การวิเคราะห์หาปริมาณไบโอจีนิกเอมีนบางชนิดในไส้กรอกพื้นเมืองไทย
QUANTITATIVE OF SOME BIOGENIA AMINE IN THAI TRADITIONAL SAUSAGE

วีรชัย สิงห์ทอง *พรพิมล ม่วงไทย นวลละออ รัตนวิมานวงศ์*
Weerachai Singthong*, Pornpimol Muangthai, Nuanlaor Ratanawimarnwong*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Thailand.

Corresponding author, E-mail: *commonsent@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน สามารถพบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีโปรตีนสูง ในงานวิจัยนี้ได้ให้ความสนใจต่อการวิเคราะห์ไส้กรอกพื้นเมืองของไทยที่มีชื่อว่าไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ ซึ่งไส้กรอกเหล่านี้ทำมาจากเนื้อสัตว์เป็นหลัก และผ่านกระบวนการหมักซึ่งเป็นการถนอมอาหารอีกวิธีหนึ่ง การสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิดออกจากตัวอย่างไส้กรอกด้วยวิธีทางเคมีคือใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์และการเซ็นตริฟิวจ์ สารไบโอจีนิกเอมีนเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันโดยมีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้น งานวิจัยนี้ศึกษาการวิเคราะห์สารไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างไส้กรอก โดยนำสารไบโอจีนิก เอมีนทั้งสามมาทำปฏิกิริยากับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ ในสารละลาย 0.4 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) ที่มี 2-เมอร์แคปโตเอทานอลรวมอยู่ด้วยพบว่าสารอนุพันธ์ทั้ง 3 สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง ทำการแยกสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตรวจวัดด้วยฟลูออร์เรสเซ็นต์ที่ λ_{ex} 335 nm และ λ_{em} 460 nm จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสาร ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ การใช้วัฏภาคเคลื่อนประกอบด้วย 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.8) : อะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 81:19 v/v อัตราการไหล 1.1 ml/min สารอนุพันธ์ดังกล่าวแสดง ตำแหน่งพีคของอนุพันธ์พิวเทรสซีน ฮีสตามีน และคาร์ดาเวรีน ซึ่งมีค่าระยะเวลารีเทนชันเป็น 8.51, 11.33 และ 14.41 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ศึกษาสารละลายตัวกลางคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าสารทั้งสองมีผลลดค่าความเข้มของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อนำวิธีนี้ไปในการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทย พบว่าสามารถตรวจพบสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดโดยพบ ฮีสตามีน 2-35 ppm พิวเทรสซีน 10-50 ppm และคาร์ดาเวรีน 2-3 ppm

คำสำคัญ: ไบโอจีนิกเอมีน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์

Abstract

Biogenic amine is a substance that synthesis from decarboxylation reaction of precursors amino acids. Histamine, putrescine and cadaverine are important biogenic amines which were found in many foods especially in food containing rich protein. This research work focused on analysis of those 3 biogenic amines in thai traditional sausages as E-sarn sausage, Mum sausage and Sai-owe Sausage. The three biogenic amines were extracted from sausage samples by borate buffer (pH 9.5) with ultrasonication and centrifugation. Then the biogenic amines were pre-derivetised with *O*-phthaldialdehyde (OPA) in borate buffer pH 9.5 containing 2-mercaptoethanol and analysed by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with fluorescent detection at λ_{em} 460 nm. The optimization condition in analysis was also studied. The best mobile system of 100 mM acetate buffer (pH 5.8) : acetonitrite was 81 : 19 v/v with flow rate at 1.1 ml/min giving good separation. The derivertised products of putrescine, histamine and cadaverine were eluted at the retention time 8.51, 11.33 and 14.41 min. respectively. The sodium hydroxide and sodium chloride solutions effect on the fluorescence intensity of derivertised products. Application of this method to analyse 3 biogenic amines in Thai traditional sasuages revealed the present amount of histamine, putrescine and cadaverine at 2-35, 10-50 and 2-3 ppm, respectively

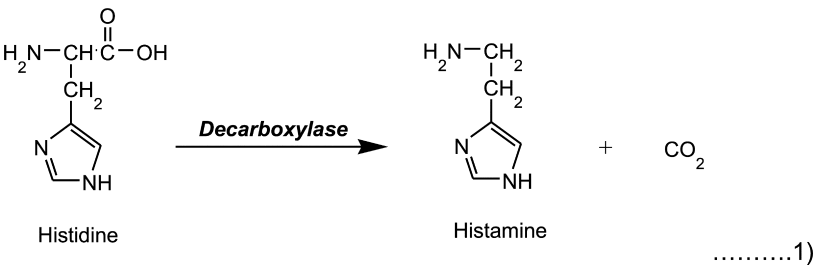
Keywords: Biogenic amine, Histamine, Putrescine, Cadaverine, *O*-phthaldialdehyde

บทนำ

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines; BAs) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน หรือปฏิกิริยาเอมิเนชันและปฏิกิริยาทรานเอมิเนชันของอัลดีไฮด์และคีโตนสารเหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีโครงสร้างแบบอะลิฟาติก (พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน) โครงสร้างแบบอะโรมาติก (ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน) และโครงสร้างแบบเฮเทอโรไซคลิก (ฮีสตามีน ทริปตามีน) [1-3] จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถตรวจพบการปนเปื้อนพิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน ฮีสตามีน และทริปตามีนมีการปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม ได้แก่ ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์นม และเนย ไวน์ เบียร์ ผักและผลไม้ ช็อคโกแลต และถั่ว เป็นต้น [1-2] สาเหตุของการปนเปื้อนเกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ เช่น ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสย่อยสลายกรดกรดอะมิโนในอาหารเกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีน [1-2] ซึ่งนอกจากปริมาณกรดอะมิโนและโปรตีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นแล้วสภาวะต่างๆ ต้องมีความเหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์และเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส เช่น น้ำ อากาศ pH อุณหภูมิ ออกซิเจน ประเภทของอาหาร และชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่มีความเหมาะสมจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแล้วย่อยสลายกรดอะมิโนในอาหารเกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีน [1] สารเอมีนมีบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเอมีนเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการสังเคราะห์ฮอร์โมน

อัลคาลอยด์ กรดนิวคลีอิก โปรตีน [7] และเอมีน ยังมีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นของอาหาร เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารก่อมะเร็ง เช่น สารประกอบ N-ไนโตรโซ [1]

ฮีสตามีนมีชื่อแบบ IUPAC ว่า 2-(4-imidazolyl) ethylamine สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน โดยมีเอนไซม์ฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) ตามสมการที่ 1 มีโครงสร้างวงแหวนอิมมิดาโซล (imidazole) 1 วง และมีหมู่อะมิโนเชื่อมอยู่กับ 2 หมู่ของเมททิลีน (methylene) [3] [4]

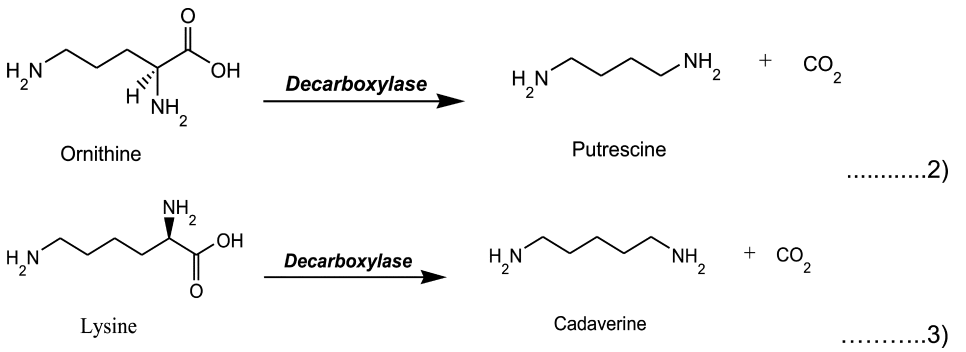


.....1)

ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน
ที่มา: ดัดแปลงจาก สมณฑา วัฒนสินธุ์. (2549). 107.

ฮีสตามีนเป็นสารที่มีอยู่ในร่างกายทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและกลไกการอักเสบ มีบทบาทต่อกลไกการอักเสบเฉียบพลันเมื่อเกิดบาดแผล การตอบสนองต่อภาวะภูมิแพ้ การหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร มีหน้าที่ในระบบประสาทส่วนกลาง [3-4] การรับประทานอาหารที่มีสารฮีสตามีนปนเปื้อนในปริมาณน้อยจะไม่เป็นอันตรายแก่ร่างกายเนื่องจากร่างกายสามารถขับสารฮีสตามีนส่วนเกินออกจากร่างกายทางปัสสาวะโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดสและไดเอมีนออกซิเดส (mono- and diamineoxidases) [6] แต่ความเป็นพิษของสารฮีสตามีนจะเกิดขึ้นได้ในกรณีที่มีการรับสารฮีสตามีนเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่องและเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องจนเกิดการสะสมในร่างกายเป็นปริมาณมาก การแสดงออกของความเป็นพิษจะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ได้แก่ เกิดผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ทำให้หน้าแดงเนื่องจากหลอดเลือดเล็กขยายตัวและเพิ่มการยอมให้สารผ่านเข้าออกหลอดเลือดแดงฝอยไปยังเนื้อเยื่อ ความดันเลือดผิดปกติอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลง ผลต่อกล้ามเนื้อ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของร่างกาย ปวดท้องเนื่องจากความผิดปกติของการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน หน้าแดง ผื่นคัน หืด ลมพิษ น้ำมูกไหล ไมเกรน และในกรณีที่มีสารฮีสตามีนในร่างกายมากเกินพอจะทำให้เกิดภาวะช็อก เป็นต้น [5]

พิวเทรสซีน หรือ 1,4-บิวเทนไดเอมีน และคาร์ดาเวรีน หรือ 1,5-เพนเทนไดเอมีน เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนออร์นิทีนและไลซีนตามลำดับ ตามสมการที่ 2 และ 3



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนออร์นิทีนและไลซีน
ที่มา: ดัดแปลงจาก สมณฑา วัฒนสินธุ์. (2549). 98.

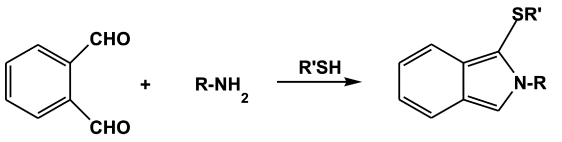
สารทั้งสองนี้มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดสและไดเอมีนออกซิเดส จึงช่วยเสริมความเป็นพิษของฮีสตามีน [6] สารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนเป็นสารที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้การเน่าเสียของอาหารประเภทเนื้อสัตว์เรียกว่า BAI (Biogenic Amine Index) ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพและความสดใหม่ของอาหาร สารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารไดเอมีนที่สามารถระเหยได้ง่ายและสามารถส่งกลิ่นเหม็นที่มีความเฉพาะตัว เช่น พิวเทรสซีนจะมีกลิ่นเหม็นเน่า และคาร์ดาเวรีนจะมีกลิ่นคล้ายซากศพ นอกจากนี้สารพิวเทรสซีนยังเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสารพอลีเอมีนชนิดสเปอร์มิดีนและสเปอร์มีนได้อีกด้วย และที่ยิ่งไปกว่านั้นคือพิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนเป็นสารตั้งต้นในการเกิดของสารไนโตรซามีน (Nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง [6]

พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนจะไม่แสดงความเป็นพิษแก่ร่างกายโดยตรงแต่สามารถช่วยเสริมความเป็นพิษของฮีสตามีนเนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดสและไดเอมีนออกซิเดสที่ทำหน้าที่ในการกำจัดฮีสตามีนออกจากร่างกาย กระบวนการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวทำให้ฮีสตามีนสะสมในร่างกายจนถึงระดับที่ร่างกายเกิดการตอบสนองและแสดงความเป็นพิษออกมา

วิธีการทางเคมีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในการตรวจหาปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่าง ได้แก่ เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) เทคนิคแคปิลารี่อิเล็กโตรโฟเรซิส (CE) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการตรวจหาปริมาณสารไบโอจีนิกในอาหารโดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับ ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ (*O*-phthaldialdehyde; OPA) ก่อนที่จะทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์ สาเหตุเนื่องจากปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างอาหารมีปริมาณน้อย รวมทั้งมีสารรบกวนอื่นๆ ปะปนอยู่จำนวนมาก ซึ่งจะรบกวนการวิเคราะห์

งานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำซึ่งเป็นไส้กรอกพื้นเมืองของไทยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนและเอมีนได้รวดเร็วที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่เป็นเบส

เช่น บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9-11) และมีสารประกอบไทอัล (Thiols; -SH) เช่น 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ทำหน้าที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ โดยจะเตรียมอนุพันธ์ก่อนนำสารอนุพันธ์ที่ได้ฉีดเข้าคอลัมน์แยกสาร (Precolumn Derivatization) สารอนุพันธ์ที่ได้คือไอโซอินโดลที่มีคุณสมบัติในการวาวแสง (Fluorescent Isoindole Derivative) และตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออร์เรสเซนต์



.....4)

ภาพที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการเกิดสารอนุพันธุ์ของออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์กับไบโอจีนิกเอมีน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Steed, Rita. (2010). Amino Acid Analysis - Agilent Restricted.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนพร้อมกันด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.3 pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

2. ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์

2.2 โซเดียมคลอไรด์

3. วิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกพื้นเมืองของไทย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบ fluorescence (รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard, คอลัมน์ C18 (5 ไมครอน, 3.9x150 mm) จากบริษัท Waters, เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตโฟโตมิเตอร์รุ่นJASCO FP-6200, เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (รุ่น LaboStar) จากบริษัท SIEMENS, เครื่อง pH meter (รุ่น Cyberscan 500)

สารเคมี

ฮีสตามีนไดไฮโดรคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท Fluka พิวเทรสซีนไดไฮโดรคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท Fluka คาร์ดาเวรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich อะซิโตไนไตรต์ (HPLC grade) จากบริษัท MERCK แอมโมเนียมแอซิเตต (AR Grade) จากบริษัท MERCK ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ (AR Grade) จากบริษัท ACROS 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (AR Grade) จากบริษัท MERCK กรดไฮโดรคลอริก (AR Grade) จากบริษัท MERCK โซเดียมคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA โซเดียมไฮ ดรอกไซด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA บอแรก (AR Grade) จากบริษัท APS Finechem

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนพร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1 เตรียมสารละลาย OPA โดยการชั่งสาร OPA หนัก 25 mg ละลายด้วยเมทานอล 1.0 ml จากนั้นเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 20 µl และปรับปริมาตรเป็น 5 ml ด้วย 0.4 M บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.5

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Stock solution ของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ความเข้มข้น 100 ppm โดยชั่งสารมาตรฐานฮีสตามีน พิวดทรสซีน และคาร์ดาเวรีนอย่างละ 100 mg ละลายด้วยน้ำ DI จนมีปริมาตรครบ 1000 ml

1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 100 ml จาก Stock solution โดยการปิเปตสารละลาย 100 ppm มา 20 ml และปรับปริมาตรเป็น100 ml ด้วยน้ำ DI

2. ปฏิกิริยาการเกิดสารอนุพันธ์ระหว่างออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์กับสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานฮีสตามีนเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 3 ml ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย OPA ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 1 นาที

2.2 นำสารอนุพันธ์ฮีสตามีน-OPA ไปวัดค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการวาวแสง (λ_{em}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้ค่า λ_{ex} = 335 nm และ λ_{em} = 460 nm

2.3 หาค่าความยาวคลื่นในการวาวแสงของพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 2.1-2.2

3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอนุพันธ์ทั้งสามชนิดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.1 การศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

3.1.1 ตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่คือ 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.8) : อะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนตอนเริ่มต้นเป็น 75:25 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 ml/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.2 เปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่จาก 75:25 v/v เป็นอัตราส่วน 77:23, 78:22, 80:20 และ 81:19 v/v ตามลำดับ และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 ml/min จะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำต่อหนึ่งอัตราส่วนและบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

3.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

3.2.1 ตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH (5.8) : อะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนตอนเริ่มต้นเป็น 81:19 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 0.9 ml/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2 เปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จาก 0.9 ml/min เป็น 1.0, 1.1, 1.2 และ 1.5 ml/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งอัตราการไหลและบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

3.2.3 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหล (แกนนอน) กับเวลารีเทนชัน (แกนตั้ง)

3.3 การศึกษา pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์

3.3.1 ตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่คือ 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนตอนเริ่มต้นเป็น 81:19 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 ml/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งค่า pH

3.3.2 เปลี่ยนค่า pH เป็น 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0, pH 5.4, pH 5.8 และ pH 6.2 ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์เป็น 81:19 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 ml/min และแต่ละค่า

pH จะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

3.3.3 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH (แกนนอน) กับพื้นที่พีค (แกนตั้ง)

ตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ คือปัจจัยที่อาจจะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากปฏิกิริยาต้องเกิดในสภาวะที่เป็นเบสและเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะทางด้านค่า pH งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไบโอจีนิกเอมีนกับสารละลาย OPA ในสารละลายตัวกลาง 2 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตามลำดับซึ่งทำได้โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ความเข้มข้นอย่างละ 20 ppm

2.1 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 M ตามลำดับ ทำได้โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิดความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 3 ml ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องหมุนวนนาน 1 นาที ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 1 นาทีจากนั้นเติมสารละลาย OPA ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องหมุนวนตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง กรองสารอนุพันธ์ที่ได้ด้วย Syringe Filters PTFE membrane ขนาด 0.45 µm ก่อนจะนำสารอนุพันธ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงสัญญาณของตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 335 nm และความยาวคลื่นของการวาวแสง 460 nm บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีกและความสูงของพีก

2.2 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 %w/v ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาตามขั้นตอนที่ใช้ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในสารละลายกรด พร้อมทั้งบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีกและความสูงของพีก

ตอนที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกพื้นเมืองของไทย

3.1 ชั่งตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหารใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 ml จำนวน 12 บีกเกอร์โดยแต่ละบีกเกอร์จะมีตัวอย่างไส้กรอกหนัก 5.00 $\pm$ 0.05 g จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) ปริมาตร 10 ml แล้วปั่นด้วยเครื่อง stirrer นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้ใส่สารละลาย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) ลงไปอีก 10 ml นำสารตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) ร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ และการเซ็นตริฟิวจ์ จำนวน 12 ระบบการทดลอง ได้แก่

ระบบที่ 1 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
ระบบที่ 2 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
ระบบที่ 3 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
ระบบที่ 4 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที
ระบบที่ 5 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
ระบบที่ 6 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
ระบบที่ 7 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
ระบบที่ 8 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที
ระบบที่ 9 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
ระบบที่ 10 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
ระบบที่ 11 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
ระบบที่ 12 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที

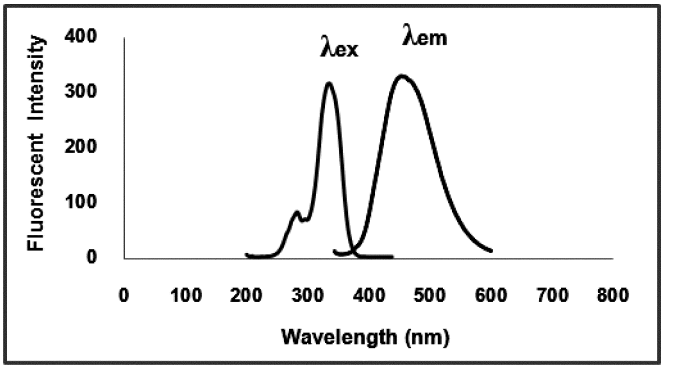
เก็บส่วนของสารละลายโดยการกรองด้วยกระดาษวอทแมนเบอร์ 1 และนำตะกอนที่เหลือไปสกัดอีก 2 ครั้งด้วยระบบที่ทำการศึกษานี้

3.2 การสกัดตัวอย่างไส้อั่วและหม่ำทำตามวิธีในข้อ 3.1

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน พร้อมกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

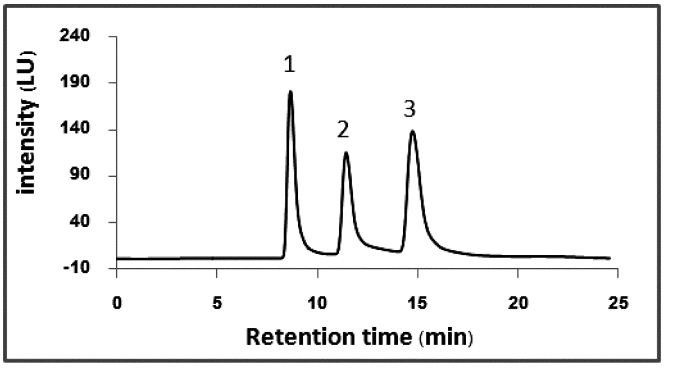
ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนกับสารละลาย OPA แล้วเกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนและ/หรือเอมีนในตัวอย่างต่างๆ ที่มีสารรบกวนจำนวนมาก จากการวัดค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการวาวแสงของสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิด กับสารละลาย OPA ในสารละลายตัวกลางที่เป็นน้ำด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์พบว่ามีค่าความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 335 nm (λ_{ex} = 335 nm) ความยาวคลื่นของการวาวแสงที่460 nm (λ_{em} = 460 nm) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สเปกตรัมของสารอนุพันธ์ฮีสตามีนที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารละลาย OPA

1.1 องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชันของอนุพันธ์ รูปร่างลักษณะของพีคที่ปรากฏในโครมาโทแกรม ซึ่งใช้สภาวะเบื้องต้นในการแยกสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.8), อุณหภูมิห้อง, อัตราการไหล 1.1 ml/min) จากผลการศึกษาพบว่าองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ส่งผลต่อการแยกชัดของพีกสารอนุพันธุ์ทั้งสามอย่างชัดเจน รวมทั้งส่งผลต่อรูปร่างลักษณะของพีก ระยะเวลารีเทนชัน และการตอบสนองต่อสัญญาณของตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์ เมื่อกำหนดให้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่มีสัดส่วนของอะซิโตไนไตรต์เป็น 75:25, 77:23, 78:22 และ 80:20 v/v ตามลำดับ พบว่าสารอนุพันธ์ทั้ง 3 มีค่าความเข้มแสงในการตอบสนองต่อสัญญาณสูง มีระยะเวลารีเทนชันน้อย แต่พีคทั้งสามไม่สามารถแยกจากกันอย่างชัดเจนจึงทำให้ไม่สามารถระบบคุณลักษณะเฉพาะตัวของพีคได้ แต่เมื่อลดองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่โดยลดเปอร์เซ็นต์ของอะซิโตไนไตรต์ให้น้อยลงพบว่าสารอนุพันธุ์ทั้ง 3 แยกจากกันได้ดีอย่างชัดเจนจนสามารถระบุคุณลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละพีคได้ โดยโครมาโทแกรมแสดงดังภาพที่ 5

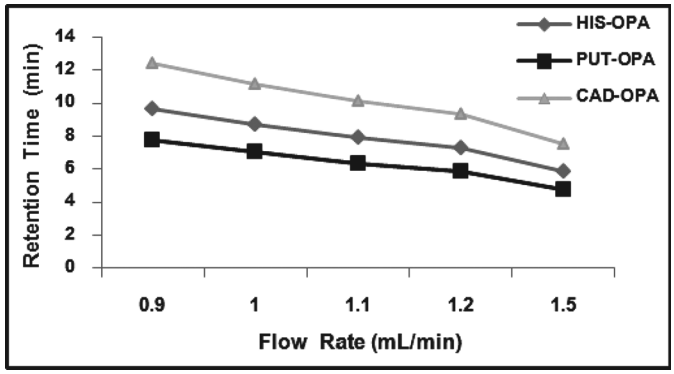


ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมการที่ได้จากการแยกอนุพันธ์ของสารมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิดด้วย
1 แทน พีคของสารอนุพันธ์ OPA – พิวเทรสซีน
2 แทน พีคของสารอนุพันธ์ OPA – ฮีสตามีน
3 แทน พีคของสารอนุพันธ์ OPA – คาร์ดาเวรีน

จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกอนุพันธ์ของสารมาตรฐานไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิดให้สามารถแยกจากกันอย่างชัดเจน คือ เลือกใช้องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ในสัดส่วนของตัวทำละลายที่เป็น 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์เท่ากับ 81:19 v/v และใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.1 ml/min ซึ่งพิวเทรสซีนมีค่าระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 9.207 นาที ฮีสตามีนมีระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 13.304 นาที และคาร์ดาเวรีนมีระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 15.629 นาที ดังแสดงในภาพที่ 5

1.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ทำศึกษาอัตราการไหลที่ 0.9 จนถึง 1.5 ml/min และมีองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.8) : อะซิโตไนไตรต์ สัดส่วน 81:19 v/v ได้ผลตามภาพที่ 6

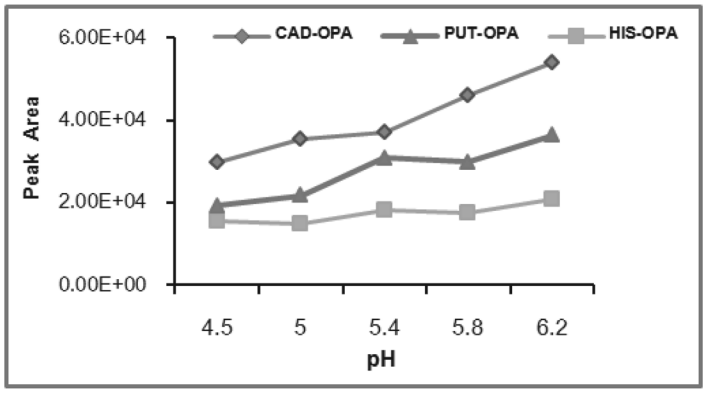


ภาพที่ 6 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

พบว่า การเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จะทำให้ชะสารออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง แต่การใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่สูงจะทำให้อนุภาคของสารเกิดการถ่ายโอนมวลสารระหว่างวัฏภาคนิ่งกับวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง ทำให้สมดุลของอันตรกิริยาการกระจายตัว (Partition Coefficient; K) ระหว่างโมเลกุลของสารกับวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลง ส่งผลทำให้ค่าการเลือกเฉพาะลดลง (selectivity) และค่าการแยก (resolution) ก็ลดต่ำลงด้วย [10] และจากการศึกษาพบว่าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม คือ 1.1 ml/min

1.3 pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการแยก จะทำการทดสอบโดยการเตรียมสารละลาย 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5, 5.0, 5.4, 5.8 และ 6.2 โดยใช้อัตราส่วน 81:19 v/v และนำสารละลาย 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้มีค่า pH ดังกล่าวข้างต้นมาใช้เป็นองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีกของสัญญาณดังภาพที่ 7

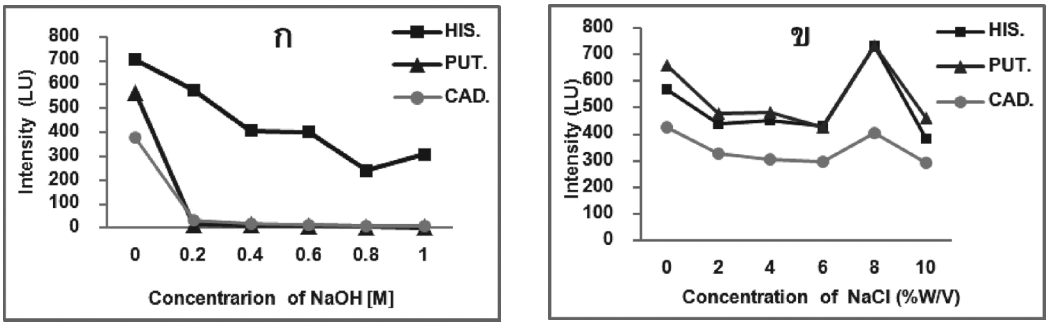


ภาพที่ 7 ผลของ pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

ผลการทดลองพบว่าเมื่อ 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์มีค่า pH เพิ่มขึ้นจะสามารถแยกสารอนุพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ค่า pH 6.2 สารทั้ง 3 สามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้นเนื่องจากมีพื้นที่ใต้พีกสูงสุด แต่มี reproducibility ต่ำเนื่องจากพีคของสารอนุพันธ์ทั้งสามมีค่ารีเทนชันไทม์เปลี่ยนแปลงจากเดิม (shift) แต่ที่ค่า pH 5.8 พบว่ามีความ reproducibility มากว่าที่ pH 6.2 ทั้งนี้เนื่องจากแอซิเตตบัฟเฟอร์มีความจุบัฟเฟอร์ (buffer capacity) อยู่ระหว่าง pH 3.8-5.8 และจากกราฟพบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า pH นั้นไม่ส่งผลต่อการแยกสารฮีสตามีนเนื่องจากกราฟมีความชันน้อย แต่การเปลี่ยนแปลงค่า pH ส่งผลต่ออนุพันธ์พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนเป็นอย่างมากเนื่องจากกราฟมีความชันมาก และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของไบโอจีนิกเอมีนและอนุพันธ์ของสารทั้งสาม ที่ค่า pH ต่ำๆ อาจเกิดการ protonation ที่ไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุล โดยเฉพาะพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีน จึงทำให้ค่ารีเทนชันไทม์เปลี่ยนแปลงมากกว่าฮีสตามีนที่มีโครงสร้างแบบเฮเทอโรไซคลิก

ตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

ปฏิกิริยาการเกิดสารอนุพันธุ์ระหว่างฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับ OPA ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นปฏิกิริยาในหลอดทดลอง ค่า pH ของสารละลายตัวกลางอาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเกิดสารอนุพันธุ์ การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทำได้โดยการเลือกใช้สารละลายตัวกลาง 2 ชนิดคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 8

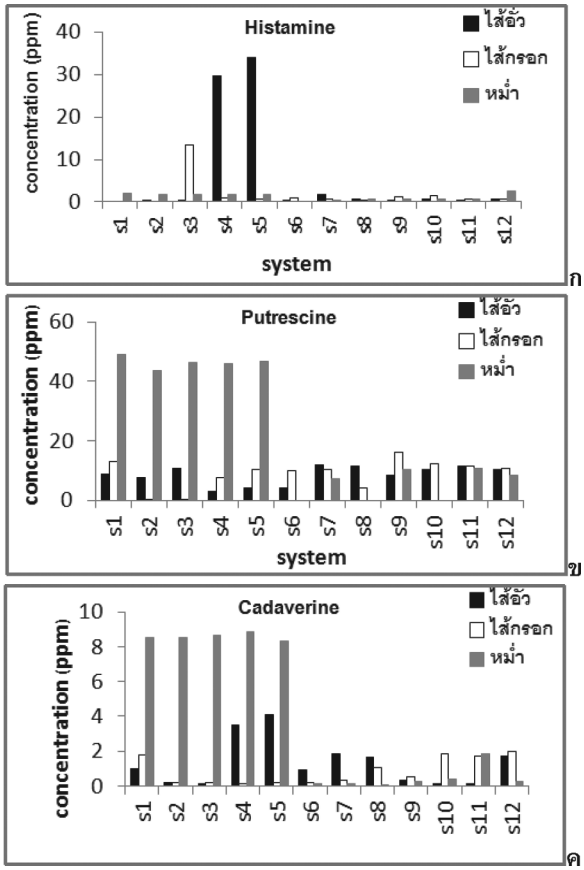


ภาพที่ 8 ผลของสารละลายตัวกลางที่ส่งผลต่อความเสถียรของสารอนุพันธ์
ก แทน ในสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์
ข แทน ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์

จากภาพที่ 8 (ก) พบว่าเมื่อให้สารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดทำปฏิกิริยากับ OPA ในสารละลายที่เป็นเบสคือโซเดียมไฮดรอกไซด์นั้นส่งผลอย่างมากต่อการเกิดปฏิกิริยาของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนเนื่องจากมีค่าความสูงพีกหรือความเข้มเข้มแสงลดลงมาก แต่สำหรับสารฮีสตามีนจะมีผลกระทบน้อยกว่าแม้ว่าความสูงพีกหรือความเข้มแสงจะมีค่าค่อยๆ ลดลง ส่วนการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในสารละลายตัวกลางที่เป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่าส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไบโอจีนิกกับสารละลาย OPA เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ตอนที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกพื้นเมืองของไทย

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลการเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ทำการสกัดสารไบโอจีนิคเอมีนทั้งสามชนิด ด้วยขบวนการโซนิเคชัน ร่วมกับการเซนตริฟิวจ์ ทั้งนี้ได้แปรผันเวลาการทดลองได้ผลตามภาพที่ 9



ภาพที่ 9 กราฟแสดงปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่ได้จากการสกัดตัวอย่างด้วย 0.1 M บอเรต
ก แทน ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่าง
ข แทน ปริมาณพิวเทรสซีนในตัวอย่าง
ค แทน ปริมาณคาร์ดาเวรีนในตัวอย่าง

กำหนดให้แกน x

S1 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
S2 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
S3 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
S4 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที
S5 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
S6 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
S7 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
S8 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที
S9 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
S10 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
S11 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
S12 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที

จากผลการสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองทั้ง 3 ชนิด สามารถตรวจพบสารเอมีนทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง แต่ข้อที่น่าสังเกตคือการสกัดและผ่านขบวนการเขย่าแบบอัลตราโซนิคและเซนตริฟิวจ์ด้วยเวลานานต่างๆ กัน มีผลต่อปริมาณสารที่ตรวจพบเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามการสกัดที่ใช้เวลาเขย่าด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคเพียง 5 นาที น่าจะเป็นเวลานานที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถตรวจวัดปริมาณเอมีนทั้ง 3 ได้มากที่สุด ซึ่งผลที่เป็นเช่นนี้เป็นผลจากการใช้เทคนิคอัลตราโซนิคเป็นเวลานานอาจทำให้เซลล์สารอาหารต่างๆ ถูกทำลายได้มาก จนได้สารที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีในไส้กรอกพื้นเมืองละลายออกมาเจือปนมากขึ้น อาจส่งผลให้บดบัง หรือมีผลรบกวนสัญญาณการวิเคราะห์

ผลการทดลองสกัดตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ สามารถตรวจพบปริมาณสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่ตรวจพบในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ

ตัวอย่าง	ไบโอจีนิกเอมีน	ปริมาณที่พบในไส้กรอก	%การคืนกลับ
ไส้กรอก	ฮีสตามีน	15	72.51
	พิวเทรสซีน	15	98.30
	คาร์ดาเวรีน	2	92.55
หม่ำ	ฮีสตามีน	50	85.30
	พิวเทรสซีน	9	86.20
	คาร์ดาเวรีน	3	82.80
ไส้อั่ว	ฮีสตามีน	35	85.60
	พิวเทรสซีน	10	99.05
	คาร์ดาเวรีน	3	101.90

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาปริมาณสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนซึ่งเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนโดยอาศัยการทำอนุพันธ์กับสารละลายออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) และมี 2-เมอร์แคปโตเอทานอลรวมอยู่ด้วย แต่อย่างไรก็ตามปริมาณที่ตรวจพบก็ยังไม่สูงในระดับที่เป็นอัตรายและมีค่าต่ำกว่าที่ตรวจพบสารไบโอจีนิกเอมีนในไส้กรอกของต่างประเทศ การพบสารโดยเฉพาะพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนซึ่งบ่งชี้ถึงความสดของผลิตภัณฑ์เนื้อโดยเฉพาะในปริมาณที่แสดงว่าวัตถุดิบที่ใช้ประกอบการแปรรูปเป็นไส้กรอกพื้นเมืองจเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพ และวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ พบว่าสารอนุพันธ์ของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน แยกจากกันได้ดีเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์ (81:19, v/v) เป็นการชะแบบไอโซ เครติก และระยะเวลาในการวิเคราะห์ 15 นาที ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเหมาะสมมากที่จะนำมาศึกษาปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน เพราะขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก จากการตรวจสอบไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ พบว่ามีสารทั้งสามชนิดโดยที่ไส้อั่วมีฮีสตามีนและคาร์ดาเวรีนมากสุด 35 ppm และ 3 ppm ตามลำดับ หม่ำมีพิวเทรสซีนมากสุด 50 ppm

เอกสารอ้างอิง

[1] Silla M.H. Santos. (1996). Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. pp. 213-231.

[2] Shalaby, Ali R. (1996). Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International.* 29(7): 675-676.

[3] ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. (ม.ป.ป.). ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 262-269.

[4] นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์. (ม.ป.ป.). *เภสัชวิทยาเล่ม 3.* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 17-23.

[5] Saarinen, M.T. (2002, March). Determination of Biogenic Amines as Dansyl Derivatives in Intestinal Digesta and Feces by Reversed Phase HPLC. *Chromatographia.* 55(5/6): 297.

[6] Moret, Sabrina. et al. (2005). A Survey on Free Biogenic Amine Content of Fresh and Preserved Vegetables. *Food Chemistry.* 89: 355.

[7] KarovičovÁ, J. (2003). Biogenic Amine in Food. Chem. Pap. 59: 70-79.

[8] Steed, Rita. (2010). *Amino Acid Analysis - Agilent Restricted.* n.p.

[9] http://www.wikipedia.com

[10] แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. (2553). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงวิเคราะห์.* กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.