.6×10^4 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$) ومعامل حساسية سلاندل تساوي (0.1 نانوغرام/ سم^2) حيث يحدث انحراف سلبي عند تراكيز اعلى من 1.0 جزء/ مليون، ويحدث ترسيب للصبغة قبل اتمام الحجم بالماء المقطر.

وتم حساب حد الكشف (limit of detection, LOD) (Valcarcel, 2000) لتقدير النتريت بتطبيق العلاقة الرياضية الآتية :

$$LOD=\bar{X}_B + 3\sigma_B$$

حيث ان $\bar{X}_B$ هو معدل قراءات امتصاص المحلول الصوري ضد الماء المقطر(n=20) وσ_B هو الانحراف القياسي للقراءات.

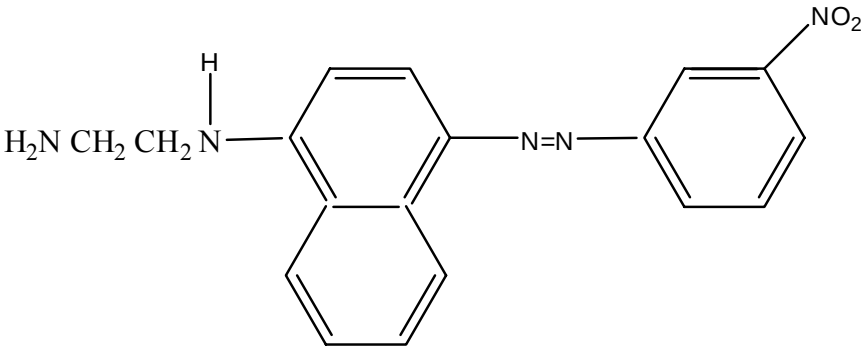
يحضر عشرون محلولاً صورياً وتقاس الامتصاصية عند 530 نانوميتر مقابل الماء المقطر ليتم إيجاد وسطها الحسابي $\bar{X}$ ومن ثم ايجاد σ، إذ وجد ان حد الكشف يساوي 0.0070 مايكروغرام. مللتر$^{-1}$ وبالطريقة ذاتها حسب حد التقدير الكمي (limit of quantitation, LOQ) (Valcarcel, 2000) وباستخدام العلاقة الرياضية الآتية:

$$LOQ=\bar{X}_B + 10\sigma_B$$

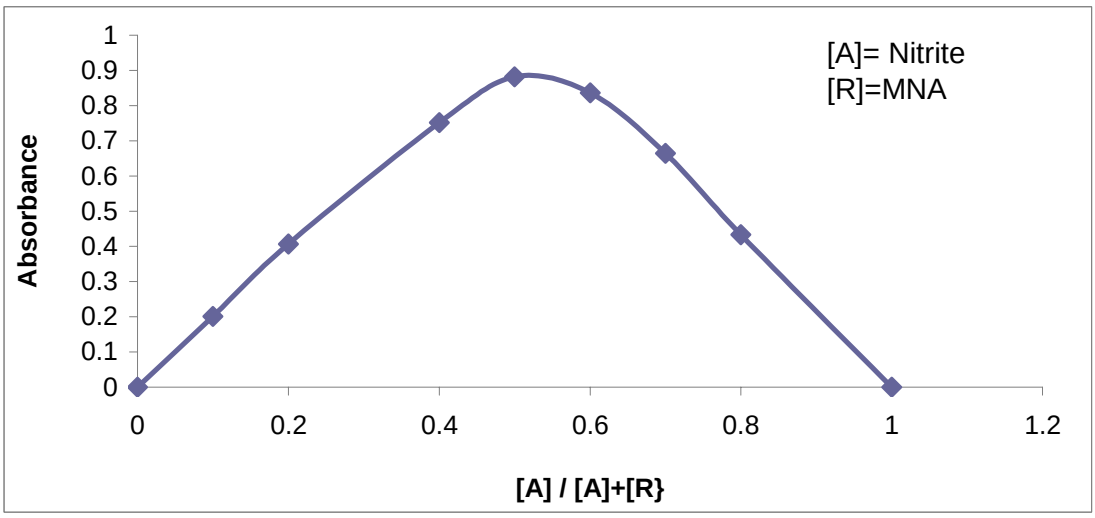
إذ وجد انه يساوي (0.0204) مايكروغرام. مللتر$^{-1}$.

طبيعة الصبغة:

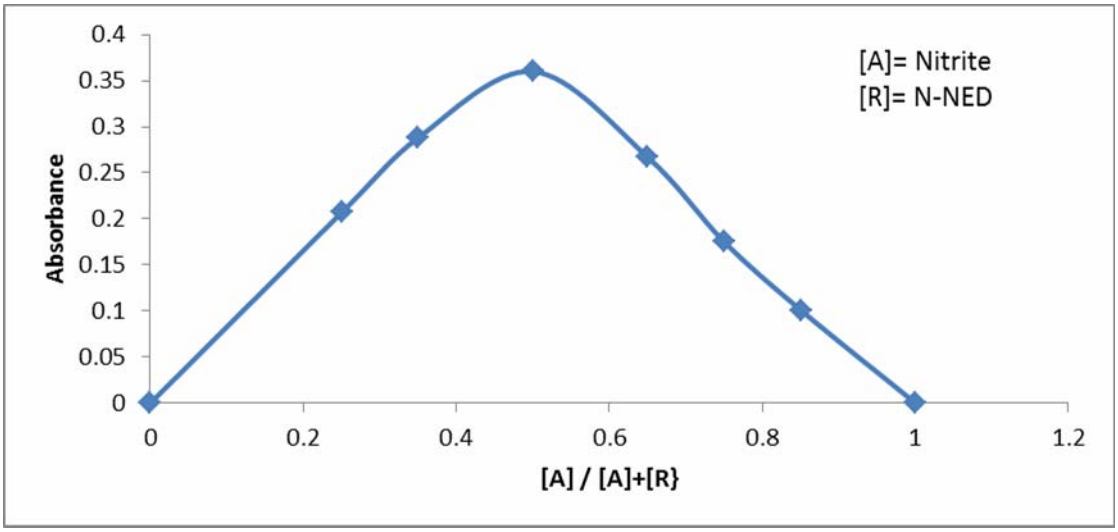
تم اعتماد طريقة التغيرات المستمرة (Job's method) بوصفها أكثر الطرائق تطبيقا لمعرفة نسبة تفاعل النتريت مع MNA ومع الكاشف N-NED حيث تؤخذ قراءات شدة امتصاص المحاليل الحاوية على كميات من النتريت (0.5-5) مللتر والامين MNA (0.5-5) مللتر بتركيز (2.2×10^{-4}) مولاري لكل منهما، وأخذت نفس الحجوم والتراكيز لمعرفة نسبة تفاعل النتريت مع الكاشف N-NED، حيث تم قياس شدة الامتصاص وفق الطريقة المعتمدة مقابل المحلول الصوري عند طول موجي (530 نانومتر) ولوحظ بان نسبة اقتران النتريت مع الـ MNA ومع N-NED هي نسبة 1:1 لكل منهما، كما وتمت دراسة نسبة اقتران الـ MNA مع الـ N-NED وبتراكيز متساوية وكانت النسبة 1:1، وتوضح الأشكال (3) و(4) و(5) ذلك على التوالي، وعليه تكون الصيغة المقترحة لصبغة الازو المتكونة على النحو الآتي:



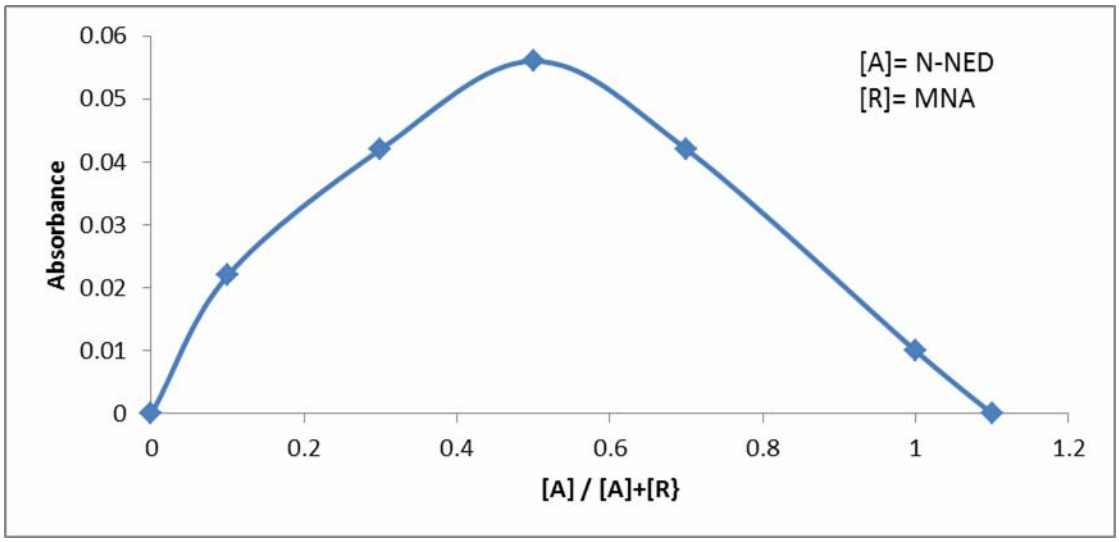
Purplish azo dye



الشكل 3: منحني التغيرات المستمرة (طريقة جوب) للصبغة المتكونة من اقتران النتريت مع الامين



الشكل 4: منحني التغييرات المستمرة (طريقة جوب) للصبغة المتكونة من اقتران النتريت مع الـN-NED



الشكل 5: منحني التغييرات المستمرة (طريقة جوب) للصبغة المتكونة من اقتران الامين مع الـ N-NED.

ثابت استقرار تكوين الصبغة:

إن ثابت الاستقرار لنسبة 1:1 لكل من النتريت مع (MNA) والنتريت مع (N-NED) يجري وفق مـا يأتي:

$$\underset{\alpha C}{A} + \underset{\alpha C}{R} \rightleftharpoons \underset{(1-\alpha)C}{AR}$$

ويمكن كتابة ثابت الاستقرارية كالآتي:

$$K = \frac{[AR]}{[A][R]}$$

فإذا كانت:

α هي درجة التفكك.

C هو التركيز النهائي للصبغة الناتجة.

فيمكن كتابة المعادلة المذكورة بالشكل الاتي:

$$K_{s_{1:1}} = \frac{1-\alpha}{\alpha^2 C}$$

ويمكن معرفة قيم α من المعادلة التالية:

$$\alpha = \frac{A_m - A_s}{A_m}$$

حيث ان:

A_m هو امتصاص المحلول الحاوي على زيادة من الكاشف.

A_s هو امتصاص المحلول الذي يحتوي نسبة مولية (1:1) من الكاشف الى النتريت.

والنتائج مبينة في الجداول الآتية:

الجدول 12: يبين ثابت الاستقرارية لنظام النتريت مع الـ MNA.

mL of NO_2^-/25 mL (2.2×10^{-4}M)	Final concn. (M)	Absorbance			K, molar^{-1}
		A_s	A_m	α	
0.5	4.4×10^{-6}	0.194	0.219	0.114	1.5×10^{7}
1.0	8.8×10^{-6}	0.342	0.406	0.157	3.9×10^{6}
1.5	13.2×10^{-6}	0.434	0.583	0.255	8.6×10^{5}
2	17.6×10^{-6}	0.684	0.796	0.140	2.5×10^{6}

الجدول 13: يبين ثابت الاستقرارية لنظام النتريت مع الـ N-NED.

mL of NO_2^-/25 mL (2.2×10^{-4}M)	Final concn. (M)	Absorbance			K, molar^{-1}
		A_s	A_m	α	
0.5	4.4×10^{-6}	0.145	0.216	0.328	1.4×10^{6}
1.0	8.8×10^{-6}	0.350	0.415	0.156	3.9×10^{6}
1.5	13.2×10^{-6}	0.545	0.620	0.120	4.6×10^{6}

الجدول 14: يبين ثابت الاستقرارية لاقتران الـ MNA مع الـ N-NED.

mL of NO_2^-/25 mL (2.2×10^{-4}M)	Final concn. (M)	Absorbance			K, molar^{-1}
		A_s	A_m	α	
1	8.8×10^{-6}	0.032	0.063	0.492	2.3×10^{5}
1	8.8×10^{-6}	0.122	0.156	0.218	1.8×10^{6}
1	8.8×10^{-6}	0.205	0.234	0.124	6.4×10^{6}

يتبين من النتائج الموضحة في الجداول (12) و (13) و (14) ان معدل ثابت الاستقرارية بين النتريت والـ (MNA) والنتريت مع الـ (N-NED) والـ (MNA) مع الـ (N-NED) في المحاليل المائية وتحـت ظروف التقدير المثلى هي 6.3×10^{6} مول$^{-1}$ ، 3.3×10^{6} مول$^{-1}$ و2.1×10^{6} مول$^{-1}$ على التوالي، وهذه القـيم لثابت الاستقرارية تدل على أن الصبغة ذات استقرارية جيدة.

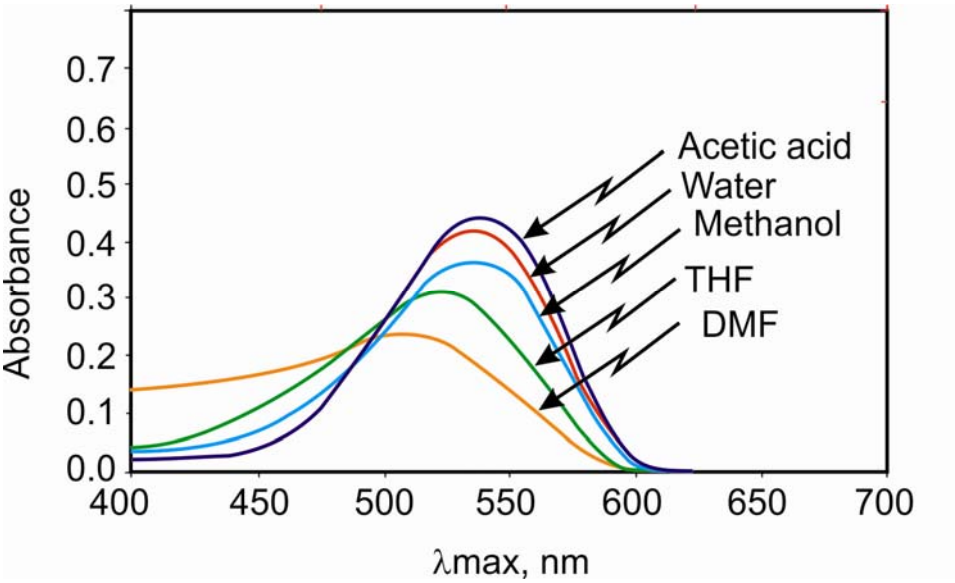
تأثير المذيبات العضوية:

تمت دراسة تأثير عدد من المذيبات العضوية على الصبغة الناتجة وذلك بتخفيف محاليل التفاعل بهذه المذيبات بدلا من الماء المقطر، وتم بعد ذلك قياس امتصاص الصبغة المتكونة في هـذه المحاليـل والنتـائج موضحة في الجدول (15).

الجدول 15: تأثير المذيبات العضوية.

Organic solvent	λ max, nm	ε, $1.mol^{-1}.cm^{-1}$
Acetic acid	540	5.09×10^4
Methanol	535	4.17×10^4
Tetrahydrofuran	521	2.62×10^4
Dimethyl formamide	510	2.72×10^4
Water	532	4.77×10^4

تبين النتائج المستحصلة من هذه الدراسة ان حامض الخليك يعطي أعلى شدة امتصاص للناتج الملـون المتكون، وعلى الرغم من ذلك تم اختيار الماء المقطر بوصفه مذيبا في التجارب اللاحقة لتوفره ورخص ثمنه وكونه غير سام.



الشكل 6: تأثير المذيبات العضوية على طيف الامتصاص.

دراسة تأثير المتداخلات:

تمت دراسة تأثير وجود بعض المتداخلات لمعرفة انتقائية الطريقة على تقدير النتريت (NO_2^-) وتعتمد الطريقة على إضافة كميات مختلفة (50، 100، 200، 500، 1000) مايكروغرام. مللتر$^{-1}$ من المتـداخلات الى قنانٍ حجمية سعة 25 مللتر حاوية على 10 مايكروغرام. مللتر$^{-1}$ من النتريت ثم اضيفت بقية المحاليـل بكمياتها المثلى واكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر وقيس الامتصاص عند الطول الموجي 530 نانوميتر مقابل المحلول الصوري وقورنت النتائج مع امتصاص محلول قياسـي يحتـوي علـى 10 مـايكروغرام. مللتر$^{-1}$ من النتريت و1 مللتر من الـ (Composite reagent) و 1 مللتـر مـن كاشـف الـ (N-NED) (0.1%) من دون إضافة أية كمية من المتداخلات إليه والنتائج مبينة في الجدول (16).

الجدول 16: تأثير المتداخلات على تقدير 10 مايكروغرام من النتريت.

Interferent	Form added	Recovery % of 10µg nitrite per µg of foreign compound added.				
		50	100	200	500	1000
HCO_3^-	$NaHCO_3$	101.2	101.2	102.5	101.2	104
Br^-	KBr	79.6	71.3	Turbid	Turbid	Turbid
CO_3^{2-}	Na_2CO_3	101.2	100	99.7	100	100
I^-	KI	76.8	73.8	69.3	58.7	54.0
Fe^{3+}	$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	92.8	95.0	94.0	107.9	117.8
Pb^{2+}	$Pb\ (NO_3)_2$	97.7	99.0	102.7	102.7	102.0
Mn^{2+}	$MnCl_2.4H_2O$	101.4	99.2	100	97.0	99.2
Hg^{1+}	$HgNO_3.H_2O$	101.0	101.0	100.2	102.0	101.2
$H_2PO_4^-$	NaH_2PO_4	104.0	102.0	102.0	101.4	94.5
Zn^{2+}	$Zn(OOCCH_3)_2.\ 2H_2O$	100.2	-	100	-	101.2
Al^{3+}	$AlCl_3.6H_2O$	139.4	138.0	134.0	134.0	135.1
NH_4^{1+}	NH_4Cl	103.6	103.0	98.0	99.7	88.7
Cl^-	NaCl	98.7	97.5	97.3	98.7	98.5
$Cr_2O_7^{2-}$	$K_2Cr_2O_7$	99.0	94.1	94.1	174.1	181.2
F^-	NaF	100.2	100.2	100.2	99.7	93.4
NO_2^-	NH_4NO_3	100.0	100.0	100.7	99.7	89.5
NO_3^-	$NaNO_3$	100.0	99.0	100.7	99.0	92.9
K^+	KCl	101.2	101.2	102.1	100.0	87.0
SO_4^{2-}	Na_2SO_4	102.1	102.0	99.0	100.0	87.3
S^{2-}	$Na_2S.2H_2O$	40.6	29.9	22.9	19.0	17.7
SO_3^{2-}	Na_2SO_3	95.0	97.7	97.8	89.9	74.4
Na^+	NaCl	99.5	99.7	100.0	99.5	90.2
MnO_4^-	$KMnO_4$	78.4	80.2	49.2	36.6	21.8
Fe^{2+}	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	96.0	94.3	93.8	91.5	70.4
Ba^{2+}	$BaCl_2$	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7
Sr^{2+}	$SrCl_2$	96.2	99.0	101.4	103.0	103.0
Be^{2+}	$BeSO_4.\ 4H_2O$	96.7	97.4	99.2	99.7	99.0
Formaldehyde	H_2CO	99.0	100.0	100.0	98.5	93.8
Glucose	----	96.4	100.0	99.7	99.7	99.0
Lactose	----	98.6	99.0	99.0	99.7	99.0

يتبين من الجدول (16) ان الطريقة تمتاز بانتقائية جيدة عند استخدام (30) ايون موجب وسالب بوصفه متداخلاً باستثناء بعض الايونات الموجبة مثل: Al^{3+} و Fe^{2+} وFe^{3+} والايونات السالبة Br^- وI^- وS^{2-} و MnO_4^- وفي التراكيز العالية NH_4^+ و $Cr_2O_7^{2-}$ و K^+ و SO_3^{2-} و SO_4^{2-}.

تطبيق الطريقة:

أولا: تقديرات المياه:

أ- تقدير النتريت في ماء الصنبور (Tap water)

النتريت هو احد الملوثات الموجودة في الغلاف الجوي والمياه الطبيعية وهو ناتج وسطي مهم في دورة النتروجين. الزيادة من النتريت والنترات عن الحدود المسموح بها في مياه الشرب (drinking water) مرتبطة بالإصابة بالـ (Mathemeglobmenia) (الهيموكلوبين غير الفعال لنقل الأوكسجين) عند الأطفال والتعرض الطويل ممكن أن يسبب مرض السرطان (Narayana and Sunil, 2009).

الجدول 17: تقدير النتريت في ماء الصنبور.

Sample	mL of sample	NO_2^- added (µg)	Recovery (%)
Tap water	1	10	78.8
	3	10	64.4
	5	10	52.8

Standard = بدون اضافة الـ Tap water.

يلاحظ أن إضافة النتريت إلى ماء الصنبور يؤدي إلى استرجاعية واطئة وهذا قد يعزى إلى تجزؤ ملح الدايزونيوم بواسطة ايونات الفلزات الموجودة في الماء. وللتغلب على هذه المشكلة تم إضافة محلول 0.1M من EDTA إلى النماذج والمحاليل القياسية والنتائج موضحة في جدول (18).

الجدول 18: تأثير إضافة EDTA كعامل حجب.

Sample	mL of (0.1M) EDTA soln.	NO_2^- added (µg)	Recovery (%)
Tap water (1mL)	0	10	78.8
	1	10	98.0
	2	10	97.5
	3	10	96.3
	4	10	91.2

من خلال الجدول أعلاه نلاحظ أن 1 مللتر من عامل الحجب (EDTA) تكون كافية لحجب المتداخلات المتواجدة في ماء الصنبور الـ (Tap water).

الجدول 19: تسلسل إضافة الـ (EDTA) المستخدم كعامل حجب.

Order of addition	A_B^S
T.W.+NO_2^-+comp. + N-NED	0.375
T. W. +EDTA + NO_2^- +comp. + N-NED	0.406
T. W. +NO_2^- +EDTA + comp. + N-NED	0.373
T. W. + NO_2^- + comp. + EDTA + N-NED	0.364
T. W. + NO_2^- + comp. + N-NED + EDTA	0.373
NO_2^- +comp. + N-NED	0.412

T. W. = Tap water. ماء الصنبور (1mL volume).
Comp. = composite amine solution (MNA + HCl conc.)

يلاحظ من نتائج الجدول (19) ان التسلسل الثاني المعتمد في التجارب السابقة أعطى أعلى امتـصاصية للمعقد المتكون ومقارنة مع بقية التسلسلات لذلك تم الاعتماد عليه.

ب- تقدير النتريت في ماء البحر (Sea water):

الجدول 20: تقدير النتريت في ماء البحر.

Sample	mL of sample	NO_2^- added (µg)	Recovery (%)
sea water	1	5	99.5
		10	100
	3	5	97.2
		10	99.5
	5	5	95.3
		10	97.8

ملاحظة: تم استخدام ماء البحر بعد مرور عام على خزنه في المختبر تحت الظروف المختبرية.
ماء البحر من البحر الابيض المتوسط في سوريا.

تؤكد النتائج المستحصلة من الجدول (20) نجاح الطريقة المقترحة لتقدير النتريت في نموذج ماء البحر.

الجدول 21: تأثير إضافة EDTA كعامل حجب.

Sample	mL of (0.1M) EDTA soln.	NO_2^- added (µg)	Recovery (%)
sea water (5mL)	0	5	95.3
		10	97.8
	1	5	100.0
		10	100.4
	2	5	98.1
		10	99.8
	3	5	99.5
		10	100.0
	4	5	100.0
		10	100.2

نلاحظ بان إضافة كميات من الـ EDTA أدت إلى تحسن في استرجاعية النتريت، وقد يعزى ذلك إلى حجب ايونات في ماء البحر تؤدي إلى تجزئة ملح الدايزونيوم عند وجود تلك الايونات بحالة حرة.

ثانيا: تقدير النتريت في التربة Soil Sample:

يتواجد النتريت بالطبيعة في الماء وفي التربة وفي النباتات لكن المصدر الرئيسي له يأتي من النتـرات عن طريق تغيرات حيوية او تفاعلات اختزال بواسطة بكتريا ازالـة النترجـة (Natachit and Wingijkul, 2007).

تتحول النترات NO_3^- الى نتريت NO_2^- والعكس بالعكس عن طريق دورة النتروجين (عملية النترجـة) وكما في المعادلة ادناه (Johnson *et al.*, 2005):

$$NH_4^+ \rightleftharpoons NO_2^- \rightleftharpoons NO_3^-$$

Ammonium nitrite nitrate

تكون عملية النترجة سريعة عندما تكون التربة رطبة ومشبعة بالهواء ودرجة حرارتها تتراوح ما بـين (67-86 فهرنهايت) لكن في الحقيقة تكون متوقفة عندما تكون درجة الحرارة دون (41° فهرنهايت) واعلـى من (122° فهرنهايت) (Johnson *et al.*, 2005) والنتائج لتقدير النتريت في التربة موضـحة فـي جـدول (22).

الجدول 22: تقدير النتريت في التربة.

Nitrite found, ppm	A_B^S	mL of soil sample
11.6	0.037	4
	0.038	4
	0.038	4
	0.039	4
	0.038	المعدل

ثالثا: تقدير النتريت في اللحم:

تستخدم مادة نتريت الصوديوم في حفظ اللحوم لكونها تمنع نمو البكتريا وتكاثرها لأعطاء اللون الاحمر القاتم للحم من خلال تفاعلها مع المايوكلوبين الموجود فيه (Wikipedia, 2009).

وبسبب السمية العالية للنتريت (الجرعة القاتلة للحم البقري تكون في حدود 22 ملغم لكل كيلوغرام مـن وزن الجسم) لذلك يكون الحد الاقصى المسموح به لكمية النتريت في اللحم المعالج هو 200 جزء بـالمليون (Wikipedia, 2009)، لذلك فان تقدير النتريت في اللحوم يكون ضروريا جدا. وعند تطبيق الطريقة الحاليـة لتقدير كمية النتريت في اللحم المعلب، لوحظ ان النتائج المستحصلة كانت واطئة، واشير في الادبيات إلى ان حامض الاسكوربيك يضاف مع النتريت كمادة حافظة للحوم أيضاً لذا يعزى سبب النتائج الواطئة إلى وجـود حامض الاسكوربيك، وعليه تم التخلص من تأثيره قبل تطبيق الطريقة وذلك من خلال اضافة عامل مؤكـسد انتقائي لحامض الاسكوربيك الا وهو ايون الحديد الثلاثي، والنتائج موضحة في الجدول (23).

الجدول 23: دراسة تأثير حامض الاسكوربيك كمتداخل في اللحم وكيفية حجبه.

$^*NO_2^-$, µg	mL of A.A.** 2.17×10^{-4}M	mL of Fe^{3+} 5×10^{-4}M	A_B^S Without Fe^{3+}, with A.A.	A_B^S With Fe^{3+}, with A.A.
10	0	0	0.413	0.413
10	0.2	5	0.381	0.404
10	0.3	5	0.373	0.406
10	0.5	5	0.366	0.402
10	0.7	5	0.361	0.414
10	1.0	5	0.328	0.411
10	2.0	5	0.291	0.411
10	3.0	5	0.273	0.417
10	4.0	5	0.246	0.387
10	5.0	5	0.238	0.351

* 10 µg/ml nitrite ≡ 2.17×10^{-4}M

** A.A.= Ascorbic acid

يتبين من النتائج في أعلاه إن تأثير حامض الاسكوربيك السلبي بدأ يزول عند إضافة ايون الحديد الثلاثي وبكمية 5 مللتر من تركيز 5×10^{-4} مولاري منه. وعليه عند تطبيق الطريقة في تقدير النتريت في اللحم المعاب تم اضافة 5 مللتر من محلول 5×10^{-4} مولاري من ايون الحديديك إلى كل من النماذج والمحاليل القياسية، والنتائج المستحصلة مبينة في جدول (24).

الجدول 24: تقدير النتريت في اللحم.

Meat, Sample	Sodium nitrite found (ppm)		Nitrite present in Beef, ppm (Shiddiky *et al.*, 2009)	$t_{exp.}$
	Present Method	Literature method (Al-Taweal, 2010)		
Bordon (Brazil)	8.28±0.002	8.5±0.03	1.1-155	1.5

تشير النتائج في الجدول (24) إلى ان قيم t التجريبية المحسوبة هي اقل من t الحرجة (المثبتة في الجداول الإحصائية) (Christian, 2004) عند مستوى ثقة (95%) ولثمان درجات حرية والبالغة 2.306 ويشير هذا إلى ان الاختلاف غير معنوي بين الطريقة المقترحة والطريقة القياسية المعتمدة، مما يدل على ان الطريقة المقترحة ذات صلاحية تطبيق ودقة جيدة.

مقارنة الطريقة:

تمت مقارنة الطريقة مع مثيلاتها من الطرائق الطيفية المعتمدة، والجدول الآتي يبين تلك المقارنة.

الجدول 25 : مقارنة طرائق تقدير النتريت.

Parameters	Present method	p-Aminoazobenzene method(Al-Taweal, 2010)
pH	0.26	0.49
λ max, nm	530	584
ε, 1. $mol^{-1}.cm^{-1}$	$4.6x10^4$	5.57×10^4
Beer's law range, ppm	0.04-1.0	0.1-1.6
Sensitivity index, ng. cm^{-2}	0.1	0.82
Time for colour development, min	5	10
Accuracy	----	----
Precision, RSD%(n=5)	0.6	1.8
Cost of reagent	Cheap	Cheap
Toxicity of reagent	----	----
Colour of dye	Purplish	Violet
K, M^{-1}	6.3×10^6 , 3.3×10^6 and 2.1×10^6	$2.09x10^5$ and $10.2x10^5$
Application of the method	Application to meat, sea water, tap water and soil sample	Application to meat only

إن النتائج المستحصلة في الجدول (25) تبين ان الطريقة الحالية تمتاز بالحساسية العالية وإمكانية أوسع للتطبيق حيث أن الطريقة باستخدام كاشف (p-Aminoazobenzene) تحتاج إلى كمية من مـذيب عـضوي (acetone) لإذابته في حين أن الطريقة الحالية باستخدام كاشف (m-nitroaniline) لا تحتـاج إلـى مـذيب عضوي لعملية إذابته.

كما أن (p-Aminoazobenzene) يكون محلوله مستقرا لمدة ثلاث ساعات فقط في حـين أن محلـول (m-nitroaniline) يكون مستقرا لمدة ثلاثة أيام على الأكثر.

ولزيادة استقرارية اللون للصبغة الناتجة من طريقة (p-Aminoazobenzene) نحتاج إلى إضافة عامل شد سطحي (SDS) في حين أن الطريقة الحالية (m-nitroaniline) لا تحتاج إلى إضافة أي من عوامل الشد السطحي لزيادة استقرارية اللون الناتج حيث يكون اللون للصبغة الناتجة مستقرا لمدة ساعة على الأقل.

المصادر

Al-Taweal, M.S.M. (2010). Colorimetric determination of nitrite via diazotization coupling reaction application to meat. H.D. Thesis, Mosul University, pp. 24-25.

Christian, G.D. (2004). "Analytical Chemistry". 6th ed., John Wiley and Sons, I ,c., New York, 90 p.

Dayananda, B.P.; Revanasiddappa, H.D. (2007). A facile analytical method for the determination of nitrite in water and soil samples . *Electro. J. Environ., Agric. Food Chem*., **6**(8), 2263-2271.

Gürkan, R.; Ulusoy, H.I.; Akcay, M. (2010). A new analytical method for the kinetic spectrophotometric determination of trace amount of nitrite in some environmental water samples. *Eurasian J. Anal. Chem*., **5**(1), 16-31.

Habib, I.H.I. (2011). Anodic stripping voltammetric determination of nitrite using carbon paste electrode modified with chitosan. *Amer. J. Anal. Chem.*, **2**, 284-288.

Hassan, S.S.M.; Marzouk, S.A.M.; Sayour, H.E.M. (2003). Selective potentiometric determination of nitrite ion using a novel (4-sulphophenylazo-)1-naphthylamine membrane sensor. *Talanta*, **59**, 1237-1244.

Johnson, C.; Albrecht, G.; Ketterings, Q.; Beckman, J.; Stockin, K. (2005). Nitrogen basics-the nitrogen cycle. Agronomy Fact Sheet Series, (http://nmsp.css.cornell.edu).

Karimzadeh, L.; Koohdani, F.; Mahmodi, M.; Safari, F.; Babaee, Z. (2010). Determination of nitrate and nitrite residues in smoked Caspian kutum, rutilus frisii kutum and mullet, Liza auratus in the north of Iran. *World J. Fish and Marine Sci*., **2**(1), 62-65.

Kramer, D.A. (2000). "Nitrogen", U.S. Geological survey mineral yearbook. Canada, 55.1. (http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/nitrogen).

Nantachit, K.; Winijkul, D. (2007). Nitrate and nitrite contents of vegetables marketed in chiang mai province. *CMU. J. Nat. Sci*., **6**(2), 349-350.

Narayana, B.; Sunil, K. (2009). A spectrophotometric method for the determinatioin of nitrite and nitrate. *Eurasian J. Anal. Chem*., **4**(2), 204-214.

Revanasiddappa; Kumar, K.; Bilwa, M. (2001). A facile spectrophotometric determination of nitrite using diazotization with p-nitroaniline and coupling with acetylacetone. Mikrochim. *Acta*., **137**, (249-253).

Shiddiky, M.J.A.; Lee, K.S.; Son, J.; Park, D.S.; Shim, Y.B. (2009). Development of extraction and analytical methods on nitrite ion from food samples: microchip elecrtrophoresis with a modified electrode. *J. Agri. Food Chem*., **57**(10), 4051-4057.

Soropogui, K.; Sigaud, M.; Vittori, O. (2007). A cobalt film electrode for nitrite determination in natural water. *Electroanal*., **19**(24), (2559-2564).

Stalikas, C.D.; Konidari, C.N.; Nanos, C.G. (2003). Ion Chromatographic method for the simultaneous determination of nitrite and nitrate by post-column indirect fluoresence determination. *J. Chromatogr*. Part A, **1002**(1-2), (237-241).

Valcarcel, M. (2000). "Principle of Analytical Chemistry". Spring-verlag, Berlin, p. 207 and 69.

Veena, K. ; Narayana, B. (2009). Spectrophotometeric determination of nitrite using new coupling agents. *Indian J. Chem. Technology*, **16**, pp.89-92.

Wikipedia, the free encyclopedia. nitrite (2009). (http://en.wikipedia.org/wiki/nitrite).

Younis, Th. I. (1998). Spectrophotometric application of diazometry. Ph.D. Thesis, University of Mosul, College of Science, pp.120-150.

Zanardi, E.; Dazzi, G.; Madarena, G.; Chizzolini, R. (2002). Comparative study on nitrite and nitrate ions determination. *Ann. Fac. Medic. Vet. Di parma*, **22**, 79-86.