บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไนไตรท์

วัตถุเจือปนอาหารกลุ่มไนเตรทและไนไตรท์หรือที่คนทั่วไปเรียกว่าดินประสิว เป็นสารที่ใช้กันมากในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยมักใช้ในรูปเกลือโซเดียมไนไตรท์ หรือโปตัสเซียมไนไตรท์ และเกลือโซเดียมไนเตรทหรือโปตัสเซียมไนเตรท เมื่อเติมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจะช่วยเพิ่มคุณลักษณะของเนื้อสัตว์ที่ผู้บริโภคชื่นชอบ เช่น สี กลิ่นรส รวมทั้งชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium botulinum* (Vidua-Martos และ คณะ, 2009) จึงเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาได้อีกทางหนึ่ง การเกิดสีของผลิตภัณฑ์นั้นเกลือไนไตรท์จะแตกตัวจนได้เป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และเข้าทำปฏิกิริยากับไมโอโกบิน (myoglobin) ในเนื้อสัตว์ ได้เป็นสารไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) จากนั้นเมื่อได้รับความร้อนจากการปรุงอาหารจะกลายเป็นสารไนโตรโซฮีโมโครม (nitrosohemochrome) ซึ่งเป็นสีชมพูที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ดังภาพที่ 2.1

$NaNO_2 \longrightarrow Na^+ + NO^-_2$

$NO^-_2 + H^+ \longleftrightarrow HNO_2$

$4\ HNO_2 \longleftrightarrow 2N_2O_3 + H_2O$

$2N_2O_3 \longleftrightarrow 2NO + NO_2$

NO + myoglobin $\xrightarrow{\text{สภาวะเหมาะสม}}$ NO-myoglobin (red)

(nitric oxide)

NO-myoglobin (red) $\xrightarrow{\text{cooking}}$ nitrosohemochrome (pink)

(nitrosomyoglobin)

ภาพที่ 2.1 : การเกิดสีของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปเนื่องจากไนไตรท์
ที่มา : ดัดแปลงจาก Romans (1994)

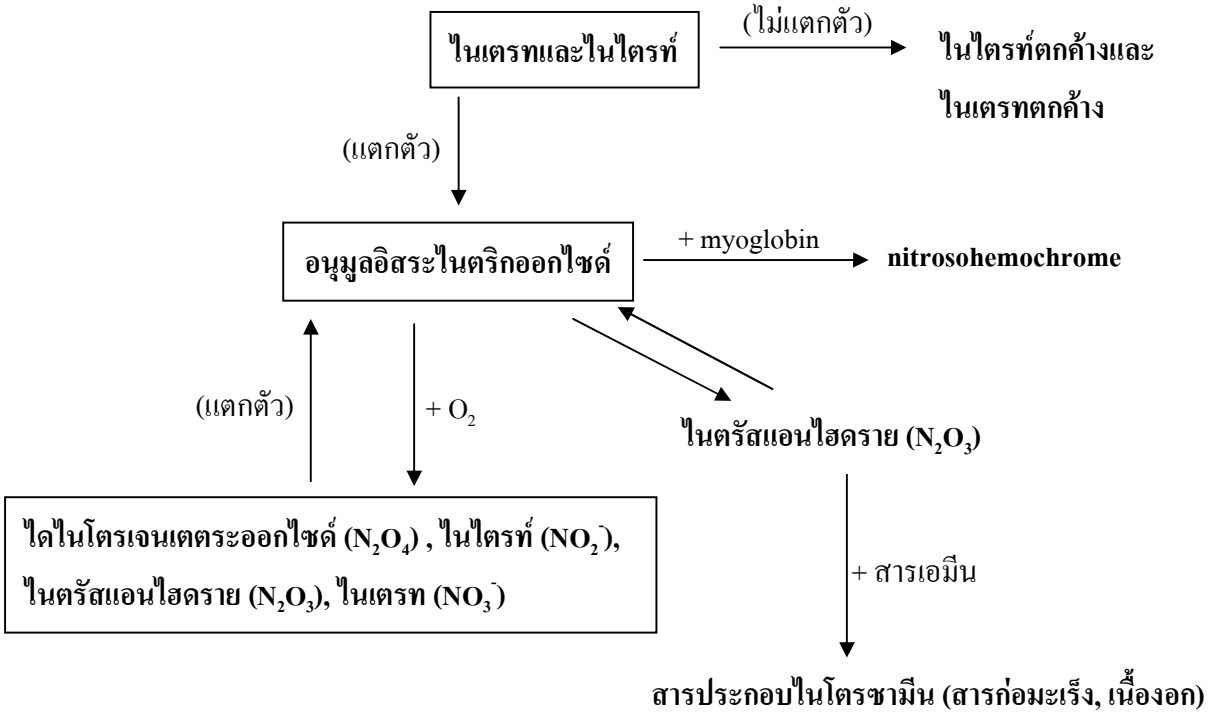
ถึงแม้ไนไตรท์จะทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้น แต่การเติมเกลือไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์อาจทำให้เกิดไนไตรท์ตกค้างซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยการบริโภคอาหารที่มีการเติมเกลือไนไตรท์และไนเตรท์จะส่งผลเสียต่อผู้บริโภค แบ่งได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ ดังนี้

1) เมื่ออยู่ในอาหารไนไตรท์ที่เกิดแตกตัวจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารกลุ่มเอมีนในเนื้อสัตว์และกลายเป็นสารประกอบไนโตรซามีนซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 2.1.2 โดยสารประกอบไนโตรซามีนมีความเกี่ยวเนื่องกับการเกิดโรคลูคีเมียในเด็ก เนื้องอกในสมอง และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งสารประกอบไนโตรซามีนที่ผู้บริโภคได้รับจะมีปริมาณเท่ากับความเข้มข้นของไนไตรท์ยกกำลังสอง (Demeyer และคณะ, 2008) และถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงในการประกอบอาหารประเภทเนื้อสัตว์ สารประกอบไนโตรซามีนจะยิ่งมีปริมาณที่มากขึ้น (Markiewicz และคณะ, 2010)

2) ไนเตรทบางส่วนที่ยังไม่เกิดการแตกตัวจะถูกแบคทีเรียในปากเปลี่ยนให้เป็นไนไตรท์ จากนั้นเมื่อก้อนอาหารถูกส่งผ่านไปยังกระเพาะหรือลำไส้ที่มีสภาวะเป็นกรดซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ไนไตรท์จะแตกตัวเกิดเป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ในสภวะที่มีออกซิเจนไนตริกออกไซด์จะเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรโดยจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนกลายเป็นไนไตรท์ (nitrite, NO_2^-) ไนเตรท (nitrate, NO_3^-) ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N_2O_3) และไดไนโตรเจนเตตระออกไซด์ (dinitrogen tetraoxide, N_2O_4) ดังภาพที่ 2.7 โดยสารดังกล่าวที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO•) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนตรัสแอนไฮไดรด์จะสามารถจับและดึงเบสในกรดนิวคลีอิก เช่น กวานีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) และอาดีนีน (adenine) ออกจากกรดนิวคลีอิก (Vidua-Martos และคณะ, 2009)

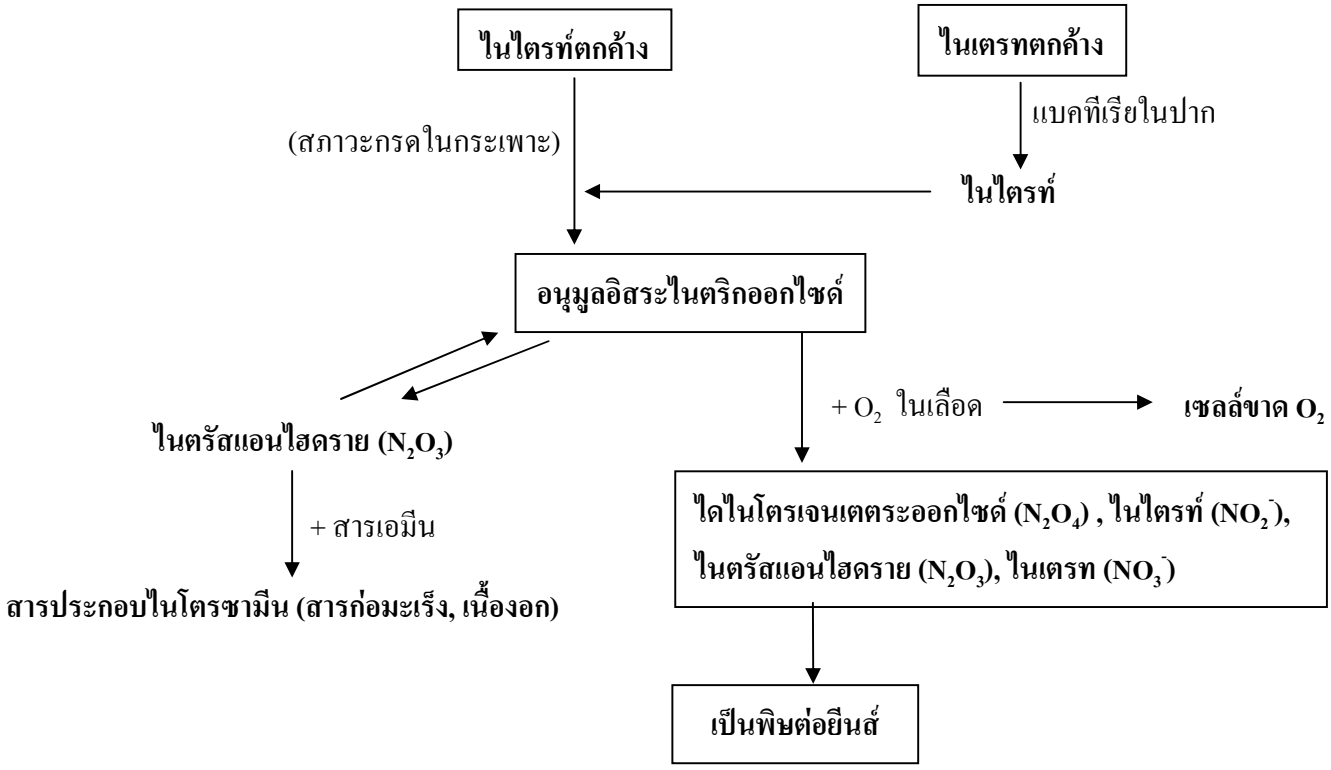
3) ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ที่เกิดขึ้นแล้วในอาหาร รวมทั้งที่เกิดขึ้นในกระเพาะหรือลำไส้ ที่มีสภาวะเป็นกรด จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนในร่างกายอย่างรวดเร็ว แม้จะไม่กระทบต่อเนื้อเยื่อหรือยีนส์โดยตรงแต่จะส่งผลให้เลือดมีปริมาณออกซิเจนต่ำ (Vidua-Martos และคณะ, 2009) และไม่เพียงพอ จึงทำให้เซลล์ในร่างกายขาดออกซิเจน

จากผลเสียทั้ง 3 ส่วนที่กล่าวข้างต้นจะเห็นว่าการเกิดสารก่อโทษต่างๆจากวัตถุเจือปนอาหารประเภทไนเตรทและไนไตรท์ สามารถเกิดได้ตั้งแต่ในอาหารจนถึงในร่างกายของผู้บริโภค โดยปริมาณสารก่อโทษต่างๆจะเปลี่ยนไปตามสภาวะและปริมาณสารตั้งต้น เช่น ไนเตรต ไนไตรท์ สารกลุ่มเอมีน ความเป็นกรด-เบสในอาหารและในกระเพาะ เป็นต้น ซึ่งสามารถอธิบายเป็นแผนภาพโดยรวมได้ดังภาพที่ 2.1 และภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.2 : การเกิดสารก่อโทษจากไนเตรทและไนไตรท์ในอาหาร

ที่มา : ดัดแปลงจาก Demeyer และคณะ (2008); Markiewicz และคณะ (2010); Vidua-Martos และคณะ (2009)



ภาพที่ 2.3 : การเกิดสารก่อโทษจากไนเตรทและไนไตรท์ในร่างกายมนุษย์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Demeyer และคณะ (2008); Markiewicz และคณะ (2010); Vidua-Martos และคณะ (2009)

2.1.1 การควบคุมปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

การควบคุมปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป จะแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ อันมีสาเหตุมาจากอัตราเสี่ยงของผู้บริโภคในประเทศนั้นๆ โดยคำนึงถึง ความถี่หรือโอกาสที่ผู้บริโภคจะได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบเกลือไนไตรท์ ตลอดจนขนาดและน้ำหนักตัวของผู้บริโภคในประเทศนั้นๆ โดยสมบัติต่างๆของวัตถุเจือปนอาหารกลุ่มไนเตรทและไนไตรท์มีดังนี้

1) Sodium nitrite

ชื่อเรียกอื่นๆ : Nitrous acid sodium salt, diazotizing salt, anti-rust

E number : Sodium nitrite (E 250)

สูตรโครงสร้าง : $NaNO_2$

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 69 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 271 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (82 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) แตกตัวได้ดีที่ pH ต่ำ

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โซเดียมโซเดียมไนไตรท์ได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

- สหภาพยุโรป (EU) กำหนดให้ใช้โซเดียมไนไตรท์ ให้ใช้ได้ไม่เกิน 150 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 180 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rat)

LD_{50} เท่ากับ 178 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

2) Sodium nitrate

ชื่อเรียกอื่นๆ : Nitrate of soda, Nitratine, Peru saltpeter, Soda niter

E number : Sodium nitrate (E 251)

สูตรโครงสร้าง : $NaNO_3$

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาวไม่มีกลิ่น หรือมีกลิ่นจางๆ

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 84.9947 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 308 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (92.1 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส หรือ

180 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส)

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โซเดียมไนเตรทใน ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

- สหภาพยุโรป (EU) กำหนดให้ใช้โซเดียมไนเตรทได้ไม่เกิน 300 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 1267 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rat)

LD_{50} เท่ากับ 2680 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

3) Potassium nitrite

E number : Potassium nitrite (E 249)

สูตรโครงสร้าง : KNO_2

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 85.1038 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 440 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (281 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 0 องศาเซลเซียส หรือ 413 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส)

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมไนไตรท์ ได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

4) Potassium nitrate

E number : Potassium nitrate (E 252)

สูตรโครงสร้าง : KNO_3

ลักษณะภายนอก : ผลึกสีขาว

น้ำหนักโมเลกุล : ประมาณ 101.103 กรัม/โมล

จุดหลอมเหลว : 334 องศาเซลเซียส

สมบัติการละลาย : ละลายในน้ำ (13.3 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 0 องศาเซลเซียส, 36 กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส หรือ 247กรัม/100 มิลลิลิตร ที่ 100 องศาเซลเซียส)

ปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ : - ประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมไนเตรทใน

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม

ความเป็นพิษ : LD_{50} เท่ากับ 3750 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rat)

LD_{50} เท่ากับ 1901 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (oral rabbit)

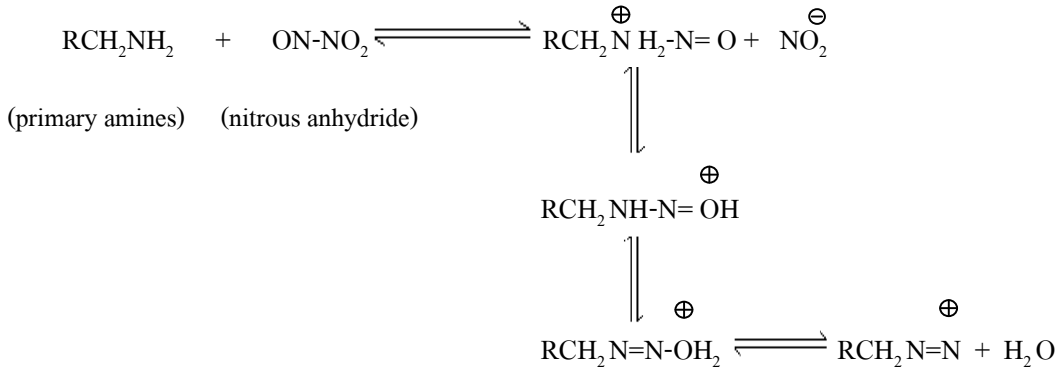
เมื่อผู้บริโภครับประทานไนไตรท์ที่ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ อนุมูลไนไตรท์ (NO_2) จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ (N-Nitrosation) เช่น สารไนโตรซามีน (nitrosamine) แม้ว่าเกลือไนไตรท์จะมีความเป็นพิษมากกว่าเกลือไนเตรท แต่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมเกลือไนไตรท์มากกว่า เนื่องจากเกลือไนไตรท์สามารถแตกตัวได้ดีกว่า ส่งผลให้สีของผลิตภัณฑ์เกิดได้เร็วเป็นที่พอใจกว่า (สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร, 2547 ; ศิวาพร, 2546; Flower, 2002; Madhavi และคณะ, 1995; Romans และคณะ, 1994)

2.1.2 การเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซจากสารไนไตรท์ตกค้าง

สารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ (N-Nitroso compounds) มีอยู่หลายชนิดโดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี

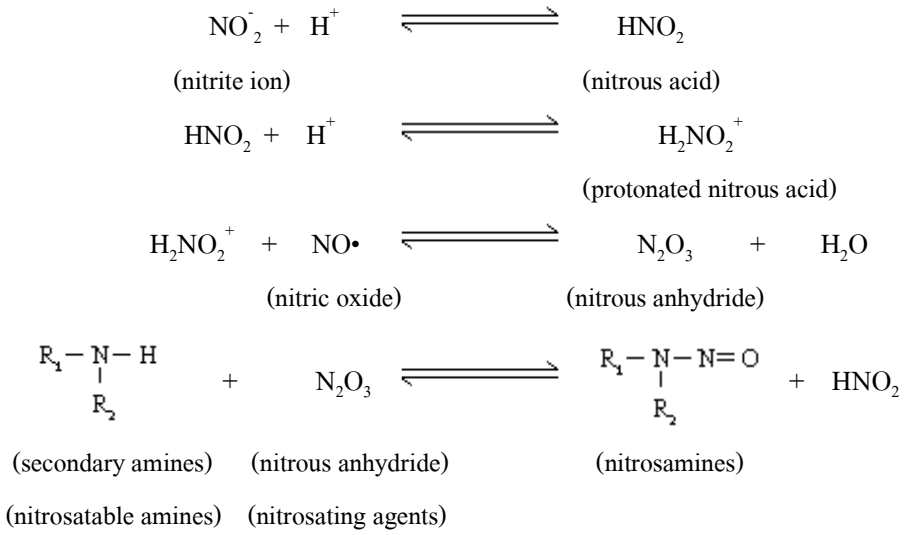
1) กลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine type) เกิดจากสารที่ทำหน้าที่เป็นไนโตรเซติงเอเจน (nitrosating agents) คือ ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N_2O_3) หรืออนุพันธ์ของไนตรัสแอซิด ซึ่งเกิดจากไนไตรท์ตกค้าง (residual nitrite) ทำปฏิกิริยากับสารที่ทำหน้าที่เป็นไนโตรเซทเอเบิลเอมีน (nitrosatable amines) คือ เอมีนปฐมภูมิ (primary amines) ดังภาพที่ 2.4 (Loeppky, 1994) เอมีนทุติยภูมิ (secondary amines) และ เอมีนตติยภูมิ (tertiary amines) ดังภาพที่ 2.5 (ประสงค์, 2549) ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ที่พบมากในอาหารประเภทเนื้อสัตว์และอาหารหมักดอง คือ สารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน (N-nitrosodimethylamine, NDMA)

2) กลุ่มไนโตรซาไมด์ (nitrosamide type) เกิดจากสารที่มีหมู่เอไมด์ (amide group) หรือหมู่คาร์บอนิล(carbonyl group) เข้าทำปฏิกิริยากับไนโตรเซติงเอเจน (nitrosating agents) หรือสารที่มีหมู่ไนโตรโซ (Nitroso group, R-N=O) ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ คือ เอ็น-ไนโตรโซคาร์บาเมท (N-nitroso-carbamates) และ เอ็น-ไนโตรโซยูเรีย (N-nitrosoureas) โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.4 : ปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนจากเอมีนปฐมภูมิ

ที่มา : Loeppky (1994)



ภาพที่ 2.5 : ปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนจากเอมีนทุติยภูมิ

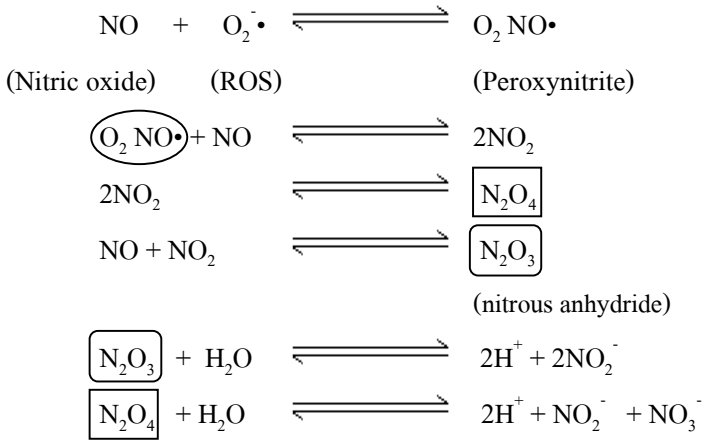
ที่มา : ประสงค์ (2549)

ก.) ข.)

ภาพที่ 2.6 : สารในกลุ่มกลุ่มไนโตรซาไมด์ ; ก.) เอ็น-ไนโตรโซคาร์บาเมท และ ข.) เอ็น-ไนโตรโซยูเรีย

ที่มา : Loeppky (1994)

ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซจะสามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องกลับไปกลับมาจนกว่าสารตั้งต้น (precursor) จะหมดลง ซึ่งกรณีของสารกลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine type) สารตั้งต้นก็คือ ไนโตรเซติงเอเจนและไนโตรเซทเอเบิลเอมีน โดยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซจากสารไนไตรท์ตกค้างนั้นจะมีอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO•) เกิดขึ้นด้วยเสมอ ดังภาพที่ 2.5 โดยอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ไม่จัดว่าเป็นไนโตรเซติงเอเจนโดยตรง (Lu และ Chen, 2007) เพราะอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับไนโตรเซทเอเบิลเอมีน แต่อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์เป็นตัวที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มรีแอ็กทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide, O_2^-•) ทำให้เกิดเปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite, $ONOO^-$) ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N_2O_3) และไดไนโตรเจนเตตระออกไซด์ (dinitrogen tetraoxide, N_2O_4) ดังภาพที่ 2.7 ซึ่งสารทั้งสามนี้สามารถทำให้เกิดสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซกลุ่มไนโตรซามีน (nitrosamine type) คือ ไนไตรท์ (nitrite, NO_2^-) และ ไนเตรท (nitrate, NO_3^-)



ภาพที่ 2.7 : การเกิดเปอร์ออกซิไนไตรท์ ($ONOO^-$) จากปฏิกิริยาระหว่างซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-•) กับไนตริกออกไซด์ (NO)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Loeppky (1994)

จากสาเหตุที่อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO•) พบได้ในอาหารเนื้อสัตว์แปรรูปทั่วไป อีกทั้งยังไม่เสถียรโดยสามารถเกิดปฏิกิริยากับสารกลุ่มอื่น เช่น อนุมูลอิสระกลุ่มรีแอ็กทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และกลายเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบไนโตรซามีน ดังนั้นงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากพืชจึงนิยมวิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (nitric oxide scavenging) ดังนี้

Kumaran และ Joelkarunakaran (2006) ได้ทำการศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชพืช *Coleus aromaticus* ซึ่งเป็นพืชที่นิยมรับประทานในประเทศอินเดีย โดยรับประทานกับขนมปังและเนย ผู้วิจัยใช้น้ำในการสกัดสารสกัดจากพืช *Coleus aromaticus* และนำมาทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried) และนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดสามารถทำลายอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์และอนุมูลโลหะเฟอรัสไอออน (ferrous ion chelating)

Wang และ คณะ (2009) ได้ทดสอบสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดผล glossy privet fruit (*Ligustrumlucidum Ait.)* โดยทำการสกัดด้วยน้ำ เอทธานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และเอทธานอล 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากแต่ละตัวทำละลายสามารถทำลายอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ และ ไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) โดยที่ความเข้มข้นเท่ากันสารสกัดที่ใช้เอทธานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวสกัดจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.2 การตรวจหาปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

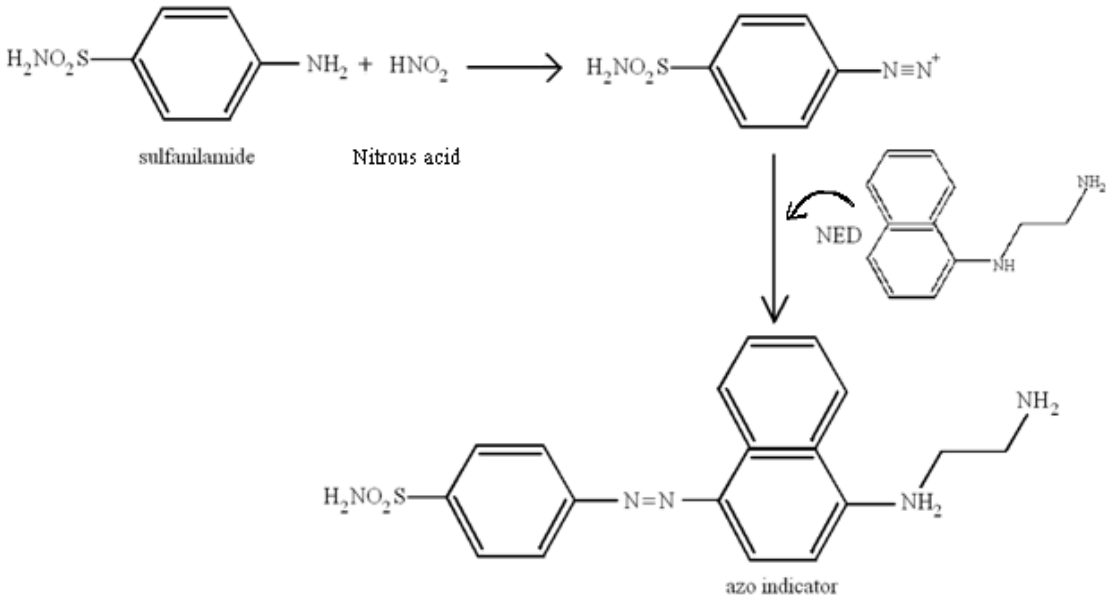
การตรวจหาปริมาณไนไตรท์ตกค้างนั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น วิธีทางแคลอรีเมตริก (colorimetric method) และวัดการเปลี่ยนแปลงสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ วิธีฟลูออโรเมตริก (fluorometric method) วิธีโพลาโรกราฟฟี (polarography) วิธีโวลท์แอมมิทรี (voltammetry) และวิธีโฟลว์อินเจ็กชัน-สเปคโตรโฟโตเมทรี (flow injection spectrophotometry) (Veena และ Narayana , 2009) แต่วิธีที่นิยมใช้ตรวจหาปริมาณไนไตรท์ตกค้างในอาหารคือวิธีทางแคลอรีเมตริกโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากวิธีฟลูออโรเมตริก (fluorometric method) และวิธีอื่นๆ จะใช้สารเคมีที่มีราคาสูง มีขั้นตอนยุ่งยาก และใช้เวลานาน (Veena และ Narayana, 2009) แม้มีความไวต่อการวัดสูงมาก แต่หากใช้ตรวจตัวอย่างอาหารที่มีองค์ประกอบหลายประเภท เช่น เกลือ ไขมัน น้ำตาล วิตามินต่างๆ เป็นต้น จะทำให้ค่าที่ได้คาดเคลื่อนสูง หรือต้องเตรียมตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์มาก ส่วนวิธีทางแคลอรีเมตริกมีความไวต่อองค์ประกอบในอาหารน้อยกว่า โดยใช้รีเอเจนต์ (reagent) ที่เจาะจงเข้าทำปฏิกิริยากับไนตรัสแอซิด ที่เป็นสารตัวแรกๆที่ได้จากการที่ไนไตรท์เปลี่ยนสภาพดังภาพที่ 2.9 การวิเคราะห์ไนไตรท์ตกค้างด้วยวิธีทางแคลอรีเมตริก (AOAC, 2000) ใช้หลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆ สารตัวอย่างจะดูดกลืนรังสี หรือแสงบางส่วนไว้ แสงที่ไม่ดูดกลืนจะผ่านออกมายังเครื่องวัดแสง และถูกวัดปริมาณแสงที่ผ่านออกมา โดยการหักล้างกับปริมาณของแสงก่อนดูดกลืน และทำการประมวลผลเป็นกราฟหรือสเปคตรัม ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง

(absorbance) และค่าความยาวคลื่น (λ) ซึ่งการตรวจหาปริมาณไนไตรท์ตกค้างในอาหารประเภทเนื้อสัตว์จะวัดที่ช่วงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และใช้สารที่สามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารสีสำหรับนำไปใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง

2.2.1 กลไกการทำงานของรีเอเจนต์ (reagent)

การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้างด้วยวิธีทางแคลอรีเมตริก (colorimetric method) ตามวิธีของ AOAC (2000) หลักการคืออาศัยการเข้าทำปฏิกิริยากันระหว่างไนตรัสแอซิดและซัลฟานิลาไมด์ ซึ่งมีวงแหวน เอมีนปฐมภูมิ (aromatic primary amine) ก่อนทำให้เกิดเป็นไดอะโซเนียมไอออน (diazonium ion) ดังภาพที่ 2.8 แล้วให้เกิดการทำปฏิกิริยาต่อ (coupling) กับ NED (N-(1-naphthyl) ethylenediamine) ในสภาวะที่เป็นกรด ได้เป็น azo indicator ดังภาพที่ 2.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ภาพที่ 2.8 : วงแหวนเอมีนปฐมภูมิ (ซ้าย) และ ไดอะโซเนียมไอออน (ขวา)
ที่มา : Song และKaylor (2007)



ภาพที่ 2.9 : การเกิด azo indicator
ที่มา : Song และ Kaylor (2007)

2.3 พืชสมุนไพรและส่วนผสมที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปในประเทศไทยที่นิยมผลิตได้แก่ ไส้กรอก กุนเชียง หมูแผ่น เป็นต้น นอกจากส่วนผสมหลักคือเนื้อสัตว์แล้วยังมีส่วนผสมอื่นๆดังนี้

2.3.1 โปรตีนจากแหล่งอื่น

โปรตีนจากแหล่งอื่นที่นอกเหนือจากโปรตีนจากเนื้อสัตว์โดยตรง เช่น ไข่ขาวผง โปรตีนถั่วเหลือง เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตปริมาณมากหรือระดับอุตสาหกรรม

2.3.2 เครื่องเทศและสมุนไพร

เครื่องเทศและสมุนไพรที่นิยมเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น เม็ดผักชี อบเชย ปาปริก้า พริกขี้หนูสวน พริกไทยดำ พริกไทยขาว กระเทียม ยี่หร่า ตะไคร้ ข่า ใบมะกรูด เป็นต้น โดยแต่ละชนิดจะมีปริมาณการใช้ที่แตกต่างกันออกไป ทำหน้าที่ในการเพิ่มกลิ่นรส และเครื่องเทศบางชนิดพบว่ายังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้จึงเป็นการยืดอายุของผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

Lo´pez-Malo และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ*เชื้อ Aspergillus flavus* ของสารสกัดเปลือกอบเชยซึ่งสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate) ผลพบว่าสภาวะที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 30 วัน สารสกัดเปลือกอบเชยที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ เท่ากับโซเดียมเบ็นโซเอท (sodium benzoate) ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.4 อบเชย

อบเชยเป็นพืชยืนต้นอยู่ในวงศ์ Lauraceae สกุล Cinnamomum ซึ่งมีความหลากหลายกว่า 50 ชนิด ในทวีปเอเชียและออสเตรเลีย ในประเทศไทยอบเชยสามารถหาได้ตามป่าธรรมชาติ เนื่องจากยังไม่มีการปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ ส่วนอบเชยที่วางจำหน่ายตามตลาดสดและตลาดขายเครื่องเทศยาจีนในกรุงเทพฯ นั้นจะเป็นอบเชยที่นำเข้า ส่วนมากนำเข้าจากประเทศอินโดนีเซีย และประเทศจีน ส่วนอบเชยจากประเทศศรีลังกาจะมีเป็นส่วนน้อยเนื่องจากราคาสูง(สันติสุข โสภณสิริ, 2549) ซึ่งอบเชยที่นำเข้ามาแต่ละประเทศก็จะมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันออกไป โดยงานวิจัยนี้ผู้วิจัย ใช้อบเชยป่นสายพันธุ์ *Cinnamomum burmanii* Blume

อบเชยชวา หรือ *Cinnamomum burmanii* Blume นั้นมีงานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤษเคมีค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับลังกา (*Cinnamomum zelanicum* Linn) และอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume) แต่จากงานวิจัยพบว่า พืชวงศอบเชย (Lauraceae) โดยเฉพาะกลุ่ม cinnamon จะมีสารประกอบที่สำคัญ คือ

ซินนามัลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) หรือ ซินนามิก อัลดีไฮด์ (cinnamic aldehyde), สารกลุ่มอนุพันธ์ฟีนอลลิค (phenolic derivative) เช่น ยูจีนอล (eugenol), สารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) เช่น แทนนิน (tannins) (Cowan, 1999) ทั้งอดีตและปัจจุบันอบเชยเป็นพืชที่ใช้เป็นประส่วนผสมในอาหารหลายประเภท เช่น ข้าวหมกไก่ ไส้กรอกรมควัน เนื้อสัตว์แปรรูปปรุงรสต่างๆ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น อีกทั้งยังเป็นส่วนผสมในยาหลายชนิด เช่น ยาจีน ยาธาตุอบเชย (สันติสุข โสภณสิริ, 2549) เป็นต้น เหตุที่มีการใช้อบเชยเป็นส่วนผสมทั้งทางยาและอาหารนี้เอง จึงทำให้มีนักวิจัยหลายท่านศึกษาสมบัติและประโยชน์ของอบเชย ดังนี้

พรรณี เด่นรุ่งเรือง และคณะ (2550)ได้ทำการทดสอบสารพฤกษเคมีของพืชวงศ์อบเชย (Lauraceae) ในไทย 8 ชนิด คือ กระทังใบใหญ่ (*Litsea grandis* Hook. f.), เทพทาโร(*Cinnamomum porrectum* Kosterm. syn. *Cinnamomum parthenoxylon* Meissn.), ทังบอน, หมีเหม็น,(*Litsea glutinosa* C.B. Robinson), เชียด (*Cinnamomum iners* Blume), เอียน (*Neolitsea zeylanica* Merr.), ยางบง(*Persea Kurzii* Kosterm.) และทำมัง (*Litsea petiolata* Hook. f.) สกัดด้วยตัวทำละลายเมธานอลพบว่าทุกชนิดมีสารกลุ่ม condensed tannins ยกเว้นหมีเหม็น ซึ่ง Condense tannins เป็นพวกสาร Polyphenol ที่โครงสร้างซับซ้อน สลายตัวได้ยากและละลายน้ำได้น้อยกว่า Hydrolysable tannins เพราะในโครงสร้างโมเลกุลไม่มีน้ำตาลอยู่

Dragland และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาปริมาณ Total Antioxidants ของพืชหลายชนิด และพบว่าเปลือก *Cinnamomum cassia* Blume มี Total Antioxidants เท่ากับ 120.2 มิลลิโมลต่อตัวอย่าง 100 กรัมสูงสุดในสมุนไพรกลุ่มพืชสมุนไพรจากจีนและญี่ปุ่น

Mathew และ Abraham (2006) ได้ศึกษาสมบัติและประสิทธิภาพการเป็น antioxidant ของสารสกัดอบเชย (*Cinnamomum verum*) ในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดอบเชยสายพันธุ์ *Cinnamomum verum* ซึ่งได้จากการสกัดเปลือกอบเชยด้วยเมธานอล (methanol) มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) DPPH• radicals ได้ดีกว่า 2,3-tert-butyl-4-methoxyphenol (BHA) ในความเข้มข้นที่เท่ากันและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นคือ 3.125, 6.26 ,12.5,25, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดอบเชยก็จะดีขึ้นด้วยโดยที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดอบเชยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• ได้กว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการจับอนุมูลอิสระ ABTS radicals cation พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดอบเชยเพิ่มตามความเข้มข้นและค่อนข้างคงที่ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า trolox equivalent antioxidant capacity เท่ากับ 18.45 ± 0.6 นอกจากนี้สารสกัดอบเชยยังมีความสามารถจับอนุมูลอิสระกลุ่ม reactive oxygen species

(ROS) คือ Superoxide radicals (O_2^{-}•) และ hydroxyl radicals (OH•) โดยสารสกัดอบเชยสามารถยับยั้ง superoxide radicals (O_2^{-}•) ได้ที่ความเข้มข้น 12.5 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้ง hydroxyl radicals (OH•) ได้ที่ความเข้มข้น 15 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบโพลี-ฟีนอล (total phenolic) เท่ากับ 289.0 ± 2.2 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม

Singh และคณะ (2007) เปรียบเทียบสมบัติทางเคมีของ volatile oils และ oleoresin ทั้งจากใบ (Leaf) และจากเปลือกไม้ (Bark) ของอบเชยสายพันธุ์ *Cinnamomum zeylanicum* Blume พบว่า เมื่อเติม oleoresin ลงไปที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดสารประกอบจาก primary และ secondary oxidation ในตัวอย่างน้ำมันมัสตาร์ด (mustard oil) เมื่อวิเคราะห์หาค่า peroxide value เรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งจากมากไปน้อยจะได้ดังนี้ Leaf oleoresin > BHT > PG ≈ eugenol > Bark oleoresin ≈ BHA > Leaf oil > cinnamaldehyde > bark oil และพบว่ามีความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH• และ hydroxyl radicals (OH•) นอกจากนี้ด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่า oleoresin จากใบที่ความเข้มข้น 6 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Penicillium citrinum* ส่วน oleoresin จากเปลือกที่ความเข้มข้น 6 ไมโครลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus A. ochraceus , A. niger, A. terreus, Penicillium citrinum* และ *P. viridicatum* และเมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะ Ampicillin พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน oleoresin จากใบ และ volatile oils จากเปลือก มีความสามารถในการยับยั้ง *Salmonella typhi* ได้ดีกว่า และvolatile oils จากใบ และ oleoresin จากเปลือก มีความสามารถในการยับยั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่า จากนั้นผู้วิจัยได้ทดสอบหาสารประกอบ volatile oils และ oleoresin ในใบ ด้วยวิธี Gas chromatographic massspectroscopy พบว่ามีองค์ประกอบอยู่ 19 และ 25 องค์ประกอบ ตามลำดับ ซึ่งสารส่วนใหญ่ คือ eugenol มีอยู่ 87.3 เปอร์เซ็นต์ และ 87.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน volatile oils และ oleoresin จากเปลือกมี E-cinnamal-dehyde เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยมีอยู่ 97.7 เปอร์เซ็นต์ และ 50.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.5 การยับยั้งการเกิดไนโตรซามีน

การยับยั้งการเกิดไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซกลุ่มหนึ่ง สามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเร่งการแตกตัวของไนไตรท์เพื่อลดปริมาณไนไตรท์ และการใช้สารทำลายไนโตรเซติงเอเจน

1.) การเร่งการแตกตัวของไนไตรท์

การเร่งให้ไนไตรท์แตกตัวเพื่อให้ลดปริมาณไนไตรท์ตกค้าง จะอาศัยการปรับสภาวะให้เป็น

กรดหรือค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำ เพื่อเหมาะสมต่อการแตกตัวของไนไตรท์ โดยในปี 1970 มีการค้นพบว่าพบว่าวิตามินซี (ascorbic acid) เมื่อถูกออกซิไดซ์จะกลายเป็นดีไฮโดรแอสครอบิกแอซิด (dehydroascorbic acid) ซึ่งสามารถรีดิวซ์ไนตรัสแอนไฮไดรด์ (nitrous anhydride, N_2O_3) ให้กลายเป็นไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) จึงสามารถช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนและส่งผลให้เกิดสารไนโตรโซไมโอโกลบินเร็วยิ่งขึ้น แต่ในระดับอุตสาหกรรมจะใช้อีริโธร์บิกแอซิด (erythorbic acid) ที่เป็นอีพิเมอร์ (epimer) ของวิตามินซี แทนเพราะราคาถูกกว่าวิตามินซี (Richard A เข้าถึงจาก: http://lpi. oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html) แต่ถ้าจะยับยั้งโดยไม่ให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซามีนขึ้นอีก ต้องใช้วิตามินซีปริมาณมากพอที่จะรีดิวซ์ไนตรัสแอนไฮไดรด์ที่เกิดขึ้นใหม่เรื่อยๆจนหมด ซึ่งไนตรัสแอนไฮไดรด์ที่เกิดขึ้นใหม่นี้เกิดจากไนตริกออกไซด์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระกลุ่มรีแอ็กทีฟออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) เช่น ซูปเปอร์ออกไซด์ ได้เป็นไนไตรท์และไนเตรท ดังภาพที่ 2.7 และสารทั้งสองตัวนี้สามารถก่อให้เกิด ไนตรัสแอนไฮไดรด์ ดังภาพที่ 2.5 และ 2.7 การเติมวิตามินซีในปริมาณมากไม่สามารถทำได้จริงในอาหาร เนื่องจากการเติมวิตามินซีปริมาณมากเกินจะส่งผลต่อรสชาติผู้บริโภคอาจไม่ยอมรับ

2.) การใช้สารทำลายไนโตรเซติงเอเจน(nitrosating agents)

ไนโตรเซติงเอเจน (nitrosating agents) คือสารที่สามารถเข้าเกิดปฏิกิริยากับไนโตรเซทเอเบิลเอมีน (nitrosatable amines)ได้เป็นสารประกอบไนโตรซามีน ไนโตรเซติงเอเจน (nitrosating agents) ได้แก่ ไนตรัสแอนไฮไดรด์ ดังนั้นหากสามารถลดไนโตรเซติงเอเจนได้การเกิดสารประกอบไนโตรซามีนก็จะลดลงตามไปด้วย จึงมีผู้ศึกษาสารต่างๆที่สามารถทำหน้าที่ทำลายสารตั้งต้นดังกล่าว โดยมักศึกษาควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันดังนี้

Chung และคณะ (2002) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน (N-nitrosodimethylamine, NDMA) ของสารสกัดสตอเบอรี่ กระเทียม และkale (ตระกูลผักกาดหอม) ทั้งในหลอดทดลองและในมนุษย์พบว่า ในหลอดทดลองสารสกัดกระเทียมมีประสิทธิภาพในยับยั้งการเกิด เอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน ได้ดีกว่าสารสกัดสตอเบอรี่และ kale ส่วนการทดลองในมนุษย์ ผู้วิจัยได้ทำการจัดอาหารเป็น 4 กลุ่ม โดย 1 กลุ่ม ใช้คน 10 คน รวมทั้งหมดเป็น 40 คน มีชาย 27 คน หญิง 13 คน อายุโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 24 ±3 ปี ทำการทดลอง 4 วัน โดยวันที่ 1-3 จะเป็นวันควบคุมอาหารเบื้องต้นในทุกกลุ่ม คือ ไม่ให้รับประทานอาหารที่มีสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน ไนเตรท์ สารกลุ่มเอมีน สารประกอบซัลเฟอร์ วิตามินซี และสารประกอบฟีนอลลิก เป็นส่วนประกอบ จากนั้นวันที่ 4 ทุกกลุ่มจะได้รับอาหารที่มีไนเตรท 400 มิลลิกรัม แต่กลุ่มที่ 2-4 จะมีการให้น้ำที่มีสารสกัดสตอเบอรี่ กระเทียม และ kale

อัตราส่วนต่างกัน ส่วนกลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารสกัดใดๆ จากนั้นเมื่อผ่านไป 18 ชั่วโมง จะทำการวิเคราะห์วิเคราะห์หาปริมาณสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีนที่ถูกขับออกมาในรูปปัสสาวะ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟีกับ thermal energy analysis (GC-TEA) ซึ่งพบว่าเมื่อให้เครื่องดื่มที่เป็นสารสกัดสตอเบอรี่ กระเทียมและ kale ปัสสาวะของผู้ทดสอบมีปริมาณสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน ลดลง 70 เปอร์เซ็นต์, 71 เปอร์เซ็นต์ และ 44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องตามการทดลองในหลอดทดลอง

Lu และ Chen (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีน ของสารสกัดชาเขียวและสารสกัดชาเขียวที่เติมเอนไซม์แทนเนส (tannase) เปรียบเทียบกับวิตามินซี (ascorbic acid) ผลพบว่าชาเขียวที่เติมเอนไซม์แทนเนสมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดสารเอ็น-ไนโตรโซไดเมธิลเอมีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือชาเขียวที่ไม่เติมเอนไซม์ และวิตามินซีตามลำดับ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นผู้วิจัยได้วิเคราะห์องค์ประ-กอบของชาเขียวที่เติมเอนไซม์แทนเนสด้วยโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC) ได้สาร 4 กลุ่ม คือ อิพิคาเทชิน (epicatechin, EC) อิพิแกล โลคาเทชิน (epigal-locatechin, EGC) อิพิแกลโลคาเทชินแกลเลต (epigallocatechin gallate, EGCG) และ อิพิคาเทชินแกลเลต (epicatechingallate, ECG) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แทนเนสพบว่าปริมาณสาร อิพิแกลโลคาเทชินแกลเลตและอิพิคาเทชินแกลเลตจะลดลง แต่อิพิคาเทชินและอิพิแกลโลคาเทชินจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนไตรท์ของสารทั้ง 4 กลุ่ม เปรียบเทียบกับสารคาเทชิน (catechin) กรดแกลลิก (gallic acid) และวิตามินซี พบว่า EGCG และกรดแกลลิกมีความ-สามารถในการลดปริมาณไนไตรท์มากที่สุดเท่ากันรองลงมาคือ อิพิแกลโลคาเทชิน อิพิคาเทชินแกลเลต คาเทชิน อิพิคาเทชิน และสุดท้ายคือวิตามินซี

Choi และคณะ (2009) ได้ศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของพืช *Achyranthis radix* (สมุนไพรจีนชนิดหนึ่ง) ที่ตัวสกัดต่างๆซึ่งได้ทำการศึกษาในหลอดทดลองและในหนูทดลอง คณะ-ผู้วิจัยพบว่า เมื่อสกัด *Achyranthis radix* ด้วยเอ็น-บิวทานอล (n-butanol) สารสกัดที่ได้จะมีความ-สามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH• มากที่สุดที่ 31.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และความสามารถในการทำลายไนไตรท์ (nitrite scavenging) ของสารสกัด 1 มิลลิลิตร สูงสุดถึง 90.2 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะ pH 1.2 โดยมีความสามารถไม่แตกต่างกับ BHT และมากกว่ากลุ่มควบคุม ที่ไม่มีการเติมสารสกัดถึง 90 เปอร์เซ็นต์