วารสารบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 กุมภาพันธ์ – พฤษภาคม 2551

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหารโดยใช้เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสที่สกัดได้จากใบข้าวโพด

THE DEVELOPMENT OF METHOD FOR QUANTITATIVE NITRATE ANALYSIS IN FOOD STUFF BY USING NITRATE REDUCTASE FROM *ZEA MAYS SACCHARATA.*

[1)]สุริยา สืบตระกูล [2)]ผศ.ดร.ศิริกานต์ ผาสุข [3)] ผศ. ดร.ชาตรี เกิดธรรม
[1)]Mr.Suriya Suebtrakool [2)] Asst.Prof. Dr.Sirikan Phasuk [3)] Asst.Prof. Dr.Chatree Kerdtham

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหารโดยวิธีรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสจากใบข้าวโพด 2) เพื่อศึกษาสภาวะของการเกิดปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชันที่เหมาะสมสำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหาร 3) เพื่อจัดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท – ไนไตรท์ในตัวอย่าง ให้กับนักศึกษาและผู้สนใจทั่วไป

ผลการวิจัยพบว่า

การศึกษาปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในข้าวโพด 2 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวโพดเทียน ข้าวโพดหวาน พบว่าปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสพบมากในข้าวโพดหวาน ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาทีเท่ากับ 0.124 ส่วนในข้าวโพดเทียนมีปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสน้อยกว่า ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาทีเท่ากับ 0.072 จากการศึกษาสภาวะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในเบื้องต้นพบว่า มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ จึงได้ทำการแยกเอนไซม์ไนเตรต รีดักเทสด้วยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้เอนไซม์และเมื่อนำสารสกัดเอนไซม์จากข้าวโพดหวานมาผ่านกระบวนแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้มีประสิทธิภาพการทำงานสูงขึ้น สูงกว่าสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแยกถึง 3 เท่า

[1)] นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา แขนงวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

[2), 3)] อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา แขนงวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคู่ควบ (Diazotization coupling) พบว่า กรดที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ สำหรับคู่ของสารประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้มี 2 คู่คือ คู่ปฏิกิริยาระหว่าง p - Bromoaniline (PBA) กับ N-(1-naphthyl)- ethylenediamine Dihydrochloride (NED) และ p - aminobenzoic acid (PABA) กับ NED จากการทดสอบความไวและความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์วิธีใหม่ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีของ AOAC พบว่าความแตกต่างของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตามวิธีของ AOAC และวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์วิธีใหม่ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับความไวของวิธีวิเคราะห์แต่ละวิธี พบว่าวิธีใหม่ทั้ง 2 วิธีมีความไวสูงกว่าวิธีวิเคราะห์เดิมของ AOAC จากการศึกษาความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาแล้วกับชนิดของสารตัวอย่างที่มีไนไตรท์เจือปน พบว่าวิธีใหม่ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 วิธีมีการตอบสนองที่ดีกว่าวิธีของ AOAC กับตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดที่ได้ทำการวิเคราะห์

ABSTRACT

The goals of this research are as follow: 1) To develop analytical method for nitrate in food sample by reduce with Nitrate reductase from corn leaves. 2) To determine the suitable condition of Diazotization reaction on the analytical method for nitrate in food sample. 3) To implement the workshop on “Using biocatalyst in quantitative analytical of Nitrate-Nitrite in sample for scholars and general interested people.

As a result, firstly from determining nitrate reductase in 2 breeds of corn which are white corn (tain corn) and sweet corn, the finding has shown that sweet corn has more amount of nitrate reductase (0.124 unit/mL/minute) than white corn
(0.072 unit/mL/minute). The basic studying of the enzyme efficiency in reaction is done and show the low reaction rate, lead to the enzyme purification by gel filtration chromatography to increase enzyme activity for the better performance of enzyme. When the enzyme extracted from sweet corn has passed gel filtration chromatography , it increase enzyme ability 3 times higher than enzyme extracted before the chromatography. Studying about the suitable time that nitrate reductase extracted has reduced nitrate to be nitrite found that the enzyme nitrate reductase extract use at least 10 munites.

Secondly, determining the suitable condition in Diazotization coupling reaction found that 0.5 molar Hydrochloric gave the best result, also there are 2 couples of compound that the

reaction can occur which are the couple of p-bromo aniline (PBA) and N-(1-naphthyl) – ethylenediamine Dihycrochloride (NED) and the couple of p-aminobenzoic acid (PABA) and NED. The sensitivity and difference of new analytical methods of Nitrite that was developed compared to the analytical method of Nitrite of AOAC found that there is no significantly different between AOAC method and 2 new developed methods, but for the sensitivity the new 2 methods has higher sensitivity than the original one of AOAC. Studying of developed method efficiency using the 2 samples contaminated with Nitrite reveal the better responsibility in both methods against the original and of AOAC in both samples.

ความสำคัญของปัญหา

ไนเตรทเป็นสารที่พบปนเปื้อนได้ตามแหล่งต่างๆ เช่น น้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน ปุ๋ย ของเสียจากสัตว์ ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำดื่ม และอาหาร รวมทั้งน้ำผัก ซึ่งเป็นแหล่งให้สารอาหารแก่มนุษย์อีกแหล่งหนึ่ง ตัวอย่างผักที่มีการปนเปื้อนของไนเตรทได้แก่ มันฝรั่ง กะหล่ำปลี แตงกวา เป็นต้น ในต่างประเทศปริมาณไนเตรทสูงสุดที่ยอมให้มีในผักชนิดต่างๆ เช่น กะหล่ำปลี 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แตงกวา 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม บีท 1,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และแครอท 415 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) จากการศึกษาของยูชาและคณะ ในปี1993 พบว่าพืชบางชนิดมีการปนเปื้อนของไนเตรท ดังนี้ ข้าว 20-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมล็ดถั่ว 39-114 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผักที่มีใบ 30-270 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รากและหัว 31-2,043 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเครื่องเทศเช่น พริก 145-4,680 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Prakasa & Puttanna, 2000) ซึ่งจะเห็นได้ว่าไนเตรทอาจจะปนเปื้อนในปริมาณน้อยมากในพืชบางชนิดและปนเปื้อนในปริมาณมากในพืชบางชนิดเช่นกัน (Corre and Breiner, 1979; Maynard and Barker, 1979) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทในน้ำผักและน้ำผลไม้ พบว่า ประมาณ 70-80% ของปริมาณไนเตรททั้งหมดที่ร่างกายสามารถรับเข้าไปได้นั้นมาจากผักและผลิตภัณฑ์จากผัก ในปี 1990 คณะกรรมการวิทยาศาสตร์การอาหารของยุโรป (Scientific Committee for Food ; SCF) ได้กำหนด ปริมาณไนเตรท (SCF, 1992) ที่ร่างกายสามารถรับเข้าไปคือ 255 มิลลิกรัมไอออนไนเตรทต่อน้ำหนัก 70 กิโลกรัม การบริโภคน้ำผัก 150 มิลลิลิตร จะมีปริมาณไนเตรทอยู่ 2000 ppm ซึ่งเป็นปริมาณที่ร่างกายรับปริมาณไนเตรทเข้าไปมากเกินที่ ADI (acceptable daily intake) กำหนด (Kolb et al, 1997)

สำหรับประเทศไทยมีการกำหนดปริมาณไนเตรทในน้ำและอาหารบางประเภทดังนี้คือ น้ำดื่มมาตรฐานปริมาณไนเตรท - ไนโตรเจนไม่เกิน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำบาดาลเพื่อการบริโภค มาตรฐานปริมาณไนเตรทไม่เกิน 45 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) และในอาหาร มาตรฐานไนเตรทไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2541) องค์การอนามัยโลกได้กำหนดปริมาณไนเตรทที่ร่างกายสามารถรับเข้าไปได้ไม่เกิน 3.65 มิลลิกรัมไนเตรทต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันหรือประมาณ 219 มิลลิกรัมต่อวันต่อคนที่มีน้ำหนัก 60 กิโลกรัม (Prakasa & Puttanna, 2000)

สำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหารเช่น น้ำดื่ม ผักสด น้ำผักผลไม้ อาหารตากแห้งเช่น เนื้อเค็ม ปลาเค็ม ไส้กรอก หมูยอ กุนเชียง ซึ่งมักเป็นอาหารที่มีการปนเปื้อนของไนเตรท วิธีการวิเคราะห์มาตรฐานที่มีขั้นตอนการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อนต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์มาก (AOAC : OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS,1998) วิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ต้องทำการรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ โดยใช้โลหะแคดเมียม ซึ่งจัดเป็นโลหะที่มีความเป็นพิษส่งผลเสียต่อ สิ่งแวดล้อม ต่อจากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการรีดิวซ์ด้วยโลหะแคดเมียมแล้วมาทำปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชัน (Diazotization) กับสารประกอบที่เกิดปฏิกิริยาคู่ควบ เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีและทำการวัดความเข้มสีหรือค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ถ้าในตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มีไนไตรท์ปนเปื้อนอยู่ด้วยต้องทำการวิเคราะห์ 2 ครั้ง เพื่อที่จะทราบเฉพาะปริมาณของไนเตรทหรือไนไตรท์เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง สำหรับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทวิธีอื่นๆ ที่ปรากฏในวารสารทางวิชาการโดยส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับวิธีมาตรฐานที่กล่าวข้างต้น แตกต่างกันในเรื่องของโลหะที่ใช้รีดิวซ์ โดยใช้สังกะสีและทองแดงแทนแคดเมียม นอกจากใช้โลหะข้างต้นดังกล่าวยังมีการใช้ไฮดราซีนในสารละลายด่าง (Ananth ,S & Moraghan, J .T.;1987) เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์อีกด้วย ในส่วนของการใช้หลักการของปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชัน ในการทำให้สารละลายเกิดสีนั้นมีการใช้สภาวะของปฏิกิริยาและสารประกอบที่เกิดปฏิกิริยาคู่ควบที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะของสารละลายและความมีขั้วของสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

จากการตรวจเอกสารเบื้องต้นพบข้อมูลที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ของเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส (Nitrate reductase) ในเซลล์แบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ส่งผลต่อระบบการควบคุมโรคและสุขภาพของไก่(Anderson, R.C. et al ;2004) นอกจากนั้นยังพบว่าในพืชผักหลายชนิด เช่น กะหล่ำปลีแดง กะหล่ำปลีขาว มะเขือเทศ หญ้าอาหารสัตว์ รวมทั้งใบข้าวโพด(Herod-L Teresa et al;1993) สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และเปลี่ยนไนไตรท์เป็นแอมโมเนียได้ โดยอาศัย

เอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส และไนไตรท์ รีดักเทส ซึ่งมีโมลิบดินัมเป็นโค-แฟคเตอร์ (ดิเรก ทองอร่าม , 2546)

เพื่อเป็นการช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมหลีกเลี่ยงการใช้โลหะหนักในการวิเคราะห์โดยเฉพาะแคดเมียมซึ่งเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงและเป็นที่มาของโรคอิไต อิไต ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหารตามแนวทางของวิธีมาตรฐาน (AOAC : OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS,1998) โดยปรับเปลี่ยนวิธีการรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ซึ่งเดิมใช้วิธีรีดิวซ์โดยโลหะแคดเมียม เป็นการรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสที่สกัดได้จากใบข้าวโพดในรูปของสารสกัดหยาบ เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการแยกและศึกษาสภาวะของการเกิดปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชันที่เหมาะสมสำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหาร และจัดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท – ไนไตรท์ในตัวอย่าง ให้กับผู้สนใจทั่วไป

คำสำคัญ

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ เอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส ไนเตรท ไนไตรท์

วัตถุประสงค์การวิจัย

1 เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหารโดยวิธีรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสจากใบข้าวโพด

2 เพื่อศึกษาสภาวะของการเกิดปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชันที่เหมาะสมสำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทในตัวอย่างอาหาร

3 เพื่อจัดการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรท – ไนไตรท์ในตัวอย่าง ให้กับนักศึกษาและผู้สนใจทั่วไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ โดยใช้เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีในห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และ ห้องปฏิบัติการโปรแกรมวิชาเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยผู้วิจัยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ดังต่อไปนี้

1.การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเมล็ดพันธุ์พืชซึ่งได้แก่ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดเทียน โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ทำการเพาะเมล็ดในวัสดุเพาะ โดยใส่เมล็ดข้าวโพด 2 เมล็ดต่อหลุม เมื่อเมล็ดงอกได้ 3 ใบหรือไม่เกิน 15 วัน ตัดส่วนลำต้นพร้อมส่วนของใบอ่อน เพื่อนำไปทำการสกัดเอนไซม์ในข้อ 3.3.3.2

2. การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในตัวอย่างพืช

2.1 การสกัดเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสจากพืชตัวอย่าง

2.1.1 นำส่วนของพืชที่ตัดได้จากข้อ 1 หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งมา 10.00 กรัม ใส่ลงในโกร่งบดยาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 40 มิลลิลิตรที่แช่เย็น

2.1.2 เติมพอลีไวนิลพอลีไพโรลิโดน 0.4 กรัมและซีสเตอีน 0.03 กรัม ทำการบดตัวอย่างพืชให้เซลล์แตกละเอียด หลังจากนั้นทำการกรองผ่านกระดาษกรองสองชั้นด้วยชุดกรองบุชเนอร์ ถ้ายังมีเศษเซลล์เหลืออยู่ให้นำไปปั่นเหวี่ยง

2.1.3 เก็บส่วนของสารละลายไว้ตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสทันทีต่อไปในข้อ 2.2

2.2 การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส

2.2.1 ปิเปตต์สารละลายโซเดียม ไนเตรทความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 900 µL และสารสกัดหยาบเอนไซม์ปริมาตร 50 µL ใส่ลงหลอดทดลอง 4 หลอดที่ติดหมายเลขแล้วหมายเลข 1-4

2.2.2 ปิเปตต์สารละลาย NADH ความเข้มข้น 1 mM ปริมาตร 50 µL ลงในหลอดทดลองหลอดที่ 2 – 4 ไม่เติมในหลอดที่ 1 จับเวลาทันทีที่เติมเสร็จ โดยหลอดที่ 2 ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที หลอดที่ 3 ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 10 นาที และ หลอดที่ 4 ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 15 นาที

2.2.3 เมื่อแต่ละหลอดครบเวลาให้เติมสารละลาย Zinc acetate ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 50 µL

2.2.4 เติมสารละลาย Sulfanilamide ความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 500 µL เติมสารละลาย NED ความเข้มข้น 0.02 % ปริมาตร 500 µL และ น้ำกลั่น 1000 µL

2.2.5 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการคำนวณปริมาณเอนไซม์ตามสูตรอ้างอิงในภาคผนวก

3. การแยกเอนไซม์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชันโดยใช้เซฟาเด็กซ์จี-25ตามวิธีของ Sanderson (Sanderson G.W. & Cocking E.C.,1963)

3.1 นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 1) 4 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์จี-25 6 กรัม ทำการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ พีเอช 7.5

3.2 เก็บสารละลายที่ชะออกมาส่วนละ 6 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่ถูกชะออกมา 12 มิลลิลิตรแรกรวมกันนำไประเหยแห้งภายใต้สภาวะลดอุณหภูมิให้ปริมาตรเหลือครึ่งหนึ่งของส่วนที่ถูกชะออกมา

3.3 เก็บรวบรวมเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C และแบ่งส่วนหนึ่งมาทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส โดยเจือจางสารละลายเอนไซม์ที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ pH 7.5 ในอัตราส่วน 1: 1

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Diazotization coupling

4.1 ศึกษาชนิดของสารประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับไนไตรท์แล้วเกิดเป็น Diazonium ion ส่วนมากเป็นสารที่เป็นอนุพันธ์ของ Aromatic amine ได้แก่ p-bromo aniline และ p-amino – benzoic acid โดยเตรียมความเข้มข้นเท่ากับวิธีการของ AOAC คือที่ความเข้มข้น 0.33 % และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 0.5 มิลลิลิตร

4.2 ศึกษาชนิดของสารประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยา coupling กับ Diazonium ion แล้วเกิดเป็นสารประกอบที่มีสี ได้แก่ diphenylamine และ N-(1-naphthyl) ethylenediamine (NED) โดยเตรียมความเข้มข้นเท่ากับวิธีการของ AOAC คือที่ความเข้มข้น 0.13 % และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 0.5 มิลลิลิตร

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา Diazotization coupling โดยมีตัวแปรดังนี้ได้แก่ ความเข้มข้นและชนิดของกรดที่เหมาะสม เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและ ความเสถียรของสีที่เกิดขึ้น

5. การศึกษาความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาแล้วกับชนิดของสารตัวอย่างที่มีไนเตรท-ไนไตรท์เจือปน

5.1 ตัวอย่างอาหารที่มีไนเตรทเจือปนที่เลือกวิเคราะห์ ได้แก่ น้ำผักผลไม้รวม และผักกาดหอมที่ปลูกโดยวิธีไฮโดรโพนิกส์

5.2 ประเมินความเหมาะสมของปฏิกิริยาต่างๆที่มีความเหมาะสมพอที่จะเป็นวิธีการวิเคราะห์ใหม่ได้ โดยประเมินผลจากค่าทางสถิติด้วยโปรแกรมไมโครซอฟท์เอ็กเซลล์ดังนี้

- ความแม่นยำ (Precision) ของผลการวิเคราะห์โดยเมื่อทำการวิเคราะห์หลายครั้งด้วยวิธีวิเคราะห์หรือสภาวะเดียวกันแล้วค่าที่ได้ในแต่ละครั้งมีความใกล้เคียงกันทุกครั้ง ค่าสถิติที่ใช้ ได้แก่ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และ ค่าความแปรปรวน

- การบอกลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ความไวของวิธีวิเคราะห์ (Sensitivity) โดยประเมินผลจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของชุดการทดลองกราฟมาตรฐานในแต่ละคู่ปฏิกิริยา

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในตัวอย่างพืช

จากการตรวจสอบหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไนเตรต รีดักเทส ในข้าวโพดหวานและข้าวโพดเทียน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรในช่วงนาทีที่ 5,10, และ 15 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากข้าวโพดทั้ง 2 พันธุ์

ชนิดของพืช	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 nm			
	Blank	5	10	15
ข้าวโพด เทียน	0.048	0.225	0.381	0.557
ข้าวโพดหวาน	0.055	0.389	0.685	0.897

ตารางที่ 2 แสดงค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาทีของสารสกัดหยาบที่ได้จากข้าวโพดทั้ง 2 พันธุ์

ชนิดของพืช	ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที)
ข้าวโพด เทียน	0.072
ข้าวโพดหวาน	0.124

จากตารางที่ 1 และ 2 พบว่า ข้าวโพดหวานมีเอนไซม์ไนเตรต รีดักเทสมากกว่าข้าวโพดเทียนเทียนคือ 0.072 และ 0.124 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ผู้วิจัยจึงตัดสินใจเลือกใช้ข้าวโพดหวานเป็นแหล่งของเอนไซม์

2. การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในสารละลายเอนไซม์ที่แยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน ได้ผลดังตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 แสดงการตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในช่วงนาทีที่ 5,10, และ 15 ของสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่แยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน

ชนิดของพืช	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 nm			
	Blank	5	10	15
ข้าวโพดหวาน	0.010	0.958	1.710	2.011

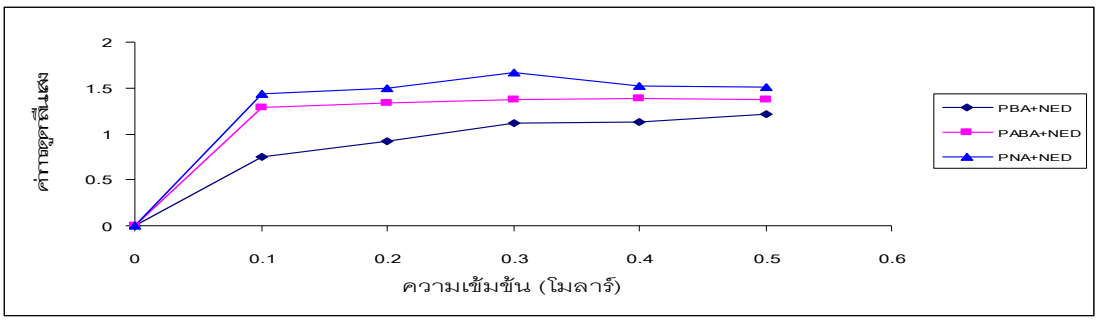
ตารางที่ 4 แสดงค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาทีของสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่แยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน

ชนิดของพืช	ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที)
ข้าวโพดหวาน	0.379

จากตารางที่ 3 และ 4 พบว่าค่าปริมาณเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (ประสิทธิภาพการทำงาน) ของสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่แยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชันมีค่าสูงกว่าสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแยกด้วยวิธีดังกล่าว

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Diazotization coupling

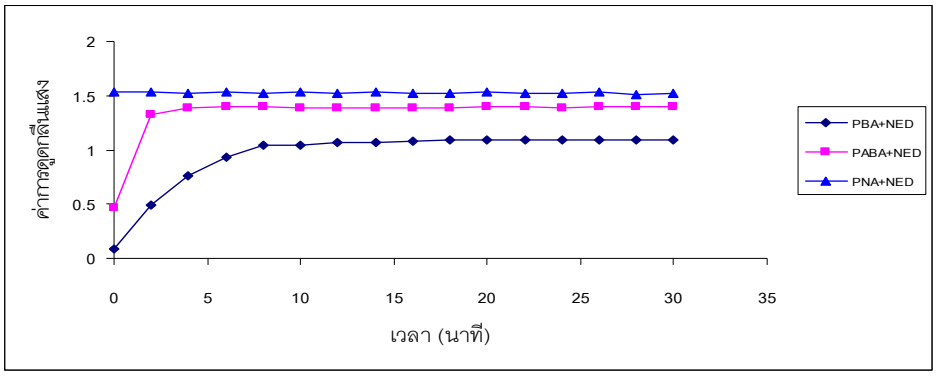
จากผลการทดลองความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มเติม โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3, และ 0.4 โมลาร์ตามลำดับ แสดงดังกราฟภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟแสดงผลความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.02 – 0.5 โมลาร์

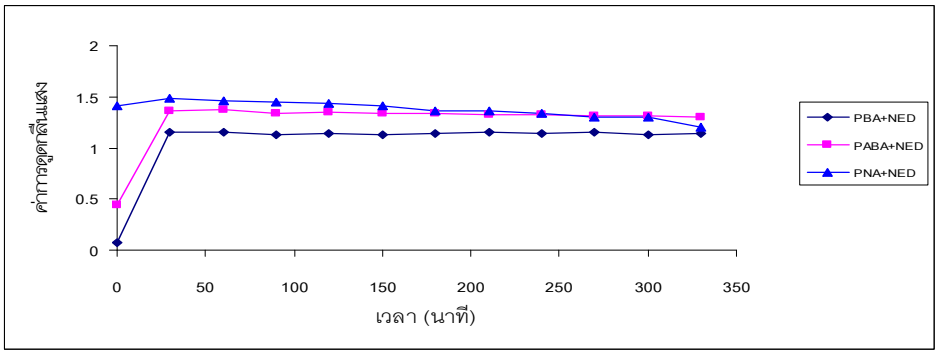
จากผลการทดลองความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเพิ่มเติม โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3, และ 0.4 โมลาร์ตามลำดับ โดยคู่ปฏิกิริยาระหว่าง PBA และ NED ได้ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมเท่ากับ 0.5 โมลาร์ สำหรับคู่ปฏิกิริยาระหว่าง PABA และ NED ได้ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมเท่ากับ 0.4 โมลาร์ และคู่ปฏิกิริยาระหว่าง PNA และ NED ใช้ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมเท่ากับ 0.3 โมลาร์

ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอนแรกและจากการศึกษาช่วงเวลาของการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละคู่ปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 16 ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงอย่างคงที่ ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจนดังในกราฟภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟแสดงช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละคู่ปฏิกิริยา

ผลการทดลองความเสถียรของสีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา โดยทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 330 นาที ภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความเสถียรของสีของแต่ละคู่ปฏิกิริยา

สรุปและอภิปรายผล

1. การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทสในสารละลายเอนไซม์ที่แยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน

จากการศึกษาสภาวะการทำปฏิกิริยาเบื้องต้นพบว่าประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาต่ำ จึงได้ทำการแยกเอนไซม์ไนเตรต รีดักเทสด้วยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน และจากการตรวจสอบ ประสิทธิภาพการทำงาน พบว่า สารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ผ่านกระบวนการแยกด้วยวิธีดังกล่าว มีค่า ประสิทธิภาพการทำงาน สูงกว่าสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแยกถึง 3 เท่า

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Diazotization coupling

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Diazotization coupling สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมต่างๆได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สรุปสภาวะที่เหมาะสมของคู่ปฏิกิริยาระหว่าง PBA และ NED กับ PABA และ NED

สภาวะที่ศึกษา	คู่ปฏิกิริยาระหว่าง	
	PBA และ NED	PABA และ NED
ค่า λ_{max} (นาโนเมตร)	556	545
ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (โมลาร์)	0.5	0.4
ช่วงเวลาของการเกิดปฏิกิริยา (นาที)	15	15
ความเสถียรของสี (ชั่วโมง)	5.5	5.5

จากการศึกษาสภาวะการทำปฏิกิริยาเบื้องต้นพบว่าประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาต่ำ จึงได้ทำการแยกเอนไซม์ไนเตรต รีดักเทสด้วยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน และจากการตรวจสอบ ประสิทธิภาพการทำงาน พบว่า สารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ผ่านกระบวนการแยกด้วยวิธีดังกล่าว มีค่า ประสิทธิภาพการทำงาน สูงกว่าสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแยก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sanderson (Sanderson G.W. & Cocking E.C.,1963) และพบว่ามีค่า ประสิทธิภาพการทำงาน สูงกว่าสารละลายเอนไซม์จากข้าวโพดหวานที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแยกถึง 3 เท่า

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Diazotization coupling ในส่วนของชนิดและความเข้มข้นของสารละลายกรด เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา และ ความเสถียรของสีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยจากการศึกษาพบว่ากรดที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก ช่วงเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง 15-30 นาที และความเสถียรของสีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานั้น มีความสอดคล้องใกล้เคียงกับวิธีการวิเคราะห์ของ AOAC และผลการทดลองของอัฟคามิและคณะ (Afkhami et al,2004)

วิธีการวิเคราะห์แต่ละวิธีนั้นมีความเหมาะสมกับตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป นั่นคือเนื้อของสารตัวอย่าง (matrix) มีผลโดยตรงต่อวิธีการวิเคราะห์ โดยที่อาจจะส่งผลรบกวนสัญญาณของการตรวจวัด หรือรบกวนการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้นวิธีใหม่ที่พัฒนาขึ้นนั้นในการนำไปใช้ในการวิเคราะห์กับสารตัวอย่างชนิดอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากการวิจัยครั้งนี้ ควรจะต้องทำชุดการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์โดยที่พิจารณาจากค่า ร้อยละประสิทธิภาพของวิธี ด้วย ซึ่งวิธีการวิเคราะห์หนึ่งอาจมีความเหมาะสมกับสารตัวอย่างบางชนิดโดยขึ้นอยู่กับเนื้อของสารตัวอย่าง (matrix)

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่กับวิธีวิเคราะห์เดิม โดยไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่มีวิธีการแตกต่างกันเช่น วิธีที่มีการใช้เครื่องมือชั้นสูง ซึ่งมีข้อจำกัดหลายด้าน ผู้วิจัยเห็นว่าสมควรที่จะมีการวิจัยต่อเพื่อเปรียบเทียบในประเด็นดังกล่าวเพิ่มเติม โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์ เปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบระหว่างผู้วิเคราะห์ ความหลากหลายของชนิดตัวอย่าง ตัวรบกวนในการวิเคราะห์ และอื่น ๆ

บรรณานุกรม

กรมควบคุมมลพิษ. 2541. **ไนเตรท ไนไตรท์ และสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ**. ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.

Ananth S and Moraghan JT. 1987. The effect of calcium and magnesium on soil nitrate determination by automated segmented-flow methods. **Soil Science Society of America Journal**. 51(3):664-667.

Andersson, R. 1985. Nitrate reduction during fermentation by Gram-negative bacterial activity in carrots. **International Journal of Food Microbiology**. 2:219-225.

Association of Analytical chemist. 1998. **official Method of Analysis Association of Analytical chemist**. Washington DC.

Afkhami et al. 2004. Spectrophotometric determination of nitrite Based on Its Reaction with p-nitrroaniline in the prersence of diphenylamine in micellar media. **Bull Korean Chem soc**. 25(7):1009-1011

Anderson RC et al. 2004. Utilization of the nitrate reductase enzymatic pathway to reduce entric pathogens in chickens. **Poultry Science**. 83(11):1857-1860.

Beijaars PR et al. 1994. Determination of nitrate in vegetables by continuous flow : Interlaboratory study. **J AOAC Int**. 77(6):1522-1529

Kolb, B., Haug, M., Janzowski, C., Vetter, A., and Eisenbrand. 1997. Potential Nitrosamine Formation and its Prevention During Biological Denitrification of Red Beet Juice. **Food and Chemical Toxicology**. *35:219-224.*

Mathews, Christopher K. et al. 2000. **Biochemistry**. 3rd ed. San Francisco : Addison Wiley Longman.

Maynard, D.N., and Barker, A.V. 1979. Regulation of nitrate accumulation in vegatables. **Acta Hort**. 93:153-162.

Usha, G., Naidu, A.N., and Kamala, K. 1993. **Food Compos Anal**. 6:242-249.

Sanderson G.W. & Cocking E.C. 1963. Enzymic Assimilation of Nitrate in Tomato Plants. I. Reduction of Nitrate to Nitrite. **Plant Physiology**. 23 : 416-422.