

การอภิปรายผลการวิจัย



ความคาดหมายที่ว่าอาจมีการเกิด Nitrosation ระหว่าง Nitrite กับพวก secondary และ tertiary amine ในร่างกายโดยเฉพาะในสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารนั้น เป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นไปได้โดยมีการทดลองหลายๆ อย่างที่มาสันนิษฐานความคาดหมายนี้ ดังนั้นถ้าคนเราบริโภคอาหารหรือยาที่เป็นพวก amines แล้วบริโภคอาหาร น้ำที่มี Nitrate หรือ Nitrite เข้าไปอีก โอกาสที่จะเกิด Nitrosamine ก็ต้องมีแน่นอนและย่อมเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคสิ่งเหล่านี้เข้าไปพร้อม ๆ กัน

สารจำพวก Amines ที่เป็นส่วนประกอบของอาหารหรือยา ซึ่งเราไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ แต่พวก Nitrate และ Nitrite เป็นสารที่มนุษย์เติมลงไปเพื่อวัตถุประสงค์บางอย่าง ดังนั้นถ้าจะเว้นการเติมสารเหล่านี้ลงในอาหารหรือเติมให้อยู่ในขอบเขตที่กฎหมายกำหนดให้ก็ย่อมไม่ทำให้เกิดผลเสียหายแต่อย่างใด

ในการทดลองครั้งนี้จุดประสงค์คือการหาปริมาณ Nitrate และ Nitrite ในอาหารจำพวก Protein ของไทยที่เก็บไว้บริโภคได้นาน ๆ ถ้ายังเป็นเนื้อเค็มแล้วผู้ผลิตมักใส่ดินประสีลงไปด้วยเพื่อให้เนื้อมีสีแดงน่ารับประทาน โดยที่ผู้ผลิตไม่รู้ถึงพิษอันจะเกิดต่อผู้บริโภคในภายหลัง การทดลองนี้บอกให้ทราบอย่างคร่าว ๆ ว่า อาหารประเภทใดที่มีปริมาณ Nitrate และ Nitrite มาก น้อย ได้มาตรฐานตามกฎหมายกำหนดหรือไม่

ในการหาปริมาณ Nitrite ตามวิธีที่ Official ใน AOAC 1975 มีดังนี้ คือ ชั่งตัวอย่างอาหารที่ทำให้เป็นชิ้นละเอียดแล้ว หนักตามความเหมาะสม ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจาก N แล้วต้มไอรอนประมาณ 80 องศาเซลเซียส ภายใต้ขวด ปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วจึงเอา ขวดนั้นแช่ในน้ำเดือดนาน 2 ชั่วโมงเพื่อสกัด Nitrite ออกจากอาหาร เมื่อครบ เวลาให้เติมสารละลายอินทรีย์ของ $HgCl_2$ ลงไป 5 มิลลิลิตร ทำสารละลายทั้งหมด ให้เย็นแล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 เอาน้ำที่กรองได้ 500 มิลลิลิตรมาเติมสารละลาย Modified Griess 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งให้สีของสารละลายเกิดในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัด หาค่า Absorbance โดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 520 nm ใช้ น้ำกลั่นที่ใส่สารละลาย Griess เป็น blank ค่า Absorbance ที่ได้นำมาหา ค่าความเข้มข้นของ Nitrite ได้จากกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ Nitrite ครั้งนี้ได้ใช้วิธีของ AOAC 1975 เป็นหลัก แต่ได้มีการดัดแปลงเพื่อให้รวดเร็ว ปลอดภัย และแม่นยำยิ่งขึ้น โดยอาศัย ผลการวิจัยของ Nicholas และ Fox (1973) พวกเขาได้ทำการทดลองเพื่อ เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ Nitrite ของ AOAC กับวิธีวิเคราะห์ใหม่ๆ อีก 4 วิธี และเขาพบว่าวิธี AOAC ได้ผลดีที่สุดนอกจากนี้พวกเขายังได้ปรับปรุงและ ย่นย่อวิธีของ AOAC โดยได้ข้อสรุปดังต่อไปนี้

1. ในการสกัด Nitrite ตามวิธี AOAC ให้แช่ขวดตัวอย่างในน้ำเดือด นาน 2 ชั่วโมง แต่จากการทดลองของ Nicholas และคณะพบว่าในเวลา 1 ชั่วโมง ก็จะสามารถสกัด Nitrite ออกได้เต็มที่ ดังนั้นในการวิเคราะห์ครั้งนีจึงใช้เวลาในการสกัด Nitrite เพียง 1 ชั่วโมง

2. วิธี AOAC ต้องเติมสารละลายอิมตัวของ $HgCl_2$ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อตกตะกอน Protein และไปทำให้พวก Nitrosothiols แตกตัวแต่ Nicholas (1973) ได้ทดลองและกล่าวว่า การแช่ตัวอย่างในน้ำเคื่อนนาน 1 ชั่วโมง ก็จะได้ผลดีพอเหมือนกัน

เนื่องจาก $HgCl_2$ เป็นสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อนแรง มีพิษต่อผู้ที่ต้องทำงานอยู่กับ สารนี้เป็นเวลานาน ๆ และเป็น Pollutant อีกด้วย ดังนั้นการเลิกใช้ $HgCl_2$ จึงทำให้การทดลองนี้ปลอดภัยยิ่งขึ้น โดยที่ปริมาณ Nitrite ไม่เปลี่ยนแปลง

3. ปริมาณสารละลาย Modified Griess ต่อปริมาตรตัวอย่างเป็น 2 : 50 แต่ Nicholas แนะนำให้ใช้เป็น 1 : 10 คือใช้สารละลาย Griess 5 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร แล้วพบวากกราฟ ซึ่งเดิมจะเป็นเส้นตรงจนถึง ความเข้มข้นของ Nitrite เท่ากับ 5 Microgram $N(NO_2^-)$ / 50 ml จะเป็น เส้นตรงจนถึงความเข้มข้นเท่ากับ 10 microgram $N(NO_2^-)$ / 50 ml.

4. การตั้งให้สีเกิดขึ้นจนเต็มที่ในวิธี AOAC ใช้เวลา 1 ชั่วโมง แต่วิธี ปรับปรุงนี้ใช้เพียง 25 นาทีก็เพียงพอและหลังจากนั้น Nicholas พบว่าสีจะค่อยๆ จางลง

จากข้อสรุปที่กล่าวมานี้ ทำให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์หนอยลง และมีความปลอดภัยยิ่งขึ้นโดยที่ผลดีพอไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำตาม คำแนะนำของ Nicholas (1973) และคณะ

ข้อควรระวังอีกประการหนึ่งที่บ่งไว้ใน AOAC คือสาร 2 - Naphthylamine นี้เป็น Carcinogen ด้วย การใส่สารตัวนี้จึงต้องระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง

บางครั้งเมื่อเติมสารละลาย Griess ลงไปตัวอย่างอาจขุ่น ซึ่งได้แก้ไข โดยการใช้การ Centrifuge ด้วยความเร็ว 3,000 - 4,000 rpm. จนกว่าจะได้สารละลายที่ใส เหตุที่ไม่กรองนั้นเพราะสีของ Azo dye ที่เกิดจาก Nitrite จะถูก

กระดามกรองดูดซับไว้ซึ่งจะทำให้ค่า Absorbance นิดไป

จากกราฟมาตรฐานของ Nitrite ที่เตรียมได้มีกราฟเป็นเส้นตรง (ดู Standard Curve ของ Nitrite จาก 0 - 0.3 จึงถือว่าช่วงนี้เป็น ช่วงที่มีความถูกต้องที่สุด เมื่อตัวอย่างใดที่นำมาวัดค่า A ใดมากกว่า 0.3 ต้องทำ Dilution ใหม่เพื่อให้ค่า A อยู่ในพิสัย 0 - 0.3

ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณ Nitrate ได้ดำเนินการตามวิธีของ AOAC 1975 ทุกประการ และได้นผลเป็นที่น่าพึงพอใจเป็นอย่างยิ่ง.