หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันโรคภัยไข้เจ็บที่คุกคามสุขภาพของมนุษย์มีมากมาย มะเร็งก็เป็นโรคร้ายอย่างหนึ่งทำลายชีวิตมนุษย์ไปปีละไม่ใช่น้อย สาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งนั้นมีหลายอย่างรวมทั้งสารเคมีบางชะนิด มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีจำพวก Nitrosamines และพบว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์ทดลองหลาย ๆ ชะนิด รวมทั้งในมนุษย์ด้วย Nitrosamines นี้พบได้ทั่ว ๆ ไปเช่น ในควันบุหรี่ อาหารหลายชะนิดรวมทั้งอาหารไทย (Migasena and Changbumrung, 1974)

อนึ่งมีผู้ทำการทดลองและพิสูจน์ได้ว่าเกิดจากปฏิกริยาระหว่าง Nitrites กับ Secondary and Tertiary Amines ในสภาวะที่เป็นกรด ทั้ง Nitrite และ Amines นี้พบได้ในอาหารหลายชะนิด โดยที่ Amines เป็นองค์ประกอบของอาหารและยาบางชะนิด ส่วน Nitrite อาจปนมาหรือถูกใส่เข้าไปโดยมีวัตถุประสงค์เป็นวัตถุกันบูด (Food Preservatives) และ ตัวคงสี (Color fixing)

Nitrite นี้ใช้มากในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ที่ถูกเก็บถนอมไว้ ส่วน Nitrate นั้นสามารถถูก reduced ให้เป็น Nitrite ได้ง่าย นอกจากนี้พวก Inorganic Nitrites, Organic Nitrites, Nitrates ยังมีใช้เป็นยาเช่น Amyl Nitrite, Nitroglycerine, Sodium Nitrite, และ Spirit of Niter (Ethyl Nitrite) ในสภาวะที่เหมาะสม Bismuth Subnitrate และ Nitrates หลายชะนิดจะถูกเปลี่ยนไปเป็น Nitritesได้ ถ้าบังเอิญมีผู้หยิบ Sodium Nitrite, Sodium Nitrate มาใช้แทน Sodium Chloride ในการปรุงอาหาร ก็อาจจะเกิดอาการพิษเนื่องจาก Nitrite หรือ Nitrate ขึ้น

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ Nitrates และ Nitrites

จะกล่าวถึงเฉพาะสารที่ใช้กันมากคือ

Sodium Nitrite ($NaNO_2$) เป็นผงสีนวลหรือขาวขุ่นอาจติดกันเป็นก้อนหรือเป็นแท่ง 1 กรัม ละลายในน้ำ 1.5 มิลลิลิตร ละลายได้น้อยใน alcohol

Potassium Nitrite (KNO_2) เป็นผงละเอียดสีขาวหรือเหลืองนวล ดูดความชื้นได้ดีมาก ละลายได้ดีในน้ำ ละลายใน alcohol ได้น้อย Nitrite เป็น Oxidizing และ Reducing substance และไวต่อพวกสารอินทรีย์ เป็น thermolabile เช่นเนื้อที่มี Nitrite 78 ppm. หลังจากปรุงแล้วจะเหลือเพียง 10 - 20 ppm.

Sodium Nitrate ($NaNO_3$) เป็นผงหรือเกล็ดใส ๆ 1 กรัม ละลายในน้ำ 1.1 มิลลิลิตร และใน alcohol 125 มิลลิลิตร

Potassium Nitrate (KNO_3) เป็นผงสีขาว 1 กรัม ละลายในน้ำ 2.8 มิลลิลิตร และ ใน alcohol 620 มิลลิลิตร

Nitrate นั้น thermostable แต่จะถูก reduced เป็น Nitrite ได้โดยจุลินทรีย์บางชะนิด มนุษย์ได้รับ Nitrites และ Nitrates เข้าไปโดยทางอาหารและน้ำ การที่น้ำมีปริมาณของ Nitrogen-salts เพิ่มขึ้นเนื่องจาก pollution ของพวก organic solids และ liquid wastes โดยเฉพาะจากปุ๋ย (Inorganic chemical fertilizer) ที่ใช้มากในทางเกษตรกรรม นอกจากนี้ Nitrites - Nitrates ยังพบมากในผักพวก spinach,rhubarb,beet, กระหล่ำดอก (cauliflower) กระหล่ำปลี (cabbage) ผักกาดหัว (radish) ซึ่งคนส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นอาหารและ Nitrate และ Nitrite ที่ใช้เป็น (Food additive) ในไส้กรอก (sausages) และเนื้อปรุงรส (processed meat) หรือในอาหารปลา

ตามมาตรฐานของน้ำสำหรับดื่มของกระทรวงสาธารณสุขของสหรัฐอเมริกา และขององค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ว่า น้ำดื่มของเด็กต้องมี Nitrate ไม่เกิน 45 ppm. ส่วน Food and Drug Administration ของสหรัฐอเมริกา กำหนดปริมาณของ Nitrate และ Nitrite ใน cured meat เอาไว้ ไม่เกิน 500 ppm. และ 200 ppm. ตามลำดับ

พิษและพยาธิสภาพของ Nitrite และ Nitrate

1. พิษจาก Nitrite และ Nitrate โดยตรงมี 2 แบบ คือ

1.1 ทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวโดยเฉพาะพวกหลอดโลหิตขนาดเล็ก

1.2 ในความเข้มข้นสูงทำให้เกิด methaemoglobin

2. พิษที่เกิดจากการรวมตัวของ Nitrites กับ Amines เกิดสาร Nitrosamines ซึ่งเป็น Potent carcinogens .

1.1 Clinical Toxicology ของ Nitrite ทำให้เกิดอาการ คลื่นไส้ (nausea) อาเจียน (vomiting) หน้าแดง (flushing) เวียนศีรษะ (vertigo) ปวดศีรษะอย่างรุนแรง (servere headache) ชัก (convulsion) อาจเกิด อาการโลหิตขาด oxygen (anoxaemia) ผิวหนังเขียว (cyanosis)

หัวใจเต้นเร็ว (tachycardia) เป็นลม (circulatory collapse) ท้องร่วง (diarrhea) หรือ อาเจียนเป็นโลหิต (haematemesis) ปวดมวนท้อง (gastric erosion) มือสั่น (trismus) แขนขาชัด (tonic and clonic limb movement) และเหงื่อออกมาก (profound perspiration) (Paulur and Schleyer, 1948)

ในทุกรายที่เกิดอาการพิษ เนื่องจากความผิดพลาดในการใช้ $NaNO_2$ แทน Na Cl หรือในกรณีย์ใส่ $NaNO_2$ ใน cured meat มากเกินไป Oppe (1951)ได้รายงานกรณีย์เกิดพิษในเด็กอายุ 2 เดือน และ Mcquiston (1936) และ Barton (1953) ได้รายงานว่ามีรายถึงตายด้วย ในรายของ Barton นั้นเป็นเด็กอายุ 2 ขวบ รับประทาน$NaNO_2$ เข้าไปโดยบังเอิญประมาณ 6.3 กรัม จึงเกิดอาการพิษและต่อมาก็ถึงแก่กรรม $NaNO_2$ ที่ใช้เป็นยานั้นมี dose 0.5 - 2 เกรน (30 - 125 มิลลิกรัม) ถ้าถึง 3 เกรน(200 มิลลิกรัม)จะทำให้เกิด severe circulatory collapse และเลือดจะเป็นพวก methaemoglobin หรือ Nitricoxide haemoglobin

ส่วน Nitrates นั้นมักจะปนมากับน้ำบ่อ น้ำคลอง น้ำแม่น้ำ ซึ่งอาจเนื่องจากการใช้ปุ๋ยพวก Nitrate หรือจากโรงงานที่ใช้ Nitrates มากเช่นทำ pickled meat อาการเป็นพิษคล้ายคลึงกับ Nitrite คือเมื่อรับประทาน Nitrate เข้าไปประมาณ 15 - 30 นาที จะเริ่มมีอาการเกิดขึ้น มีอาการอ่อนเพลีย (weakness)และ สมองสับสน (confuses) ซึ่งจะมากกว่า Nitrite มาก ต่อมาก็เกิดอาการ ระส่ำระสายในกระเพาะและลำไส้ (gastro - intestinal disturbance) เกิดอาการขาดน้ำ (dehydration) อาเจียนเป็นโลหิต (vomiting of blood) อาจจะมีโลหิตออกมาด้วยหรือเป็นสีดำ (haemorrhagic or melaena stool) ต่อมาก็ถึงตาย แต่โดยทั่วไปแล้ว Nitrates นั้นทำให้ตายไม่ง่ายนัก จะต้องกินเป็นจำนวนมากถึง 8 กรัมจึงถึงตายได้

ในประเทศไทยมีรายงานถึงพิษของ Nitrate, Nitrite ไว้ดังนี้ จากรายงานของ น.พ.มุกดา ฤกษณานนท์ และ น.พ.ไพโรจน์ อุ่นสมบัติ (2509) ในจดหมายเหตุทางแพทย์ "เรื่องการเกิดปลาเค็มเป็นพิษ" ซึ่งผู้ป่วยเป็นนักเรียนประจำ มีอาการคลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง ปวดศรีษะ เวียนศรีษะ หน้าแดง ใจสั่น นัยน์ตาแดง หายใจอึดอัด ลุกไม่ได้และคันตามตัว

จากการศึกษาพบว่า ปลาเค็ม เป็นต้นเหตุของการเป็นพิษทำให้ผู้ป่วยมีอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และอาการของเส้นเลือดในร่างกายขยายตัว ทำให้ผู้ป่วยมีหน้าแดง ปวดศรีษะตุบ ๆ บางรายหน้าแดงคล้ายจะบวม ใจเต้น

การทำปลาเค็มนอกจากใส่เกลือแกงแล้ว ยังใส่ดินประสิว (KNO_3) เพื่อทำให้เนื้อปลามีสีแดงน่ารับประทาน

เพราะฉะนั้นอาการที่เกิดจากการรับประทานปลาเค็ม ก็เนื่องจากดินประสิวที่ใส่ในปลานั่นเอง และเมื่อนำมาทอดบางส่วนเปลี่ยนเป็น Nitrite ดังนั้นอาการที่เกิดขึ้นจึงเนื่องจาก Nitrite และ Nitrate ที่อยู่ในปลาเค็มมากเกินไปนั่นเอง ซึ่งอาจเป็นการบังเอิญที่ปลาเค็มชุดนี้ใส่ดินประสิวมากเกินไป หรือคลุกเคล้าดินประสิวกับเนื้อปลาไม่ทั่ว เพราะจากการตรวจพบ Nitrate ในปลาเค็มบางชิ้นมีมากกว่า 3.01 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่บางชิ้นก็ไม่พบ

อาการพิษสำคัญของดินประสิว คือ การระคายเคืองต่อ กระเพาะ ลำไส้ ทำให้มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียน ท้องเดิน ถ้ามากทำให้มีอาการอักเสบของกระเพาะลำไส้ ทำให้อุจจาระเป็นเลือด หรือ อาเจียนเป็นเลือดก็ได้ ขนาดเกิดพิษคือมากกว่า 4 กรัม/วัน หรือรับประทานครั้งเดียวมากกว่า 1 กรัม ถ้ามากกว่า 5 กรัมก็เข้าขั้นอันตราย ถ้า 8 กรัม ก็ถึงแก่ความตายได้

นอกจากนี้ Nitrate ทำให้หลอดเลือดทั่วร่างกายขยายตัว หน้าจะแดง เส้นเลือดในสมองขยายตัว ทำให้มีอาการปวดหัวตุบ ๆ แรงดันเลือดต่ำลง หัวใจเต้นเร็วขึ้น ขนาดมากเกินไป Haeoglobin ในเม็ดเลือดเปลี่ยนเป็น Methaemoglobin โดยมากมักจะพบตามชนบท ในทารกที่ดื่มน้ำบ่อ ซึ่งมี Nitrate มากโดยบ่ออยู่ใกล้ท้องไร่ท้องนาที่ใช้ปุ๋ย Nitrate และ Nitrate สามารถซึมผ่านดินลงไปในน้ำได้ หรือบ่อน้ำนั้นตื้น ๆ

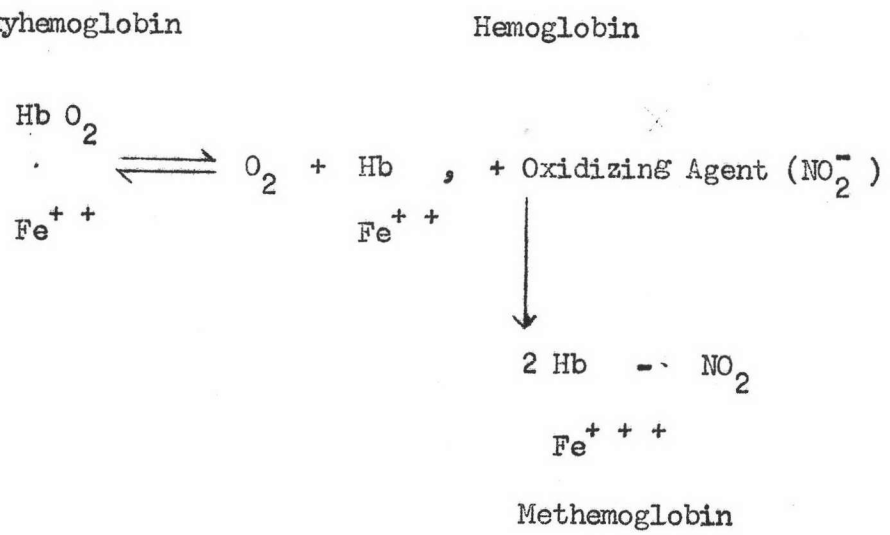
1.2 พิษอีกทางคือทำให้เกิด Methaemoglobin คือมันไปรวมตัวกับ haemoglobin เกิดเป็น methaemoglobin ทำให้การขนถ่าย Oxygen ของเม็ดเลือดแดงเสียไป เด็กที่เกิดอาการนี้ผิวหนังจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสี grey blue หรือ brown blue โดยเริ่มจากริมฝีปาก นิ้วมือ นิ้วเท้า หน้า แล้วตลอดลำตัว ตอนแรก ๆ มักสังเกตไม่ทันเพราะอาการ cyanosis นี้มักไม่มีอาการภายนอกให้เห็น ในรายที่เป็นมากหรือมีอาการหนักจะมีอาการขาด oxygen (anoxia) บางทีอาจถึงตายได้

เด็กทารกโดยเฉพาะที่อายุต่ำกว่า. 90 วัน จะไวต่อ Nitrite และ Nitrate มาก โดยเฉพาะในช่วง 27 - 62 วัน แม้จะใช้น้ำต้มสุกก็ไม่ช่วยแก้ เพราะยิ่งเป็นการไปทำให้ Nitrate เข้มข้นขึ้น ปริมาณ Nitrate ที่ก่อให้เกิดอาการ cyanosis กว้างมาก คือ 66 - 1107 ppm. แต่เด็กที่อายุมากขึ้นจะมีความทนทานต่อ Nitrate ในอาหารได้สูงขึ้น มีผู้กล่าวไว้ว่าบุคคลที่แพ้หรือไวต่อ Nitrate นั้นมักจะมี pH ของน้ำย่อยมากกว่า 4 และมี (Nitrate - reducing bacteria (Coliform Bacillus : Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Edwardsiella; Citrobacter; proteus; Providence group; Samonella : Arizona group ; Shigellae.) ในทางเดินอาหารตอนบน

Cornblath and Hartmann (1948) ได้ทดลองใส่ Nitrate ที่ Colon พบว่าทำให้เกิด methaemoglobin ทันที จำนวน $NaNO_2$ ต้องสูงถึง 30 ppm. จึงทำให้เกิด methaemoglobin ส่วน $NaNO_3$ นั้นไม่เกิน 10 ppm. และเมื่อน้ำน้ำไปต้มความเข้มข้นของ Nitrate จะเพิ่มขึ้น (Rosenfield and Huston, 1950)

เมื่อมีผู้ป่วยอาการ methaemoglobin แพทย์จะต้องรีบฉีด 0.3 มิลลิลิตร ของ 5 % Methylene blue เข้าเส้นโลหิตดำ หรือใช้ dose 1 - 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยแต่ละ dose ไม่เกิน 0.2 กรัม หรือใช้ dose ย่อย ๆ รวมกันไม่เกิน 0.6 กรัมภายใน 24 ชั่วโมง โดยใช้ aqueeus solution 1 % คนไข้จะเริ่มมีอาการดีขึ้นและปกติในที่สุด (Oppe, 1951 ; Martindale, 1952) แต่ถ้าสาเหตุเนื่องจากน้ำบ่อมี Nitrate , Nitrite สูง เมื่อหยุดบริโภคน้ำ อาการจะดีขึ้น แต่ถ้าอาการหนักก็ให้ Methylene blue โดยในเด็กฉีดเข้าใต้หนังศีรษะ (scalp) แล้วคลึง (Comly, 1945) บางครั้งอาจจะให้ Ascorbic acid 500 มิลลิกรัม เข้ากล้ามทุก 4 ชั่วโมง หรือให้ทางปากรวม 1,000 มิลลิกรัม นาน 4 วัน

เมื่อเกิด methaemoglobin ทำให้ haemoglobin สูญเสียคุณสมบัติในการนำ Oxygen ไปยัง cells ต่าง ๆ ดังสมการ



ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น Nitrite และ Nitrate มีบทบาทเป็น Food - Additive ที่สำคัญพวกหนึ่ง โดยใช้เป็น Prescrvative เพื่อ

1. ใช้เป็นสารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพในการถนอมอาหาร
2. ใช้เป็นสารคงสีในการปรุงรสอาหารเนื้อและปลา (Cured Meat and Fish)

1. <u>ใช้เป็นสารต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพในการถนอมอาหาร</u>

ทั้ง Nitrite และ Nitrate มีคุณสมบัติเป็น สารต้านจุลินทรีย์ ในการทดลองในหลอดแก้ว (in vitro) แต่ไม่ถึงขั้น sterilization ซึ่งคุณสมบัตินี้ขึ้นกับ pH ของผลิตภัณฑ์ตามตารางของ Castellani and Niven (1955) ตามตารางที่ 1

ในตอนแรกเริ่มใช้เป็น pigment fixative นั้นคิดว่า Nitrite ไม่มีผลทางต้านจุลินทรีย์เพียงพอในการเก็บถนอมเนื้อ แต่ต่อมาพบว่าในเนื้อที่เก็บถนอมเอาไว้ซึ่งมี pH ประมาณ 5.7 และมี Nitrite เข้มข้นปานกลาง จะสามารถยังยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ และ Nitrite มีผลต่อ Anaerobic มากกว่า Aerobic นอกจากนี้ประสิทธิภาพยังขึ้นกับ microbial flora ด้วย Nitrite มีฤทธิ์ยับยั้งห้ามการเจริญเติบโตต่อจุลินทรีย์หลายชะนิด ยกเว้นพวก <u>Lactobaccili Streptococci</u> และมีข้อเสียคือมันเป็น Prooxidant และเร่งการเกิด oxidative rancidity ใน ปลา แช่เยือกแข็ง (frozen fish) ถึงแม้ว่าในปลาแช่เย็น (chilled nonfrozen fish) มันจะเป็นตัวป้องกัน oxidation อย่างอ่อน

Nitrite ที่ใช้ในเนื้อปรุงรส 78 – 156 ppm. ใช้ความร้อนช่วยในขณะ Processing ซึ่งพวก spores ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ Nitrite ยังมีผลดีต่อจุลินทรีย์ที่ทนต่อความร้อน เนื้อปรุงรส เช่น เชื้อพวก Streptococcus faecium เป็นเชื้อที่ผลิต Lactic acid ที่พบเสมอในแฮมบรรจุกระป๋อง และ เนื้อบรรจุกระป๋อง Streptococcus faecium จะไวต่อความร้อนยิ่งขึ้นถ้ามี Nitrite อยู่ด้วย

Silliker และคณะ (1958) กล่าวว่า Nitrite สามารถทำให้เนื้อบดกระป๋องอยู่ได้นานยิ่งขึ้น ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์นั้นมี spore ไม่มากนัก แต่ถ้ามี spore มากๆ Nitrite ก็ช่วยไม่ได้เช่น Gough and Alford (1965) พบว่ามี Clostridium perfringens จาก ham ที่ใส่น้ำเกลือและมี spore อยู่ 20/ ml ของน้ำเกลือ ส่วน Bulman and Ayres (1952) พบว่าในหมูบดซึ่งใส่เกลือ 3.6 % กับ Nitrite 150 ppm. (หลังจากให้ความร้อนแล้วเหลือ 83 ppm.) และมี spore น้อยกว่า 1/ กรัม ของเนื้อ จะไม่เน่าเสีย แต่ถ้ามี spore ถึง 50/กรัมของเนื้อก็จะเน่าเสียได้

Castellani and Niven (1955) รายงานถึงชื่อเชื้อที่ทนต่อ Nitrite ปรากฏว่ามีถึง 16 ชะนิดของจุลินทรีย์ เขายังได้ศึกษาถึงปริมาณของ Nitrite ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพวก Staphylococcus aureus, Streptococcus salivarius ส่วน Streptococcus mitis จะพบน้อยมากถ้าใช้ Nitrite กับ glucose นอกจากนี้ยังพบว่าสารที่มีหมู่ Sulhydryl(-SH) รวมกับ glucose จะทำลายความต้านทานของเชื้อที่มีต่อ Nitrite ใน media ที่ sterile

การออกฤทธิ์ของ Nitrite และ Nitrate

เนื่องจาก Nitrite เป็นเกลือของกรดอ่อน ดังนั้น ประสิทธิภาพในการระงับการเจริญเติบโตของเชื้อจึงขึ้นกับ pH ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1

Effect of pH on the Aerobic Nitrite Tolerance of Staphylococcus aureus Strain 196, When Glucose is Autoclaved in a Complex Medium

pH[1]	Nitrite Concentration		Calculated Undissociated HNO_2[2]	
	Growth[3]	No Growth	Growth	No Growth
	ppm	ppm	ppm	ppm
6.90	3,500	4,000	1.12	1.28
6.52	1,800	2,000	1.37	1.52
6.03	600	700	1.38	1.61
5.80	300	400	1.20	1.60
5.68	250	400	1.32	2.12
5.45	140	180	1.25	1.50
5.20	80	150	1.12	2.10
5.05	40	80	0.92	1.84

[1] The pH values were determined on duplicate tubes of medium at the time of inoculation.

[2] The amount undissociated Nitrous acid was calculate from the dissociation courve imploying pKa of 3.4

[3] Growth was determined after 48 hours at 30°C

* (Source : Castellani and Niven , 1955)

นอกจากนี้ Castellani and Niven (1955) ได้ทดสอบทฤษฎีว่าด้วยการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของ Nitrite เช่น กฎของVan Slyke กล่าวถึงปฏิกริยาของ HNO_2 กับ amino acid ก็อาจจะไปรบกวนโครงสร้างของ dehydrogenose ของจุลินทรีย์ ปฏิกริยาของพวก mono - phenol เช่น tyrosine อาจจะไปเปลี่ยนแปลงพวก cellular components ส่วนปฏิกริยากับ heme pigment อาจจะเกี่ยวโยงไปถึง cytochrome system ของ cells ด้วยก็ได้ อย่างไรก็ตามเขาได้ชี้ให้เห็นด้วยว่า Nitrite สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งขาดRespiratory Catalyst ที่ Heme เป็นองค์ประกอบได้ด้วยเหมือนกัน

ส่วน Nitrate นั้นยังไม่แน่นอน จากการทดลองแรก ๆ โดย Tanner and Evans (1942) พบว่า $NaNO_3$ 2.213 – 4.427 % สามารถห้ามการเจริญเติบโตของเชื้อ Clostridium botulinum ได้ 7 cultures แต่ผลไม่สม่ำเสมอ ส่วน 0.0588 – 0.392 % นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Clostridium botulinum Clostridium Putrificum หรือ Clostridium sporogenus ได้

Yesair and Cameron (1942) ทดลองกับ spore ของ Clostridium botulinum พบว่าใน pork infusion agar ถ้าใช้ 0.1 % $NaNO_3$ หรือ 0.005 % $NaNO_2$ หรือ 2 % NaCl แล้วจำนวน spore ลดลงถึง 70 % แต่ถ้าใช้เกลือเหล่านี้รวมกันตามจำนวนที่ใช้กันในการเก็บถนอมอาหาร เช่น curing practice แล้ว อัตราการตายเพิ่มขึ้นเกือบถึง 100 %

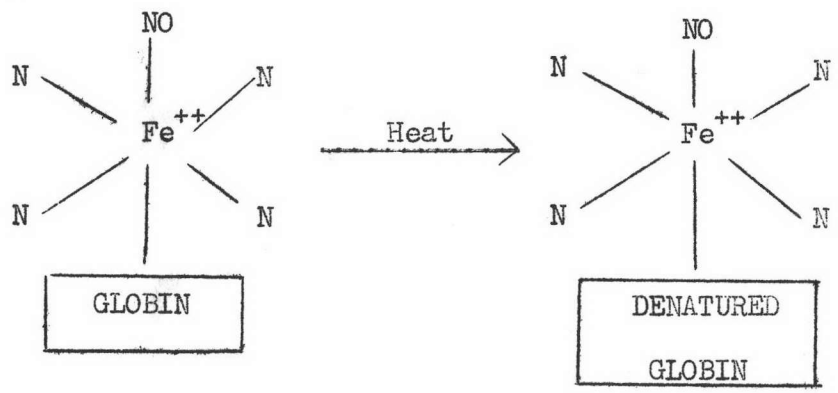
$NaNO_2$ เดี่ยว ๆ อาจใช้เป็น Preservative ในปลาได้โดยผสมน้ำแข็งแช่ปลาในขนาด 0.1 – 0.5 % (Tarr and Sunderland, 1946)

ภายใต้ Code of Federal Regulation (121. 1063 – 1064) กำหนดไว้ว่าถ้าใช้ $NaNO_2$ และ $NaNO_3$ เป็น preservative และ color fixing ในเนื้อปรุงรสแล้ว ระดับของ Nitrate ต้องไม่เกิน 500 ppm. และ Nitrite ต้องไม่เกิน 200 ppm.

ในบางประเทศการเติม Nitrite, Nitrate จะมีกฎหมายบังแยกออกมาต่างหาก แล้วแต่ชนิดอาหาร เช่น ในประเทศอังกฤษให้ใช้สารเหล่านี้เป็น preservative ได้ในเนยแข็ง (ยกเว้น Cheddar or Cheshire type) ประเทศ เนเธอร์แลนด์ นอร์เวย์ อาฟริกาใต้ และสวีเดน ให้ใช้ได้ในเนยแข็ง นอกจากนี้นอร์เวย์ สวีเดน ยังให้ใช้ในผลิตภัณฑ์จากปลา ในประเทศแคนาดาให้ใช้กับผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกด้วย

1.2 ใช้เป็นสารคงสีในการปรุงรสอาหารเนื้อและปลา (Cured Meat and Fish)

สมัยโบราณมนุษย์ถนอมเนื้อโดยขยำกับเกลือ (rock salt) แล้วแช่เก็บไว้ เมื่อนำมาปรุงเป็นอาหารพบว่าเนื้อนั้นมีแถบแดง ๆ ปะปนกับสีน้ำตาลของเนื้อที่สุกแล้ว ต่อมารู้ว่าแถบแดงนี้เกิดจาก metallic nitrate ซึ่งเจือปนอยู่ในเกลือจะทำปฏิกริยากับรงควัตถุในเนื้อสัตว์ (meat pigment) จึงนิยมใส่ Nitrate ลงไปให้สีของเนื้อเสมอกันและแดงยิ่งขึ้น ในเวลาต่อมาทราบว่า Nitrite ที่เกิดจาก reduction ของ Nitrate โดยจุลินทรีย์ไปทำปฏิกริยากับรงควัตถุโดยตรง จึงนิยมใช้ Nitrite ในพวกอาหารเนื้อที่ต้องการเก็บถนอมเอาไว้ Nitrite ที่ใช้เป็นพวก $NaNO_2$ หรือ KNO_2 จะไปทำปฏิกริยากับ myoglobin ซึ่งเป็น meat pigment เปลี่ยนไปเป็น Nitrosomyglobin ซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดง



Nitroso - Myoglobin
(Pink)

Denatured Globin
Nitroso - Hemochrome
(More Intense Pink)

ปริมาณ Nitrite และ Nitrate โดย Food and Drug Administration ของสหรัฐอเมริกากำหนดไว้ในผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อบด ไส้กรอก คือ 200 ppm. และ 500 ppm. ตามลำดับ ซึ่งประกอบเป็นอาหารแล้วควรเหลือ Nitrite ประมาณ 10 ppm. ส่วน Nitrate นั้นไม่เปลี่ยนแปลง

2. พิษของ Nitrites ที่เกิดจากปฏิกริยาระหว่าง Nitrites กับ Amines เกิดเป็น Nitrosamines ซึ่งเป็นสารทำให้เกิดมะเร็งอย่างแรง

Nitrosamines พบในควันบุหรี่ เห็ด ในอาหารเช่นเมล็ดพืช นมผาส-เจอร์ไรซ์ เนยแข็ง เนยแข็งที่ใส่ Nitrite ลงไปด้วย ปลา ปลารมควัน เนื้อสัตว์รมควัน ฯลฯ

Nitrosamines ทุกชนิดเป็น Carcinogen ที่ร้ายแรง ตั้งแต่ Magee และ Barnes (1956) ได้ค้นพบอำนาจในการทำให้เกิดมะเร็งของ DMN (Dimethylnitrosamine) แล้ว มีผู้ทดลองหา Carcinogenic effect ของ N- Nitroso compounds กันเรื่อยมา

Druckey, Preussmann, Ivankovic and Schmahl (1967)

ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของโครงสร้าง (Structure) กับการทำให้เกิดมะเร็ง (Carcinogenicity) ของ Nitrosamines 65 ชะนิด พบว่ามันเป็นสาเหตุของมะเร็งในตับ ไต หลอดอาหาร โพรงจมูก กระเพาะอาหาร ปอด กระเพาะปัสสาวะ ระบบประสาทส่วนกลาง

DMN เป็น Hepatotoxic และ carcinogenic ที่รุนแรง ออกฤทธิ์ได้ในสัตว์หลายชะนิด ทำให้เกิดเนื้องอก (tumors) ในอวัยวะเกือบทุกชะนิดของหนู แม้ได้รับตัวยานี้เพียงครั้งเดียวก็อาจทำให้เกิดมะเร็งได้ นอกจากนี้

Nitrosamines บางตัวยังเป็น Teratogenic อีกด้วย และอาจทำให้เกิดเนื้องอกในตัวอ่อนถ้าให้สารนั้นแก่หนูที่กำลังท้อง พวก Nitroso carcinogens หลายตัวยังเป็น Mutagens อย่างแรง ดังนั้นถ้าหากสารเหล่านี้สามารถเกิดได้ในอาหารหรือในสภาวะแวดล้อมย่อมก่อให้เกิดอันตรายอย่างยิ่ง

เกี่ยวกับการเกิด Carcinogenic Nitrosamines นี้เริ่มต้นที่ประเทศนอร์เวย์ โดย Koppang และผู้ร่วมงานได้ศึกษาเกี่ยวกับโรคตับชนิดร้ายแรง (Severe Liver Disease) ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ruminants) เมื่อปี 1961 และ 1962 ได้พบว่าโรคนี้มีความสัมพันธ์กันกับอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งมีปลาแฮริงที่เก็บถนอมเอาไว้ด้วย Sodium Nitrite รวมอยู่ด้วย เมื่อทดลองให้ DMN กับแกะ และ Mink ก็เกิดอาการทำนองเดียวกันขึ้นด้วยเหมือนกัน เขาจึงนำเอาปลาแฮริงนั้นมาหา DMN และ DEN (Diethyl Nitrosamine) พบปริมาณ DMN ในพิสัย 30 - 100 ppm. และหลังจากการทดลองพบว่าการใส่ DMN ลงในอาหาร 2 - 5ppm. ก็สามารถทำให้เกิดเนื้องอกในตับของหนูได้

การเกิด N - Nitroso - Compound โดย Nitrosation ของ Amines อาจเกิดในกระเพาะของคนได้เหมือนกันในอาหารที่เก็บไว้นาน ๆ Sander (1971) พบว่า Nitrosamine เกิดในร่างกายจาก Secondary Amines กับ Nitrite เมื่อผสมกับน้ำย่อยในกระเพาะ Sander (1971) และ Sander and Burkle (1969) รายงานการเกิด Malignant tumor โดยการให้ Nitrite กับ Basic secondary amines เช่น N - Methylbenzylamine และ N - Methylaniline ติดต่อกันเป็นเวลานาน ๆ ในกรณีนี้เข้าใจว่า Nitrosamines เกิดในกระเพาะไม่ใช่เกิดในอาหารโดยตรง

การสร้าง Nitrosamines ขึ้นในร่างกายโดยการกระทำของจุลินทรีย์เป็นสิ่งหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นได้ กล่าวคือเชื้อ Escherichia coli ในลำไส้ของคนจะสามารถสร้าง Nitrosamines จาก Nitrite และ Secondary amines

ในสภาวะที่เป็นกลางโดยมี enzyme เป็น catalyst ได้ นอกจากนี้พวก non - Nitrate reducing bacteria เช่น Lactobacilli, Group D streptococci, Clostridia, Bacteroids และ Bifidobacteria สามารถที่จะ Nitrosateพวก Secondary amines ด้วย Nitrite ในสภาวะเป็นกลางได้เหมือนกัน มีการเสนอข้อคิดเห็นว่า Bacterial Nitrosation อาจเกิดขึ้นในลำไส้ได้ จากการที่ร่างกายได้รับ Nitrates เข้าไปร่วมกับสารประเภท Amines หรืออาจเกิดขึ้นในปัสสาวะของพวกที่เป็นโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (ส่วนใหญ่ได้แก่ Escherichia coli) แต่กรณีหลังนี้ควรเกิดเฉพาะในบริเวณที่ใช้น้ำบริโภคที่มี Nitrate สูง (ตามปกติ Nitrate ในปัสสาวะจะไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดอันตรายทำนองนี้ได้)

004731

นอกจากนั้นน้ำลายคนก็มี Nitrite อยู่ด้วย และจากการที่ Thiocyanate ซึ่งเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในน้ำลายสามารถทำหน้าที่เป็น catalyst ได้ดีในการ Nitrosate secondary amines โดย Nitrites จึงเชื่อว่าเมื่อน้ำลายเข้าสู่กระเพาะแล้วจะทำให้ศักย์ในการสร้าง Nitrosamines ในร่างกายมีมากกว่าที่เคยคาดกันไว้

Magee (1971) ได้สรุปเรื่องราวของอันตรายต่อสุขภาพที่อาจจะเป็นไปได้ของ Nitrosamines ที่เกี่ยวพันกับการที่มีสารต่าง ๆ เหล่านี้อยู่ในอาหารเอาไว้ ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากเนื้อหลายชนิด เขาใส่ Nitrite ลงไปเป็น Preservative ด้วย แล้วจึงนำเนื้อนั้นไป Pasteurize หรือ sterilize บางทีเขาก็ใส่ Glucono - d - Lactone (GDL) ลงไปด้วยเพื่อจะลด pH ความร้อนและการมี pH ต่ำ ๆ นี้เป็นสภาวะที่เหมาะมากสำหรับการเกิด Nitrosamines ขึ้นจาก Nitrite และ Secondary Amines

i 17350202

สารเคมีที่ใช้ในทางเกษตรกันอย่างกว้างขวางหลายชนิดเป็นอนุพันธ์ของ Alkylurea และ Alkyl carbamic acid ชนิดต่าง ๆ สารประกอบแบบนี้ทุกชนิดสามารถทำปฏิกริยากับ Nitrite ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน ๆ เกิดเป็น Dialkylnitrosamines หรือ N - Nitroso Derivatives อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้งสองอย่างขึ้นได้

Secondary amines เช่น Dimethylamine พบในปลา ผลิตภัณฑ์จากปลา ธัญญาหาร ชา สารปรุงแต่งรส เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ยังไม่ได้กลั่น ยาสูบ ควันบุหรี่ ยาต่าง ๆ หลายชนิด เช่น Piperazine, Thiocarbazone, Tolbutamide, Tryparsamide, Streptomycin ส่วน Nitrite เกิดจาก Nitrate ได้หลายทางเช่น ในพืช ผัก น้ำ โดย enzyme Nitroreductases ที่มีในจุลินทรีย์ ปกติแล้วปริมาณของ Nitrite ที่คนได้รับเข้าไปในแต่ละวัน

(Average human daily intake of Nitrite)

คือ 22 Micromole ≡ 1.5 มิลลิกรัมของ $NaNO_2$

ในปัจจุบันกลไกในการเป็นพิษของ Nitrosamines ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดนัก เพราะยังไม่มีวิธีการอื่นใดที่จะใช้สำหรับวัดผลของการเผยผึ่ง (expose) ต่อ Nitrosamines ที่ว่องไวและแม่นยำยิ่งไปกว่าการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ซึ่งทำให้เกิดเนื้องอกขึ้น จากการทดลองกับสัตว์พบว่า Nitrosamines จะถูก Metabolized รวดเร็วและตรวจพบได้ในลมหายใจออก ในตับ และในปัสสาวะ ในรูปของ CO_2 , Methylamine แสดงว่า DMN ถูก Demethylated ก่อนที่จะกลายเป็นพิษ และ Metabolite ของมันชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดอาจจะเป็นผู้รับผิดชอบในการทำให้เกิดการเป็นพิษและเกิดมะเร็ง Metabolism นี้ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ microsomal structure ของตับและไต คือจะเกิดการ inhibit การสร้าง liver protein ของหนู (Mouse) และการสร้าง n RNA เกิด

alkylation of guanine in liver RNA ทำให้การเจริญเติบโตของ cell ผิดปกติไปกลายเป็นมะเร็งได้

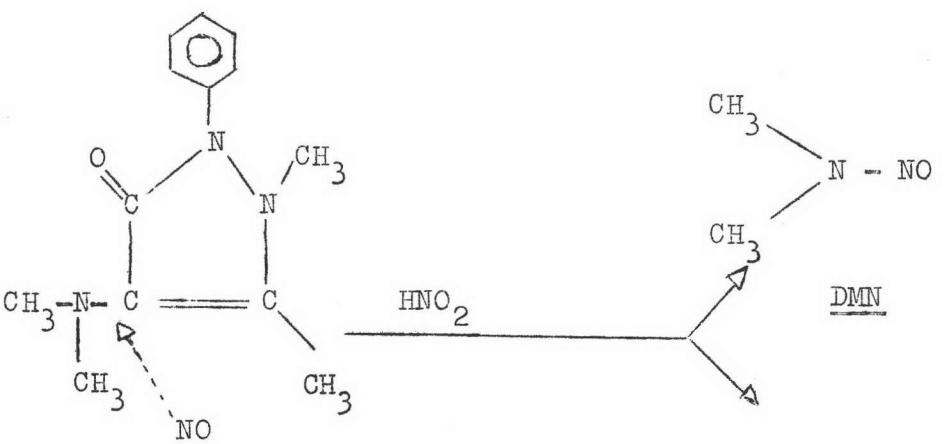
พวก Tertiary amines นั้นคนเราได้รับอยู่เสมอในรูปของยาต่างๆมี ผู้ศึกษาเกี่ยวกับปฏิกริยาของ tertiary amines กับ nitrous acid (HNO_2) จะได้ dialkyl Nitrosamines โดย Nitrosative Dealkylation ซึ่งเป็นปฏิกริยาที่เกิดกับพวก tertiary amines ในมัชฉิมที่ค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งปฏิกริยานี้ที่เกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของคนอาจจะเป็นต้นเหตุของการเกิด carcinogenic nitrosamines ก็ได้ ทั้งนี้เพราะ Nitrite นั้นถูกใช้ในการ cured และ Preserved เนื้อและปลาอยู่เป็นประจำและยังมาจาก Reduction ของ Nitrates ได้อีกด้วย

Lijinsky (1974) ได้ทดลองศึกษาเกี่ยวกับปฏิกริยาของยาต่าง ๆ กับ Nitrous Acid โดยเน้นถึงว่าปฏิกริยาระหว่างสาร 2 ชนิด (Interactions) นี้เกิดขึ้นได้แม้ในขณะที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ เพื่อเป็นการเตือนภัยให้เกิดข้อพึงระวังในพิษที่อาจจะเกิดจากการบริโภคยาเหล่านั้นเข้าไป ยาที่มีผู้ทดลองทำก็คือ Aminopyrine (Analgesic), Chlorpheniramine (Antihistamine) Methapyrilene (Antihistamine), Tolazomide (Hypoglycemic) Chlorpromazine (Tranquilizer), Dextropropoxyphene (Tranquilizer) Quinacrine (Antimalaria), Lucanthone (Antischistosomiasis) Cyclizine (Antimotion sickness), Disulfiram (Artialcoholic) Methadone (Narcotic), Oxytetracycline (Antibiotic) Nikethamide (Respiratory stimulant).

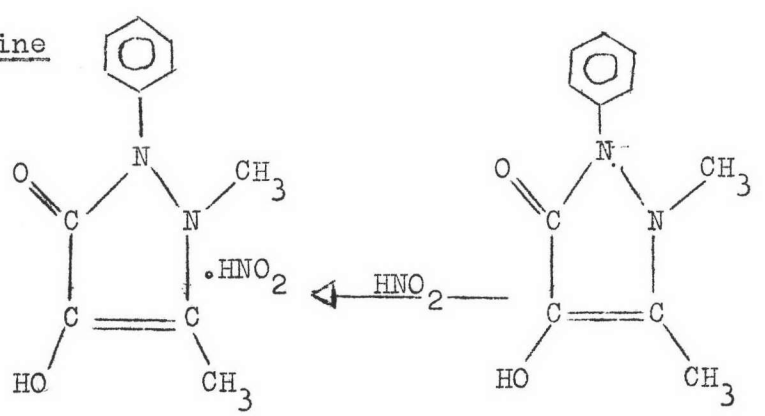
Lijinsky ยังพบว่ายาเหล่านี้ทำให้เกิด Nitrosamines ได้ทุกชะนิด ปริมาณ Nitrosamines ที่เกิดขึ้นแปรผันจาก 0.03 % - 40 %

(Dextropropoxyphene - Aminopyrine) และส่วนมากปริมาณ Nitrosamines ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 90°C จะสูงกว่าที่ 37°C มาก (ดูตารางที่ 14) Products ที่ได้ส่วนใหญ่เป็น DMN และ DEN ซึ่งเป็น carcinogen อย่างแรง ยาที่นำมาทดลองนี้เป็นเพียงส่วนน้อยจากยาทั้งหมดที่ใช้กันอยู่ และยาบางตัวก็เป็นยาที่มีผู้ใช้กันเป็นประจำ ถ้าบังเอิญในขณะที่ก่อนหรือหลังรับประทานยานั้นแล้วไปรับประทานอาหารที่มี Nitrite หรือ Nitrate สูง ๆ ก็อาจเกิด Nitrosamines ในกระเพาะได้ จากผลการทดลองเรื่องยานี้ก็เป็นเหตุผลอันหนึ่งที่สนับสนุนว่าควรจะเลิกใช้ Nitrites ในอาหาร

ปฏิกริยาระหว่าง Aminopyrine กับ Nitrite (Nitrous Acid)



Aminopyrine

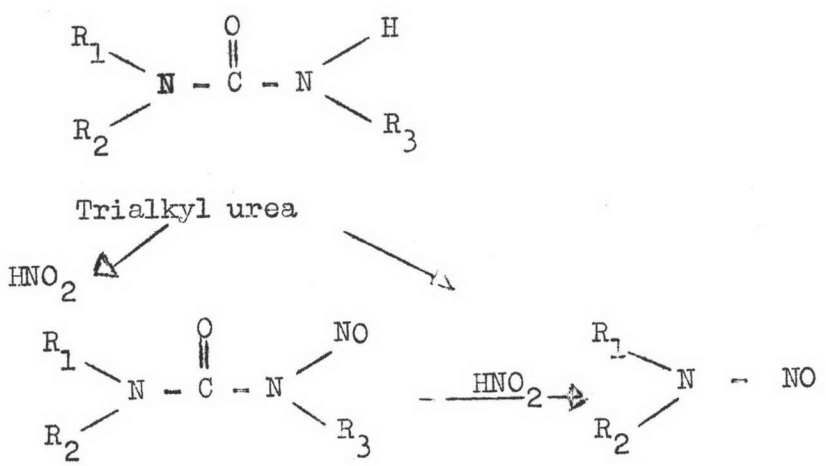


4 Hydroxyantipyrine nitrite

4 Hydroxyantipyrine

ซึ่ง Aminopyrine เป็นยาที่ทำปฏิกริยากับ Nitrite ได้ DMN มากที่สุด แม้มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ดูตารางที่ 15 ดังนั้นปริมาณ Nitrite ที่เหลือในอาหารจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่อาจจะมีผลต่อสุขภาพมนุษย์ได้

ไม่เพียงเท่านั้น Nitrosamines ยังอาจเกิดจากปฏิกริยาระหว่าง Nitrite กับพวกสารเคมีที่ใช้ในการเกษตร (Agricultural Chemicals) เช่นพวก Pesticides และ Herbicides ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Alkyl urea และ Alkyl carbamic Acid ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน ๆ ได้ เป็น Dialkylnitrosamines หรือ N - Nitroso Derivatives อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง เช่นการทำปฏิกริยาระหว่าง Trisubstituted urea กับ Nitrite ในสารละลายที่เป็นกรดอ่อน ๆ จะได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดคือ Nitroso urea และถ้าเกิด Nitrosative cleavage ก็จะได้ Dialkylnitrosamines ซึ่งปริมาณของผลผลิตที่ 37 °C จะมีนัยสำคัญที่เดียว



สารเคมีทางเกษตรเหล่านี้มนุษย์อาจได้รับได้หลายทาง เช่น ขณะใช้สารเคมีเหล่านั้นหรือเป็นกากที่ตกค้างอยู่ในพืช เช่น ผัก และผลไม้

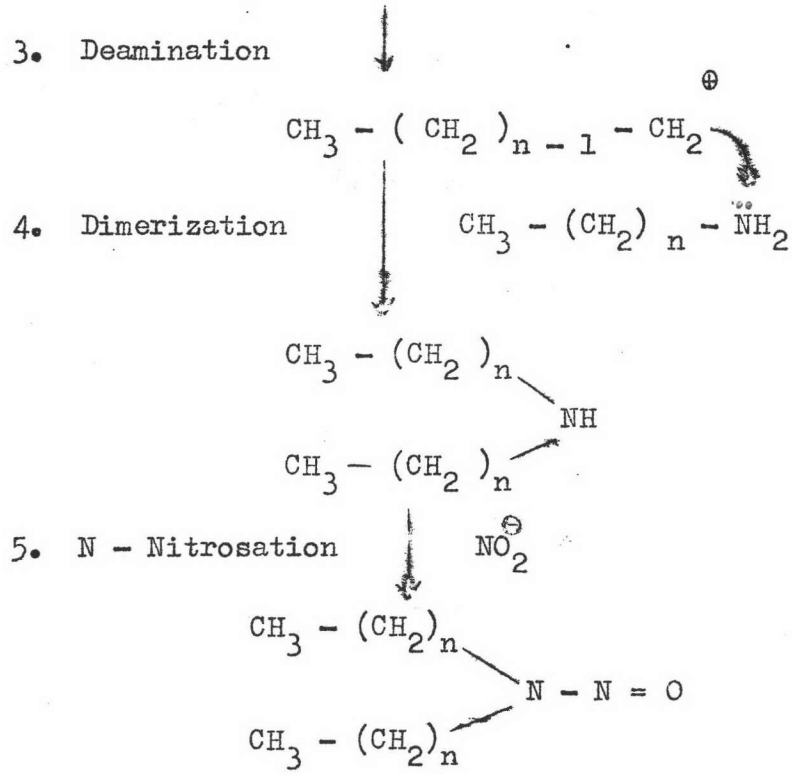
โดยทั่วไปแล้วพวก Primary monoamine ไม่ใช่ Precursors ที่ดีของ Nitrosamines เพราะว่าเมื่อทำปฏิกริยากับ Nitrite เกิด Diazotization และ Deamination แล้วได้พวก Olefins, Alcohols หรือ Substituted Products ออกมา มีผู้พยายามทดลองว่า Primary amines ทำปฏิกริยากับ Nitrites เกิดเป็น Nitrosamines หรือไม่ เช่น Adamson และ Konner(1934) พบ Dialkyl Nitrosamine จากปฏิกริยาของ Nitrite กับ Primary Aliphatic amines หลายตัว Ender และ Ceh (1971) พบ DMN และ DEN จากปฏิกริยาระหว่าง Nitrite กับ Methylamine และ Ethylamine ตามลำดับ Lijinsky และ Epstein (1970) กล่าวว่า Primary amines เช่น Putrescine และ Cadaverine อาจ cyclize เกิดเป็น secondary amines ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการหุงต้มแล้วทำปฏิกริยากับ Nitrite เกิดเป็น Nitrosamines ได้

พวก Primary amines นั้นพบเสมอในอาหาร ส่วนปฏิกริยาของ Nitrite กับ diamines เกิดเป็น Heterocyclic nitrosamines ก็เป็นปฏิกริยาที่สำคัญอาจเป็นแหล่งกำเนิดของ Nitrosamines ได้ ดังนั้นการเติม Nitrites ในอาหารที่มีพวก Primary และ Secondary amines จึงเป็นข้อที่พึงสังวรไว้เป็นอย่างยิ่ง เพราะว่าอาจเกิด Nitrosamines ขึ้นในขณะที่หุงต้มหรือระหว่างการเก็บเอาไว้ได้

วิถีทางที่อาจเป็นไปได้ในการเกิด Dialkylnitrosamine จาก Primary Monoamine

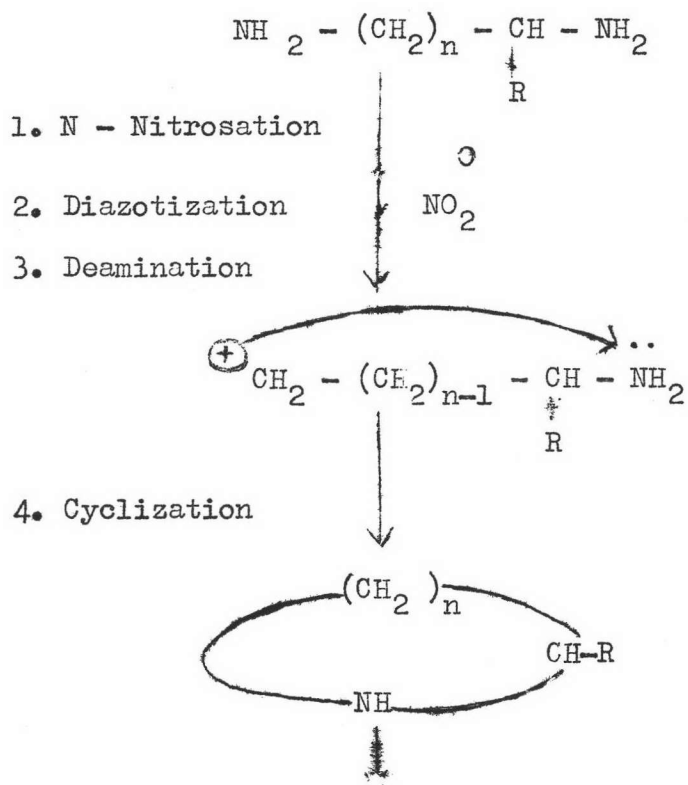
$$CH_3 - (CH_2)_n - NH_2$$

1. N - Nitrosation
2. Diazotization $\downarrow$ $NO_2^{\ominus}$

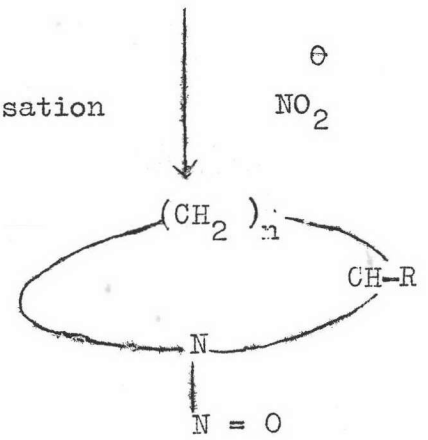


วิถีทางที่อาจจะเป็นไปได้ในการเกิด Heterocyclic Nitrosamines

จาก Primary diamine



5. N – Nitrosation



(R = H for Diamines, – COOH for Diamino acids)

Druckey และผู้ร่วมงาน (1967) ได้ศึกษาถึงผลของการออกฤทธิ์ของสารประกอบจำพวก N – Nitrosamines รวม 65 ชนิด ที่มีต่อหนู โดยมุ่งดูที่อวัยวะที่เป็นอันตราย แล้วสรุปว่า

1. Symmetrical Dialkyl Nitrosamines ทำให้เกิดมะเร็งของตับหลังจากให้ทางปาก และพบว่า DEN ใน Dose ต่ำ ๆ นอกจากจะทำให้เกิดเนื้องอกของตับแล้วยังมีหลอดอาหารและโพรงจมูก ส่วน DMN นั้นทำให้เกิดเนื้องอกของไตปอด และตับด้วย

2. Non – Symmetrical Dialkyl Nitrosamines จะทำให้เกิดเนื้องอกของหลอดอาหารอย่างเดียว

3. Cyclic Nitrosamines เช่น N – Nitrosopyrrolidine จะทำให้เกิดเนื้องอกของตับอย่างเดียว

ในปี 1972 Mirvish และผู้ร่วมงาน ได้ค้นพบว่า Ascorbate อาจใช้เป็น Blocking agent เพื่อป้องกันการเกิด Nitrosation ของ amines โดย Nitrites ได้การค้นพบนี้อาจใช้ลดการเกิด Nitrosamines โดยยาหรืออาหารบางชนิดได้

การวิเคราะห์หา Nitrosamines นั้นมีผู้คิดค้นหากันมากมาย เช่น Polarography, Gas chromatography, Thinlayer chromatography และ Spectrometric methods ต่างๆ เช่นNuclear magnetics resonance และ Infrared เป็นต้น วิธีที่พอจะกล่าวได้ว่าเป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดคือการใช้ Gas chromatography ร่วมกับ spectrometry.

ในประเทศไทย จากการศึกษาด้านระบาดวิทยาของมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ พบว่าประชากรที่เป็นโรคนี้อยู่ในระหว่างอายุค่อนข้างต่ำ (30 - 60 ปี) นอกจากนี้อัตราการเกิดโรคยังอยู่ในเกณฑ์สูงถึง 5 เท่าของอัตราการเกิดโรคนี้ในสหรัฐ-อเมริกาหรือยุโรป (มิคะเสน และ แจ้งบำรุง,2517) และจากการศึกษาในหนูขาวที่ให้กิน Standard Rat Diet ที่มีปลาร้าเจือปนอยู่ร้อยละ 20 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าหนูทั้งหมด (4 ตัว) มี Marked Fatty Metamorphosis ที่ตับและ 3 ใน 4 ตัวนี้มีการเปลี่ยนแปลงที่ไตด้วย (Migasena et al,1971) ได้ทำการตรวจปลาร้าที่ต่าง ๆ 12 ตัวอย่าง และอาหารที่เก็บถนอมไว้ 9 ชนิด โดยวิธีทางเคมี สามารถตรวจพบสาร Nitrosocompounds ได้ทุกตัวอย่าง (Migasena and Chang bamrung, 1974)

จากการศึกษาข้างต้นนี้พอที่จะบอกได้ว่าอาหารไทยที่เก็บถนอมไว้นาน ๆ อาจที่จะมีสารที่เป็นพิษอยู่ ถึงแม้ว่าจะมิได้พิสูจน์อย่างแน่ชัดแต่ก็เป็นข้อสังวรให้นึกถึงว่า อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดมะเร็งในตับชนิดปฐมภูมิได้ จึงน่าที่จะได้ทำการศึกษา โดยเฉพาะสาร Nitrate และ Nitrite ที่มีอยู่ในอาหารเหล่านั้น ดังได้กล่าวถึงความสัมพันธ์ของการเกิดสาร Nitrosamines ไว้แล้วข้างต้น.