การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาฮ์ล

อ.ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อให้เข้าใจหลักการและวิธีการของวิธีเคลดาฮ์ล
2. สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างจากค่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่หาได้จากการทดลอง

ไนโตรเจนเป็นธาตุสำคัญธาตุหนึ่งของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบในสารประกอบอินทรีย์มากมายหลายชนิด เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก ยูเรีย เป็นต้น การทราบปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งในตัวอย่างของผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบสำหรับการผลิต เช่น อาหารสัตว์ ปุ๋ย ดิน อาหาร ส่วนต่าง ๆของพืช เช่น ใบ และเมล็ด เป็นต้น สามารถใช้บ่งบอกคุณภาพของตัวอย่างนั้น ๆ ในทางชีวเคมีการทราบปริมาณไนโตรเจนสามารถคำนวณกลับเพื่อบ่งบอกปริมาณโปรตีนในตัวอย่างนั้น ๆ วิธีการวิเคราะห์ที่เป็นที่นิยมกันแพร่หลายในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ได้แก่ **วิธีเคลดาฮ์ล (Kjeldahl method)**

จอห์น กุสตาฟ เคลดาฮ์ล (John Gustaf Kjeldahl) นักวิทยาศาสตร์ชาวเดนมาร์ก เป็นผู้พัฒนาวิธีเคลดาฮ์ลขึ้นในปี ค.ศ. 1883 เพื่อใช้ในการหาปริมาณไนโตรเจนในสารประกอบอินทรีย์ โดยเริ่มครั้งแรกในอุตสาหกรรมผลิตสุรา เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนในข้าวบาร์เลย์ ข้าวมอลท์ ยีสต์ และในขั้นตอนต่าง ๆ ของกระบวนการผลิต ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีมาเป็นลำดับเพื่อหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างรูปแบบอื่น ๆเช่น อาหาร ปุ๋ย เป็นต้น การวิเคราะห์ทำได้หลายระดับตั้งแต่ระดับมหัพภาค (macro scale) กึ่งจุลภาค (semi-micro scale) และจุลภาค (micro scale) เมื่อตัวอย่างเป็นสารที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น อาหาร วิธีเคลดาฮ์ลที่ใช้ควรเป็นระดับมหัพภาค ซึ่งต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมาก หากตัวอย่างเป็นสารที่เป็นเนื้อเดียวกันการวิเคราะห์ในระดับกึ่งจุลภาพจะมีความเหมาะสมและสะดวกกว่าโดยใช้สารตัวอย่างในปริมาณไม่มากนัก ขณะที่ระดับจุลภาคใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย ๆ วิธีที่เหมาะสมและมักนิยมใช้กันทั่วไปเป็นวิธีเคลดาฮ์ลในระดับกึ่งจุลภาค

หลักการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ การย่อยและการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่เกิดขึ้น

1. การย่อย (digestion)

สารตัวอย่างซึ่งมีสารประกอบที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถูกย่อยหรือถูกออกซิไดส์ จนทำให้ไนโตรเจนในตัวอย่างถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอมโมเนียมไอออนในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งแสดงเป็นสมการเคมีได้ดังนี้

สารประกอบอินทรีย์ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ

$$\xrightarrow[\text{ตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น Se, ความร้อน}]{H_2SO_4 \text{ เข้มข้น}, K_2SO_4} (NH_4)_2SO_4 + CO_2 + H_2O$$

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

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

2. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไอออน

ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่เกิดขึ้นหลังการย่อยสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี คือ

2.1 การกลั่นและการไทเทรต (alkaline distillation and acidimetric titration)

สารละลายใสที่ได้จากการย่อยถูกทำให้เย็นลงและเจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วทำให้เป็นด่างโดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์มากเกินพอ ซึ่งจะเปลี่ยนแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ให้กลายเป็นแก๊สแอมโมเนีย จากนั้นกลั่นแยกแก๊สแอมโมเนียออกมาพร้อมกับน้ำในรูปของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในกรณีที่ใช้ปรอทไอออนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต้องมีการเติมโซเดียมไทโอซัลเฟตลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่าง Hg^{2+} กับแอมโมเนีย โดยไทโอซัลเฟตไอออนไปรีดิวซ์ปรอทไอออน การกลั่นแอมโมเนียจึงเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ได้ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสรุปเป็นสมการเคมีได้ดังนี้คือ

$$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \longrightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2SO_4$$

$$NH_3 + H_2O \xrightarrow{\text{การกลั่น}} NH_4OH$$

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ได้จากการกลั่นถูกดักเก็บไว้ในสารละลายกรดบอริก (Boric acid) ที่ไม่จำเป็นต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และเกิดปฏิกิริยากับกรดบอริกดังสมการเคมีต่อไปนี้

$$NH_4OH + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4^+ + H_2O + H_2BO_3^-$$

จากนั้นทำการไตเตรตหาปริมาณบอเรทไอออน ($H_2BO_3^-$) ที่เกิดขึ้นกับสารละลายกรดมาตรฐาน โดยใช้อินดิเคเตอร์บ่งบอกจุดยุติเป็นอินดิเคเตอร์ผสมของเมธิลเรด (methyl red) และบรอมครีซอลกรีน (bromcresol green) ซึ่งมีการเปลี่ยนสีในช่วงพีเอช 5-6 จากสีชมพูในสารละลายกรด และสีเขียวแกมน้ำเงินในสารละลายด่างมาเป็นสีม่วงเทาที่จุดยุติ ในการทดลองต้องมีการทำสารละลายเปล่า (blank) ซึ่งไม่มีการใส่ตัวอย่างควบคู่ไปกับตัวอย่างในทุกขั้นตอนเดียวกัน ผลต่างระหว่างปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างกับที่ใช้ในการไทเทรตสารละลายเปล่า คือ ปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ในปฏิกิริยาระหว่างกรดกับบอเรทไอออน ดังสมการเคมี

$$H_2BO_3^- + H^+ \longrightarrow H_3BO_3$$

ซึ่งสามารถนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างได้ ทั้งนี้จะต้องทราบเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในโปรตีนตัวอย่างชนิดนั้นด้วย

2.2 การวัดความเข้มของสีจากปฏิกิริยาการเกิดสี (colorimetric procedure) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีหรือน้ำยาให้เกิดเป็นสารประกอบที่สีได้ และความเข้มของสีที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และแปรผันโดยตรงกับปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่ ตัวอย่างปฏิกิริยา ได้แก่

2.2.1 ปฏิกิริยาเบอเธลอท (Berthelot reaction) แอมโมเนียทำปฏิกิริยากับไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) เกิดเป็นสารประกอบคลอโรเอมีน (chloroamine) ซึ่งเกิดการควบแน่นกับฟีนอลได้เป็นควิโนนคลอโรเอมีน (quinonechloroamine) แล้วควบแน่นต่อกับฟีนอเลตไอออน (phenolate ion) ได้เป็นสารประกอบอินโดฟีนอล บลู (indophenol blue)

2.2.2 ปฏิกิริยานินไฮดริน ซึ่งรายละเอียดได้กล่าวไว้แล้วในการทดลองที่ 4 โปรตีน I

2.2.3 ปฏิกิริยากับน้ำยาเนสเลอร์ (Nessler's reagent) น้ำยาชนิดนี้เตรียมขึ้นจากการผสมปรอทคลอไรด์ ($HgCl_2$) และโปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI) ในสารละลายด่าง ได้สารประกอบ K_2HgI_4 เกิดขึ้น ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียได้ตะกอนสีเหลือง ส้ม หรือน้ำตาล ขึ้นกับปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่

2.3 การใช้แอมโมเนียอิเล็กโทรด (ammonia gas sensing electrode) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากการย่อยโดยตรง

เนื่องจากการทดลองต้องทำด้วยความระมัดระวังภายในตู้ควันและใช้เวลานาน จึงไม่ได้ให้นิสิตฝึกปฏิบัติ แต่นิสิตต้องเข้าใจในหลักการของวิธีวิเคราะห์และสามารถคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดได้ ดังนั้นจึงได้ให้ข้อมูลจากการทดลองสำหรับฝึกคำนวณไว้ดังนี้

ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของเลือดหมูอบแห้ง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอย่างละเอียดแล้วใส่ลงในขวดเคลดาฮ์ล 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 แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายกรดมาตรฐานไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.0196 โมลาร์ การวิเคราะห์นี้ได้มีการทำสารละลายเปล่าควบคู่ไปด้วยโดยไม่มีการใส่ตัวอย่างลงไป 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
ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจริง (มิลลิลิตร) (ค = ก – ข)	.....	.....
คิดเป็นมิลลิโมลของแอมโมเนียที่เกิดจากการย่อย เท่ากับ (ง = ค × 0.0196)	.....	.....
คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างได้เท่ากับ (มิลลิกรัม) (จ = ง × 14)	.....	.....

	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**
คิดเป็นร้อยละไนโตรเจนในตัวอย่างเท่ากับ (% N) (ฉ = จ ÷ [(ต1 + ต2)]/2 × 100)	.....	.....
ร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเท่ากับ (%) (ช = ฉ × 6.25)	.....	.....

การหาปริมาณโปรตีนในอาหารมักเป็นปัญหาเฉพาะสำหรับนักเคมีและนักชีวเคมี โดยทั่วไปปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง มักแสดงในค่าของร้อยละ ซึ่งคำนวณจากร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่หาได้คูณกับตัวคูณ

ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาศึกษา เช่น ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชมีค่าเป็น 5.70 นมและผลิตภัณฑ์จากนมมีค่าเป็น 6.38 เจลาตินมีค่าเป็น 5.55 ไข่มีค่าเป็น 6.68 เป็นต้น แต่โดยทั่วไปมักใช้ค่าเท่ากับ 6.25 สำหรับกรณีทั่ว ๆ ไปที่โปรตีนในตัวอย่างมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 16 อย่างไรก็ตามร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่างไม่ใช่ค่าจริง เนื่องจากเป็นการสันนิษฐานว่าธาตุไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในรูปของโปรตีน ทั้งที่ในความเป็นจริงแล้วอาจมีปริมาณไนโตรเจนมากหรือน้อยกว่าซึ่งอยู่ในรูปอื่น เช่น กรดอะมิโนหรือสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ

สรุป

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเลือดหมูแห้ง เท่ากับ .....

ร้อยละปริมาณโปรตีนในเลือดหมูแห้ง เท่ากับ .....