ทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทะเล และปลาน้ำจืด

TAURINE AND HISTAMINE IN SEAFISH AND FRESHWATER FISH SAMPLES

*กาญจนา คล่องงานฉุย** *พรพิมล ม่วงไทย*

Kanjana Klongnganchui*, *Pornpimol Muangthai*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

****Corresponding author, E-mail:*** *k.klongnganchui@gmail.com*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างปลา ได้แก่ ปลาทะเล และปลาน้ำจืดของประเทศไทยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยวิธีการเตรียมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนด้วยออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ ทั้งนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมจะใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ต่ออะซิโตไนไตรล์ อัตราส่วน 65 : 35 โดยปริมาตร ควบคุมอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยสามารถวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนได้พร้อมกันภายในเวลา 10 นาที ค่าระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 5.415 และ 8.483 นาที ตามลำดับ ผลของการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์พบว่ากราฟมาตรฐานของทอรีนและฮีสตามีนมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.0005 ถึง 10 และ 0.03 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของทอรีนและฮีสตามีนเท่ากับ 0.9975 และ 0.9980 ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) ของทอรีน เท่ากับ 0.0001 และ 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับฮีสตามีนมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถแยกทอรีนและฮีสตามีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลาน้ำจืดและปลาทะเลได้ โดยตรวจพบปริมาณทอรีนในตัวอย่างปลาอยู่ในช่วง 490.81$\pm$1.7 ถึง 1721.92$\pm$1.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณฮีสตามีนในช่วง 6.78$\pm$0.2 ถึง 19.07$\pm$1.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ได้ศึกษาปัจจัยวิธีการปรุงอาหารด้วยวิธีต้ม นึ่ง และทอดในตัวอย่างปลา พบว่าวิธีการปรุงอาหารส่งผลต่อปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่าง

คำสำคัญ: ทอรีน ฮีสตามีน ปลาทะเล ปลาน้ำจืด

Abstract

The aim of this research was to simultaneous analysis taurine and histamine content in fish samples as seafish and freshwater fish of Thailand by high-performance liquid chromatography and derivatied with *o*-phthalaldehyde (OPA). The optimization of HPLC conditions for quantitative analysis of taurine and histamine were obtained. The optimum conditions for mobile phase system were 0.02 M phosphate buffer pH 4.8 : acetonitrile as 65:35, controlled flow rate at 0.8 mL/min and detected by fluorescence detector with fluorescence excitation and emission peaks at 333 and 451 nm, respectively. This condition could separate taurine and histamine within 10 mins, retention time of taurine and histamine were 5.415 and 8.483 mins, respectively. Validation method of the analysis was also studied and the calibration curve showed a linearity range of 0.0005 - 10 and 0.03 - 10 mg/L for taurine and histamine, respectively, with the correlation coefficients (R^2) of taurine and histamine as 0.9975 and 0.9980 respectively. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of taurine and histamine presented as 0.0001 mg/L and 0.0005 mg/L for taurine and 0.01 mg/L and 0.03 mg/L for histamine. The method was showed an effective separation of both taurine and histamine and applied to quantity of taurine and histamine in fish samples. Taurine in Thai fishes samples were found in the range of 490.81$\pm$1.7 - 1721.92$\pm$1.9 mg/kg. Histamine in Thai fishes were found in the range of 6.78$\pm$0.2 - 19.07$\pm$1.4 mg/kg. The effects of processing on fish samples such as boiling, steaming and frying were studied and the results revealed that taurine and histamine content depend on processing method.

Keywords: Taurine, Histamine, Seafish, Freshwater Fish

บทนำ

ปลาเป็นหนึ่งในอาหารที่คนส่วนใหญ่นิยมบริโภค เนื่องจากปลาเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่มีปริมาณโปรตีนสูง มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมกา-3 โอเมกา-6 และมีวิตามิน A, D, E, K และแร่ธาตุ อีกทั้งยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด เช่น ไลซีน ทรีโอนิน และทอรีน ซึ่งทอรีนเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์

ทอรีน (Taurine หรือ 2-Aminoethane Sulfonic Acid) เป็นกรดอะมิโนอิสระชนิดเบตา (β-amino acid) ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ แต่ไม่ได้เป็นกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน (Non Protein Amino Acid) [1] ทอรีนเป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ โดยเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของซีสเทอีน(Cysteine)และเมธไทโอนีน(Methionine) ทอรีนมีบทบาทสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ โดยเป็นหนึ่งในสารที่ส่งผลต่อการพัฒนาระบบประสาทและสมอง ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมนุษย์ ช่วยลดความดันโลหิต ช่วยควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในเลือด และทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย [2] ถึงแม้ทอรีนเป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณทอรีนที่ร่างกายสังเคราะห์ได้นั้นไม่เพียงพอต่อการใช้งานจึงจำเป็นต้องรับทอรีนเพิ่มจากการบริโภคอาหารที่มีทอรีน เช่น อาหารทะเล หอยนางรม ปลา เนื้อหมู

เนื้อไก่ และนมวัว เป็นต้น เป็นที่ทราบกันว่าการบริโภคปลาจะได้รับคุณค่าทางอาหารมากกว่าการบริโภคเนื้อสัตว์ชนิดอื่น แต่ในขณะเดียวกันอาจได้รับสารพิษเข้าไปพร้อมกัน โดยสารพิษที่พบมากในปลาคือ ฮีสตามีน

ฮีสตามีน (Histamine หรือ β-aminoethylimidazole) เป็นสารในกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic Amines) ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ฮีสตามีนเป็นสารที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน ด้วยเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (Histidine Decarboxylase) สลายตัวเป็นฮีสตามีน [3] นอกจากนี้ยังสามารถรับสารฮีสตามีนได้จากอาหารที่มีการปนเปื้อนฮีสตามีน โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จากปลาและอาหารทะเล เมื่อในร่างกายมีปริมาณฮีสตามีนมากเกินไป ฮีสตามีนจะส่งผลให้เกิดอาการแพ้ มีผื่นคัน แสบร้อนบริเวณปาก [4] ฮีสตามีนเป็นสารพิษในกลุ่มที่เรียกว่า Scombroid Poisoning ที่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้อาหารทะเล โดยจะพบมากในปลาวงศ์ Scombridae และ Scomberesocidae เช่น ปลาซาร์ดีน ปลาทูน่า และปลาแฮริง เป็นต้น [5] จึงทำให้หลายประเทศให้ความสำคัญกับปริมาณฮีสตามีนในอาหาร โดยใช้เป็นข้อกำหนดตัวบ่งชี้ที่ บ่งบอกถึงคุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา เนื่องจากปลาและผลิตภัณฑ์ปลาจะมีปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลังจากปลาตาย โดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกากำหนดให้ปริมาณฮีสตามีนในปลาไม่ควรเกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม [6]

จากความสำคัญของสารทั้งสองชนิด ทำให้งานวิจัยนี้สนใจที่จะนำเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารทอรีนและฮีสตามีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างปลาสด และทำการศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภค โดยเฉพาะกรณีผู้บริโภคที่แพ้อาหารทะเล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ในการตรวจสอบปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสดและปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ (รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard โดยใช้คอลัมน์ C18 (SphereClone 5 μm ODS, ขนาด 250 x 4.60 mm) จากบริษัท Fortis
- เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น JASCO FP-6200
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB104-S) จากบริษัท METTLER TOLEDO
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (รุ่น LaboStar) จากบริษัท SIEMENS
- เครื่องอัลตราโซนิค (Ultrasonic) จากบริษัท Mettler electronic
- เครื่อง pH meter (รุ่น Cyberscan 500)
- เครื่องเขย่า (รุ่น Vortex-genie 2) จากบริษัท Scientific
- สารมาตรฐานทอรีน (taurine, AR Grade) จากบริษัท sigma
- สารฮีสตามีนไดไฮโดรคลอไรด์ (histamine dihydrochloride, AR Grade) จากบริษัท Fluka
- สารออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ (*o*-phathalaldehyde, AR Grade) จากบริษัท ACROS
- สาร 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol, AR Grade) จากบริษัท Merck

- สารบอแรก (borax, AR Grade) จากบริษัท APS Finechem

- สารอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, HPLC Grade) จากบริษัท Carlo Erba

- สารโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (potassium di-hydrogen phosphate anhydrous, AR Grade)

จากบริษัท Quality Reagent Chemical Product

- สารไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid, AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA

- สารโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate anhydrous, AR Grade) จากบริษัท Quality Reagent Chemical Product

ตัวอย่างปลา

ตัวอย่างปลาที่ใช้ในงานวิจัยแบ่งเป็นตัวอย่างปลาทะเล และปลาน้ำจืดที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด

ปลาทะเล ได้แก่ ปลาโอ (*Katsuwonus pelamis*) ปลาทู (*Rastrelliger brachysoma*) ปลาเนื้ออ่อน (*Kryptopterus bleekeri*) ปลาอินทรีย์ (*Scomberomorus guttatus*) และปลากระบอก (*Parupeneus cinnabarins*)

ปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus*) ปลานิล (*Alutera monceros*) ปลาช่อน (*Channa striatus*) ปลาดุก (*Clarias spp.*) และปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*)

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ทำการศึกษาโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โดยศึกษาสภาวะระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Pappa-Louisi และคณะ [7] มีดังนี้

- คอลัมน์ C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)

- อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตไนไตรล์

- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ 20 ไมโครลิตร

- ตรวจวัดสัญญาณโดยใช้ฟลูออเรสเซนต์ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง เท่ากับ 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ

1.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตไนไตรล์ ในช่วง 60:40 ถึง 75:25 โดยปริมาตร บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.1.2 ศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ต่ออะซิโตไนไตรล์ ในช่วง 0.6 ถึง 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.1.3`ศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 65 : 35 โดยปริมาตร ในช่วง pH 4.6 ถึง 5.8 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หา pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation)

1.2.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานผสมแต่ละความเข้มข้นทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พร้อมกับบันทึกโครมาโทแกรม และค่าพื้นที่ใต้พีค เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานทอรีนและฮีสตามีน โดยสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณพื้นที่ใต้พีค (แกน Y) กับค่าความเข้มข้นของทอรีน และฮีสตามีน (แกน X)

1.2.2 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีน และฮีสตามีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นทำการลดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทอรีนและฮีสตามีนจนกระทั่งสัญญาณที่วัดได้มีความสูงเป็น 3 เท่า และ 10 เท่าของสัญญาณของสารละลายแบลงค์ (Blank) โดยจะได้ความเข้มข้นของค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ

ตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

2.1 วิธีการเตรียมตัวอย่างปลา

สุ่มตัวอย่างปลาจากตลาดสด ได้แก่ ปลาโอ ปลาทู ปลาเนื้ออ่อน ปลาอินทรีย์ ปลากระบอก ปลาทับทิม ปลานิล ปลาดุก ปลาสวาย และปลาช่อน นำตัวอย่างเนื้อปลามาสับให้ละเอียด พร้อมกับชั่งตัวอย่าง 1.000 กรัม แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนเนื้อปลาด้วยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติกที่ความเข้มข้น 10%(w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Extraction) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองและเก็บส่วนสารละลายใสมาปรับให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2 วิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา ที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างจากตลาดสด โดยนำสารสกัดตัวอย่างปลาที่เตรียมได้ทำอนุพันธ์กับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจากตอนที่ 1 และทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ พร้อมกับบันทึกโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

ตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหาร ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

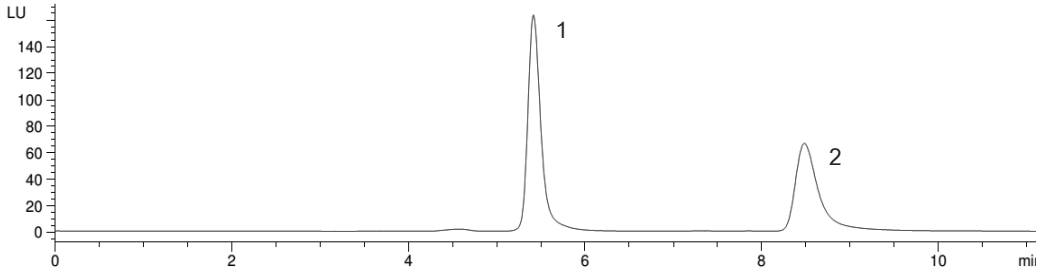
ทำโดยนำตัวอย่างปลาทับทิมมาผ่านการปรุงอาหารด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การต้ม นึ่ง และทอด แล้วทำการเตรียมตัวอย่างปลาจากขั้นตอนที่ 2 และวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกทอรีนและฮีสตามีนคือ วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วนร้อยละ 65 : 35 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งระบบสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนได้พร้อมกันภายในเวลา 10 นาที โดยให้ค่าระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 5.415 และ 8.483 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 1



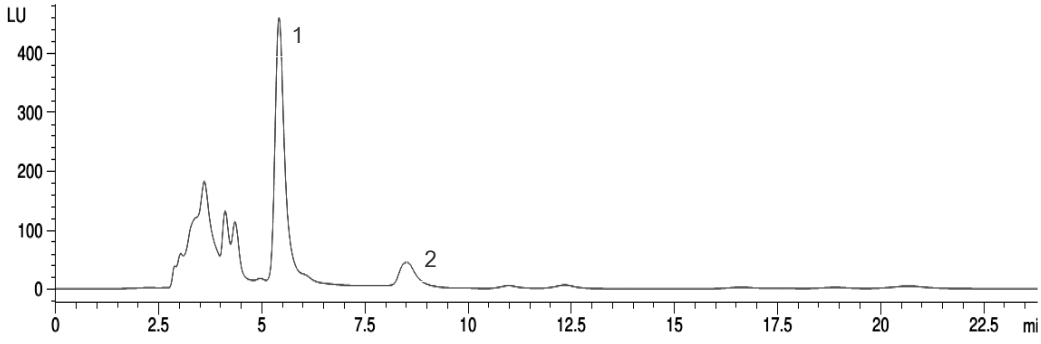
ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกัน (1 แทน ทอรีน 2 แทน ฮีสตามีน)

1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation)

จากผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนโดยสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทอรีนและฮีสตามีนกับพื้นที่ใต้พีค ในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากราฟมาตรฐานของทอรีนและฮีสตามีนมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ได้ทำการศึกษา และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของทอรีน และฮีสตามีน เท่ากับ 0.9975 และ 0.9980 ตามลำดับ และวิธีวิเคราะห์นี้มีค่า LOD และ LOQ ของทอรีน เท่ากับ 0.0001 และ 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับฮีสตามีน มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์หาปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสด พบว่าปลาแต่ละชนิดมีปริมาณทอรีนและฮีสตามีนที่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณทอรีนอยู่ในช่วง 490.81$\pm$1.7 ถึง 1721.92$\pm$1.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณฮีสตามีนในช่วง 6.78$\pm$0.2 ถึง 19.07$\pm$1.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 2 แสดงดังโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทู



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทู (1 แทน ทอรีน 2 แทน ฮีสตามีน)

ตารางที่ 1 ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสด

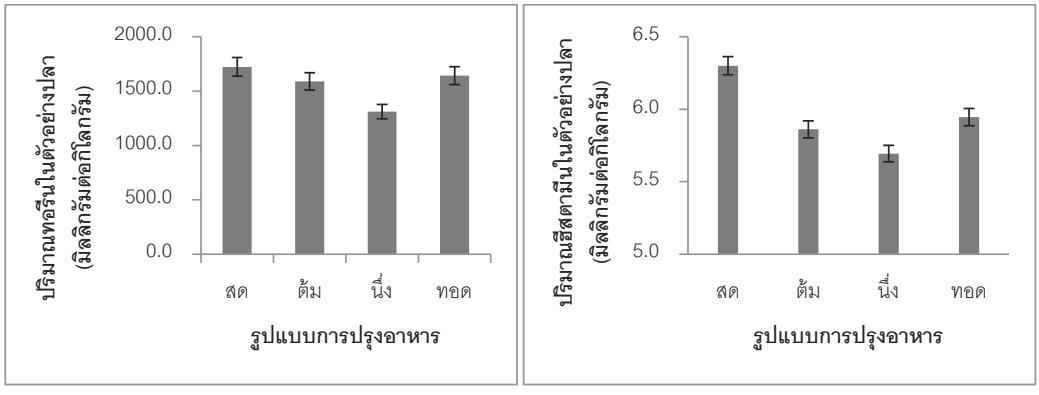
ตัวอย่างปลา	ปริมาณทอรีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม±SD)	ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม±SD)
ปลาทะเล		
ปลากระบอก	1628.76±2.4	19.07±1.4
ปลาเนื้ออ่อน	593.40±2.1	11.37±1.1
ปลาทู	907.92±1.5	7.41±0.2
ปลาอินทรีย์	490.81±1.7	9.38±0.6
ปลาโอ	1721.92±1.9	11.30±0.3
ปลาน้ำจืด		
ปลาช่อน	1295.79±3.4	9.15±0.5
ปลาดุก	520.66±2.9	10.76±0.2
ปลานิล	1380.97±2.4	10.14±0.9
ปลาทับทิม	1648.45±1.3	6.78±0.2
ปลาสวาย	1137.73±2.7	7.88±0.1

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสดที่นิยมบริโภคในประเทศไทยแต่ละชนิด พบว่าปลาทะเลที่มีปริมาณทอรีนสูงที่สุดคือ ปลาโอมีปริมาณทอรีนเท่ากับ 1721.92±1.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปลาน้ำจืดที่มีปริมาณทอรีนสูงสุดคือ ปลาทับทิมมีปริมาณทอรีนเท่ากับ 1648.45±1.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ทราบว่านอกจากทอรีนจะสามารถพบได้ในปลาทะเลซึ่งเป็นแหล่งของทอรีนแล้วยังพบว่าในปลาน้ำจืดก็มีทอรีนสูงที่เป็นแหล่งของทอรีนเช่นกัน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในปลาน้ำจืดและปลาทะเล พบว่าในปลาทะเลมีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่าปลาน้ำจืด โดยในปลาทะเลที่มีปริมาณฮีสตามีนสูงที่สุดคือ ปลากระบอกมีปริมาณฮีสตามีนเท่ากับ 19.07±1.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในปลาน้ำจืดมีปริมาณฮีสตามีนสูงที่สุดคือ ปลาดุกมีปริมาณฮีสตามีนเท่ากับ 10.76±0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งความสดของปลาเป็นปัจจัยสำคัญ

ที่ส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนในปลาแตกต่างกัน นอกจากนี้จากการรายงานของ Silva และคณะ [8] พบว่าปลาแต่ละชนิดจะมีปริมาณ ฮีสติดีนที่แตกต่างกัน โดยปลาทะเลในตระกูล Scombroid เช่น ปลาโอ (*Katsuwonus pelamis*) ปลาทู (*Rastrelliger brachysoma*) มีปริมาณฮีสติดีนในเนื้อปลาสูง จึงส่งผลให้เมื่อปลาเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กรดอะมิโนฮีสติดีนในปลาจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฮีสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส ไปเป็นฮีสตามีน ดังนั้นจึงทำให้ตรวจพบปริมาณฮีสตามีนในปลาทะเลมากกว่าปลาน้ำจืด นอกจากนี้ปลาน้ำจืดยังสามารถตรวจพบฮีสตามีนได้ เนื่องจากฮีสติดีนเป็นกรดอะมิโนสารตั้งต้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของฮีสตามีนที่สามารถพบได้ในปลาทุกชนิด

ตอนที่ 3 ศึกษาปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหาร ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

จากการศึกษากระบวนการปรุงอาหารที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในปลาสด พบว่ากระบวนการปรุงอาหารแต่ละวิธีส่งผลให้ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนลดลง ซึ่งผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา เมื่อนำตัวอย่างปลาสดไปปรุงอาหารด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ ต้ม นึ่ง และทอด ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทับทิมที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร พบว่าการปรุงอาหารด้วยวิธีการต้ม นึ่ง และทอด ส่งผลต่อปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในเนื้อปลา โดยการปรุงอาหารด้วยวิธีการทอดสามารถเก็บรักษาปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในเนื้อปลาไว้ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีปรุงอาหารวิธีต้ม และนึ่ง เนื่องจากทอรีนและฮีสตามีนสามารถละลายในน้ำมันได้น้อย แต่สามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งการปรุงอาหารด้วยวิธีการต้มและนึ่งจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหารจึงทำให้ทอรีนและฮีสตามีนละลายออกมากับน้ำจากกระบวนต้มและนึ่ง นอกจากนี้ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารจะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายฮีสติดีนไปเป็นฮีสตามีนได้จึงส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนในปลาที่ผ่านการปรุงอาหารไม่เพิ่มขึ้น [9]

สรุปและอภิปรายผล

การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทะเล และปลาน้ำจืดของไทยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ทอรีนและฮีสตามีน

ด้วยออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ก่อนทำการตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนต์ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกทอรีนและฮีสตามีนคือ วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งสามารถวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนภายในเวลา 10 นาที และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทะเลและปลาน้ำจืด แสดงให้เห็นว่าปลาทะเลและปลาน้ำจืดมีปริมาณทอรีนไม่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของปลา สำหรับฮีสตามีนพบว่าปลาทะเลจะมีปริมาณฮีสตามีนมากกว่าปลาน้ำจืด เนื่องจากปลาทะเลในตระกูล Scombroid จะมีปริมาณฮีสติดีนสูง ส่งผลให้ในปลาทะเลมีปริมาณฮีสตามีนมากกว่าปลาน้ำจืด จากข้อมูลผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาข้างต้น สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกบริโภคปลาสำหรับผู้ที่แพ้อาหารทะเลได้

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา พบว่ากระบวนการปรุงอาหารจะส่งผลให้ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนลดลง เนื่องจากทอรีนและฮีสตามีนสามารถละลายน้ำในกระบวนการปรุงอาหาร และความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีนในปลาได้

เอกสารอ้างอิง

[1] Shifen, M.; Xiaojing D.; & Yongjian L. (2002). Separation method for taurine analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B.* 781: 251-267.

[2] ประสงค์ เทียนบุญ. (2547). ทอรีน. *วารสารโภชนะบำบัด*. 15(1): 23-32.

[3] Valeria, F.; & Claudia, L. (1998). Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography Derivatization with *o*-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of "free" species. *Journal of Chromatography A*. 809: 241–245.

[4] ยุพิน สังวรินทะ; และคณะ. (2537). *เภสัชวิทยา*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

[5] จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล; และคณะ. (2546). ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา. ใน *เอกสารรายงานการวิจัย*. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

[6] Food and Drug Administration, USA. (1995). Decomposition and histamine-raw frozen tuna and mahi–mahi; canned tuna; and related species; availability of revised compliance policy guide. *Federal Registration*. 60: 39754–39756.

[7] Pappa-Louisi, A.; Sotiropoulos, S.; & Balkat zopoulou, P. (2008). Mobile phase pH, column temperature, and eluent flow rate effects on separation and fluorescence electrochemical detection of OPA derivatives of amino acids in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 31: 1434-1447.

[8] Silva, C.C.G.; Da Ponte, D.J.B.; & Enes Dapkevicius, M.L.N. (1998). Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. *Journal of Food Science*. 63: 644-647.

[9] World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). *Joint FAO/WHO expert meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products: meeting report*. Rome Italy: FAO headquarters.