

การหาปริมาณไนโตรเจนและไนเตรท

โดยเทคนิครีเวอร์สเฟส-ไอออนอินเทอร์แอคชันโครมาโทกราฟี

บทคัดย่อ

ไส้กรองเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสำเร็จรูปชนิดหนึ่ง ที่ต้องใช้สารกันเสียเพื่อรักษาคุณภาพสารที่ใช้กันแพร่หลายได้แก่ ดินประสิว (KNO_3) และสารประกอบของกลุ่มไนเตรท-ไนโตรท สารเหล่านี้ทำหน้าที่ถนอมรักษาให้ผลิตภัณฑ์เก็บไว้ได้นาน และมีรสขมได้จากการศึกษาวิจัยกันมากเกี่ยวกับพิษภัยของสารประเภทนี้ และพบว่าจะทำให้เกิดพิษภัยต่อร่างกายได้ถ้าใช้โดยไม่ระมัดระวัง การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท-ไนโตรทในอาหารจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยทั่วไปแล้ววิธีมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์สามารถทำได้โดยวิธีสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ซึ่งทำได้โดยการออกซิไดซ์ (oxidize) หรือ รีดิวซ์ (reduce) สารในตัวอย่างให้อยู่ในรูปของไนเตรทหรือไนโตรท ซึ่งขั้นตอนการทำงานนั้นค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน เพื่อที่จะขจัดปัญหาเหล่านี้ จึงได้นำเสนอวิธีวิเคราะห์แบบใหม่โดยหาปริมาณไนโตรท และไนเตรทได้พร้อมกันโดยวิธีโครมาโทกราฟี คอลัมน์ที่ใช้เป็นประเภท

รีเวอร์สเฟส (reversed phase) ชื่อ Nova-Pak C18 แล้วใช้สารละลายของ cetyltrimethylammonium hydroxide เป็นตัวเคลือบคอลัมน์ และใช้สารละลายที่ประกอบด้วย เมทธานอล : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (mM) 15 : 85 (สัดส่วนโดยปริมาตร) ซึ่งประกอบด้วยเกลือโซเดียมซัลเฟต 10 mM เป็นตัวชะ (eluent) ออกจากคอลัมน์เพื่อตรวจวัดโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

1. คำนำ

การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรทและไนเตรทในอาหารนั้น เป็นตัวบ่งชี้ถึงอันตรายที่อาจก่อแก่ผู้บริโภคในกรณีที่ได้รับประทานเกินกว่าที่กำหนด เนื่องจากในร่างกายของเรามีเอ็นไซม์ชนิดหนึ่ง ซึ่งถ้าอยู่ในสภาพที่เหมาะสมจะสามารถย่อยสลายไนโตรทและไนเตรทให้กลายเป็นไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง (สารก่อมะเร็ง) เดิมทีเคยมีวิธีที่นิยมกันมากมักใช้การสกัดไนโตรทและไนเตรทโดย

ใช้น้ำร้อน และหลังจากนั้นถ้าต้องการวิเคราะห์ในรูปของไนโตรทก็ต้องนำมารีดิวซ์ด้วยคอลัมน์ที่บรรจุโลหะแคดเมียม และใช้ N-(1-naphthyl) ethylenediaminedihydrochloride เป็นสารก่อให้เกิดสี (1, 2) ในทำนองเดียวกันถ้าต้องการวิเคราะห์ในรูปของไนเตรท ทำได้โดยใช้โพแทสเซียมเปอร์มังกานेटเป็นตัวออกซิไดซ์ แล้วใช้ Xylenol เป็นตัวทำให้เกิดสี (3) ปริมาณไนโตรทและไนเตรทหลังจากการเปลี่ยนรูปจะถูกวิเคราะห์ต่อไปโดยใช้เทคนิคการวัดการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นที่เหมาะสม เมื่อตระหนักถึงวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ ซึ่งมีความยุ่งยาก และหลายขั้นตอน อันสามารถนำไปสู่ข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์ งานนี้จึงได้เสนอวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคใหม่ หรือที่เรียกว่า ไอออนอินเทอร์แอคชันโครมาโทกราฟี (Ion-interaction chromatography) โดยใช้การแยกบนคอลัมน์ที่บรรจุด้วยวัสดุที่ปราศจากซิลหรือรีเวอร์สเฟส (reversed-phase) สารละลายที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น 2 ประเภท

ประเภทแรกใช้สำหรับเคลือบผิวของคอลัมน์ ให้กลายเป็นวัสดุที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ (ion-exchangers) ซึ่งได้แก่ สารละลายของ cetyltrimethylammonium hydroxide 1 มิลลิโมลาร์ (mM) เตรียมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM (pH 5) ส่วนสารละลายประเภทที่ 2 มีไว้สำหรับชะสารที่สนใจจะวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ ได้แก่ สารละลายส่วนผสมของ เมทานอล : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 15 : 85 สัดส่วนโดยปริมาตร และประกอบด้วยสารละลายโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 mM เทคนิคที่จะนำเสนอใหม่นี้ช่วยลดขั้นตอนการวิเคราะห์ลงอย่างมาก ซึ่งทำให้ประหยัดเวลาและจำนวนสารเคมี รวมทั้งขั้นตอนที่ใช้ในการทดลอง

3. วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

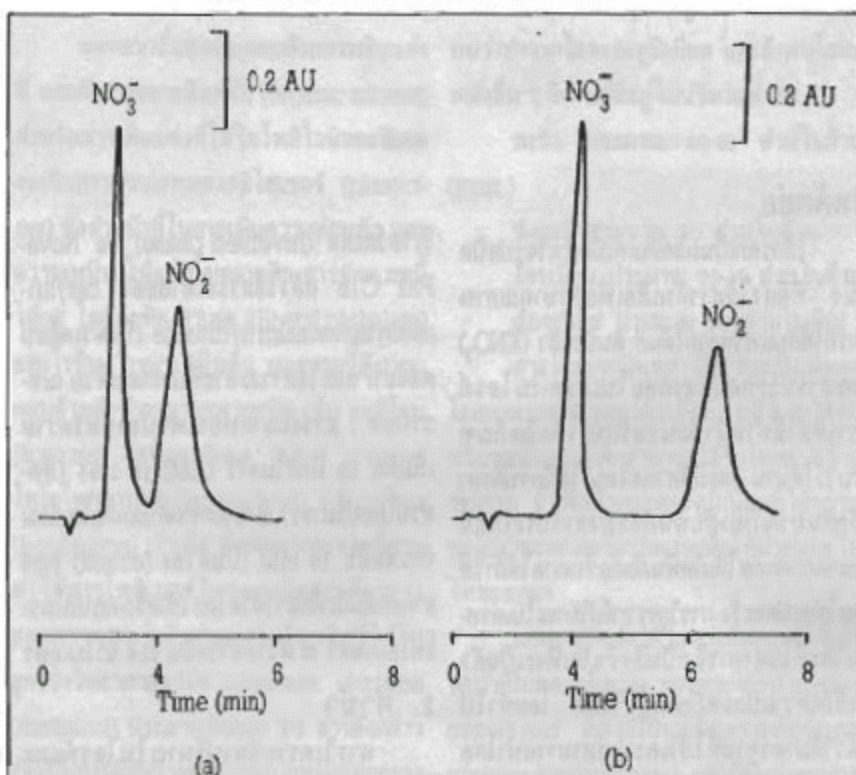
ในการเตรียมตัวอย่างให้นำไส้กรอกมา 200 กรัม บดด้วยเครื่องบดอาหารให้ละเอียดแล้วเก็บไว้ในภาชนะที่ป้องกันอากาศ และเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของตัวอย่างในการวิเคราะห์ ควรทำทันทีหรือภายใน 24 ชม. ซึ่งตัวอย่างมา 10 กรัม นำหนักควรละเอียดถึง 0.001 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมสารละลายอิมิตัวบอแรกซ์ลงไป 5 มล. แล้วเติมน้ำร้อน (อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 70°C) 100 มล. ลงไป วางขวดนี้ลงบนอ่างน้ำร้อน เขย่าให้เข้ากันหรือใช้แท่งแก้วคนเพื่อให้ก้อนเนื้อกระจายตัวประมาณครึ่งชั่วโมง ทั้งให้เป็นแล้วเติมสารละลายชนิดที่ 1 คือ potassium ferrocyanide trihydrate, $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$ 2 มล. คนให้ดี จึงเติมสารละลายชนิดที่สองคือ Zinc acetate dihydrate คนให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายเหล่านีกลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มล. ทั้งให้เป็น แล้วจึงทำปริมาณจนถึงขีด กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วผ่านเมมเบรน 0.45 ไมครอน แล้วเตรียมที่จะวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC ต่อไป

ในการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ให้นำสารละลายที่ใช้สำหรับเคลือบผิวคอลัมน์ (cetyltrimethylammonium hydroxide 1

mM ในสารละลายที่ประกอบด้วยเมทานอล : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM pH 5) ซึ่งเตรียมไว้ ประมาณ 200 มิลลิลิตรให้ไหลผ่านคอลัมน์โดยใช้ปั๊มพัลส์อัตรา 1 มล.ต่อนาทีเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. หลังจากกล่ออัตราไหลจนกระทั่งหยุดแล้วจึงเปลี่ยนสารละลายเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เป็นตัวชะ (สารละลายที่ประกอบด้วยเมทานอล : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM pH 5 : 85, สัดส่วนโดยปริมาตร และมี sodium sulfate ชัน 10 mM อยู่ด้วย) ใช้อัตรา 1 มล. ต่อ นาที เช่นกัน ทั้งไว้ให้อยู่ในสมดุลประมาณ 2 ชั่วโมงก่อนจะเริ่มฉีดสารละลายเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

4. ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้วิธีเคลือบคอลัมน์ด้วย

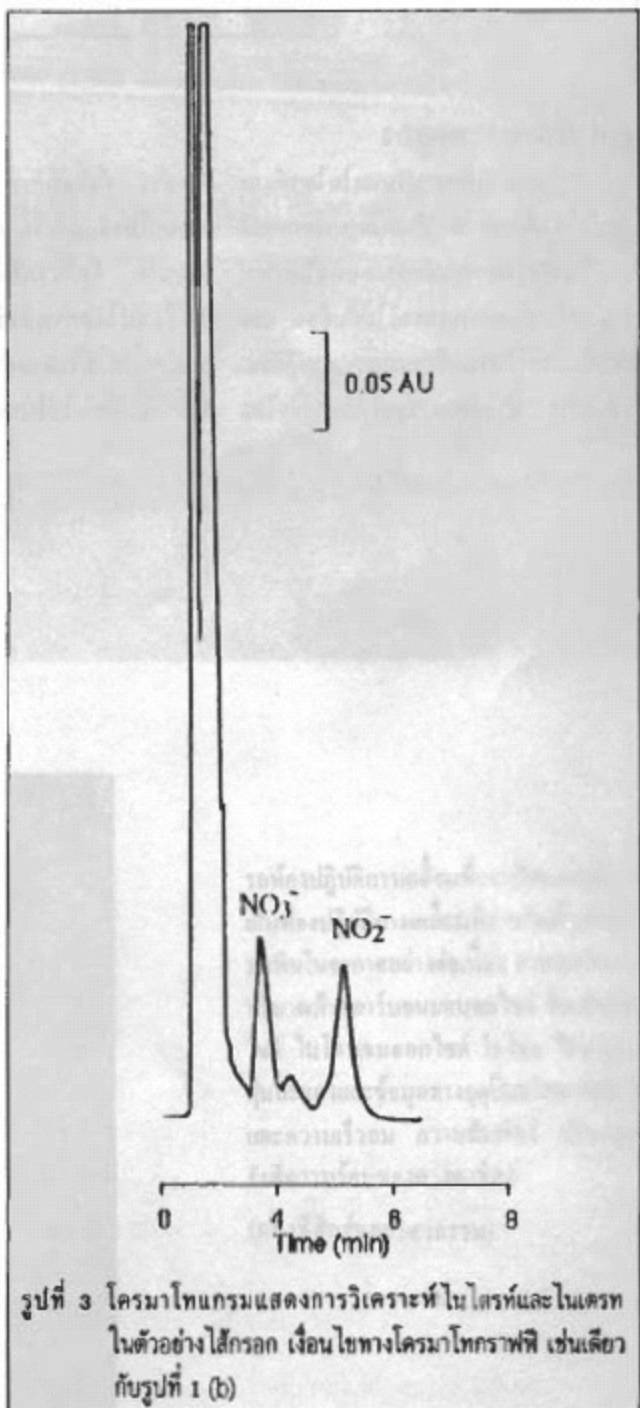
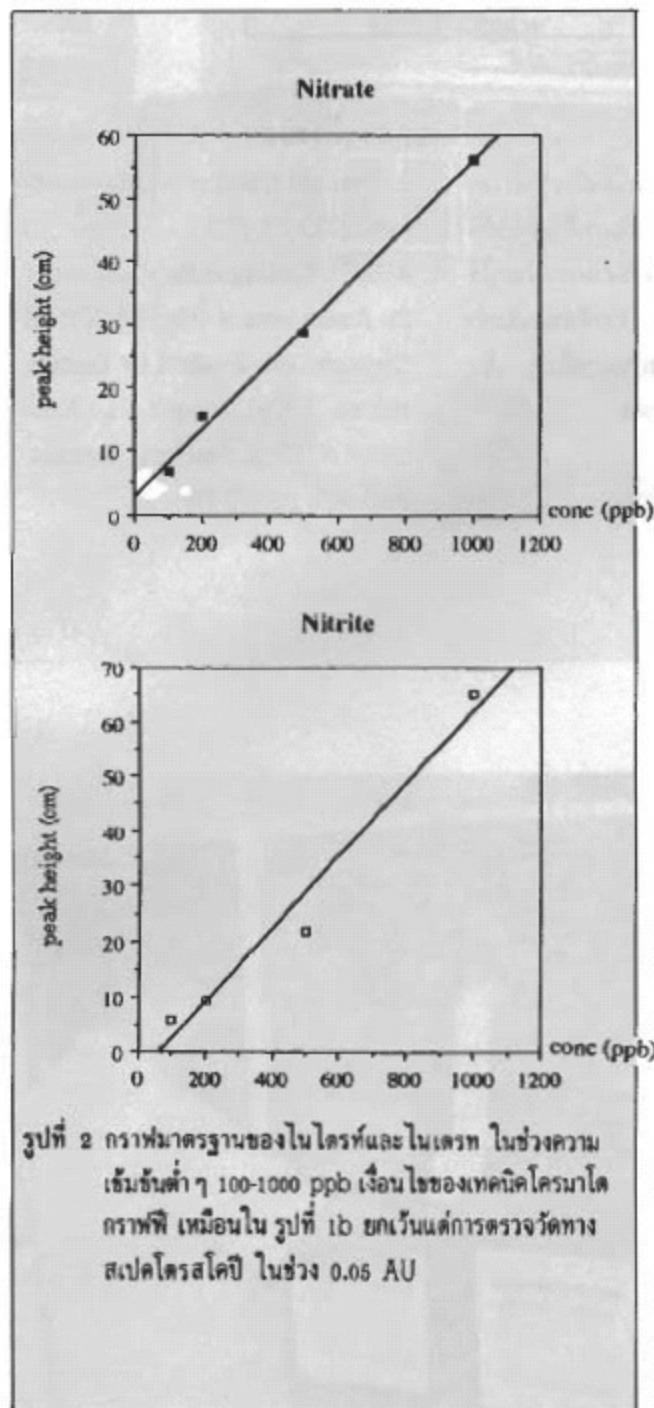


รูปที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงการแยก NO_3^- และ NO_2^- โดยใช้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน นั่นคือความเข้มข้นของ IIR (cetyltrimethylammonium hydroxide) เป็น 0.5 และ 1 mM ในรูป (a) และ (b) ตามลำดับ สำหรับเงื่อนไขโครมาโทกราฟีอื่น ๆ คือ สารละลายของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นตัวชะ : เมทานอล 15% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมซัลเฟตชัน 10 mM ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีด : 20 μ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน : ไนไตรท์และไนเตรทอย่างละ 20 ppm อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ : 1 มล. ต่อ นาที การตรวจวัด : เทคนิคสเปกโทรสโกปี ณ ความยาวคลื่น 214 nm ในช่วง 0.2 AU

สำหรับการนำมาใช้กับตัวอย่างไส้กรอก นั้น เราเริ่มต้นด้วยการสร้างกราฟมาตรฐานของ ไนไตรท์และไนเตรท ดังแสดงในรูปที่ 2 จาก รูปแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ สามารถมี linear range ในช่วง 0-1000 ppb ซึ่งแสดงในกราฟรูปที่ 2 ความเข้มข้นต่ำสุดของ ไนไตรท์และไนเตรทที่สามารถวิเคราะห์ได้ ขณะนี้คือ 9.02 และ 10.04 ppb ตามลำดับ จากการศึกษาดังผลของสิ่งรบกวนต่อ

การวิเคราะห์ที่นั้นพบว่ามีน้อยมาก ดังแสดงใน โครมาโทแกรมรูปที่ 2 จะเห็นว่าพีคของไน- ไตรท์และไนเตรทแยกออกจากพีคแรก ๆ ได้ดี สันนิษฐานว่าพีคใหญ่ ๆ ตอนต้นโครมาโทแกรม คงเนื่องมาจากสารที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน เช่น potassium ferrocyanide เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ผลของสิ่งรบกวนนั้นนับว่าน้อยมาก ดัง ยืนยันจากผลการทดลองหาค่า % recovery ของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์

และไนเตรทอย่างละ 500 ppb ลงไป แล้ว เทียบกับค่าของตัวอย่างที่อ่านได้โดยตรงจาก กราฟมาตรฐาน พบว่าค่า recovery เท่ากับ 95.83% นั้นย่อมเป็นการยืนยันได้ว่าการหา ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทโดยเทคนิคนี้ไม่มี ผลกระทบจากสิ่งรบกวน ตารางที่ 1 แสดง ตัวอย่างข้อมูลและ ค่าทางสถิติของการวิเคราะห์ ตัวอย่างไส้กรอก



ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ไส้กรอก 3 ตัวอย่างโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ครั้งที่	ไนเตรท (ppm)	ไนโตรท์ (ppm)
1	37.54	5.50
2	36.84	5.37
3	34.71	6.75
S.D. (δ_{n-1})	1.47	0.76
Mean (\bar{X})	36.36	5.87

5. สรุปผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณไนโตรท์และไนเตรทในไส้กรอก โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี นับว่าเป็นวิธีที่ให้ความแม่นยำของการวิเคราะห์สูง ขั้นตอนของการทดลองก็ไม่ซับซ้อน และไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีจำนวนมากทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง ทำให้ลดการสูญเสียขณะเตรียม

ตัวอย่าง ทั้งสิ่งรบกวนอื่นเนื่องมาจากสารตกตะกอนโปรตีนและอื่น ๆ ต่อการวิเคราะห์ก็น้อยมาก จึงนับว่าเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ การพัฒนาและนำเทคนิคนี้ไปใช้ในตัวอย่างประเภทอื่น ๆ เป็นสิ่งที่น่าจะทำต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. International organization for Standardization. ISO 309-1975 E.
2. AOAC Official methods of analysis of the Associations of Official Analytical Chemists, Vol. 2 edited by Kenneth Helrich. 15 th ed Arlington, Va. : Association of Official Analytical Chemists, Inc., 1990. pp. 937-938