

## การทดลองที่ 6

## การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาล์

อ.ชัยวัฒน์ วามวรรรัตน์

- วัตถุประสงค์
1. เพื่อให้เข้าใจหลักการและวิธีการของวิธีเคลดาล์
  2. สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างจากค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่หาได้จากการทดลอง

ไนโตรเจนเป็นธาตุสำคัญธาตุหนึ่งของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบในสารประกอบอินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ยูเรีย เป็นต้น การทราบปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งในตัวอย่างของผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบสำหรับการผลิต เช่น อาหารสัตว์ ปุ๋ย ดิน อาหาร ส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ และเมล็ด เป็นต้น สามารถใช้บ่งบอกคุณภาพของตัวอย่างนั้นๆ ในทางชีวเคมีการทราบปริมาณไนโตรเจนสามารถคำนวณกลับเพื่อบ่งบอกปริมาณโปรตีนในตัวอย่างนั้นๆ วิธีการวิเคราะห์ที่เป็นที่นิยมกันแพร่หลายในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ วิธีเคลดาล์ (Kjeldahl method)

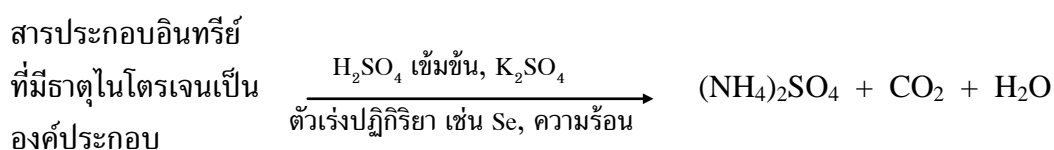
จอห์น กุสตาฟ เคลดาล์ (John Gustaf Kjeldahl) นักวิทยาศาสตร์ชาวเดนมาร์ก เป็นผู้พัฒนาวิธีเคลดาล์ขึ้นในปี ค.ศ. 1883 เพื่อใช้ในการหาปริมาณไนโตรเจนในสารประกอบอินทรีย์ โดยเริ่มครั้งแรกในอุตสาหกรรมผลิตสุรา เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนในข้าวบาร์เลย์ ข้าวมอลต์ ยีสต์ และในขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิต ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีมาเป็นลำดับเพื่อหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างรูปแบบอื่น ๆ เช่น อาหาร ปุ๋ย เป็นต้น การวิเคราะห์ทำได้หลายระดับตั้งแต่ระดับมหัพภาค (macro scale) กึ่งจุลภาค (semi-micro scale) และจุลภาค (micro scale) เมื่อตัวอย่างเป็นสารที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น อาหาร วิธีเคลดาล์ที่ใช้ควรเป็นระดับมหัพภาค ซึ่งต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมาก หากตัวอย่างเป็นสารที่เป็นเนื้อเดียวกัน การวิเคราะห์ในระดับกึ่งจุลภาคจะมีความเหมาะสมและสะดวกกว่าโดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณไม่มากนัก ขณะที่ระดับจุลภาคใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ วิธีที่เหมาะสมและมักนิยมใช้กันทั่วไปเป็นวิธีเคลดาล์ในระดับกึ่งจุลภาค

## หลักการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ การย่อยและการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่เกิดขึ้น

## 1. การย่อย (digestion)

สารตัวอย่างซึ่งมีสารประกอบที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถูกย่อยหรือถูกออกซิไดส์ จนทำให้ไนโตรเจนในตัวอย่างถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอมโมเนียมไอออนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งแสดงเป็นสมการเคมีได้ดังนี้



ก่อนทำการย่อยต้องมีการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งจะยกตัวอย่างในกรณีวิธีกึ่งจุลภาคซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างไม่มากนัก เช่น ตัวอย่างจากพืชใช้ 50-200 มิลลิกรัม ตัวอย่างดินใช้ 100-500 มิลลิกรัม เป็นต้น และต้องเตรียมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น โดยบดให้ละเอียดและกรองผ่านตะแกรงแรงที่มีช่องขนาดเล็กกว่า 100 เมช (mesh) ในกรณีที่เป็นตัวอย่างแห้ง หรือโดยทำให้เป็นตัวอย่างเปียก ด้วยการบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่น ในกรณีที่เป็นตัวอย่างที่มีความชื้นสูง เช่น ผัก ผลไม้ ซึ่งต้องแบ่งตัวอย่างเปียกออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน อีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ความชื้น เพื่อให้สามารถรายงานผลเป็นปริมาณต่อน้ำหนักแห้งหรือต่อน้ำหนักสดของตัวอย่างได้

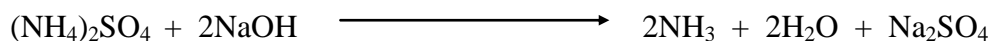
ตัวอย่างที่นำมาย่อย ต้องนำมาซึ่งน้ำหนักอย่างละเอียดแล้วนำมาใส่ในขวดเคลดดาห์ล (Kjeldahl flask) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นและเกลือที่ช่วยเพิ่มจุดเดือดของกรดซัลฟิวริกให้สูงขึ้น ได้แก่ โพตัสเซียมซัลเฟต ( $K_2SO_4$ ) โพตัสเซียมไบซัลเฟต ( $KHSO_4$ ) หรือโซเดียมซัลเฟต ( $Na_2SO_4$ ) เกลือที่ใช้ยังช่วยให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อลดเวลาที่ใช้ในการย่อย จึงมีการเติมตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น ทองแดง (Cu)ปรอท (Hg) ซีลีเนียม (Se) หรือสารประกอบของธาตุเหล่านี้ตัวใดตัวหนึ่งผสมกัน และเพื่อให้การเดือดเป็นไปอย่างสม่ำเสมอจึงมีการใส่เม็ดแก้ว (glass bead) ลงไปด้วย จากนั้นให้ความร้อนแก่ขวดเคลดดาห์ล ระหว่างการย่อยจะมีควันกรดเกิดขึ้น ซึ่งต้องมีชุดเครื่องมือดูดควันกรดออกไปละลายในน้ำและกำจัดออกไปในน้ำทิ้ง การย่อยใช้เวลานานเท่าใดขึ้นอยู่กับปริมาณ ชนิดของตัวอย่าง และชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ เมื่อย่อยจนได้สารละลายใสแล้ว มักต้องให้ความร้อนต่อไปอีกระยะหนึ่ง (0.5-3 ชั่วโมงแล้วแต่ชนิดของตัวอย่าง) เพื่อให้แน่ใจว่าเกิดการย่อยที่สมบูรณ์ สารประกอบที่มีพันธะระหว่างไนโตรเจนกับออกซิเจน และระหว่างไนโตรเจนด้วยกัน ตัวอย่างเช่น ไนเตรต (nitrate) ไนไตรท์ (nitrite) ออกซิม (oxime) ไพราโซโลน (pyrazolone) ไตรอะซีน (triazine) ไฮดราซีน (hydrazine) ไฮดราโซน (hydrazone) สารประกอบอะโซ (azo) ไนโตรโซ (nitroso) และไนโตร (nitro) ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียมไอออนได้ทั้งหมดระหว่างการย่อย ดังนั้นตัวอย่างที่มีสารประกอบเหล่านี้ ต้องผ่านการเตรียมก่อนการย่อยอีกขั้นหนึ่ง ตัวอย่างเช่น นำตัวอย่างที่มีสารประกอบไนเตรตและไนไตรท์ไปทำปฏิกิริยากับโพตัสเซียมเปอร์มังกาเนต และเหล็กรีดิวซ์ หรือกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) และไทโอซัลเฟต (thiosulfate) ก่อนนำไปย่อย

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน

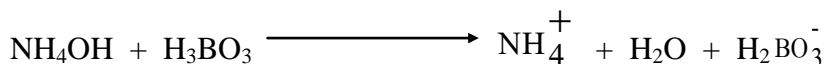
ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี คือ

### 2.1 การกลั่นและการไทเทรต (alkaline distillation and acidimetric titration)

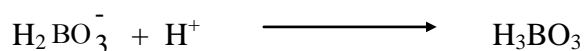
สารละลายสีที่ได้จากการย่อยถูกทำให้เย็นลงและเจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วทำให้เป็นด่างโดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์มากเกินไป ซึ่งจะเปลี่ยนแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ให้กลายเป็นแก๊สแอมโมเนีย จากนั้นกลั่นแยกแก๊สแอมโมเนียออกมาพร้อมกับน้ำในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในกรณีที่ใช้ปรอทไอออนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต้องมีการเติมโซเดียมไทโอซัลเฟตลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่าง  $Hg^{2+}$  กับแอมโมเนีย โดยไทโอซัลเฟตไอออนปรีดิซปรอทไอออน การกลั่นแอมโมเนียจึงเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ได้ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสรุปเป็นสมการเคมีได้ดังนี้คือ



แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการกลั่นถูกดักเก็บไว้ในสารละลายกรดบอริก (Boric acid) ที่ไม่จำเป็นต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และเกิดปฏิกิริยากับกรดบอริกดังสมการเคมีต่อไปนี้



จากนั้นทำการไตเตรตหาปริมาณบอเรทไอออน ( $H_2BO_3^-$ ) ที่เกิดขึ้นกับสารละลายกรดมาตรฐาน โดยใช้ อินดิเคเตอร์บอริกจุดยุติเป็นอินดิเคเตอร์ผสมของเมธิลเรด (methyl red) และบรอมครีซอลกรีน (bromocresol green) ซึ่งมีการเปลี่ยนสีในช่วงพีเอช 5-6 จากสีชมพูในสารละลายกรด และสีเขียวแกมน้ำเงินในสารละลายต่างมาเป็นสีม่วงเทาที่จุดยุติ ในการทดลองต้องมีการทำสารละลายเปล่า (blank) ซึ่งไม่มีการใส่ตัวอย่างควบคุมไปกับตัวอย่างในทุกขั้นตอนเดียวกัน ผลต่างระหว่างปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างกับที่ใช้ในการไทเทรตสารละลายเปล่า คือ ปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ในปฏิกิริยาระหว่างกรดกับบอเรทไอออน ดังสมการเคมี



ซึ่งสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างได้ ทั้งนี้ต้องทราบเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในโปรตีนตัวอย่างชนิดนั้นด้วย

**2.2 การวัดความเข้มของสีจากปฏิกิริยาการเกิดสี (colorimetric procedure)** แอมโมเนียที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีหรือน้ำยาให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีได้ และความเข้มของสีที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่ ตัวอย่างปฏิกิริยา ได้แก่

**2.2.1 ปฏิกิริยาเบอเธลอต (Berthelot reaction)** แอมโมเนียทำปฏิกิริยากับไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) เกิดเป็นสารประกอบคลอโรเอมีน (chloroamine) ซึ่งเกิดการควบแน่นกับฟีนอลได้เป็นควิโนนคลอโรเอมีน (quinonechloroamine) แล้วควบแน่นต่อกับฟีนอลเลตไอออน (phenolate ion) ได้เป็นสารประกอบอินโดฟีนอล บลู (indophenol blue)

**2.2.2 ปฏิกิริยานินไฮดริน** ซึ่งรายละเอียดได้กล่าวไว้แล้วในการทดลองที่ 4 โปรตีน I

**2.2.3 ปฏิกิริยากับน้ำยานเนสเลอร์ (Nessler's reagent)** น้ำยาชนิดนี้เตรียมขึ้นจากการผสมปรอทคลอไรด์ ( $HgCl_2$ ) และโปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) ในสารละลายต่าง ได้สารประกอบ  $K_2HgI_4$  เกิดขึ้น ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียได้ตะกอนสีเหลือง ส้ม หรือน้ำตาล ขึ้นกับปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่

**2.3 การใช้แอมโมเนียอิเล็กโทรด (ammonia gas sensing electrode)** ซึ่งเป็นการวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการย่อยโดยตรง

เนื่องจากการทดลองต้องทำด้วยความระมัดระวังภายในตู้ควันและใช้เวลานาน จึงไม่ได้ให้นิสิตฝึกปฏิบัติ แต่นิสิตต้องเข้าใจในหลักการของวิธีวิเคราะห์และสามารถคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดได้ ดังนั้นจึงได้ให้ข้อมูลจากการทดลองสำหรับฝึกคำนวณไว้ดังนี้

ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของเลือดหมอบแห้ง ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างอย่างละเอียดแล้วใส่ลงในขวดเคลตาฮัล เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร และโปตัสเซียมซัลเฟต 1.5 กรัม ต้มย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 40 ลงไป 15 มิลลิลิตร นำไปกลั่นและรองรับสิ่งที่กลั่นได้ลงในภาชนะที่มีสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 0.2 และอินดิเคเตอร์ผสมอยู่ รวมปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายกรดมาตรฐาน ไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.0196 โมลาร์ การวิเคราะห์นี้ได้มีการทำสารละลายเปล่าควบคู่ไปด้วยโดยไม่มี การใส่ตัวอย่างลงไป บันทึกผลที่ได้ลงไว้ดังนี้

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม) (ต)	100.1	100.2
ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (มิลลิลิตร)		
(ก) ในขวดตัวอย่าง	10.2	10.4
(ข) ในขวดสารละลายเปล่า	0.2	0.2
ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจริง (มิลลิลิตร)		
(ค = ก - ข)	.....	.....
คิดเป็นมิลลิโมลของแอมโมเนียที่เกิด จากการย่อย เท่ากับ	.....	.....
(ง = ค × 0.0196)		
คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างได้ เท่ากับ (มิลลิกรัม)	.....	.....
(จ = ง × 14)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
คิดเป็นร้อยละไนโตรเจนในตัวอย่าง เท่ากับ (% N)	.....	.....
(ฉ = จ ÷ [(ต1 + ต2)]/2 × 100)		
ร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเท่ากับ	.....	.....
(%) (ซ = ฉ × 6.25)		

การหาปริมาณโปรตีนในอาหารมักเป็นปัญหาเฉพาะสำหรับนักเคมีและนักชีวเคมี โดยทั่วไปปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง มักแสดงในค่าของร้อยละ ซึ่งคำนวณจากร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่หาได้คูณกับตัวคูณ

ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาศึกษา เช่น ผลិតภัณฑ์จากธัญพืชมีค่าเป็น 5.70 นมและผลิตภัณฑ์จากนมมีค่าเป็น 6.38 เจลาตินมีค่าเป็น 5.55 ไข่มีค่าเป็น 6.68 เป็นต้น แต่โดยทั่วไปมักใช้ค่าเท่ากับ 6.25 สำหรับกรณีทั่วๆ ไปที่โปรตีนในตัวอย่างมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 16 อย่างไรก็ตามร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่างไม่ใช่ค่าจริง เนื่องจากเป็นการสันนิษฐานว่าธาตุไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในรูปของโปรตีน ทั้งที่ในความเป็นจริงแล้วอาจมีปริมาณไนโตรเจนมากหรือน้อยกว่าซึ่งอยู่ในรูปอื่น เช่น กรดอะมิโน หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ

### สรุป

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเลือดหมูแห้ง เท่ากับ .....

ร้อยละปริมาณโปรตีนในเลือดหมูแห้ง เท่ากับ .....