การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

วีรชัย สิงห์ทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2556

การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

วีรชัย สิงห์ทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย

บทคัดย่อ

ของ

วีรชัย สิงห์ทอง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2556

วีรชัย สิงห์ทอง. (2556). *การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม รองศาสตรจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย, ดร. นวลละออ รัตนวิมานวงศ์

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์ปริมาณของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนซึ่งเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทยสามชนิด ได้แก่ ไส้กรอก ไส้อั่ว และหม่ำ เนื่องจากสารนี้สามารถพบได้ในอาหารและเครื่องดื่มประเภทหมักดอง และเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษและบ่งบอกถึงการเสื่อมคุณภาพของอาหาร โดยสารอนุพันธ์ของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงประเภทรีเวิร์สเฟส ซึ่งได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ทั้งนี้ได้ทำการตรวจวัดสารด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 335 nm และความยาวคลื่นการวาวแสง 460 nm ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอนุพันธ์ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์ คือ 82:18 โดยปริมาตร โดยใช้แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 และควบคุมอัตราการไหลที่ 1.1 ml/min ซึ่งสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนมีเวลารีเทนชันเป็น 9.29 12.47 และ 15.64 นาที ตามลำดับ และพบว่ากรดอะมิโนฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีนไม่ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์เนื่องจากภายใต้สภาวะการแยกนี้สามารถแยกอนุพันธ์ของกรดอะมิโนทั้งสามซึ่งมีเวลารีเทนชันเป็น 2.54 3.64 และ 5.60 นาทีตามลำดับ และจากการศึกษาความเสถียรของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์ พบว่าสารละลายทั้งสามมีผลทำให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซ็นต์ลดลง และจากการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างไส้กรอก ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดไตรคลอโรแอซิติกแอซิด กรดเปอร์คลอริก บอเรตบัฟเฟอร์ เมทานอล เอทานอล และน้ำ พบว่าบอเรตบัฟเฟอร์มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุดโดยให้ค่าการคืนกลับของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกเป็น 72.51%, 98.30%, 92.55% และในไส้อั่วเป็น 85.60%, 99.05%, 101.90% และในหม่ำ 85.30%, 86.20% และ 82.80 ตามลำดับ ซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณฮีสตามีนในไส้กรอก 0.30-13.46 mg/kg ในไส้อั่ว 0.23-33.97 mg/kg และหม่ำในระดับ 0.05-2.65 mg/kg ตรวจพบปริมาณพิวเทรสซีนในไส้กรอก 0.17-15.97 mg/kg ในไส้อั่ว 2.87-18.31 mg/kg และหม่ำ 7.36-49.11 mg/kg และสามารถตรวจพบปริมาณคาร์ดาเวรีนในไส้กรอก 0.11-1.95 mg/kg ในไส้อั่ว 0.11-4.11 mg/kg และในหม่ำ 0.09-8.88 mg/kg

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOGENIC AMINES IN THAI TRADITIONAL SAUSAGES

AN ABSTRACT

BY

WEERACHAI SINGTHONG

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Chemistry

At Srinakharinwirot University

March 2013

Weerachai Singthong. (2013). *Quantitative analysis of biogenic amines in thai traditional sausages.* Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai, Dr. Nuanlaor Ratanawimarnwong

Thai traditional sausages that sold in Thailand. They are fermentation products from animal meat. In this work, histamine , putrescine and cadaverine were focused to analyse their contents in three types of traditional sausages such as E-sarn sausage, Mum sausage and Sai-owe Sausage.The derivatized substances of histamine, putrescine and cadaverine were prepared with *O*-phthaldialdehyde. Then those derivatized substances were separated and analysis their content by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). The study for optimization condition such as pH of acetate buffer, ratio of mobile phase, and flow rate. The signal response were detected by fluorescent detection at excitation wavelength 335 nm and emission wavelength 460 nm, respectively. The optimized condition for good separation showed that ratio of 100 mM acetate (pH 5.8): Acetonitrite was 82:18 v/v. The mobile phase flow rate was controlled at 1.1 ml/min. The retention time of histamine, putrescine and cadaverine were 9.25, 12.45 and 15.64 min, respectively. Their amino acids precursor such as histidine, ornithine and lysine did not effected on the quantitative analysis. The retention time of their amino acids showed that 2.54, 3.64 and 5.60 min, respectively. The stability study of those derivatized products in hydrochloric acid, sodium hydroxide and sodium chloride depend on the reaction medium which decrease the intensity of fluorescent. The resulted from preparation study of samples by hydrochloric acid, trichloroacetic acid, perchloric acid, borate buffer, methanol, ethanol and water were present that borate buffer gave the highest extraction efficiency. The percentage recovery percentage of histamine, putrescine and cadaverine in E-sarn sausage were 72.51%, 98.30%, 92.55% and in Sai-owe sausage were 85.60%, 99.05%, 101.90% and Mum sausage were 85.30%, 86.20% and 82.80%, respectively. The content of histamine in E-san sausage, Sai-owe sausage and Mum sausage were 0.30-13.46 mg/kg,0.23-33.97 mg/kg and 0.05-2.65 mg/kg.The content of putrescine in histamine in E-san sausage, Sai-owe sausage and Mum sausage were 0.17-15.97 mg/kg,2.87-18.31 mg/kg and 7.36-49.11 mg/kg. The content of cadaverine in histamine in E-san sausage, Sai-owe sausage and Mum sausage were 0.11-1.95 mg/kg, 0.11-4.11 mg/kg and 0.09-8.88 mg/kg.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2555

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพื้นเมืองไทย
ของ
วีรชัย สิงห์ทอง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์	คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์
.....ประธาน	.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย)	(ดร.วินัย อวงพิพัฒน์)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ดร. นวลละออ รัตนวิมานวงศ์)	(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย)
	.....กรรมการ
	(ดร. นวลละออ รัตนวิมานวงศ์)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ กูโน)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ และความช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากคณาจารย์ในภาควิชาเคมีหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และ ดร. นวลละออ รัตนวิมานวงศ์ คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาชี้แนะตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการแก้ปัญหาในระหว่างการทำงานวิจัยทุกขั้นตอนรวมทั้งการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ กูโน ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ณ โอกาสนี้ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร รวมถึงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิญญา ชัยวิสุทธิธางกูล อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ในภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเอาใจใส่ต่อผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความกรุณาของทุก ๆ ท่านเป็นอย่างยิ่ง

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย รวมทั้งผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วีรชัย สิงห์ทอง

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของงานวิจัย	3
	ความสำคัญของงานวิจัย	3
	ขอบเขตของงานวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	สารไบโอจีนิกเอมีน	5
	การเกิดสารฮีสตามีน สารพิวเทรสซีน และสารคาร์ดาเวรีน	6
	ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดไบโอจีนิกเอมีน	10
	สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส	11
	การควบคุมปริมาณสารฮีสตามีนและสารไบโอจีนิกเอมีน	14
	ไส้กรอกและไส้กรอกพื้นเมือง	16
	ส่วนผสมหลักของไส้กรอก	21
	การสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการและการเน่าเสีย	22
	บทบาทของสารไบโอจีนิกเอมีนต่อลักษณะทางกายภาพและชีวภาพ	28
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาปริมาณ สารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน	37
3	**วิธีดำเนินงานวิจัย**	55
	อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	55
	วิธีดำเนินการวิจัย	56
	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	56
	การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์	60
	ศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมือง	62
	การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิคแผ่นบางโครมาโทกราฟี (TLC)	64
4	**ผลการทดลอง**	66
	ตอนที่ 1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนพร้อมกันด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	67

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 (ต่อ)

1.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ 67

1.2 ผลการศึกษา pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์.....68

1.3 การศึกษาหาอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์.....70

1.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 74

1.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน.....77

1.6 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดปริมาณ.....79

ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ 80

2.1 ผลการศึกษากรดอะมิโนฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน.....80

2.2 รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมคลอไรด์.....82

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทย 85

3.1 ปริมาณสารฮีสตามีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ.....86

3.2 ปริมาณสารพิวเทรสซีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ.....89

3.3 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ.....92

ตอนที่ 4 การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิค ..... แผ่นบางโครมาโทกราฟี (TLC).....100

5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....103

บรรณานุกรม 107

ภาคผนวก 119

ประวัติย่อของผู้วิจัย.....125

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

ชนิดของกรดอะมิโนที่เกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีน....7
เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์....8
กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนเนื่อสัตว์ (กรัม/100กรัม)....16
ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่พบในไส้กรอกแห้ง....26
ไบโอจีนิกเอมีนที่เป็นดัชนีชี้วัดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์....25
จุลินทรีย์ที่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์....26
ปริมาณสารฮีสตามีนในอาหารชนิดต่าง ๆ....31
ปริมาณสารพิวเทรสซีนในอาหารชนิดต่าง ๆ....35
ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในอาหารชนิดต่าง ๆ....36
ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่รับเข้าสู่ร่างกายในหนึ่งวัน....36
ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง....38
สารตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปเดี่ยว....40
สารตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปคู่....41
ค่า R_f ของสารไบโอจีนิกเอมีนที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค TLC....41
ค่า R_f และสีของสารอนุพันธ์แดนซิลคลอไรด์....43
วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างอาหาร....46
วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารด้วยแผ่นบางโครมาโทกราฟี....65
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชัน....70
สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน....76
เวลารีเทนชัน สมการเส้นตรง และ R^2 ของสารมาตรฐาน....79
ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ....79
เวลารีเทนชันของกรดอะมิโน....81
ปริมาณมากสุดของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนที่สกัดด้วยตัว ทำละลายชนิดต่างๆ....95
ปริมาณสารฮีสตามีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำสกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) 97
ปริมาณสารฮีสตามีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำสกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) 98

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

26 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำสกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5)....99

27 ร้อยละการคืนกลับ (recovery%) ของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในตัวอย่างไส้กรอกที่สกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5)....100

28 ค่า R_f ในการแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิค TLC....102

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ปฏิกิริยาการเกิดฮีสตามีน พิวเทรสซีน และดาร์ดาเวรีน 10
2 การย่อยสลายสารฮีสตามีน.....30
3 กระบวนการสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนในร่างกาย.....34
4 ปฏิกิริยาระหว่างแดนซิลคลอไรด์กับเอมีน.....40
5 TLC Plate ในการแยกสารไบโอจีนิกเอมีน.....42
6 ปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นระหว่างออร์โท – พทาลไดอัลดีไฮด์ (OPA) กับสาร ไบโอจีนิกเอมีนและ 2 – เมอร์แคปโตเอทานอล (RSH) 51
7 ปฏิกิริยาระหว่างฮีสตามีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์/2-เมอร์แคปโตเอทานอล.....52
8 สเปกตรัมการวาวแสงของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน.....65
9 ผลของ pH แอซิเตตบัฟเฟอร์ต่อการแยกสารอนุพันธ์.....65
10 โครมาโทแกรมจากผลการทดลองศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ 68
11 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชัน.....71
12 โครมาโทแกรมการแยกอนุพันธ์ของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน.....73
13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีกกับช่วงความเข้มข้น.....74
14 โครงสร้างของกรดอะมิโนออร์นิทีน ฮีสติดีน และไลซีน.....77
15 โครมาโทแกรมการที่ได้จากการแยกอนุพันธุ์ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน.....78
16 ผลของความเข้มข้นของกรดไฮโรคลอริกต่อความเข้มแสง.....80
17 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อความเข้มแสง.....80
18 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความเข้มแสง 81
19 ปริมาณสารฮีสตามีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ.....83
20 ปริมาณสารพิวเทรสซีนในตัวอย่างไส้กรอก ไส้อั่ว และหม่ำ.....86
21 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอก ไส้อั่ว และหม่ำ.....89
22 ปฏิกิริยาระหว่างนินไฮดรินกับกรดอะมิโนหรือเอมีน 97
23 การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิค TLC.....97
24 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ความเข้มข้น 40 ppm.....117
25 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการ spike ตัวอย่างไส้กรอกด้วยสารละลาย มาตรฐาน 40 ppm.....117
26 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการ spike ตัวอย่างไส้อั่วด้วยสารละลาย มาตรฐาน 40 ppm.....118

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

27 ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการ spike ตัวอย่างหม่ำด้วยสารละลายมาตรฐาน 40 ppm....118

28 เครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ใช้ในการให้ความร้อนในการเตรียมอนุพันธ์....120

29 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองสารมาตรฐานและสารตัวอย่างก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง....120

30 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง....121

31 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน....121

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

สารไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amines; BAs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง มีน้ำหมักโมเลกุลต่ำ มีคุณสมบัติเป็นเบส ซึ่งสารไบโอจีนิกเอมีนนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตดังนั้นจึงสามารถที่จะพบสารเอมีนได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์(Stute. 2002: 101); (Shalaby. 1996: 675); (Cinquina; et al. 2004: 79); (DR. Claudia Ruiz-Capillas; & Francisco Jiménez-Colmenero. 2004: 489) ซึ่งโครงสร้างของสารไบโอจีนิกเอมีนสามารถแบ่งออกได้เป็นอะลิฟาติกเอมีน (aliphatic amine) อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) และเฮเทอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) (Molins-Legua; & Campins-FalcÓ. 2005: 206)

ในอาหารชนิดต่าง ๆ นั้นมีการปนปื้อนของสารไบโอจีนิกเอมีนเนื่องจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนที่เร่งโดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) ดังนั้นกรดอะมิโนฮีสติดีน (histidine) ไทโรซีน (tyrosine) ทริปโตเฟน (tryptophane) และฟีนิลลามีน (phenylamine) จะเกิดเป็นสารมอนอเอมีน (mono amine) ได้แก่ ฮีสตามีน (histamine) ไทรามีน (tyramine) ทริปตามีน (tryptamine) และ 2-ฟีนิลเอทิลลามีน (2-phenylethylamine) ตามลำดับ ส่วนสารไดเอมีน เช่น พิวเทรสซีน (putrescine) และคาร์ดาเวรีน (cadaverine) นั้นเกิดจากกรดอะมิโนออร์นิทีน (ornithine) และ ไลซีน (lysine) ตามลำดับ สำหรับสารพิวเทรสซีนนั้นเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารพอลิเอมีน ได้แก่ สเปอร์มิดีน (spermidine) และสเปอร์มีน (spermine)

ไส้กรอกเป็นอาหารประเภทหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลาย โดยกระบวนการผลิตไส้กรอกนั้นอาจมีความแตกต่างกันในเรื่องของวัตถุดิบ(Smith; & Hui. 2004: 49) สำหรับไส้กรอกบางชนิดอาจมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักเรียกว่าไส้กรอกหมัก การผลิตไส้กรอกพื้นเมืองของไทยก็มีความแตกต่างกันทั้งส่วนผสมและกระบวนการผลิต โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ในแถบภาคอีสานของไทยมีไส้กรอกพื้นเมืองที่รู้จักทั่วไป 2 ประเภท คือ หม่ำและไส้กรอกอีสาน ส่วนภาคเหนือมีไส้กรอกพื้นเมืองที่รู้จักกันดีในชื่อ ไส้อั่ว เป็นต้น (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 67-68) ในไส้กรอกหมักจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นานาชนิดในชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดจะทำให้อาหารมีความเป็นกรด นอกจากนี้ในกระบวนการหมักไส้กรอกจะเกิดกระบวนการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic) และปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันทำให้เกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งในปัจจุบันการผลิตไส้กรอกมีจุดมุ่งหมายเพื่อจำหน่าย ทำให้กระบวนการผลิตมีการใช้สารเติมแต่งอาหารมากขึ้น เช่น การใส่

สารเติมแต่ง สารกันบูดจะเป็นสารหนึ่งที่ได้รับความนิยมเติมลงในผลิตภัณฑ์ สารเติมแต่งเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถเก็บรักษาไส้กรอกได้นานขึ้น นอกจากนี้อาจมีการเติมสีผสมอาหารลงไป เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน่าบริโภค เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามอาหารที่เหมาะแก่การบริโภคต้องมีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือความเป็นพิษใดๆ (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 113-115) สำหรับไส้กรอกพื้นบ้านเป็นอาหารที่อาศัยการหมักเนื้อสัตว์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ทั้งที่อยู่ในอาหารเองหรือเติมลงไปเพื่อให้อาหารหลังกระบวนการหมัก มีความพิเศษและมีลักษณะเฉพาะหลาย ๆ อย่างทั้งกลิ่น รสชาติ และสีสัน (Smith; & Hui. 2004: 399-402)

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารมีที่มาจากหลายสาเหตุ เช่น เนื้อสัตว์ เครื่องปรุงรส สภาวะแวดล้อมโดยรอบ และภาชนะบรรจุ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารจะใช้คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบในอาหารมาใช้ในการดำรงชีวิตซึ่งเป็นเหตุทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ มีคุณค่าทางโภชนาการลดลง นอกจากนี้ยังเกิดสี กลิ่น และรสชาติที่ผิดปกติและไม่เป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภค (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549: 33); (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 5) ปฏิกิริยาชนิดหนึ่งที่สามารถเกิดในอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ คือ ปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation reaction) สาเหตุการเกิดของปฏิกิริยานี้คือจุลินทรีย์ในอาหารผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase enzyme) ออกมาเพื่อย่อยสลายกรดอะมิโนในอาหาร เช่น กรดอะมิโนฮีสติดีน (histidine) กรดอะมิโนออร์นิทีน (ornithine) กรดอะมิโนไลซีน (lysine) เป็นต้น ทำให้มีการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์แล้วเกิดเป็นสารประกอบเอมีนที่ทำให้อาหารมีกลิ่นเหม็น นอกจากนี้ยังสามารถเกิดเป็นสารที่มีกลิ่นเหม็นอื่นๆ เช่น ฟีนอล (phenol) อินโดล (indole) เมอร์แคพแทน (mercaptan) แอมโมเนียและไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 26-27)

การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนไบโอจีนิกเอมีนปริมาณมากเกินพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฮีสตามีนและไทรามีนจะส่งผลทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ได้แก่ คลื่นไส้ เกิดความผิดปกติที่ระบบทางเดินหายใจ อัตราการเต้นของหัวใจเร็วไม่สม่ำเสมอ ปวดศรีษะ ความดันเลือดสูงหรือต่ำเกินไป ไมเกรน รู้สึกปวดแสบปวดร้อนและคันโดยเฉพาะที่บริเวณฝ่ามือ หน้า หนังศรีษะ และตา ผิวแดงแผ่ไปทั่วลำคอ เกิดอาการบวมและผื่นลมพิษบนผิวหนัง ปวดท้อง มีการหลั่งกรดอย่างมากในกระเพาะอาหาร เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดเล็กทำให้หน้าแดง (ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. 2537: 265); (นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์.“ม.ป.ป.”: 17) หากอาการดังกล่าวเกิดจากการรับประทานอาหารจะเรียกว่า อาหารเป็นพิษ ส่วนสารพอลิเอมีน เช่น พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนมีความสำคัญต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ กระบวนการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อ และสารพอลิเอมีนยังสามารถพัฒนาไปเป็นสารก่อมะเร็งสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนแม้ว่าจะไม่แสดงความเป็นพิษที่รุนแรงเท่าฮีสตามีนแต่สารทั้งสองนี้

จะทำหน้าที่ในการเสริมความเป็นพิษของสารฮีสตามีนโดยสามารถเกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase) และแทรกแซงกลไกการขับสารฮีสตามีนออกจากร่างกาย (Ladero.“n.d.” 10-13) นอกจากนี้พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนคือสารที่ใช้เป็นดรรชนีบ่งบอกความสดใหม่ของเนื้อสัตว์ เนื่องจากความเข้มข้นของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเนื้อสัตว์เกิดการเน่าเสียและยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549: 97-98); (Shalaby. 1996: 683)

ดังนั้นไส้กรอกที่ไม่ได้มาตรฐานและเสื่อมคุณภาพจากการเน่าเสียพบว่ามีลักษณะทางกายภาพและทางเคมีที่เปลี่ยนไป เช่น มีสีเขียวเกิดขึ้น มีกลิ่นเหม็นจากสารเคมีต่างๆ มีรสขมหรือเปรี้ยวมาก เป็นต้น ทั้งหมดนี้เป็นลักษณะที่ไม่เหมาะแก่การบริโภคทั้งสิ้น เพราะสามารถที่จะเกิดอันตรายต่อร่างกายของผู้บริโภคได้ แม้ว่าร่างกายมีกลไกที่สามารถขับสารไบโอจีนิกเอมีนออกจากร่างกายแต่โอกาสที่จะเกิดการสะสมในร่างกายก็มีมาก เช่น การได้รับสารนี้เป็นระยะเวลานานติดต่อกันซ้ำๆ การสะสมของสารไบโอจีนิกเอมีนในร่างกายนี้สามารถที่จะก่อให้เกิดเป็นสารก่อมะเร็งได้ โดยงานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองของไทยโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และจะศึกษาวิธีการทางคุณภาพวิเคราะห์เพื่อจะได้ตรวจสอบสารประเภทเอมีนได้รวดเร็ว

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและปัจจัยที่กระทบต่อวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองของไทยที่เหมาะสมเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน
3. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารแบบคุณภาพวิเคราะห์

ความสำคัญของงานวิจัย

1. สามารถแยกและวิเคราะห์สารไบโอจีนิกเอมีน ทั้ง 3 ชนิด คือ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนพร้อมกัน
2. ทราบถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อเทคนิคที่ทำการวิเคราะห์
3. ทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง
4. ทราบเทคนิคในการตรวจสอบสารไบโอจีนิกเอมีนทางคุณภาพวิเคราะห์

ขอบเขตของงานวิจัย

1. สภาวะที่ศึกษาในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด คือ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่
   1.1 ช่วง pH ของบัฟเฟอร์
   1.2 อัตราส่วนของบัฟเฟอร์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์
   1.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
2. การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ ได้แก่
   2.1 กรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน
   2.2 รีเอเจนต์ที่ใช้ทดลอง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมคลอไรด์
3. ศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมือง ได้แก่
   3.1 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ศึกษาในการสกัด ได้แก่
   กรดไฮโดรคลอริก กรดไตรคลอโรแอซิติก กรดเปอร์คลอริก
   บอเรตบัฟเฟอร์ เมทานอล เอทานอล
   3.2 วิธีการสกัดสาร ได้แก่
   ทางเคมี เช่น การสกัดด้วยกรด บัฟเฟอร์ และตัวทำละลายอินทรีย์
   ทางกายภาพ เช่น การใช้เครื่องเขย่า การใช้เครื่องโซนิเคเตอร์
   3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการดำเนินการข้อ 3.2
4. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองของไทย ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน ผลิตภัณฑ์หม่ำ ผลิตภัณฑ์ไส้อั่ว
5. วิธีการตรวจสอบฮีสตามีน พิวเทรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ทางคุณภาพวิเคราะห์ใช้วิธีแบบแผ่นบางโครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด ได้แก่ สารฮีสตามีน สารพิวเทรสซีน และสารคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองของไทย ผู้วิจัยจะได้นำเสนอตามหัวข้อต่าง ๆ เป็นลำดับ

1. สารไบโอจีนิกเอมีน
2. การเกิดสารฮีสตามีน สารพิวเทรสซีน และสารคาร์ดาเวรีน
3. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดไบโอจีนิกเอมีน
4. สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส
5. การควบคุมปริมาณสารฮีสตามีนและสารไบโอจีนิกเอมีน
6. ไส้กรอกและไส้กรอกพื้นเมือง
7. การสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการและการเน่าเสีย
8. บทบาทของสารไบโอจีนิกเอมีนต่อลักษณะทางกายภาพและชีวภาพ
9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาปริมาณ สารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

สารไบโอจีนิกเอมีน

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic Amines; BAs) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สารนี้เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน หรือปฏิกิริยาเอมิเนชันและปฏิกิริยาทรานเอมิเนชันของอัลดีไฮด์และคีโตน มีโครงสร้างแบบอะลิฟาติก อะโรมาติก และโครงสร้างแบบเฮเทอโรไซคลิก (Silla M.H. Santos. 1996. 213) ไบโอจีนิกเอมีนสามารถเกิดได้ในระหว่างกระบวนการเมทาบอไลต์ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงสามารถพบสารไบโอจีนิกเอมีนในเซลล์ของพืชและสัตว์ และจุลินทรีย์ (De Mey; et al. 2012: 1017); (Shalaby. 1996: 675); (Molins-Legua; & Campins-FalcÓ. 2005: 206); (T. Saeed; et al. 2011: 756) สารไบโอจีนิกเอมีนบางประเภทที่สามารตรวจพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เช่น ไทรามีน ฮีสตามีน ทริปตามีน เบตา-ฟีนิล-เอทิลลามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มิดีน และสเปอร์มีน (J. Ekaterini. 2011: 1126)

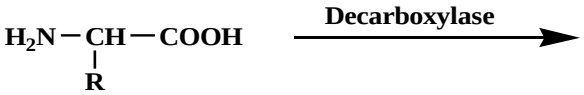
สารเอมีนเหล่านี้พบได้ตามธรรมชาติทั้งในเซลล์พืชและสัตว์รวมทั้งจุลินทรีย์เป็นแหล่งของไนโตรเจนในการสังเคราะห์ฮอร์โมน อัลคาลอยด์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (Bover-Cid; Izquierdo-Pulido; & Vidal-Carou. 2001: 215) สารเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อร่างกายมนุษย์ เช่น อุณหภูมิร่างกาย การควบคุมความดันเลือด ควบคุมการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร โดยเฉพาะสารไทรามีนและฮีสตามีนเป็นฮอร์โมนในร่างกายมนุษย์และสัตว์ การตอบสนองต่อการเกิดภูมิแพ้ อาการบวม และอักเสบเป็นต้น ส่านสารพิวเทรสซีนและสารคาร์ดาเวรีนมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเรียกว่าเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Ladero. “n.d.”; 11-12) และเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์จึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ มีผลต่อความคงสภาพของเซลล์เมมเบรน (Alain Bouchereau; et al. 2000. 49) (De Robertis; et al. 1998: 185-186) ความน่าสนใจของสารพอลิเอมีนทั้งที่เกิดเองในร่างกายและได้รับจากการรับประทานอาหาร พบว่าสามารถทำให้เกิดการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของทั้งเซลล์และเนื้อเยื่อ เช่น เกิดอาการบวม หรืออักเสบ (Sadain; & Koropchak. 1999: 111) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการควบคุมปริมาณสารพอลิเอมีนในอาหารผู้ป่วยมะเร็งเป็นเรื่องที่มีความสำคัญมาก (Ke-Jing Huang; et al. 2009: 6636)

สารไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนที่เร่งด้วยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น อย่างไรก็ตามการเกิดอันตรายต่อร่างกายจะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสารไบโอจีนิกเอมีนเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่องจนเกิดการสะสมในร่างกายเป็นปริมาณมาก เช่น การรับประทานอาหารและเครื่องดื่มซึ่งเป็นแหล่งสะสมของสาร ไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ปลา ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลา ไวน์ เบียร์ และไส้กรอก เป็นต้น (De Mey; et al. 2012: 1017) สารไบโอจีนิกเอมีนที่มักพบในอาหาร ได้แก่ ฮีสตามีน ไทรามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน และฟีนิลเอทิลลามีน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน ไทโรซีน ออร์นิทีน ไลซีน และฟีนิลเอทิลลามีน ตามลำดับ ทั้งชนิดและปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดในอาหารนอกจากเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้ว ปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ก็ส่งผลต่อปริมาณสารไบโอจีนิกเอ มีนเช่นกัน ได้แก่ ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน pH ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (water activity; a_W) ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ วิตามิน ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร เป็นต้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549: 46-48)

การเกิดสารฮีสตามีน สารพิวเทรสซีน และสารคาร์ดาเวรีน

การเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักเนื่องจากจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนและสร้างเอนไซม์ย่อยสลายกรดอะมิโนอิสระด้วยปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันแล้วกำจัดหมู่

คาร์บอนิลออกจากโครงสร้างของกรดอะมิโนเกิดเป็นสารเอมีนขึ้น (Sadain; & Koropchak. 1999: 111); (Proestos; Loukatos; & Komaitis. 2008. 1218); (Santos. 1996: 216-217) ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่มีโครงสร้างทั้งที่เป็นโครงสร้างแบบ อะลิฟาติก เช่น พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน โครงสร้างแบบอะโรมาติก เช่น ไทรามีน และโครงสร้างแบบเฮเทอโรไซคลิกเช่น ฮีสตามีน (Molins-Legua; & Campins-Falcó. 2005: 206) ดังสมการ 1



(1)

กรดอะมิโน เอมีน

โดยทั่วไปชื่อของสารไบโอจีนิกเอมีนขึ้นอยู่กับชื่อของกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นของสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดนั้น ๆ เช่น ฮีสตามีนเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน พิวเทรสซีนเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนออร์นิทีนหรืออาร์จีนีน และคาร์ดาเวรีนเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันกรดอะมิโนไลซีน เป็นต้น (Shukla et al. 2010: 1191-1192) และกรดอะมิโนที่เกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดต่าง ๆ แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ชนิดของกรดอะมิโนที่เกิดเป็นสารไบโอจีนิกเอมีน

กรดอะมิโน	ไบโอจีนิกเอมีน
ฮีสติดีน	ฮีสตามีน
ไทโรซีน	ไทรามีน
ไฮดรอกซีทริปโตเฟน	เซโรโทนิน
ทริปโตเฟน	ทริปตรมีน
ไลซีน	คาร์ดาเวรีน
ออร์นิทีน	พิวเทรสซีน
อาร์จีนีน	สเปอร์มีน
อาร์จีนีน	สเปอร์มิดีน
ฟีนิลอะลานีน	เบตา-ฟีนิลเอทิลลามีน

ที่มา: Santos M.H. Silla. (1996). *Biogenic Amines: Their Importance in Foods*. p. 214.

ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่เกิดในระบบชีววิทยาเนื่องจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ สารไบโอจีนิกเอมีนบางชนิดจะมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับร่างกายมนุษย์ตามธรรมชาติอยู่แล้ว แต่ปริมาณที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายและมีความเป็นพิษเฉพาะตัวแตกต่างกันออกไป (Custódio; Tavares; & Glória. 2007: 280) โดยที่กระบวนการรักษาและยาที่ใช้ในการรักษาแตกต่างกันออกไปตามอาการ เช่น การใช้ยาต้านฮีสตามีน เป็นต้น

สารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดในอาหารนั้นเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนาเนื่องจากทำให้เกิดการสูญเสียกรดอะมิโนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย อาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสหรือเกิดจากการเติมจุลินทรีย์ที่เรียกว่า เชื้อนำ (culture starter) ลงไปในอาหารเพื่อให้เกิดการหมัก ประกอบกับสภาวะมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส รวมทั้งสภาวะที่เหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน (Custódio; Tavares; & Glória. 2007: 280)

ดีคาร์บอกซิเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างจากจุลินทรีย์นานาชนิดที่มีในอาหารหรือมาจากการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิตแปรรูปอาหาร ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในอาหารทั่วไปตามแสดงในตาราง 2 เช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Photobacterium* และที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae *เช่น Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* และ *Shigella* ในวงศ์ Micrococcaceae เช่น *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Kocuria*. และแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่พบคือ *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* และ *Leuconostoc* (Cinquina; et al. 2004: 79); (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 8-9); (Ekici; et al. 2004: 123) เหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสได้หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักเนื้อสัตว์และการเพิ่มปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนในอาหาร

ตาราง 2 เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์

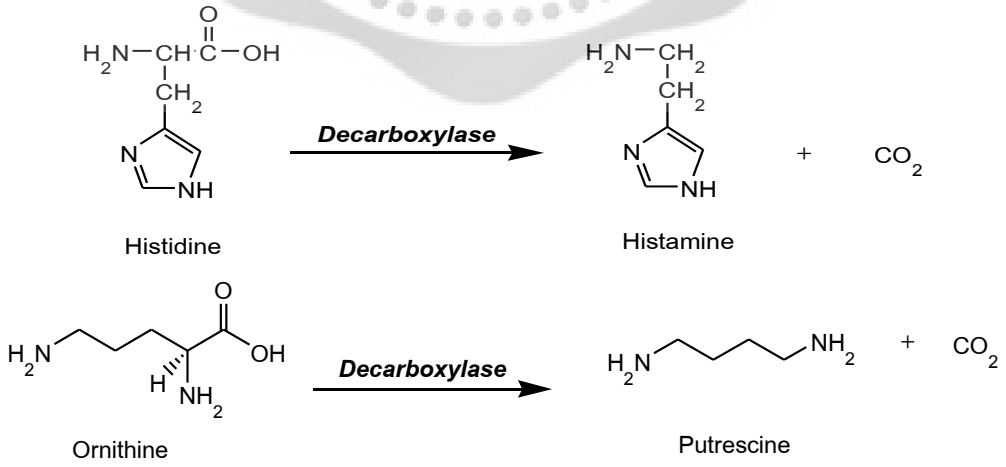
อาหาร	ไบโอจีนิกเอมีน	เชื้อจุลินทรีย์
เนื้อสัตว์	ฮีสตามีน	*Enterobacteriaceae, Stphylococcus capitis*
	ไทรามีน	*Staphylococccus carnosus, Staphylococccus xylosus, Staphylococccus epidermidis, Staphylococccus saprophyticus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus*

ตาราง 2 (ต่อ)

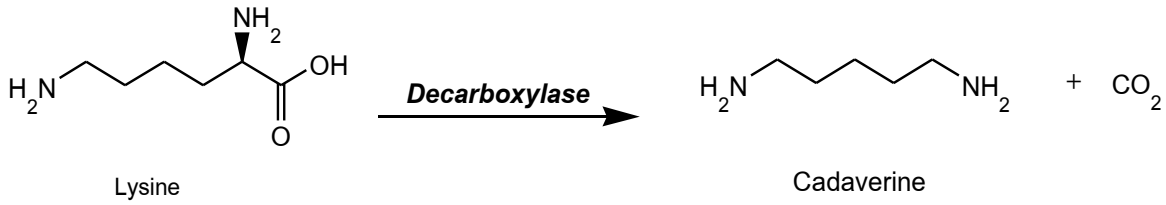
อาหาร	ไบโอจีนิกเอมีน	เชื้อจุลินทรีย์
เนื้อสัตว์	ไทรามีน	*sakei, Lactobacillus bavaricus,Carnobacterium divergens, Carnobacterium pisicola*
	พิวเทรสซีน	*Enterobacteriaceae, M. morganii, S. liquefaciens, Pseudomonas, Lb. curvatus, Enterococcus*
	คาร์ดาเวรีน	*Enterobacteriaceae*

ที่มา: L. Victor; et al. (n.d.). *Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines*. p. 9.

ในอาหารที่มีกรดอะมิโนฮีสติดีน ไทโรซีน ทริปโตเฟน และฟีนิลอะลานีน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารมอนอเอมีน คือ ฮีสตามีน ไทรามีน ทริปตามีน และ 2-ฟีนิลเอทิลลามีน ตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโนออร์นิทีนและไลซีนจะเกิดเป็นสารไดเอมีน คือ พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนตามลำดับ (Santos M.H. Silla.1996: 223.) นอกจากนี้สารพิวเทรสซีนสามารถจะเกิดเป็นสารพอลิเอมีน คือ สเปอร์มิดีนและสเปอร์มีน (spermidine and spermine) ปฏิกิริยาการเกิดสาร ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน แสดงดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ปฏิกิริยาการเกิดฮีสตามีน พิวเทรสซีน และดาร์ดาเวรีน



ภาพประกอบ 1 (ต่อ) ปฏิกิริยาการเกิดฮีสตามีน พิวเทรสซีน และดาร์ดาเวรีน

สารฮีสตามีนนั้นแสดงความเป็นพิษต่อร่างกายหลายประการ ในขณะเดียวกันสารไบโอ จีนิกเอมีนบางตัวจะเสริมความเป็นพิษของสารฮีสตามีน ปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหารประเภทไส้กรอกนั้นเนื่องจากการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ มีกระบวนการเตรียมวัตถุดิบที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นสารไบโอจีนิกเอมีนจึงเป็นสารที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของวัตถุดิบและการเน่าเสียของอาหาร อันตรายร้ายแรงประการหนึ่งที่เกิดจากสารไบโอจีนิกเอมีน คือ สามารถเกิดเป็นสารก่อมะเร็งหลังจากที่เกิดปฏิกิริยากับสารประกอบไนไตรต์

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดไบโอจีนิกเอมีน

ปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนขึ้นอยู่กับระดับของกรดอะมิโนอิสระที่มีอยู่ในอาหารนั้น ๆ และขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส และเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้สภาวะต่าง ๆ ยังส่งผลต่อการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน เช่น การเก็บรักษาอาหารเป็นระยะเวลานานภายใต้อุณหภูมิสูงจะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตและสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ pH เกลือ ปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม และจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย

จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสนั้นเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติอยู่แล้วไม่ว่าจะอยู่ตามผิวหนังของคนและสัตว์ เหงือกปลา และเครื่องในของสัตว์ และจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในอาหารที่มีปริมาณมากจะสร้างเอนไซม์อย่างรวดเร็วและย่อยสลายกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ สภาวะที่ส่งผลต่อปริมาณสารไบโอจีนิกอมีนในอาหาร สรุปได้ดังนี้ คือ

- ชนิดของอาหารที่มีปริมาณกรดอะมิโน และสารอาหารชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ วิตามิน เป็นต้น
- สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

- สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส
- ระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหาร
- อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร
- pH
- ปริมาณเกลือ
- ปริมาณออกซิเจน
- ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (water activity; a_W)

สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส

1. ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิส่งผลต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนในการแปรรูปปลาและชีส และพบว่าอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเก็บรักษาเนื่องจากอุณหภูมิส่งผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในไส้กรอก เช่น การเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ การสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสและเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส การหมักไส้กรอกภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 24 ^{O}C พบว่าแลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและทำให้กลิ่นและรสชาติของอาหารเปลี่ยนแปลง ในขณะที่การหมักภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 4 ^{O}C จะเกิดสารพิวเทรสซีน แต่การเก็บรักษาไส้กรอกที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ตรวจพบสารไบโอจีนิกเอมีนปริมาณน้อย

อุณหภูมิในการเก็บรักษานั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการถนอมอาหารหมักให้เก็บได้นาน (ธนาวุธ จารุทัศน์; และคนอื่นๆ. 2522: 83-111) การสะสมของสารไบโอจีนิกเอมีนจะเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำเนื่องจากเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนอยู่ระหว่าง 20-37°C อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาจจะส่งผลต่อปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในอาหารแต่ไม่สามารถที่จะส่งผลต่อปริมาณสารไทรามีนที่เกิดขึ้น ปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีจะลดลงเมื่อเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 °C หรือมากกว่า 40 °C

สารฮีสตามีนจะเกิดช้ามากเมื่อเก็บรักษาอาหารที่ 10 °C เนื่องจากจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสเจริญเติบโตช้าที่อุณหภูมิต่ำซึ่ง *Morganella morganii* มีความสามารถในการสังเคราะห์ฮีสตามีนในอาหารทะเลแม้ว่าจะเก็บรักษาอาหารทะเลที่อุณหภูมิสูง

กว่า 7-10 ºC ปริมาณสารฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหารเพิ่มขึ้น สำหรับอาหารที่มีการแช่แข็ง เช่น ปลาแช่แข็งแบคทีเรีย *psychrotolerant* สามารถทำงานและก่อให้เกิดสารเอมีนสะสมในอัตราสูงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 ºC เมื่อเก็บรักษาอาหารเป็นระยะเวลานาน *Photobacterium phosphoreum* และ *Morganella psychrotolerans* จะทำให้อาหารเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนได้ง่าย เช่น ไทรามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเหตุนี้ควรเก็บรักษาอาหารภายใต้อุณหภูมิต่ำเพื่อลดการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสโดยจุลินทรีย์

การสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนโดย *Enterobacter cloacae* พบได้หลังจากที่เก็บรักษาอาหารนาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20 °C แต่กลับพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 °C ไม่สามารถตรวจพบพิวเทรสซีน ส่วนการสังเคราะห์คาร์ดาเวรีนโดย *Klebsiella pneumoniae* พบว่าสามารถที่จะตรวจพบคาร์ดาเวรีนในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิ 10 °C เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 20 °C

2. ผลของ pH

pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส โดย pH จะส่งผลต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนสองประการ ได้แก่ การส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เนื่องจาก pH ที่เป็นกรดจะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งส่งผลต่อการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่เพิ่มขึ้นกับค่า pH ที่ลดลงของไส้กรอกนั้นเป็นผลที่เกิดจากกรดแลกติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก แต่อย่างไรก็ตามสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสด้วย

3. ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์

โซเดียมคลอไรด์มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน การยับยั้งเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสที่สร้างขึ้นโดย *Staphylococcus capitis, Enterobacter cloacae* และ *Pantoea agglomerans* ทำได้โดยการเติมเกลือลงไปในอาหาร ในทางกลับกันโซเดียมคลอไรด์จะปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสที่สร้างจาก *Staphylococcus* spp. ดังนั้นสามารถที่จะยืนยันได้ว่าโซเดียมคลอไรด์จะส่งผลได้ทั้งการยับยั้งและกระตุ้นการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีน

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำในอาหารและอัตราส่วนระหว่างเกลือ/น้ำในระหว่างกระบวนการหมักและการเก็บรักษาไส้กรอกนั้นมีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และ

อัตราการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีน ซึ่งในการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือจะยับยั้งการเกิดสารฮีสตามีน เนื่องจากเกลือเข้มข้นลดอัตราการแบ่งเซลล์รวมทั้งรบกวนการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสของจุลินทรีย์

4. ปริมาณออกซิเจน

ปริมาณออกซิเจนจะส่งผลต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนโดย *Enterobacter cloacae* สามารถสร้างสารพิวเทรสซีนได้ในปริมาณมากภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจนและ *Klebsiella pneumoniaem* สามารถสังเคราะห์คาร์ดาเวรีนได้ในปริมาณเล็กน้อยแต่สามารถสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนได้มากกว่าภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสจะหยุดทำงานหรือถูกทำลายเมื่อมีออกซิเจนอยู่ ในทางกลับกันออกซิเจนจะส่งผลเล็กน้อยต่อการสังเคราะห์ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน และพิวเทรสซีนด้วย *Lactobacillus curvatus*

5. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไส้กรอกและรีดอกโพเทนเชียล (redox potential)

ไส้กรอกที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแตกต่างกันส่งให้มีแอนแอโรไบโอซิส (anaerobiosis), ศักย์รีดอกซ์ (redox potential), ค่าความเข้มข้นของเกลือ (salt concentration) และค่า a_w ที่แตกต่างกันด้วย พบว่าปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในไส้กรอกและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางนั้นมีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไส้กรอกส่งผลต่อสภาวะแวดล้อมที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโต ตัวอย่างเช่นในไส้กรอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากจะมีปริมาณความเข้มข้นของเกลือต่ำและมีค่า a_W สูงและพบว่าในไส้กรกขนาดใหญ่จะมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนมากกว่าไส้กรอกที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้ในแต่ละบริเวณของไส้กรอกยังพบปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น บริเวณขอบและตรงกลางของไส้กรอกจะมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนน้อยเนื่องจากบริเวณนี้เป็นบริเวณที่แห้งส่วนตรงกลางมีปริมาณเกลือมาก แต่ถ้าปริมาณเกลือน้อยตรงกลางจะเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนปริมาณมากเนื่องจากมีค่า a_W สูง

6. สารเติมแต่งในอาหาร

การเติมน้ำตาลลงในไส้กรอกส่งผลต่อปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดขึ้นเนื่องจากทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็วขึ้น แต่การที่ไม่เติมน้ำตาลนั้นจะส่งผลต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนในไส้กรอกระหว่างกระบวนการเก็บรักษาเนื่องจากจุลินทรีย์จะนำเอาสารอาหารอื่น ๆ เช่น กรดอะมิโนมาใช้เป็นแหล่งอาหารจึงทำให้มีสารไทรามีน คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน และทริปตามีนเพิ่มขึ้น ส่วนการเติมโซเดียมซัลไฟด์ที่ระดับความเข้มข้น 500-1000 mg/kg ไม่สามารถลดปริมาณไทรามีนลงได้แต่สามารถลดปริมาณคาร์ดาเวรีนได้ การเติมโซเดียมไนไตรต์ปริมาณความเข้มข้น 150 mg/kg ลงในไส้กรอกสามารทำให้ปริมาณพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนลดลง

7. ปัจจัยด้านอื่น ๆ

ส่วนปัจจัยอื่น ๆ เช่น กรดทาร์ทาร์ริกและปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาล พบว่ากรดทาร์ทาร์ริกมีส่วนทำให้ปริมาณพิวเทรสซีนที่สร้างโดย *L. hilgardii* มีปริมาณเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามน้ำตาลจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส

การควบคุมปริมาณสารฮีสตามีนและสารไบโอจีนิกเอมีน

การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีความสำคัญมากในการควบคุมปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนที่เกิดขึ้นในอาหาร สภาวะที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่งผลต่อการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนดังนั้นปริมาณของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับกระบวนการที่ใช้ในอุตสาหกรรม ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก อุณหภูมิในการเก็บรักษา pH ความเข้มข้นของเกลือ(Papavergou. 2011: 1126-1127); (Ruiz-Capillas et al. 2007: 365-366) และพบว่าสารฮีสตามีนจะมีความเข้มข้นมากขึ้นเมื่อระดับ pH สูงกว่า 3.77 เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนนั้นมีความคงทนในสภาวะกรด โดยที่ pH 4.0 และ 5.5 เป็นสภาวะที่จุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี

การควบคุมปริมาณสารฮีสตามีนและสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ สามารถทำได้โดยการล้างทำความสะอาดเนื้อสัตว์ที่นำมาประกอบอาหาร การทำความสะอาดอุปกรณ์ การเก็บรักษาอาหารด้วยการแช่แข็ง การให้ความร้อนเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส การควบคุม pH และปริมาณเกลือ การเก็บรักษาด้วยการไม่ให้สัมผัสกับอากาศ การฉายรังสี การใช้สารเติมแต่งอาหาร การเลือกใช้เชื้อหมักที่ไม่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสมาในการหมักอาหาร

1. การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง

การแช่แข็งที่อุณหภูมิ 4 °C จะช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส นอกจากนี้จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ยังเจริญเติบโตได้ช้าลงทำให้อาหารไม่เน่าเสีย ส่วนการเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิ -18 °C หรือต่ำกว่านี้จะหยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสที่ทำหน้าที่สร้างสารฮีสตามีนอีกด้วย อาหารหมักที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรือกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์พบว่าการเก็บรักษาอาหารด้วยการแช่แข็งไม่สามารถที่จะป้องกันการเกิดสารฮีสตามีนได้ การทำไส้กรอกที่มีการใช้วัตถุดิบที่มีความสดใหม่และเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพสูงมีการเติมพริกและมีการแช่แข็งพบว่าเป็น

วิธีการที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดสารฮีสตามีนและสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ

2. การให้ความร้อนเพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์

ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่จะเก็บรักษาด้วยการแช่เย็นหรือแช่แข็ง แต่สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทนั้นก็ต้องอาศัยความร้อนในการป้องกันการเกิดสารฮีสตามีนหรือสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งความสำคัญในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารโดยอาศัยความร้อนนั้นจะช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้สามารถเก็บอาหารได้นานขึ้นก่อนที่อาหารนั้นจะเกิดการเน่าเสียและมีปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเพิ่มขึ้นจนทำให้อาหารเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แม้ว่ากระบวนการให้ความร้อนจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส อย่างไรก็ตามฮีสตามีนเป็นสารที่ทนต่อความร้อนถ้าในอาหารมีการปนเปื้อนสารฮีสตามีนการให้ความร้อนจากการประกอบอาหารจะทำลายจุลินทรีย์แต่จะไม่ทำลายสารฮีสตามีน เพราะฉะนั้นการกำจัดสารไบโอจีนิกเอมีนหรือการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นเรื่องที่มีความสำคัญซึ่งกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นจะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสจะเสียสภาพเมื่อมีการให้ความร้อน เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องพบว่าการให้ความร้อนก่อนการเก็บรักษานั้นจะมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นน้อยกว่า อย่างไรก็ตามแม้ว่าความร้อนจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ถ้าจุลินทรีย์นั้นเกิดการปนเปื้อนหลังจากกระบวนการให้ความร้อนก็มีความเป็นไปได้ที่อาหารจะเกิดการปนเปื้อนสารไบโอจีนิกเอมีน ดังนั้นสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ปลารมควัน ควรหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจุลินทรีย์หลังกระบวนการรมควัน

3. ควบคุม pH เกลือ ออกซิเจน และการบรรจุภัณฑ์ให้ปราศจากอากาศ

การใช้สารอินทรีย์ที่เป็นกรดเพื่อทำให้ค่า pH ลดลง การใช้เกลือเพื่อลดค่า a_W และการเก็บรักษาอาหารภายใต้บรรยากาศที่มีแก๊ส CO_2 ปริมาณมากสามารถที่จะจำกัดหรือป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ส่วนการแช่แข็งหรือการตากแห้งการหมักเกลือ ก็สามารถทำได้เพื่อให้อาหารเก็บได้นานขึ้น

4. สารเติมแต่งอาหาร

สารเติมแต่งอาหาร เช่น โพแทสเซียมซอเบต โซเดียมไนเตรต กลูโคโน-เดลตา-แลกโทนหรือไกลซีน เหล่านี้เป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสทำให้ฮีสตามีนในอาหารลดลง อาหารหลายชนิดสามารถลดปริมาณฮีสตามีนลงได้ด้วยการใช้สารเติมแต่งอาหาร เช่น สารกันบูด ผลที่เกิดจากการใช้สารเติมแต่งในอาหารนั้นอาจจะส่งผลต่อสี กลิ่นและรสของอาหารเพียงเล็กน้อย แต่จะอยู่ในเกณฑ์ควบคุมและ

ผู้บริโภคสามารถยอมรับได้และไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้สารเคอร์คูมินนอกจากจะทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แล้วในขณะเดียวกันยังยับยั้งเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสารฮีสตามีน

5. การใช้เชื้อหมักหรือเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้นั้นขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ทรีย์ที่เติมลงไปและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้สภาวะที่มีความเหมาะสมต่อกระบวนการหมักจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีคุณลักษณะเป็นที่น่าพึงพอใจ เช่น กลิ่น สี รสชาติ เนื้อสัมผัส เป็นต้น การเตรียมการหมักและการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิที่มีความเหมาะสมนั้นสามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์รวมทั้งสามารถที่จะยับยั้งเอนไซม์ที่สร้างจากจุลินทรีย์นั้น ๆ ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส ดังนั้นการใช้เชื้อจุลินทรียที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ในทางกลับกันจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสที่ย่อยสลายสารไบโอจีนิกเอมีนได้

ไส้กรอกและไส้กรอกพื้นเมือง

เนื้อและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อเป็นอาหารที่รับประทานกันทั่วโลก การตรวจสอบคุณภาพของเนื้อหมักจึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากจะอธิบายถึงสุขอนามัยระหว่างกระบวนการหมักเนื้อ และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่เกิดขึ้นมีผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์เนื้อที่ได้ การบอกถึงคุณภาพของเนื้อหมักนั้นสัมพันธ์กับความปลอดภัยของเนื้อหมัก กลิ่น และรสชาติของเนื้อหมักซึ่งการบอกคุณภาพทำได้โดยการตรวจปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไปและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่เดิมซึ่งเชื้อนี้จะสร้างกรดแลกติกและทำให้เนื้อหมักมีค่า pH ต่ำลงและมีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวอีกทั้งมีคุณลักษณะต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไป (ธนาวุธ จารุทัศน์; และคนอื่นๆ. 2522: 77-83); (Fernández et al. 2000: 202) เนื้อสัตว์จัดเป็นแหล่งของอาหารที่มีโปรตีนสมบูรณ์ให้กรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการอย่างครบถ้วน แต่มีข้อเสียคือมีกรดไขมันอิ่มตัวและโคเลสเตอรอลสูง โปรตีนที่มีเนื้อสัตว์นั้นมีอยู่ราว 15-50% ดังแสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนเนื่อสัตว์ (กรัม/100กรัม)

กรดอะมิโน	เนื้อหมู	เนื้อวัว	เนื้อไก่
อาร์จีนีน	12.2	13.7	12.8
ซีสทีน	2.6	2.6	2.6
ฮีสติดีน	8.9	7.5	6.2

ตาราง 3 (ต่อ)

กรดอะมิโน	เนื้อหมู	เนื้อวัว	เนื้อไก่
ไลซีน*	19.7	18.5	18.4
เมทไทโอนีน*	5.6	5.5	4.9
ฟีนิลเอทิลลามีน*	7.9	9.1	9.2
ทรีโอนีน*	8.9	9.4	8.5
ทริปโตเฟน*	2.3	2.6	2.3
ไทโรซีน	7.6	7.8	7.2
วารีน*	9.9	10.7	9.8

* กรดอะมิโนจำเป็น

ที่มา : ธนากร ทองประยูร. (2541). *ศึกษาการทำซอสหมักปรุงรสสำหรับเนื้อหมูและเนื้อไก่*

ไส้กรอกเป็นเนื้อหมักประเภทหนึ่งที่รู้จักกันมาเป็นเวลานานหลายปี โดยมีต้นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียนก่อนที่จะแพร่เข้าสู่ยุโรปและอเมริการใต้ ไส้กรอกใช้เนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบหลัก การเตรียมวัตถุดิบสำหรับทำไส้กรอกนั้นจะนำเนื้อสัตว์มาบดให้ละเอียดจากนั้นจึงเติมเกลือ ไนเตรต และ/หรือไนไตรต์ น้ำตาล เชื้อหมัก และสารเติมแต่งอื่น ๆ จากนั้นผสมให้เข้ากันก่อนที่จะนำเนื้อดังกล่าวบรรจุเข้าในไส้หมูหรือไส้เทียม (J. Ekaterini. 2011: 1126) จากนั้นรอให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นจนเสร็จสมบูรณ์และนำไส้กรอกไปทำให้แห้งด้วยการรมควันเพื่อกำจัดความชื้นและทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากระยะเวลาในการเก็บรักษาไส้กรอกให้ได้นานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณเกลือเข้มข้น และมีค่า a_W ต่ำ การกำจัดแก๊ส O_2 เพื่อทำลายแลกติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์กรดแลกติกจากคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ การสร้างกรดแลกติกทำให้มีค่า pH ต่ำลง ทำให้ไส้กรอกมีรสเปรี้ยว ซึ่งไส้กรอกหลังกระบวนการหมักเสร็จสิ้นจะมีค่า pH 4.5 และ 5.5 รวมทั้งโปรตีนในเนื้อสัตว์เกิดการเสียสภาพเนื่องจากเกลือที่เติมลงในไส้กรอกทำให้เกิดลักษณะที่เป็นแผ่นเจลบาง ๆ

กระบวนการหมักไส้กรอกทำให้โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมี ซึ่งมีสาเหตุจากการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในอาหารทำให้ส่งผลต่อความปลอดภัยและคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร คุณลักษณะด้านประสาทสัมผัสเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากการตัดสินใจในการเลือกซื้ออาหารนั้นลำดับแรกผู้บริโภคจะพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏให้เห็น เช่น สี เนื้อสัมผัส และกลิ่น เป็นต้น (J. Ekaterini. 2011: 1126) ซึ่งความต้องการให้ไส้กรอกมีสีที่น่ารับประทานอาจจะต้องมีการเติมพริกลงไปหรืออาจเติมสี

ผสมอาหาร ส่วนกลิ่นของไส้กรอกบ่งบอกถึงสารที่ปนเปื้อนหรือสารที่เกิดในอาหาร เช่น สารที่ระเหยได้หรือเกิดจากการรมควัน นอกจากสารที่ระเหยได้หรือสารเติมแต่งแล้วกลิ่นและรสชาติของไส้กรอกอาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของไขมัน โปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตซึ่งจุลินทรีย์ย่อยสลายสารอาหารเหล่านี้ให้กลายเป็นสารอื่น หรือการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารอาหารเหล่านี้กับสารเติมแต่งอื่น ๆ ที่เติมลงไป (Bover-Cid; et al. 2001: 185-186)

เนื้อและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อจะมีสารไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ไทรามีน คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน สเปอร์มีน และสเปอร์มิดีน ปนเปื้อนอยู่ ซึ่งกระบวนการหมักเนื้อนั้นมีความสำคัญต่อการเกิดสารฮีสตามีนในไส้กรอก สำหรับไส้กรอกกึ่งแห้งนั้นจะหมักในระยะเวลาที่สั้นกว่าไส้กรอกแห้งและกระบวนการหมักไส้กรอกกึ่งแห้งจะมีการเติมเชื้อหมักชนิดที่สร้างกรดแลกติก ในขณะที่ไส้กรอกแห้งจะอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าจะมีสารฮีสตามีนเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่าในระยะเวลา 1-3 วัน ปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนในไส้กรอกหมักมีปริมาณที่แตกต่างกันออกไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ ระยะเวลาในการหมัก ความแตกต่างของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส การทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ชนิดและคุณภาพของเนื้อสัตว์ เช่นเนื้อหมูสดจะมีการปนเปื้อนของสเปอร์มีนและสเปอร์มิดีน รวมทั้งมีสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ ในปริมาณเล็กน้อย และสารไบโอจีนิกเอมีนจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาโดยมีอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญ เช่น ที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C จะมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นมากกว่าที่ 4 ^{O}C ในขณะที่การแช่แข็งเนื้อหมูที่อุณหภูมิ -18 ^{O}C ไม่มีการเพิ่มปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนและสามารถเก็บไว้ได้นาน 9 เดือน (Ali R. Shalaby. 1996: 682.)

ไส้กรอกที่ทำจากเนื้อหมูและเนื้อวัวสามารถที่จะเก็บได้นานเพียงหนึ่งสัปดาห์เท่านั้น หลังจากที่กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ใช้ระยะเวลานานประมาณ 3 วันที่อุณหภูมิ 30ºC ไส้กรอกจะมีความเป็นกรดมีค่า pH ต่ำกว่า 5 รวมทั้งมีน้ำหนักที่หายไปเนื่องจากการรมควันเพื่อทำให้ไส้กรอกแห้ง การยืดระยะเวลาในการเก็บรักษานั้นสามารถทำได้โดยการพาสเจอไรส์หรือการรมควันซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากเนื่องจากทำให้ไส้กรอกมีกลิ่นและรสชาติที่น่ารับประทาน สำหรับการเก็บรักษาไส้กรอกให้ได้นานหนึ่งถึงหลาย ๆ เดือนนั้นสามารถทำได้โดยการเก็บรักษาไส้กรอกไว้ภายใต้อุณหภูมิต่ำประมาณ -20ºC ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดโดยไส้กรอกดังกล่าวไม่จำเป็นต้องผ่านการรมควัน

ไส้กรอกมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ต่าง ๆ เป็นจำนวนมากทำหน้าที่ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ผลิตกรด และย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นกระบวนการซึ่งจะเกิดในระหว่างกระบวนการหมักไส้กรอกทำให้ไส้กรอกเกิดสารไบโอจีนิกเอมีน เช่น ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และ

คาร์ดาเวรีน ในเนื้อสดจะเกิดการปนเปื้อนของสเปอร์มิดีนและสเปอร์มีน ส่วนสารไทรามีน พิวเทรสซีน และ คาร์ดาเวรีน จะเกิดในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ทำให้คุณภาพของเนื้อสัตว์ลดลง (Bover-Cid; et al. 2001: 391-392) เช่น ไทรามีนจะมีปริมาณมากขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของเนื้อสัตว์และจะลดลงด้วยการล้างน้ำเปล่า ส่วนเนื้อหมักเป็นอาหารอีกประเภทหนึ่งที่สามารถตรวจพบสารไบโอจีนิกเอมีน การปนเปื้อนและความไม่เหมาะสมของสภาวะในการเก็บรักษา การเติมเชื้อนำเพื่อประโยชน์ในการหมักก็สามารถทำให้เกิดสารไบโอจีนิกเอมีน (Tasić; et al. 2012: 107-108) สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนจะเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักรวมทั้งกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดไบโอจีนิกเอมีน กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่เกิดขึ้นในเนื้อสัตว์เอง และปฏิกิริยาโปรติโอไลซีสที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนและทำให้ความเป็นกรดของอาหารเพิ่มขึ้น เกิดการสูญเสียน้ำ (ทองใบ เศรษฐีธร. 2537: 70-72) ส่วนเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำไส้กรอกนั้นเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่ทำให้เกิดสารไบโอจีนิกเอมีน อย่างไรก็ตามเนื้อสัตว์ชนิดเดียวกันอาจจะเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณที่แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนและขนาดของไส้กรอก เส้นผ่านศูนย์กลางของไส้กรอก ผลจากสิ่งแวดล้อมที่จุลินทรีย์เจริญเติบโต เช่น ความเข้มข้นของเกลือปกติจะใช้ในปริมาณน้อย และวอเตอร์แอคตีวิตี้ (Water activity; a_w) ไส้กรอกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดสารไบโอจีนิกเอมีน เช่น ไทรามีนและพิวเทรสซีน โดยทั่วไปสารไบโอจีนิกเอมีนจะมีปริมาณมากในไส้กรอกที่มีขนาดใหญ่และด้านในไส้กรอกจะมีสารไบโอจีนิกเอมีนมากกว่าด้านนอก อาหารที่มีโปรตีนและกรดอะมิโนในปริมาณสูงประกอบกับมีสภาวะแวดล้อมที่มีความเหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่างๆ แล้วให้สารผลิตภัณฑ์เป็นไบโอจีนิกเอมีน (Komprda; Sládková; & Dohnal. 2009: 534-535) สารไบโอจีนิกเอมีนนั้นสามารถปนเปื้อนในอาหารนานาชนิดทั้งผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลา เนื้อสัตว์ นม ไวน์ เบียร์ ผักผลไม้ ถั่ว และช็อคโกแลต กรณีที่อาหารมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนเกิดขึ้นในปริมาณมากแสดงให้เห็นว่าอาหารนั้นมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มาก (J. Ekaterini. 2011: 1126)

ไส้กรอก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากการหั่นหรือบดเนื้อสัตว์เติมเกลือ นำเนื้อที่ได้ใส่ในไส้ธรรมชาติหรือไส้เทียม ทำให้ไส้กรอกมีรูปร่างทรงกระบอกคล้ายกับลำไส้ซึ่งเป็นรูปร่างเฉพาะตัวของไส้กรอก ไส้กรอกแบ่งเป็น 5 ประเภท ได้แก่ (ถาวร จันทโชติ; และ วาสนา มู่สา. 2552: 7-11)

1. ไส้กรอกสด (fresh sausage) เป็นไส้กรอกที่ทำมาจากเนื้อสดโดยที่ไม่มีการหมักเพื่อให้เกิดการถนอมอาหารแต่อย่างใด โดยสามารถที่จะเลือกใช้ทั้งหมูหรือเนื้อวัวสดและมีส่วนผสมที่เป็นเนื้อแดงและมีไขมันปนเล็กน้อย วิธีการในการทำไส้กรอกสดคือจะนำเนื้อหมูหรือเนื้อวัวมาบดให้ละเอียดแล้วปรุงรส อาจมีการปรุงรสด้วยเครื่องเทศเพื่อทำให้เกิดรสชาติและกลิ่นใหม่ เช่น พริกไทย หรือผสมพริกสด จากนั้นยัดเข้าไปในไส้หมู ไส้กรอกสดจะไม่มีการรมควัน การเก็บรักษานั้นทำได้โดยการแช่แข็ง ไส้กรอกที่ได้ต้องนำมาผ่านกระบวนการปรุงอาหารก่อนรับประทาน

2. ไส้กรอกดิบรมควัน (uncook smoke sausage) มีลักษณะและส่วนผสมที่ใช้ในการทำเช่นเดียวกับไส้กรอกสด แต่ไส้กรอกชนิดนี้มีการเพิ่มกรรมวิธีในการผลิตที่ต่างจากไส้กรอกสดคือหลังจากผ่านกระบวนการบดเนื้อแล้วจะทำการปรุงรสแล้วจึงยัดใส่ไส้หมูก่อนจะทำการรมควัน

3. ไส้กรอกสุกรมควัน (cooked smoke Sausage) ไส้กรอกชนิดนี้มีการเพิ่มกรรมวิธีในการผลิตที่ต่างจากไส้กรอกสดคือ เมื่อปรุงรสเนื้อบดและยัดใส่ไส้หมูแล้วจะต้องนำไปรมควันจากนั้นนำไปต้มให้สุก

4. ไส้กรอกสุก (cook sausage) เรียกได้ว่าเป็นไส้กรอกที่มีลักษณะกึ่งของแข็งในการเตรียมนั้นสามารถที่จะใช้เนื้อสัตว์มากกว่าหนึ่งชนิด นอกจากนี้ยังสามารถที่จะใช้เนื้อของสัตว์ปีก เช่น เนื้อไก่ ไส้กรอกที่ได้นี้ต้องผ่านกระบวนการทำให้สุกก่อน จากนั้นนำไปรมควัน และการเก็บรักษาไส้กรอกนี้จะเก็บโดยการแช่แข็ง สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน 1 สัปดาห์ ไส้กรอกชนิดนี้สามารถที่จะรับประทานได้เลยโดยที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการปรุงสุก แต่ว่าการรับประทานอาหารให้ถูกสุขลักษณะนั้นจะต้องมีการทำให้สุกก่อนเพราะเป็นการช่วยเพิ่มกลิ่นของอาหารให้น่ารับประทานและเป็นการทำลายเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหาร

5. ไส้กรอกแห้งและไส้กรอกกึ่งแห้ง (dry and semi-dry sausages) ไส้กรอกชนิดนี้จะนำเนื้อบดมาปรุงรสแล้วทำให้สุกก่อนที่จะยัดใส่ไส้หมูจากนั้นจะรอให้เกิดการหมักก่อนที่จะทำการรมควันจนไส้กรอกไม่มีความชื้น ไส้กรอกแห้งสามารถที่จะนำมารับประทานได้เลยโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรุงอาหาร ไส้กรอกชนิดนี้จะมีกลิ่นฉุนซึ่งเป็นกลิ่นเฉพาะตัวเนื่องจากเกิดกรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักเนื้อที่ยัดใส่ในไส้หมูจะเกิดกระบวนการหมักขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ย่อยสลายน้ำตาลทำให้เกิดกรดขึ้นรวมทั้งเกิดสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ร่วมอื่นๆ ในกระบวนการหมักเนื้อจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่สร้างกรดแลคติกทำให้ไส้กรอกที่ได้มีกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัว และพบว่าไส้กรอกชนิดนี้จะมีค่า pH ลดลงซึ่งเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ปนเปื้อนในอาหาร

ส่วนผสมหลักของไส้กรอก

น้ำ

การเติมน้ำลงไปจะทำให้เกลือละลายได้ดียิ่งขึ้นและสามารถที่จะกระจายตัวทั่วทั้งเนื้อสัตว์ ไส้กรอกที่ได้นั้นเมื่อใช้นิ้วกดลงไปจะมีลักษณะของเนื้อสัมผัสที่แข็งซึ่งเป็นผลที่เกิดจากปริมาณน้ำที่เติมลงไป น้ำจะช่วยละลายสารต่าง ๆ ที่ไม่ใช่ไขมันรวมทั้งยังช่วยทดแทนปริมาณน้ำที่สูญเสียไประหว่างการปรุงอาหารและการรมควันและทำให้ไส้กรอกที่ผ่านกระวนการปรุงอาหารแล้วมีเนื้อสัมผัสน่ารับประทานอนุภาคของเนื้อในไส้กรอกจับกันเป็นก้อนไม่แตกยุ่ย นอกจากนี้น้ำยังทำงานร่วมกับเกลือในการละลายโปรตีนให้จับกับไขมัน

เกลือ

การเติมเกลือแกง (โซเดียมคลอไรด์) นั้นนอกจากจะเป็นการเพิ่มรสชาติให้กับไส้กรอก เกลือที่เติมลงในขั้นตอนของการเตรียมวัตถุดิบนั้นยังทำหน้าที่หลายอย่าง เป็นส่วนผสมที่ขาดไม่ได้เลยในการทำไส้กรอกเนื่องจากเกลือนั้นมีบทบาทที่สำคัญมากต่อเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการทำไส้กรอก การเติมเกลือต้องเติมในปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณน้ำ เกลือช่วยยับยั้งการเน่าเสียและละลายโปรตีนบริเวณผิวหน้าของเนื้อสัตว์ที่เป็นส่วนผสมหลักของไส้กรอก และโปรตีนที่ละลายออกมานี้จะจับกับไขมัน ซึ่งเกลือจะช่วยยืดเวลาในการเก็บรักษาไส้กรอกเนื่องจากยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก. 2532: 32-38) เกลือจะเปลี่ยน Electrostatic charge ของโปรตีนในกล้ามเนื้อ เนื่องจากน้ำจะแทรกตัวอยู่ระหว่างเส้นใยของโปรตีน การเปลี่ยนแปลง Electrostatic repulsion ของเส้นใยโปรตีนด้วยเกลือจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่เป็นช่องว่างระหว่างเส้นใยของโปรตีนให้น้ำสามารถเข้าไปแทนที่ เพิ่มความแรงของไอออนและความสามารถในการกักเก็บน้ำและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเพียงเล็กน้อย เกลือช่วยละลายโปรตีนเส้นใยในเนื้อสัตว์ที่ไม่ละลายน้ำให้สามารถละลายออกมาได้ดีขึ้น การละลายของโปรตีนเส้นใยนี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ได้นั้นจับตัวเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีและทำให้ไขมันละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับสารอื่น การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือจะส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนในกล้ามเนื้อ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า “salting out” นอกจากนี้ยังทำให้ไส้กรอกมีรสชาติที่น่ารับประทาน โดยทั่วไปเกลือที่เติมลงในไส้กรอกจะเติมที่ปริมาณ 1% - 2% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักไส้กรอกทั้งหมด

น้ำตาล

น้ำตาลที่ใช้นั้นมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับความต้องการและความสะดวกในการจัดหา แต่ส่วนมากนิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเนื่องจากเป็นน้ำตาลอย่างง่ายที่แบคทีเรียต้องการในการผลิตกรดแลคติก ประโยชน์หลักๆ ของน้ำตาล คือ การช่วยเพิ่มรสชาติของไส้กรอกและช่วยลดความเค็ม

ของเกลือ น้ำตาลสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำทำให้โครงสร้างของน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงและเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการเกิดปฏิกิริยาเคมีในอาหาร ความเข้มข้นที่นิยมใช้อยู่ที่ประมาณ 0.5% - 2%

เครื่องเทศ

เครื่องเทศเป็นส่วนผสมที่เติมในปริมาณเล็กน้อยเพื่อปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของไส้กรอกที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้ยังช่วยกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ เครื่องเทศที่นิยมใช้ เช่น พริกไทย พริกแดง พริกหยวก ฯลฯ (ธนากร ทองประยูร. 2541: 12-19)

ฟอสเฟต

นิยมใช้โซเดียมหรือโพแทสเซียมฟอสเฟต การเติมฟอสเฟตจะช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน เพราะฟอสเฟตที่เติมลงไปจะทำให้ pH และประจุสุทธิเพิ่มมากขึ้น และเป็นการเพิ่มสารที่เป็นไอออนเป็นการเพิ่มความแรงของไอออน (Ionic Strength) ทำให้เพิ่มความสามารถในการสร้างพันธะกับน้ำทำให้ความชื้นลดน้อยลง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถจับกับสารไอออนบวกเช่นแคลเซียมและแมกนีเซียมทำให้ในอาหารนั้นปราศจากสารที่เป็นไอออนบวก และทำให้อาหารไม่มีไอออนของโลหะ ฟอสเฟตเป็นสารที่มีความสามารถละลายน้ำได้น้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งการละลายในน้ำเย็น ดังนั้นทำให้เป็นปัญหาในการกระจายตัวในเนื้อสัตว์ที่ใช้ในการทำไส้กรอก

โซเดียมไนไตรต์

ไนไตรต์เป็นสารที่มีการปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์ที่เป็นวัตถุดิบ คุณลักษณะที่พิเศษคือจะช่วยเพิ่มสีสัน กลิ่นและรสชาติ ช่วยป้องกันไม่ให้อาหารเน่าเสียหรือเกิดกลิ่นเหม็นหืน (ทองใบ เศรษฐีธร. 2537: 24-26) ไส้กรอกที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารไนไตรท์จะมีสีน้ำตาลไม่มีสีแดงหรือสีชมพูหลังจากการปรุงสุก และเกิดการเน่าเสียได้ง่าย (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก. 2532: 38-39) การเติมสารไนไตรท์จะเติมในปริมาณน้อยเท่านั้น ถ้าเติมมากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อร่างกาย (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 122-123) ไนไตรต์เป็นสารที่ทำให้เกิดสีในเนื้อสัตว์เนื่องจากไนตริกออกไซด์จะเกิดการรวมตัวกับไมโอโกลบิน (myoglobin) เกิดเป็นไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบิน จากนั้นไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบินจะเกิดเป็นไนตริกออกไซด์ฮีโมโครมซึ่งเป็นสารที่ทำให้เนื้อสัตว์มีสีชมพู และเป็นสารต้านอะนุมูลอิสระโดยการลดฮีมไอรอนออกซิเดชัน (Heme iron oxidation)

การสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการและการเน่าเสีย

การหมักเป็นกระบวนการถนอมอาหารที่มีมานานแล้ว ซึ่งกระบวนการหมักนั้นจะใช้ลักษณะของกลิ่น รสชาติ และการเน่าเสียเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพของอาหารในเบื้องต้น ลำดับ

แรกจะพิจารณากลิ่นที่เกิดจากกระบวนการหมักซึ่งการพิจารณากลิ่นนี้นิยมใช้กันอย่างมากในการพิจารณาเบื้องต้นเนื่องจากสามารถที่จะบอกถึงการเน่าเสียของอาหารได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้สารฮีสตามีนยังเป็นสารที่มีกลิ่นเหม็นบ่งบอกถึงการเน่าเสียและการลดลงของคุณค่าทางอาหาร

เอมีนเป็นสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นในอาหารและเป็นสารตั้งต้นของสารก่อมะเร็ง ส่วนไดเอมีน เช่น พูเทรสซีนเป็นสารที่จำเป็นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและทุกๆ เซลล์มีความสามารถในการสังเคราะห์ไดเอมีน ซึ่งการได้รับสารไดเอมีนอาจได้รับจากภายนอกเข้าสู่ร่างกาย

อาหารที่มีความปลอดภัย หมายถึง อาหารที่ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งแปลกปลอมที่เป็นสารเคมีที่อาจจะเป็นอันตรายต่อสุขภาพทั้งที่สามารถเกิดพิษทันทีเรียกว่าพิษเฉียบพลัน เช่น การรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลง หรืออาการที่เกิดจากพิษเรื้อรังเช่น การรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารก่อมะเร็งที่จะเกิดการสะสมในร่างกายและอาจจะใช้เวลานานหลายปีก่อนที่จะแสดงอาการความเป็นพิษออกมา

โดยทั่วไปแล้วสารประกอบ เอ็น-ไนโตรโซ (*N*-nitroso) เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาของกรดอะมิโนกับสารที่เรียกว่า ไนโตรเซติงรีเอเจนต์ (nitrosating reagents) ตัวอย่างเช่น ไนไทรต์และไนโตรเจนออกไซด์ในระหว่างการเก็บรักษา การถนอมอาหารและการปรุงอาหาร การเกิดปฏิกิริยาของไนโตรเซติงรีเอเจนต์กับเอมีนปฐมภูมิทำให้เกิดเป็นสารมัธยันต์พวกอัลคิลเลติงสปีชีร์ (alkylating species) และสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นๆ ในอาหารโดยมีอัลกอฮอล์เป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งเป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษร้ายแรง ส่วนการเกิดปฏิกิริยาไนโตรเซชัน (Nitrosation) ของสารเอมีนทุติยภูมิจะทำให้เกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซ ซึ่งเป็นสารที่เสถียร การศึกษาการเกิดสารประกอบเอ็น-ไนโตรโซในร่างกายนั้นไม่สามารถทำได้เนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีสารไบโอจีนิกเอมีนและไนโตรเซติงรีเอเจนต์ทางช่องปากยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ

การเน่าเสียของอาหาร หมายถึง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับอาหารในลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ต่างๆ เช่น กลิ่นเหม็นเน่า รสชาติเปรี้ยวหรือขม รูปร่างที่บวมพอง เนื้อสัมผัสเปื่อยยุ่ย สีคล้ำ คุณค่าทางโภชนาการลดลงตลอดจนความปลอดภัยในการบริโภคอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหาร (ชมภู่ ยิ้มโต. 2550: 1) จุลินทรีย์บางชนิดนอกจากจะทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียแล้วยังผลิตสารพิษให้เกิดขึ้นในอาหารอีกด้วย ดังนั้นเมื่อเรารับประทานอาหารที่มีสารพิษปนเปื้อนจะทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย เป็นต้น ปฏิกิริยาจากสารเคมีหรือการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพจากการแช่แข็ง การเผาไม้ การตากแห้ง เป็นต้น

(ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. 2522) การเน่าเสียของอาหารจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร อาหารที่เกิดการเน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์จะก่อให้เกิดอันตรายจากสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนเป็นสารที่เกิดในอาหารแล้วส่งผลต่อความเป็นพิษแก่ร่างกายผู้บริโภค ความเป็นพิษหลายอย่างเกิดจากฮีสตามีนที่มีมากในอาหารจำพวกปลา ผลของพิษที่เกิดขึ้นนั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณที่ร่างกายได้รับ และสุขภาพของแต่ละบุคคล ส่วนสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนสามารถเกิดปฏิกิริยากับไนไตรต์เกิดเป็นสารก่อมะเร็ง เช่น เฮเทอโรไซ-คลิกไนโตรซามีน ไนโตรโซไพโรริดีน และไนโตรโซเพปเปอร์ริดีน (Bover-Cid; Izquierdo-Pulido; & Vidal-Carou. 2001: 215) (Min-Ki Kim; Jae-Hyung Mah; & Han-Joon Hwang. 2009: 87)

กลไกการเน่าเสีย เนื้อสัตว์ที่เริ่มเน่าเสียจะพบสารเมทาบอไลต์ประเภทแอมโมเนีย อินโดล และเอมีน สารเหล่านี้จะมีมากขึ้นหากกระบวนการเน่าเสียยังคงดำเนินต่อไป และจะมีก๊าซไข่เน่าหรือก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เกิดขึ้นร่วมด้วย กระบวนการเน่าเสียเริ่มจากการย่อยสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และเมื่อคาร์โบไฮเดรตหมดลงจะเริ่มย่อยสลายโปรตีนเกิดเป็นสารเอมีน และไดเอมีน เช่น พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีน จุลินทรีย์มีบทบาทที่สำคัญในการทำให้เนื้อสัตว์เกิดการเน่าเสีย (เติมศักดิ์ ส่งวัฒนา. “ม.ป.ป.”: 64-65) แบคทีเรียเหล่านี้จะเจริญในชิ้นเนื้อและทำให้เนื้อหรือผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย เช่น มีรสเปรี้ยว (souring) เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารอาหารที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์แล้วผลิตกรดต่างๆ ออกมา เช่น กรดแลคติก บางครั้งอาจเรียกว่าเกิดกลิ่นเหม็นเปรี้ยว เนื่องจากนี้อาจเกิดกลิ่นเหม็นเน่าเนื่องจากการย่อยสลายโปรตีน ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหลายชนิด เช่น กลิ่นแอมโมเนีย กลิ่นเอมีน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ อินโดล เมอร์แคปแทน เนื้อสัตว์เกิดการเน่าเสียได้ที่อุณหภูมิต่ำ

ไส้กรอกพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเป็นเชื้อที่มาจากส่วนผสมของเครื่องปรุงรส ภาชนะ และสภาวะแวดล้อมโดยรอบ บริเวณผิวไส้กรอกมีความชื้นสูงจะเกิดการเน่าเสียจากกิจกรรมของยีสต์และแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา เมื่อผิวไส้กรอกแห้งลงหรือมีความชื้นลดลงจะพบการเสียโดยเชื้อรา อย่างไรก็ตามมักพบว่าการเน่าเสียของไส้กรอกจะเกิดจากยีสต์แบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา

การที่สามารถเก็บรักษาอาหารในระยะเวลาที่ยาวนานโดยที่อาหารนั้นไม่เกิดการเน่าเสียสามารถนำมาบริโภคได้ และอาหารนั้นต้องปราศจากการเน่าเสียทุกประการและมีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วน การเสื่อมคุณภาพของอาหารเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากจุลินทรีย์ หรือเกิดจากสาเหตุที่กล่าวมาข้างต้นมากกว่าหนึ่งสาเหตุ (เติมศักดิ์ ส่งวัฒนา. ม.ป.ป.”: 1-3)

การกวดขันในเรื่องสุขอนามัยและการควบคุมความปลอดภัยของเนื้อสัตว์ที่จะนำมาทำไส้กรอกนั้นมีความสำคัญมาก เนื่องจากอันตรายที่เกิดจากเนื้อสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไส้กรอกเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่จะทำให้อาหารเป็นพิษ เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียที่จะก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ บริเวณที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบจะต้องมีความสะอาดทั้งก่อนและหลังการผลิตไส้กรอก ระยะเวลาในการเก็บรักษาไส้กรอกจะมีข้อจำกัด การเก็บรักษาไส้กรอกไว้ในตู้เย็นนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถเก็บรักษาไส้กรอกไว้ได้นาน 3 สัปดาห์และเมื่อพบว่าไส้กรอกเกิดกลิ่นเหม็นก็ไม่ควรนำมารับประทาน

ตาราง 4 ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่พบในไส้กรอกแห้ง

ประเทศ	**ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเฉลี่ย (mg/kg)**		
	ฮีสตามีน	**พิวเทรสซีน**	**คาร์ดาเวรีน**
เบลเยียม	4.1	15.1	2.5
ฟินแลนด์	54	79	50
รัสเซีย	89	93	10
เดนมาร์ก	9	130	180
โปแลนด์	25.5	54	6
อียิปต์	5.3	39	19

ที่มา: Giovanna Suzzi; & Fausto Gardini. (2003) p.43.

ตาราง 5 ไบโอจีนิกเอมีนที่เป็นดัชนีชี้วัดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์	ชนิดไบโอจีนิกเอมีน
เนื้อวัวสด	พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีน
ไส้กรอก Bologna	BAI = พิวเทรสซีน+คาร์ดาเวรีน+ฮีสตามีน+ไทรามีน
หมูสับและเนื้อสับ	BAI = พิวเทรสซีน+คาร์ดาเวรีน+ฮีสตามีน+ไทรามีน
เนื้อหมูเก็บที่ 6-8 ^{O}C	BAI = พิวเทรสซีน+คาร์ดาเวรีน+ฮีสตามีน+ไทรามีน
แฮมเบอร์เกอร์	ไทรามีน พิวเทรสซีน ฮีสตามีน คาร์ดาเวรีน
เนื้อวัวเก็บที่ 1 ^{O}C ปราศจากอากาศ	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ไทรามีน
ไส้กรอกแห้ง	ไทรามีน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน

BAI คือ Biogenic Amines Index

ที่มา: DR. CLAUDIA RUIZ-CAPILLAS; & FRANCISCO JIMÉNEZ COLMENERO. (2004). *Biogenic Amines in Meat and Meat Products.* p. 492.

ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์และอาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์จะมีกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาด้วยวิธีการที่แตกต่างกันออกไปทำให้เนื้อสัตว์ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไปสามารถที่จะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน และเป็นสาเหตุให้เนื้อสัตว์ที่มีความสดใหม่ เนื้อสัตว์ที่มีกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีการต่าง ๆ และเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปมีปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน

ตาราง 6 จุลินทรีย์ที่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	ไบโอจีนิกเอมีน
ไส้กรอกสุก	Enterococci Lactic acid bacteria (LAB)	ไทรามีน
ไส้กรอกหมัก	LAB *Enterobacteriaceae*	ไทรามีน คาร์ดาเวรีน

ตาราง 6 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	ไบโอจีนิกเอมีน
เนื้อปลาสด เนื้อวัวสด	Pseudomonads	พิวเทรสซีน
เนื้อหมู	*Carnobacterium* *Lactobacillus curvatus* *Lactobacillus plantarum*	ไทรามีน
เนื้อหมูเก็บที่ 5 ^{O}C	*Enterobacter cloacae* *Klebsiella pneumoniae*	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน
เนื้อหมู วัว ลูกแกะ เก็บที่ 5 ^{O}C	Enterobacteriaceae	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน
เนื้อหมู ปลา วัว ที่ห่อและไม่ห่อพลาสติก	Enterobacteriaceae Pseudomonads	คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน
เนื้อวัวเก็บที่อุณหภูมิ 1 ^{O}C ภายใต้สุญญากาศ	*Lactobacillus divergens* *Lactobacillus carnis* *Hafnia alvey* *Serratia liquefaciens*	ไทรามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวีรน
เนื้อหมูเก็บในสภาวะที่มี คาร์บอนไดออกไซด์/อากาศที่ อุณหภูมิ 2 ^{O}C	*Brochothrix thermosphacta* Lactobacilli *Enterobacteriaceae*	คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน
ไส้กรอกแห้ง	Lactobacilli *Carnobacterium* *Lactobacillus carvatus* *Lactobacillus plantarum*	ไทรามีน ฮีสตามีน

ที่มา: DR. CLAUDIA RUIZ-CAPILLAS; & FRANCISCO JIMÉNEZ COLMENERO. (2004). *Biogenic Amines in Meat and Meat Products.* p. 495.

บทบาทของสารไบโอจีนิกเอมีนต่อลักษณะทางกายภาพและชีวภาพ

ถ้าร่างกายได้รับสารไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณน้อย ร่างกายสามารถขับสารไบโอจีนิกเอมีนออกจากร่างกายด้วยระบบการทำงานของร่างกาย ภายใต้สภาวะปกติร่างกายจะดูดซึมสารไบโอจีนิกเอมีนจากอาหารอย่างรวดเร็วและมีการกำจัดออกจากร่างกายโดยอาศัยเอนไซม์เอมีนออกซิเดส (amine oxidases) (Ladero; et al. n.d.: 12) แต่ในบางรายพบว่าอาจทำให้เกิดอาการแพ้หรือเกิดการยับยั้งเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดส (monoamine oxidase) (Mah; et al. 2002: 239–240) ในกรณีที่ร่างกายได้รับสารไบโอจีนิกเอมีนในปริมาณมากเกินไป กระบวนการขับสารไบโอจีนิกเอมีนก็ไม่สามารถที่จะขับสารไบโอจีนิกเอมีนออกจากร่างกายได้ทั้งหมดและจะเกิดการสะสมของสารไบโอจีนิกเอมีนบางส่วนในร่างกาย พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนจะช่วยเสริมความเป็นพิษของสาร ฮีสตามีนที่มีต่อร่างกายโดยจะแสดงอาการอย่างรวดเร็วภายใน 5 นาที พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการขับสารฮีสตามีน (histamine-detoxifying enzymes) ออกจากร่างกายกาย เช่น เอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดส (MAO) และไดเอมีนออกซิเดส (DAO) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการขับสารไบโอจีนิกเอมีนออกจากร่างกาย เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยสารใดสารหนึ่งกระบวนการขับสารไบโอจีนิกเอมีนก็จะถูกยับยั้ง ความเป็นพิษของสารฮีสตามีนสามารถยับยั้งโดยยาต้านฮีสตามีน (antihistamines) ยาต้านมาลาเรีย (antimalaria agents) และยาอื่นๆ ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่เมทาบอไลต์ฮีสตามีน (histamine-metabolizing enzymes)

ฮีสตามีน

ฮีสตามีน หรือ β-aminoethylimidazole ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1910 โดย Dale และ Laidlaw และได้รับการยืนยันว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้เมื่อปี ค.ศ. 1932 ฮีสตามีนมีอยู่หรือถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกายและมีช่วงชีวิตที่สั้น เป็นสารสื่อกลาง (mediator) ที่สำคัญในการตอบสนองต่อการเกิดภูมิแพ้ชนิดเฉียบพลันและกลไกการอักเสบหลายชนิดเมื่อเนื้อเยื่อเกิดบาดแผล สารฮีสตามีนสามารถเกิดอันตรกิริยากับรีเซปเตอร์ที่มีความจำเพาะ เช่น H1, H2, H3 และ H4 ที่บริเวณเซลล์เป้าหมาย ฮีสตามีนที่ถูกปล่อยออกมาจะทำให้หลอดเลือดในบริเวณนั้นขยายตัว ทำให้พลาสมาซึ่งมีตัวกลางของการอักเสบแบบเฉียบพลัน แอนติ้บอดี้และเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบเล็ดลอดออกจากหลอดเลือด นอกจากนี้สารฮีสตามีนยังมีบทบาทที่สำคัญของการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และออกฤทธิ์ ณ ตำแหน่งที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเท่านั้น สามารถที่จะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเป็น “local hormone” การสังเคราะห์ฮีสตามีนในร่างกายนั้นจะถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อร่างกายต้องการใช้เท่านั้น (ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. 2537: 262-265); (นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์. “ม.ป.ป.”: 17)

ฮีสตามีนเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ มีสูตรโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนอิมิดา โซล (imidazole) 1 วงและมีหมู่อะมิโนเชื่อมต่ออยู่กับหมู่เมธิลีน (methylene) ฮีสตามีนเป็นเฮเทอโรไซคลิกเอมีนเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน เร่งด้วยเอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส เมื่อร่างกายได้รับฮีสตามีนในระดับที่มากเกินพอจะส่งผลต่อระบบประสาท กระเพาะอาหาร และระบบไหลเวียนของเลือด ภาวะความดันโลหิตต่ำกว่าปกติ ปวดศรีษะ คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องร่วง หน้าแดงและอาจจะมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วย การบริโภคอาหารที่มีสารไบโอจีนิกเอมีนปนเปื้อนในปริมาณมากจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. 2537: 262-265)

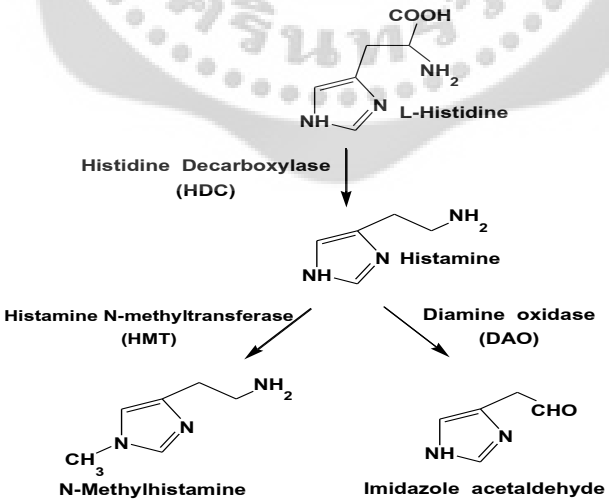
ฮีสตามีนสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อของสัตว์ พืช และแบคทีเรีย (Mah; et al. 2002: 239–240) ฮีสตามีนในร่างกายสังเคราะห์จากกรดอะมิโน แอล-ฮีสติดีน (L-histidine) โดยปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์ แอล-ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (L-histidine hecarboxylase) ซึ่งมีอยู่มากใน mast cell เซลล์ของผิวหนังชั้นนอก เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร เซลล์ในระบบประสาทส่วนกลาง สารฮีสตามีนส่งผลหลายอย่างต่อร่างกาย เช่น การหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร การเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งเซลล์ การเต้นของหัวใจ ประสาทสัมผัสและการรับรู้ และฮีสตามีนยังตอบสนองต่ออาการแพ้โดยจะจับกับรีเซปเตอร์ที่จำเพาะและส่งผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่บริเวณลำไส้ ปอด และมดลูก

แบคทีเรียบางชนิดในลำไส้สามารถที่จะสร้างสารฮีสตามีนได้ ส่วนสารฮีสตามีนที่เรารับประทานเข้าไปหรือสร้างโดยแบคทีเรียในทางเดินอาหารจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วที่ผนังลำไส้ บางส่วนถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะถูกทำลายที่ตับ และถูกขับออกทางปัสสาวะ (ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. 2537: 262, 264-268)

สารฮีสตามีนที่เกิดในอาหารนั้นส่วนมากเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาอาหารนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน เพปไทด์ และกรดอะมิโน สารเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ประเภทเอมีน การเน่าเสียของเนื้อสัตว์นั้นเป็นสาเหตุมาจากสารฮีสตามีนที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักทั้งกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมและการหมักอาหารที่กระทำกันในครัวเรือน

ถ้าร่างกายได้รับสารฮีสตามีนเข้าสู่ร่างกายอันเนื่องมาจากการรับประทานอาหารที่มีสารฮีสตามีนปนเปื้อน สารนี้จะถูกกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วทางปัสสาวะด้วยการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส แต่การรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนสารฮีสตามีนในปริมาณมากจะส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายเนื่องจากการกำจัดออกไม่หมดและเกิด

การสะสมในร่างกาย เช่น พิษที่เกิดจากสารฮีสตามีนเนื่องจากการรับประทานปลาในตระกูล scombroid หรือกระทั่งการรับประทานชีส สำหรับมนุษย์และสัตว์ฮีสตามีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์สองชนิด ได้แก่ ไดเอมีนออกซิเดส (DAO) และฮีสตามีน-เอ็น-เมทิลทรานส์เฟอเรส (HMT) (Maintz & Novak, 2007). เอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสจะเปลี่ยนฮีสตามีนเป็นอิมิดาโซลแอซิติกแอซิดซึ่งสามารถรวมตัวกับไรโบสก่อนที่จะถูกขับออกจากร่างกาย ส่วนเอนไซม์ HMT จะเปลี่ยนสารฮีสตามีนไปเป็นเมทิลฮีสตามีนซึ่งจากนั้นจะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดสไปเป็นเอ็น-อิมิดาโซลแอซิติกแอซิด และผลิตภัณฑ์สุดท้ายของสารฮีสตามีนจะเกิดกระบวนการเมทาบอลิซึมและถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ สำหรับในร่างกายมนุษย์นั้นจะพบเอนไซม์ไดเอมีนออกซิเดสได้ที่บริเวณลำไส้ การรับเอาสารฮีสตามีนจากภายนอกเข้าสู่ร่างกายเป็นเรื่องที่มีข้อจำกัดเนื่องจากสารฮีสตามีนจะแพร่กระจายเข้าสู่ระบบไหลเวียนในร่างกาย จากนั้นจะเกิดการแพร่เข้าสู่เข้าสู่เนื้อเยื่อตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายดังนี้ คือ ตับ ม้าม ปอด ลำไส้เล็ก ช่องท้อง (Hesterberg et al., 1984) เพราะฉะนั้นเอนไซม์ไดเอมีนออกซเดสจึงเป็นเอนไซม์หลักในการเมทาบอลิซึมเพื่อย่อยสลายฮีสตามีน ในขณะที่เอนไซม์ HMT จะทำหน้าที่ในการเมทาบอลิซึมเป็นลำดับแรกเนื่องจากเอนไซม์ HMT มีความจำเพาะอย่างมากต่อสารฮีสตามีนส่วนเอนไซม์ DAO จะทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารไบโอจีนิกเอมีนอื่น ๆ เช่น คาร์ดาเวรีนและพิวเทรสซีน สารฮีสตามีนและสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น เช่น คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน และไทรามีน เมื่อรับเข้าสู่ร่างกายด้วยการรับประทานอาหารพบว่า 68 - 80 % จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะบางส่วนจะถูกขับออกมากับอุจจาระ ส่วนปริมาณที่เหลือจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในลำไส้



ภาพประกอบ 2 การย่อยสลายสารฮีสตามีน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hubert G. Schwelberger

ร่างกายสามารถที่จะทนต่อความเป็นพิษเมื่อได้รับสารฮีสตามีน 180 mg ทางช่องปาก โดยจะไม่แสดงความเป็นพิษออกมาให้เห็นอย่างชัดเจน ในขณะที่การรับเอาสารฮีสตามีนทางเส้นเลือดเพียง 0.007 mg จะทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจซึ่งฮีสตามีนที่ระดับความเข้มข้น 0.007 mg นี้จะไม่ส่งผลต่อการดูดซึมที่บริเวณกระเพาะอาหาร แต่เอนไซม์ที่บริเวณลำไส้จะย่อยสลายฮีสตามีนเพื่อป้องกันไม่ให้ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย การรับประทานยาที่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DAO ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลงทำให้มีปริมาณฮีสตามีนในร่างกายสะสมจนมีปริมาณมากเกินพอที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษขึ้น ซึ่งพิษที่เกิดขึ้นจะแสดงอาการอยู่ระหว่าง 2-3 นาทีจนถึง 1 ชั่วโมงและอาการจะค่อย ๆ หายไปในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง ซึ่งอาการที่สามารถสังเกตุได้โดยทั่วไป เช่น ความดันเลือดสูงหรือต่ำจนเกินไป อาการปวดศรีษะ น้ำมูกไหล ภาวะหัวใจเต้นเร็วผิดปกติ หัวใจบีบตัวอย่างรุนแรง เกิดผื่นคัน อาการคันอย่างรุนแรง หน้าแดงและหอบหืด นอกจากนี้ฮีสตามีนยังทำให้สารต่าง ๆ ซึมผ่านหลอดเลือดได้ ซึ่งผลนี้ทำให้เกิดอาการบวมน้ำ ฮีโมโกลนินปะปนออกมากับปัสสาวะ ทำให้เลือดมีความหนืดเพิ่มขึ้น และภาวะช็อคอันเป็นสาเหตุที่เกิดจากการรับเอาสารฮีสตามีนมากเกินขีดจำกัดที่ร่างกายจะรับได้ นอกจากนี้สารฮีสตามีนยังส่งผลกระทบต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อที่บริเวณหลอดลมและลำไส้ทำให้เกิดอาการปวดที่บริเวณช่องท้อง ท้องร่วง และอาเจียน เป็นต้น

ตาราง 7 ปริมาณสารฮีสตามีนในอาหารชนิดต่าง ๆ

ชนิดของอาหาร	ฮีสตามีน (mg/kg)
ปลาตากแห้ง	348.0
น้ำปลา	196.0-197.0
ผักดอง	39.4-42.6
ชีส	20.9-62.0
ผลิตภัณฑ์ปลา	26.8-31.2
ไส้กรอกหมัก	23.0-23.6

การแพ้อาหาร (Allergy) บทความแรกที่ได้อธิบายเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างฮีสตามีนกับอาการที่แสดงความเป็นพิษตีพิมพ์ในประเทศฝรั่งเศสเมื่อปี ค.ศ. 1946 จนกระทั่งมีการรายงานและตีพิมพ์บทความเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารฮีสตามีนที่เกิดจากการบริโภคอาหารบางประเภท เช่น ในชีส การบริโภคอาหารที่มีปริมาณของสารฮีสตามีนปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูงเป็นสาเหตุที่จะก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ การแพ้เกิดจากร่างกายได้รับแอนติเจนทำให้ร่างกายสร้าง

แอนติ้บอดี้ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่อต่างๆ รวมทั้งฮีสตามีน ทำให้เกิดอาการต่างๆ เช่น ผื่นคัน หืด ลมพิษ น้ำมูกไหล ความดันโลหิตต่ำ ทางเดินหายใจอักเสบ (Maintz; & Novak. 2007: 1185-1196) ซึ่งจากการวินิจฉัยอาการของโรคโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญพบว่าไม่สามารถที่จะระบุสาเหตุที่แน่ชัดได้ อย่างไรก็ตามอาการที่เกิดขึ้นสามารถที่จะจำแนกอาการแพ้ที่เกิดขึ้นได้ ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่มีอาการแพ้อื่นๆ เกิดขึ้นก่อนหน้านี้ อาการแพ้อาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นปัญหาในการรักษาสำหรับผู้ป่วยบางรายที่อาการแพ้เกิดอย่างรวดเร็วและรุนแรง และเมื่อรับประทานอาหารที่สามารถจะก่อให้เกิดภูมิแพ้ เช่น อาหารที่มีสารฮีสตามีนในปริมาณสูง

นอกจากนี้แล้วการบริโภคอาหารที่มีสารฮีสตามีนอาจจะไม่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้อาหารเสมอไป เช่น มีรายงานว่าเมื่อบริโภคอาหารที่มีระดับของสารฮีสตามีนอยู่ในช่วง 6-25 มิลลิกรัมต่อมื้ออาหาร จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ อย่างไรก็ตามการรายงานเกี่ยวกับการรักษาอาการความเป็นพิษที่เกิดขึ้นและเป็นปัญหาด้านสุขภาพของประชาชนมานาน การบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารฮีสตามีนที่ระดับความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจะส่งผลที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และการบริโภคอาหารที่มีสารฮีสตามีนที่ระดับประมาณ 1000 มิลลิกรัมของสารฮีสตามีนจะก่อให้เกิดความเป็นพิษที่รุนแรงต่อร่างกาย และอาการของความเป็นพิษจะอยู่ในช่วงเวลาประมาณ 2-3 นาทีจนถึง 2-3 ชั่วโมงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น เพศ วัย และการตอบสนองของร่างกาย โดยอาการที่เกิดขึ้นนั้นจะมีอาการที่รุนแรงในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรกเท่านั้น

ไมเกรน (Migraine) นอกจากนี้จะรวมทั้งโรคปวดศรีษะอื่น ๆ ที่เกี่ยวกับความผิดปกติของหลอดเลือดที่เกิดโดยทราบสาเหตุ แต่อาการปวดศรีษะที่เกี่ยวกับการขยายตัวของหลอดเลือดสารฮีสตามีนที่ถูกปล่อยออกมาจากผนังหลอดเลือดหรือจากปลายประสาททำหน้าที่กระตุ้นปลายประสาทที่หลอดเลือดนี้

ภายใต้สภาวะปกติระหว่างการดูดซึมสารอาหารที่เกิดในร่างกายที่บริเวณกระเพาะอาหารจะเกิดการดูดซึมสารไบโอจีนิกเอมีนน้อยมาก โดยสารไบโอจีนิกเอมีนที่ร่างกายได้รับจากการรับประทานอาหารจะขับออกจากร่างกายโดยอาศัยเอนไซม์มอนอเอมีนออกซิเดส (MAO) ไดเอมีนออกซิเดส (DAO) และพอลิเอมีนออกซิเดส (PAO) ในกรณีผู้ป่วยที่รับประทานยาที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MAO, DAO และ PAO เช่นยารักษาอาการทางจิต ยารักษาอาการอัลไซม์เมอร์ และอาการพาร์คินสัน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงการดูดซึมสารไบโอจีนิกเอมีนซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่ากาย ส่วน อัลกอฮอล์ แอซิตัลดีไฮด์ สามารถเพิ่มความเป็นพิษของสารไบโอจีนิกเอมีน และเกิดการซึมผ่านของไบโอจีนิกเอมีนที่ผนังลำไส้ได้ดีขึ้น

ส่วนสารไดเอมีน เช่น พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน แม้ว่าจะไม่มีพิษโดยตรงแต่ก็เป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในการขับสารฮีสตามีนและไทโรซีน ดังนั้นจะทำให้สารฮีสตามีนมีความเป็นพิษมากขึ้นเนื่องจากมีปริมาณของฮีสตามีนและไทรามีนในกระแสเลือดมากขึ้น

ผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ฮีสตามีนมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดเล็กเนื่องจากกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเล็กคลายตัวทำให้หน้าแดง คอแดง ความดันโลหิตต่ำ ความต้านทานการไหลของเลือดลดลง และเพิ่มการยอมให้สาร เช่น โปรตีนผ่านออกจากหลอดเลือดแดงฝอยไปยังเนื้อเยื่อเนื่องจากเซลล์บุภายในหลอดเลือดหดตัวเกิดช่องว่าง เพิ่มการไหลของน้ำเหลืองและทำให้เกิดการบวมน้ำในบริเวณนั้น เนื่องจากการที่ฮีสตามีนขยายหลอดเลือดดังกล่าวทำให้เซลล์บุหลอดเลือดหดตัวแยกจากกัน โปรตีนในพลาสมาและของเหลวจะผ่านออกจากหลอดเลือดได้อย่างอิสระ หัวใจบีบตัวแรงและเร็วขึ้น อาจทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นเสียจังหวะได้ (ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. 2537: 267-268); (นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์. “ม.ป.ป.”: 20-23)

จากการทดสอบการฉีดสารฮีสตามีนเข้าที่ผิวหนังจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ 3 อย่าง เรียกว่า “triple response” คือ

(1) จุดแดงเฉพาะที่ (localized red spot) : รอยแดงที่เกิดขึ้นมีขนาด 1-2 มิลลิลิเมตร อย่างรวดเร็วรอบบริเวณที่ฉีดภายในเวลาไม่กี่วินาทีและจะปรากฏชัดเจนภายใน 1 นาที เป็นผลจากการที่ฮีสตามีนทำให้หลอดเลือดเล็กบริเวณนั้นขยายตัวอย่างรวดเร็ว

(2) ผื่นแดง (flare) : หลังจากที่เกิดรอยแดงขึ้นแล้วต่อมาผิวหนังจะแดงอย่างชัดเจน และร้อน และรอยแดงจะแผ่กระจายจากจุดเริ่มต้นอย่างช้าๆ

(3) ปรากฏผื่นนูน (wheal) : ภายในเวลา 1 นาทีที่บริเวณเดียวกับจุดแดงเริ่มต้นจะเกิดการผ่านออกของสารต่างๆ ทำให้เกิดการบวมน้ำขึ้นที่บริเวณนี้

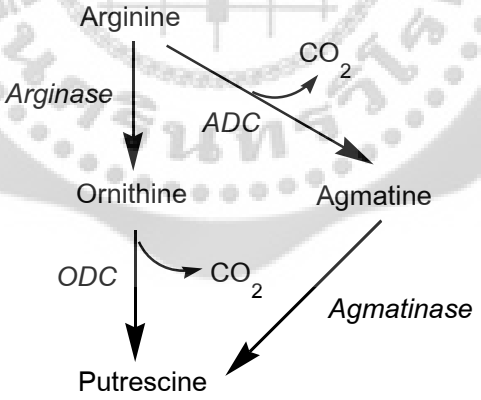
อาการช็อคเนื่องจากฮีสตามีน เกิดเมื่อร่างกายได้รับสารฮีสตามีนปริมาณสูง จะทำให้ความดันเลือดลดลงอย่างมาก เมื่อหลอดเลือดขยายและมีการเพิ่มการยอมให้สารผ่านหลอดเลือดเพิ่มขึ้น เกิดการสูญเสียพลาสมา ทำให้ปริมาณเลือดในหลอดเลือดลดน้อยลง ปริมาณเลือดที่ไหลเวียนทั่วร่างกายไม่เพียงพอ ทำให้ปริมาณเลือดที่กลับสู่หัวใจลดลงเกิดอาการช็อคในที่สุด

โรคแผลในกระเพาะอาหารเนื่องจากกรด การเกิดแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้สาเหตุประการหนึ่งเนื่องจากมีการหลั่งกรดในกรระเพาะอาหารมากเกินไป ฮีสตามีนเป็นสารสำคัญตัวหนึ่งในการกระตุ้นการหลั่งกรด การยับยั้งการหลั่งสารฮีสตามีนจะช่วยบรรเทาโรคแผลในทางเดินอาหารอันเนื่องจากกรดได้

พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีน

พิวเทรสซีน (1,4-diaminobutane) และคาร์ดาเวรีน (1,5-diaminopentane) เป็นไดเอมีนมักพบในเนื้อที่เน่าเสียแล้ว ใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้การเน่าเสียของเนื้อ (Marks; & Anderson. 2005: 60-61); (Latorre-Moratalla; et al. 2008: 913) สารพิวเทรสซีนสามารถเกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารพอลิเอมีนโดยไบโอซินเทนซิส (biosynthesis) สารพิวเทรสซีนในร่างกายมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งเซลล์ (Pavel Kalač; & Petra Krausová. 2005: 219-230) และในอาหารจะเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนออร์นิทีนโดยอาศัยการเร่งด้วยเอนไซม์ออร์นิทีนดีคาร์บอกซิเลส นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์จากกรดอะมิโนอาร์จีนีนและแอกมาติน ส่วนกรดอะมิโนไลซีนเมื่อเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันโดยอาศัยเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลสจะเกิดเป็นสารคาร์ดาเวรีน

สารพิวเทรสซีนสังเคราะห์จากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนออร์นิทีนโดยอาศัยเอนไซม์ออร์นิทีนดีคาร์บอกซิเลส (ODC) และ เอส-อะดีโนซิลเมทไทโอนีนดีคาร์บอซิเลส (S-adenosylmethhionine decarboxylase; AdoMetDC) ส่วนในพืชและจุลินทรีย์นั้นสามารถสร้างสารพิวเทรสซีนโดยการเร่งด้วยเอนไซม์อาร์จินีนดีคาร์บอกซิเลส (ADC) ภายในเซลล์ของคนที่มีร่างกายปกตินั้นระดับของสารพอลิเอมีนมีความซับซ้อนมากแต่จะถูกควบคุมโดยการสังเคราะห์ทางชีววิทยาและเร่งโดยเอนไซม์ (Mitchell J. L. A. 2003; 89)



ภาพประกอบ 3 กระบวนการสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนในร่างกาย

ที่มา : Mitchell, J. L. A. (2003). p. 89.

สารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนนั้นส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อร่างกายมนุษย์แตกต่างจากสารฮีสตามีนและไทรามีนที่ทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตต่ำกว่าปกติ อาการหัวใจเต้นช้า ขากรรไกรแข็ง อาการเหน็บชาเฉพาะส่วนหรืออัมพาตบางส่วน สารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนจะเสริมความเป็นพิษของสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสริมความเป็นพิษของสารฮีสตามีน ความเป็นพิษของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนนั้นทำได้โดยการศึกษาความสามารถในการยับยั้งของเอนไซม์ DAO และ HMT ในหนู จากการศึกษาในหนูพบว่าทั้งสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนสามารถทำให้ปริมาณสารฮีสตามีนในร่างกายมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น (un-metabolized) และในขณะเดียวกันสารฮีสตามีนที่ถูกเมทาบอลิซึมที่สามารถตรวจพบในปัสสาวะก็มีปริมาณลดน้อยลง นอกจากนี้สารไดเอมีนสามารถเกิดปฏิกิริยากับไนไทรท์เกิดเป็นสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนเป็นสารที่พบในอาหารหมักดองเช่นเดียวกับสารฮีสตามีนและพบได้บ่อยครั้งในเนื้อปลาและยังเป็นสารที่ใช้บ่งบอกถึงการเน่าเสียของอาหาร จากการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาเนื้อวัวที่อุณหภูมิ 1°C เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ โดยเก็บแบบสุญญากาศพบว่าเชื้อ *Enterobacter* ผลิตสารคาร์ดาเวรีนมากกว่าพิวเทรซีน ส่วนเนื้อวัวที่เก็บในที่มีอากาศพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* ผลิตพิวเทรสซีนมาก กว่าคาร์ดาเวรีน นอกจากอากาศแล้วพบว่าอุณหภูมิก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เนื้อและผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย เนื่องจากการเก็บเนื้อที่อุณหภูมิ 0 °C จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำเติบโตได้เป็นอย่างดีและหนึ่งในจำนวนนี้คือเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเมือกได้ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อเกิดรสเปรี้ยว ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนที่จะช่วยเสริมความเป็นพิษของสารฮีสตามีนนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อัตราส่วนระหว่างสารพิวเทรสซีนหรือคาร์ดาเวรีนต่อสารฮีสตามีนต้องมีค่ามากพอที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย และยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าปริมาณสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนในเนื้อสัตว์ที่เกิดการเน่าเสียนั้นจะต้องมีปริมาณมากเพียงใดที่จะช่วยเพิ่มความเป็นพิษของสารฮีสตามีนในร่างกายมนุษย์

ตาราง 8 ปริมาณสารพิวเทรสซีนในอาหารชนิดต่าง ๆ

ชนิดของอาหาร	พิวเทรสซีน (mg/kg)
ไวน์ขาว	5.2
ไวน์แดง	4.2-4.8
เบียร์	3.3-3.5
น้ำปลา	98.1-99.3

ตาราง 8 (ต่อ)

ชนิดของอาหาร	พิวเทรสซีน (mg/kg)
ซอสปรุงรส	6.0-13.6
ปลาหมัก	13.4-17.0
ไส้กรอกหมัก	84.2-84.6
ผักดอง	264.0
ผักอื่น ๆ	449.0

ตาราง 9 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในอาหารชนิดต่าง ๆ

ชนิดของอาหาร	คาร์ดาเวรีน (mg/kg)
เนื้อที่ผ่านการปรุงสุก	17.2-17.5
เนื้ออื่น ๆ	6.7-6.8
เบียร์	1.3-1.5
น้ำปลา	180.0-182.0
ซอสปรุงรส	-
ปลาหมัก	1690.0
ไส้กรอกหมัก	37.4-38.0
เนื้อหมัก	14.0-17.3
ชีส	72.0-109.0
ผักดอง	26.0-35.4

ตาราง 10 ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่รับเข้าสู่ร่างกายในหนึ่งวัน

ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่ได้รับจากการรับประทานอาหาร (mg/day)				
		ฮีสตามีน	พิวเทรสซีน	คาร์ดาเวรีน
เครื่องดื่มอัลกอฮอล์	เบียร์	3.6-24.2	6.2-41.9	4-26.7
	เหล้า	0.1-1.1	0.2-1.4	<0.1-0.1
	ไวน์แดง	2.5-12.4	1.9-11.5	0.1-1.6
	ไวน์ขาว	0.1-3.9	0.2-6.5	<0.1-0.6

ตาราง 10 (ต่อ)

ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนที่ได้รับจากการรับประทานอาหาร (mg/day)				
		ฮีสตามีน	**พิวเทรสซีน**	**คาร์ดาเวรีน**
ปลาและผลิตภัณฑ์	เนื้อปลาหมัก	0.3-12.6	0.6-2.7	0.3-12.4
	ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ	8.8-41.4	3.8-10.9	18.9-53.8
ผลิตภัณ์เนื้อ	ไส้กรอกหมัก	6.4-31.1	14.5-83.6	6.7-38.5
	เนื่อที่ทำให้สุก	1.4-9.9	5.3-38.6	3.3-23.9
	เนื้อื่น ๆ	0.8-1.4	20.9-36.9	4.3-7.5
ผลิตภัณฑ์นม	ชีส	13-32.1	14.3-35.3	47-116.1
	โยเกิร์ต	0.3-0.8	0.3-0.9	2.6-8.2
	ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ	0.2-0.6	0.3-0.9	0.9-2.9
ซอสปรุงรส	น้ำปลา	0.4-29.9	0.1-8.3	0.4-25.1
ผักและผลิตภัณฑ์	ผักดอง	0.8-27.6	4.9-164.7	0.8-28.2
	ผักอื่น ๆ	<0.1-0.2	13.4-93.6	3.7-25.6

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาปริมาณ สารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และ คาร์ดาเวรีน

วิธีวิเคราะห์ที่มีความไวและมีความรวดเร็วสำหรับการวิเคราะห์ฮีสตามีนนั้นมีความจำเป็นอย่างมากเนื่องจากฮีสตามีนเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนหนึ่งในหลาย ๆ ชนิดที่ส่งผลรุนแรงต่อร่างกายมนุษย์ตามหลักของ hazard analysis critical control point หรือมีชื่อย่อว่า HACCP เพื่อให้สามารถมั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์ไส้กรอกนั้นมีความปลอดภัย วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ แคปิลารีอิเล็กโทรโฟเรซิส (CE) เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย

ก่อนกระบวนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือหรือวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง ขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างมีความสำคัญต่อความถูกต้องต่อปริมาณที่ตรวจพบ โดยมากการเตรียมตัวอย่างจะอาศัยการสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อกำจัดสารอื่น ๆ ที่จะรบกวนกระบวนการวิเคราะห์ปริมาณซึ่งสามารถทำการสกัดด้วยสารละลายกรด เช่น กรดไตรคลอโรแอซิติก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์

คลอริก หรือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล เอทานอล เป็นต้น จากนั้นทำการกรองสารตัวอย่างเพื่อกำจัดกากตะกอนออกจนได้สารละลายใส

ตาราง 11 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	เอมีน	รีเอเจนต์
6%TCA	ปลา กะหล่ำปลีดอง ไวน์	ฮีสตามีน	OPA
0.1M HCl	ไวน์	ไบโอจีนิกเอมีน	OPA
0.6M $HClO_4$	เนื้อ	ไบโอจีนิกเอมีน	OPA
0.6M $HClO_4$	ไส้กรอก	ไบโอจีนิกเอมีน	OPA
0.6M $HClO_4$	ผลิตภัณฑ์ปลา	ไบโอจีนิกเอมีน	OPA
10%TCA	ซาร์ดีน	ฮีสตามีน	OPA
0.6M $HClO_4$	ชีส นม	ไบโอจีนิกเอมีน	OPA
0.1 M HCl	ชีส	ไบโอจีนิกเอมีน	OPA
0.1 M HCl	ชีส	ไบโอจีนิกเอมีน	แดนซิลคลอไรด์
0.1M HCl	ปลา ชีส เนื้อ	ไบโอจีนิกเอมีน	แดนซิลคลอไรด์
5%TCA	ปลา	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮีสตามีน สเปอร์มิดีน สเปอร์มีน	แดนซิลคลอไรด์
เมทานอล	ปลากระป๋อง	ไบโอจีนิกเอมีน	แดนซิลคลอไรด์
10%TCA	เนื้อ	ไทรามีน	แดนซิลคลอไรด์
0.1M HCl	ไส้กรอก	ไบโอจีนิกเอมีน	แดนซิลคลอไรด์
0.4M $HClO_4$	เนื้อ	ไบโอจีนิกเอมีน	แดนซิลคลอไรด์
บิวทานอล	ไวน์	ไบโอจีนิกเอมีน	แดนซิลคลอไรด์

TCA คือ กรดไตรคลอโรแอซิติก
OPA คือ ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์
ACN คือ อะซิโตไนไตรต์
HCl คือ กรดไฮโดรคลอริก
$HClO_4$ คือ กรดเปอร์คลอริก

ที่มา: J. Karovičová & Z. Kohajdova. (2005). *Biogenic Amines in Food*. p.75-77.

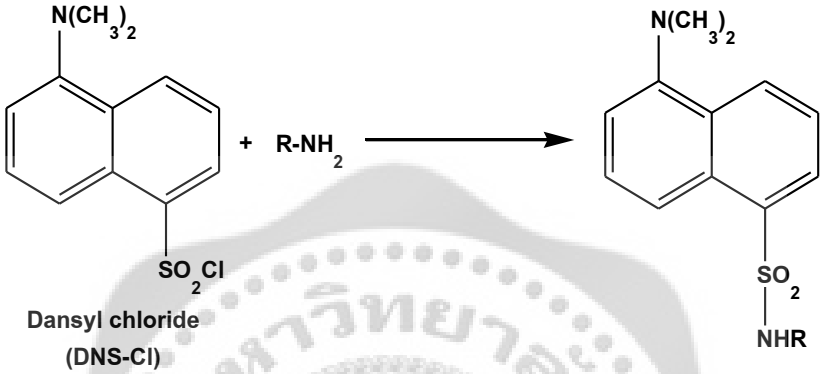
การวิเคราะห์แบบ Rapid Semi-Quantitative

โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางหรือ thin layer chromatography (TLC) มีกลไกการแยกสารโดยอาศัยการกระจายตัวของสารบนตัวดูดซับ (sorbent) และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน สารต่างชนิดกันจะถูกดูดซับได้แตกต่างกันที่ตัวเพลท วัฏภาคนิ่งในโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางนั้นเป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาหรืออะลูมินาที่เคลือยอยู่บนผิวแก้วหรือแผ่นอะลูมิเนียม จากนั้นนำสารละลายของสารผสมมาจุด (spot) ลงบนด้านล่างของแผ่นโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC plate) และรอให้แห้ง จากนั้นนำเพลตนี้ไปใส่ลงในภาชนะที่มีฝาปิด (chamber) ซึ่งภายในบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่มีปริมาตรต่ำกว่าจุดของสารตัวอย่าง และในภาชนะที่บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่จะต้องมีบรรยากาศที่อิ่มตัวด้วยไอระเหยของสารละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และการระเหยของตัวทำละลายในเพลตเกิดขึ้นน้อยที่สุดก่อนที่กระบวนการแยกสารจะเสร็จสมบูรณ์ เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ถึงจุดสูงสุดของเพลต (solvent front) จะนำเอาเพลตออกจากภาชนะที่บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่และบันทึกระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ก่อนที่ตัวทำละลายจะแห้งเพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \qquad (2)$$

การระบุชนิดของสารหลังจากที่ทำการแยกด้วยโครโทกราฟีแบบแผ่นบางทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า R_f ของสารในตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ข้อเสียคือค่า R_f ที่ได้จากการทดลองแต่ละครั้งในห้องปฏิบัติการจะมีค่าแตกต่างกันออกไปไม่มีความแม่นยำ (reproducibility) ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า R_f ของสาร คือ ลักษณะทางธรรมชาติของสาร อัตราการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาตรและองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ สภาวะในการเกิดสมดุล ความชื้นสัมบูรณ์ และวิธีการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางยังสามารถบอกถึงความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานได้ด้วย

Judite Lapa-Guimarães และ Jana Pickova ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแนบาง (TLC) ทำการศึกษาการแยกสารไบโอจีนิกเอมีนจำนวน 9 ชนิดได้แก่ แอกมาติน พิวเทรสซีน ทริปตามีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มิดีน ฮีสตามีน สเปอร์มีน ไทรามีน และเบตา-ฟีนิลเอทิลลามีน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้กับสารแดนซิลคลอไรด์ ปฏิกิริยาเกิดดังแสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 ปฏิกิริยาระหว่างแดนซิลคลอไรด์กับเอมีน

จากการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการพาสารให้เคลื่อนทั้งการศึกษาระบบที่เป็นแบบ single development – solvent system และระบบที่เป็นแบบ double development system ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 สารตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปเดี่ยว (single development – solvent system)

single development – solvent system	Ratio
คลอโรฟอร์ม : ไตรเอทิลลามีน	4 : 1
ไซโคลเฮกเซน : เอทิลแอซิเตต	1 : 1
ไซโคลเฮกเซน : ไดเอทิลอีเทอร์ : ไตรเอทิลลามีน	6 : 4 : 1
ไดเอทิลอีเทอร์ : อะซิโตน : ไตรเอทิลลามีน	10 : 2 : 1
คลอโรฟอร์ม : ไดเอทิลอีเทอร์ : ไตรเอทิลลามีน	4 : 1 : 1

ที่มา: Judite Lapa-Guimarães. & Jana Pickova. (2004). *New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid.* p. 225.

ตาราง 13 สารตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปคู่ (double development – solvent system)

double development – solvent system	**Ratio**
คลอโรฟอร์ม : ไตรเอทิลลามีน	4 : 1
ไดเอทิลอีเทอร์ : คลอโรฟอร์ม : อะซิโตน : ไตรเอทิลลามีน	4 : 6 : 1 : 1
ไซโคลเฮกเซน : เอทิลแอซิเตต	1 : 1
ไดเอทิลอีเทอร์ : อะซิโตน : ไตรเอทิลลามีน	10 : 2 : 1
คลอโรฟอร์ม : ไดเอทิลอีเทอร์ : ไตรเอทิลลามีน	6 : 4 : 1
ไดเอทิลอีเทอร์ : อะซิโตน : ไตรเอทิลลามีน	10 : 2 : 1
คลอโรฟอร์ม : ไดเอทิลอีเทอร์ : ไตรเอทิลลามีน	6 : 4 : 1
คลอโรฟอร์ม : ไตรเอทิลลามีน	6 : 1

ที่มา: Judite Lapa-Guimarães. & Jana Pickova. (2004). *New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid.* p. 225.

จากการแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางด้วยตัวทำละลายที่แสดงดังตาราง 12 และตาราง 13 ได้ผลการทดลองแสดงดังตาราง 14

ตาราง 14 ค่า R_f ของสารไบโอจีนิกเอมีนที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค TLC

Biogenic amines	**Retardation factor (R_f)**
แอกมาติน	0.00
คาร์ดาเวรีน	0.47
ฮีสตามีน	0.63
พิวเทรสซีน	0.34
สเปอร์มิดีน	0.59
สเปอร์มีน	0.73
ทริปตามีน	0.32
ไทรามีน	0.71

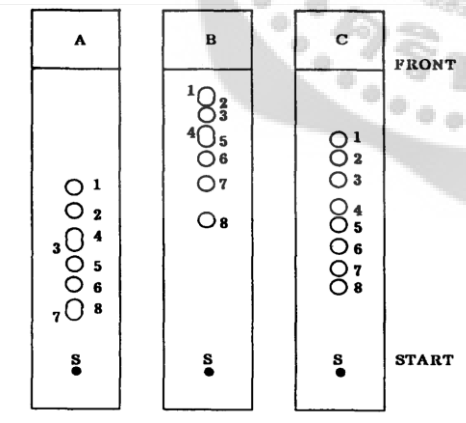
ตาราง 14 (ต่อ)

Biogenic amines	Retardation factor (R_f)
เบตา-ฟีนิลเอทิลลามีน	N.D.

N.D. คือไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีการนี้

ที่มา: Judite Lapa-Guimarães. & Jana Pickova. (2004). *New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid.* p. 226.

A. R. Shalaby ตรวจหาสารไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ฮีสตามีน คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน ฟีนิลเอทิลลามีน ไทรามีน ทริปตามีน สเพนนิน และสเปอร์มิดีนในอาหาร ได้แก่ ปลาเฮอริง รมควันจำนวน 9 ตัวอย่าง ชีสจำนวน 9 ตัวอย่าง และไส้กรอก 10 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 28 ตัวอย่างโดยทำการวิเคราะห์แบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางร่วมกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไบโอจีนิดเอมีนกับแดนซิลคลอไรด์ และใช้ระบบตัวทำละลายในการดีเวลลอป (developing solvent system) เป็น คลอโรฟอร์ม / เบนซีน / ไตรเอทิลลามีน อัตราส่วน 6:4:1 v/v/v และระบบที่สองใช้ เบนซีน / อะซิโตน / ไตรเอทิลลามีน อัตราส่วน 10:2:1 v/v/v วิธีการดังกล่าวสามารถแยกสารไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 8 ชนิดได้และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โดยภาพรวมสำหรับสารไบโอจีนิกเอมีนที่ปนเปื้อนในอาหาร



หมายเลข 1 คือ เบตา – ฟีนิลเอทิลลามีน
หมายเลข 2 คือ ไทรามีน
หมายเลข 3 คือ สเปอร์มีน
หมายเลข 4 คือ ฮีสตามีน
หมายเลข 5 คือ สเปอร์มิดีน
หมายเลข 6 คือ คาร์ดาเวรีน
หมายเลข 7 คือ พิวเทรสซีน
หมายเลข 8 คือ ทริปตามีน

ภาพประกอบ 5 แสดง TLC Plate ในการแยกสารไบโอจีนิกเอมีน
A คือ คลอโรฟอร์ม/เบนซีน/ไตรเอทิลลามีน (6:4:1 v/v/v)
B คือ เบนซีน/อะซิโตน/ไตรเอทิลลามีน (10:2:1 v/v/v)
C คือ การผสมระหว่าง A:B

ที่มา: A. R. Shalaby. (1995). *Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health*. p. 369.

ตาราง 15 ค่า R_f และสีของสารอนุพันธ์แดนซิลคลอไรด์

ไบโอจีนิกเอมีน	R_f	สีของสารอนุพันธ์
ทริปตามีน	0.45	เขียว – เหลือง
พิวเทรสซีน	0.49	เขียว
คาร์ดาเวรีน	0.57	เขียว
สเปอร์มิดีน	0.62	เขียว
ฮีสตามีน	0.66	ส้ม – เหลือง
สเปอร์มีน	0.71	เขียว
ไทรามีน	0.78	เหลือง
ฟีนิลเอทิลลามีน	0.81	น้ำเงิน

ที่มา: A. R. Shalaby. (1995). *Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health*. p. 369.

วิธีทางโครมาโทกราฟี (Chromatographic methods)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการใช้วิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างที่สนใจ ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์เชิงปริมาณจะอาศัยการทำปฏิกิริยากับสารอื่นเพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติทางเคมีเปลี่ยนไปและเหมาะกับตัวตรวจวัดสัญญาณที่ใช้ สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับสารไบโอจีนิกเอมีน เช่น แดนซิลคลอไรด์ เบนโซอิลคลอไรด์ ฟลูออเรสซีน 9–ฟลูออรีนิลเมทิลคลอโรเมตออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ แนฟทาลีน-2,3-ไดคาร์บอกซาลดีไฮด์ เอ็น-แอซิติลซิสเตอีน 2-เมอร์แคปโตเอทานอล เป็นต้น ซึ่งแดนซิลคลอไรด์มีข้อจำกัดเรื่องความเสถียรและแดนซิลคลอไรด์มีความไวต่อแสง รวมทั้งในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้ความร้อนและใช้เวลานาน สำหรับเบนโซอิลคลอไรด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารเอมีนปฐมภูมิและทุติยภูมิได้ และมีความเสถียรไม่ไวต่อแสงแต่สารมีกลิ่นเหม็น แต่ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เป็นรีเอเจนต์ที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์ ปฏิกิริยาเกิดใน

สภาวะที่เป็นเบส เช่นบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2-9.5 ข้อดีของออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์คือเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารไบโอจีนิกเอมีนโดยใช้เวลาประมาณ 30 วินาทีถึง 3 นาที

วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถทำได้ทั้งคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ข้อมูลที่ได้จากโครมาโทแกรมที่ใช้บ่งชี้ด้านคุณภาพวิเคราะห์ คือค่าระยะเวลารีเทนชัน ที่สภาวะในการทดลองเดียวกันทั้งวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคนิ่ง องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนนั้นเป็นปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาระยะเวลารีเทนชันของสารในการแยกด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟี สำหรับการแยกอนุพันธ์ของสารผสมของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิครีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต้องหาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถแยกสารทั้งสามให้แยกออกจากกันอย่างเด็ดขาด และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นที่สุด ซึ่งกระบวนการศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่สามารถทำได้โดยใช้การลองผิดลองถูก (try and error)

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารด้วยระบบรีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีนั้นจะประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ เช่น การเลือกคอลัมน์ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารที่สะดวกที่สุดคือการออพติไมซ์วัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น การปรับความแรงของวัฏภาคเคลื่อนโดยการเพิ่มร้อยละของอะซิโตไนไตรต์ที่เป็นองค์ประกอบในวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ความสามารถในการชะสารได้ดียิ่งขึ้นเนื่องจากความมีขั้วเพิ่มมากขึ้น แต่สิ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ ความสามารถในการละลายซึ่งกันและกันระหว่างอะซิโตไนไตรต์กับแอซิเตตบัฟเฟอร์ การปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อให้ได้ค่าแคพปาซิตี้แฟกเตอร์ (k') ที่เหมาะสมซึ่งสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงร้อยละของตัวทำละลายอินทรีย์จนกระทั่งพีกสองพีคที่อยู่ติดกันสามารถแยกออกจากกันได้อย่างเด็ดขาด ซึ่งแคพปาซิตี้แฟกเตอร์เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่ออธิบายอัตราการเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์ ค่า k' สามารถคำนวณได้จากโครมาโทแกรมตามสมการ 3

$$k' = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M} \qquad (3)$$

ในขั้นตอนของการวิเคราะห์นั้นมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการแยก ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสามารถในการแยกสารทั้งสามชนิดให้แยกออกจากกันได้อย่างเด็ดขาด คือการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อน และการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่นี้ยังส่งผลต่อความเสถียรและระยะเวลาการใช้งานของคอลัมน์ ในการทดลองที่มีการใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นองค์ประกอบในวัฏภาคเคลื่อนที่จะต้องมีการเลือกใช้คอลัมน์ที่สามารถทนทานต่อช่วง pH ที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากอนุภาคของซิลิกาอาจจะเกิดการละลายและหลุดออกจากคอลัมน์ได้ ซึ่งจะส่งผลต่อการแยกสารในระยะยาว และสิ่งที่สำคัญอีก

ประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ ต้องมีการทดสอบความสามารถในการละลายซึ่งกันและกันระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์กับตัวทำละลายอินทรีย์เมื่อจำเป็นต้องใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายผสมสองชนิด เนื่องจากการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์และตัวทำละลายอินทรีย์จะเกิดการตกตะกอนของสารละลายบัฟเฟอร์ในคอลัมน์ได้ และต้องเป็นสารเคมีที่มีความบริสุทธิ์สูงในระดับ “HPLC grade” เนื่องจากเมื่อมีการปนเปื้อนของสารเคมีอื่น ๆ เมื่อนำมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่จะส่งผลต่อระบบของโครมาโทกราฟี เช่น การเกิดพีคที่ไม่ต้องการ (ghost peak) ส่วนความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลอย่างมากต่อระยะเวลารีเทนชันของสารอนุพันธ์ที่ทำการแยก

ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อค่าการแยก (resolution; R_S) ของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนก็คืออัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ เนื่องจากการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีความเกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่วัฏภาคเคลื่อนที่จะสัมผัสกับวัฏภาคนิ่ง การเพิ่มอัตราการไหลจะทำให้สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น ประสิทธิภาพในการแยกลดลงเนื่องจากสารและวัฏภาคนิ่งไม่เกิดอันตรกิริยาซึ่งกันและกันทำให้ความจำเพาะในการแยกลดลง สำหรับการใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่น้อยเกินไปจะใช้ระยะเวลาในการแยกสารนาน และแถบของสารจะเกิดการแพร่ตามแนวยาวของคอลัมน์ได้มากขึ้น ทำให้ค่าการแยกลดลงเนื่องจากพีกที่ได้มีลักษณะของฐานพีคกว้าง และเกิดพีคมีหาง ประสิทธิภาพในการแยกลดลง และใช้ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่มากขึ้น ทำให้มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสิ้นเปลืองงบประมาณในการวิเคราะห์ ค่าการแยกสามารถคำนวณได้จากโครมาโทแกรมโดยใช้สมการที่ 4

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \qquad (4)$$

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

Shigeyuki Oguri และคณะใช้เทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโครมาโทกราฟี (CEC) วิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ฮีสตามีน ซีโรโทนิน ไทรามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างอาหารที่มีสารรบกวนการวิเคราะห์จำนวนมาก วิธีนี้อาศัยการทำอนุพันธ์กับสารออร์โท-พาลไดอัลดีไฮด์ / 2-เมอร์แคปโตเอทานอล แบบ on – column derivatization ร่วมกับการฉีดสารแบบอิเล็กโตรไคเนติกอินเจ็คชัน (electrokinetic – injection) ใช้ฟิวส์ซิลิกาแคปปิลลารีคอลัมน์ (fused – silica capillary column) ที่มีความยาวเท่ากับ 45 cm และมีความยาวของ effective length เท่ากับ 25 cm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 μm และแพ็กคอลัมน์ด้วยอนุภาค ODS ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคเท่ากับ 5 μm การวิเคราะห์ใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์

pH 10 ที่มีออร์โท – พทาลไดอัลดีไฮด์ / 2 – เมอร์แคปโตเอทานอลละลายอยู่ด้วย และติดตามการเปลี่ยนของสัญญาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm

R. Hanczkó และ I. Molnár-Perl ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนและเอมีนโดยอาศัยการทำอนุพันธุ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ (*O*-phthaldialdehyde ; OPA) และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (MCE) ซึ่งใช้วิธีการนี้ในการจำแนกชนิดของโปรตีนและกรดอะมิโน ศึกษาสารอะลิฟาติกเอมีนที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ C_1-C_4 สารพอลิเอมีน และอัตราส่วนระหว่าง OPA/MCE ศึกษาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและเอมีน กับ OPA/MCE และศึกษาองค์ประกอบของรีเอเจนต์ คือ สัดส่วนโมลระหว่าง OPA กับ SH-group ที่เติมลงไปในปฏิกิริยา และยังทำการศึกษาความเสถียรของสารอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของ OPA/MCE กับกรดอะมิโนและเอมีนจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสิ่งที่ส่งผลต่อความเสถียรของสารอนุพันธ์ คือ ขั้นตอนของการเตรียมและสภาวะในการเก็บรักษารีเอเจนต์ OPA รวมทั้งความไม่เสถียรของกรดอะมิโนและเอมีนเนื่องจากสารทั้งสองประเภทนี้สามารถที่จะเกิดการแตกตัวและมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจากโครงสร้างแบบเดิม และสัดส่วนโมลของ OPA/SH additive/กรดอะมิโน/เอมีน

ตาราง 16 วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่าง	เอมีน	เทคนิค	รีเอเจนต์	ผู้วิเคราะห์
ผลิตภัณฑ์ปลา	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มิดีน ฮีสตามีน ไทรามีน	TLC, HPLC	แดนซิลคลอไรด์	R. Jeya Shikila et al.
ปลาทูน่า	ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ไทรามีน	HPLC	ออร์โท-พทาไดอัลดีไฮด์ (OPA)	Saeed Tahmouzi et al.
เบียร์	ไทรามีน ฟีนอลเอทิลลามีน	HPLC	2, 6-dimethyl-4-quinolinecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (DMQC-OSu)	Huang, Ke-Jing et al.

ตาราง 16 (ต่อ)

ตัวอย่าง	เอมีน	เทคนิค	รีเอเจนต์	ผู้วิเคราะห์
ไส้กรอกแห้ง	ไทรามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮีสตามีน สเปอร์มิดีน ฟีนิลเอทิลลามีน ทริปตามีน สเปอร์มีน	HPLC	ออร์โท-พทาไดอัลดีไฮด์ (OPA)	Ekaterini J. Papavergou
ปลา	ฮีสตามีน	GC	-	Bao-Shyung Hwang et al.
ไวน์องุ่น	กรดอะมิโน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน	HPLC	ออร์โท-พทาไดอัลดีไฮด์ (OPA)	Mary T. Kellya et al.
ไวน์ข้าว	ออกโทพามีน ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน	HPLC	2,6-ไดเมทิล-4-ควิโนลีน คาร์บอกซิลิกเอซิด และ เอ็น-ไฮดรอกซีซักซินิไมด์ เอสเทอร์	Ke-Jing Huang et al.
ไวน์	เมทิลลามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ทริปตามีน ฟีนิลเอทิลลามีน สเปอร์มิดีน ฮีสตามีน ไทรามีน แอกมาติน	HPLC	เบนโวอิลคลอไรด์และออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์	Özgül Özdestan & Ali Üren

ตาราง 16 (ต่อ)

ตัวอย่าง	เอมีน	เทคนิค	รีเอเจนต์	ผู้วิเคราะห์
เบียร์	พิวเทรสซีน ฮีสตามีน ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน สเปอร์มีน สเปอร์มิดี ทริปตามีน	HPLC	4-คลอโร-3,5-ไดไนโตรเบนโซไตรฟลูโอไรด์ (CNBF)	Tao Tang et al.
ซอสถั่วเหลือง น้ำปลา	ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน สเปอร์มิดีน สเปอร์มีน	HPLC	3,5-ไดไนโตรเบนโซอิล	Jochen Kirschbaum et al.
เนื้อหมัก	สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน ฟีนิลเอทิลลามีน ไทรามีน ฮีสตามีน	HPLC	แดนซิลคลอไรด์	E. De Mey et al.
ชีส	ทริปตามีน ฟีนิลเอทิลลามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮีสตามีน ไทรามีน สเปอร์มิดีน สเปอร์มีน	HPLC	แดนซิลคลอไรด์	N. Innocente et al.

ตาราง 16 (ต่อ)

ตัวอย่าง	เอมีน	เทคนิค	รีเอเจนต์	ผู้วิเคราะห์
-	ฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน	HPLC	2-chloroethylnitrosourea (CENU)	O. Vandenabeele et al.
-	ฮีสตามีน	FIA	ออร์โท-พทาไดอัลดีไฮด์ (OPA)	James M. Hungerford et al.
อาหารจากลำไส้	เมทิลลามีน เอทิลลามีน โพรพิลลามีน บิวทิลลามีน แอกมาติน ฟีนิลเอทิลลามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮีสตามีน ไทรามีน สเปอร์มิดีน สเปอร์มีน ไดเมทิลลามีน	HPLC	แดนซิลคลอไรด์	Saarinen M. T
ปลาหมัก	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮีสตามีน ไทรามีน สเปอร์มิดีน สเปอร์มีน	HPLC	แดนซิลคลอไรด์	Jae-Hyung Mah et al.

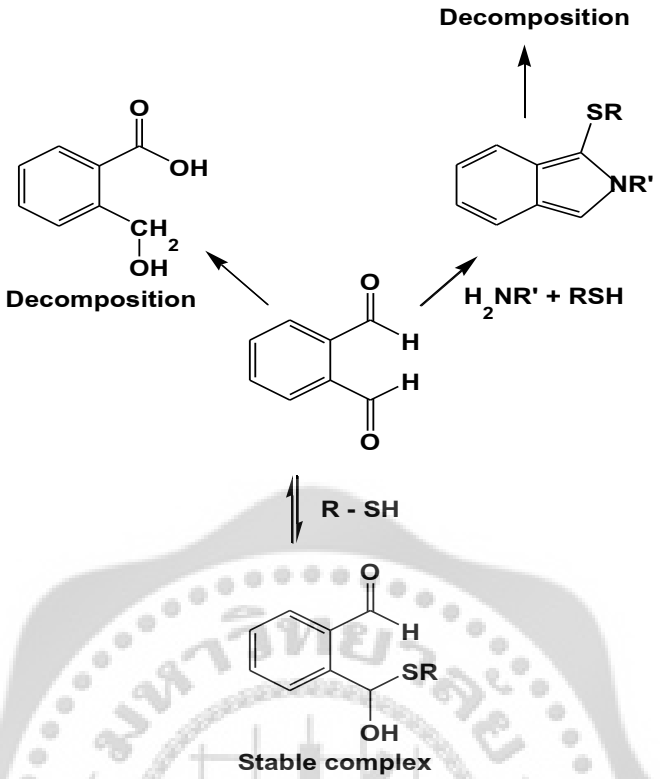
ตาราง 16 (ต่อ)

ตัวอย่าง	เอมีน	เทคนิค	รีเอเจนต์	ผู้วิเคราะห์
เนื้อและชีส	ทริปตามีน ฟีนิลเอทิลลามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ไทรามีน สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน		แดนซิลคลอไรด์	Moret Sabrina
ถั่วเหลือง หมัก	พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ทริปตามีน ฟีนิลเอทิลลามีน สเปอร์มิดีน ฮีสตามีน ไทรามีน แอกมาติน	HPLC	เบนโซอิลคลอไรด์	Jae-Hyun Kim et al.
ชีส	สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน แอกมาติน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮีสตามีน ไทรามีน ฟีนิลเอทิลลามีน ทริปตามีน	HPLC	ออร์โท-พทาไดอัลดีไฮด์ (OPA)	Custódio, Flávia Beatriz et al.
ปลากระป๋อง	ฮีสตามีน	HPLC	ออร์โท-พทาไดอัลดีไฮด์ (OPA)	Peng, Jin-feng et al

ตาราง 16 (ต่อ)

ตัวอย่าง	เอมีน	เทคนิค	รีเอเจนต์	ผู้วิเคราะห์
เบียร์	พิวเทรสซีน ฮีสตามีน ฟีนิลเอทิลลามีน ไทรามีน สเปอร์มีน สเปอร์มิดีน ทริปตามีน	HPLC	4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBF)	Tang, Tao et al.

ในงานวิจัยนี้อาศัยหลักการเตรียมสารอนุพันธ์ของสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิด ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เกิดสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงได้ ปฏิกิริยาระหว่างเอมีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนิลนั้นเป็นปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation reaction) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์กับสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดจะใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลทำหน้าที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ (2-mercaptoethanol; MCE) ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนและเอมีน ซึ่งวิธีการนี้เสนอโดย Roth เมื่อปี ค.ศ.1971 ซึ่งรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือเอมีนคือออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์ และต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนและเอมีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รวมทั้งมีการศึกษาผลกระทบต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เช่น การศึกษาชนิดของรีดิวซิงเอเจนต์ ได้แก่ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล อีเทนไทอัล หรือ 3-เมอร์แคปโตโพรพิโอนิกแอซิด เป็นต้น ปฏิกิริยาเกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่เป็นเบสและมีสารประกอบไทอัล (thiol; -SH) เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพียง 1 นาทีเท่านั้นและไม่ต้องอาศัยความร้อนในการเกิดปฏิกิริยาถือเป็นข้อดีเนื่องจากช่วยประหยัดเวลาในการทดลองและลดขั้นตอนของการเตรียมอนุพันธ์ หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นไอโซอินโดล (isoindole derivatives) ดังภาพประกอบ

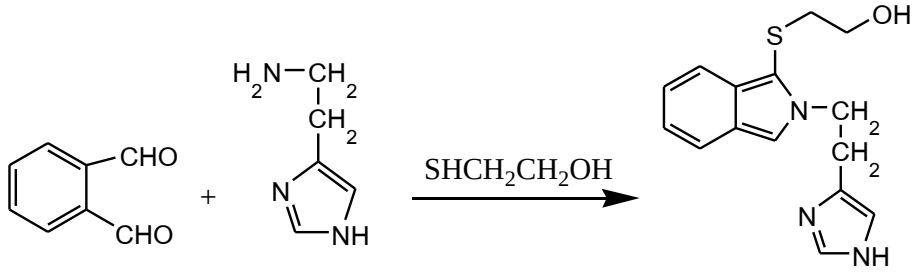


ภาพประกอบ 6 ปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นระหว่างออร์โท – พทาลไดอัลดีไฮด์ (OPA) กับสารไบโอจีนิกเอมีนและ 2 – เมอร์แคปโตเอทานอล (RSH)

ที่มา : R.C. Dorresteijn; et al. (1996). *Determination of Amino Acid Using O – Phthalaldehyde - 2 – Mercaptoethanol Derivatization Effect of Reaction Condition. p.*160.

ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เป็นรีเอเจนต์ที่นิยมใช้ในการทำอนุพันธ์กับกรดอะมิโนและเอมีน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนพร้อมกันโดยใช้ตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์แต่การแยกสารต้องใช้เวลานาน การวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในอาหารจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนของการสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนออกมาจากตัวอย่างอาหารเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญสำหรับงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทย 3 ชนิดซึ่งมีลักษณะทางกายภาพเป็นของแข็ง การสกัดสารตัวอย่างโดยทั่วไปนิยมใช้สารละลายกรด เบส บัฟเฟอร์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้เพื่อความจำเพาะในการสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนจะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพราะค่า pH ที่แตกต่างกันจะสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนแต่ละชนิดได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน และเพื่อให้มั่นใจได้ว่าเป็นวิธีการสกัดที่มีความเหมาะสมและมีความแม่นยำ (reproducibility) จะต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องหรือปรับปรุงวิธีการสกัด

การทำอนุพันธ์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปริมาณโดย มีวัตถุประสงค์เพื่อเปลี่ยนแปลงหรือปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีของสารให้มีความเหมาะสมต่อเครื่องตรวจวัดและเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์



OPA **Histamine** **Isoindole derivative**

ภาพประกอบ 7 ปฏิกิริยาระหว่างฮีสตามีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์/2-เมอร์แคปโตเอทานอล

ที่มา: Laurance Coppex; (2000). p.17.

2-เมอร์แคปโตเอทานอล ($SHCH_2CH_2OH$) ทำหน้าที่เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ที่ได้รับความนิยมมากในการทำปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ / 2–เมอร์แคปโตเอทานอล ส่งผลต่อความถูกต้องในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน (R.C. Dorresteijn; et al. 1996: 159) ปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ที่ดีควรเป็นปฏิกิริยาที่เกิดได้รวดเร็ว สามารถหาปริมาณได้อย่างแม่นยำ และเป็นปฏิกิริยาที่ให้สารผลิตภัณฑ์ร่วม (by-product) น้อย

ในการทำการวิเคราะห์สารตัวอย่าง จำเป็นต้องรายงานผลการวัดออกมาเป็นที่ยอมรับกันได้นั้นต้องมีการรายงานเพื่อสามารถแสดงผลการทดสอบด้วยเครื่องมือเพื่อบอกประสิทธิภาพของกระบวนการวิเคราะห์ เช่น ขีดจำกัดในการตรวพบ (limit of detection; LOD) หมายถึงปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างมีความแม่น ในกรณีที่ทดสอบสารมีปริมาณน้อย จำเป็นต้องรายงานค่าขีดจำกัดในการตรวจพบด้วย LOD เป็นคุณสมบัติของการวัดที่แสดงความสามารถของวิธีในการตรจวัด การตรวจสอบ LOD ทำได้หลายวิธีที่นิยมคือ การทดสอบแบลค์ของตัวอย่างหรือตัวอย่างที่มีสารสนใจปริมาณต่ำมาก ๆ ทำการทดสอบซ้ำและคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) หมายถึงปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้อย่างมีความเที่ยงและแม่นยำ ค่า LOQ เป็นคุณสมบัติของการวัดที่แสดงความสามารถของวิธีในการรายงานปริมาณที่ตรวจวัดได้โดยมีความมั่นใจว่ามีความเที่ยง ความแม่น

ความเที่ยง (precision) พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับสมรรถนะของการวิเคราะห์เนื่องจากความเที่ยงคือความซ้ำของผลการวิเคราะห์ โดยทั่วไประบุค่าความเที่ยงในเทอมของการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) หรือ การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standard deviation; RSD) หรืออาจเรียกเป็นสัมประสิทธิ์การผันแปร (coefficient of variation; CV) ค่า RSD คำนวณได้ดังนี้

$$RSD = \frac{(SD)\times 100}{X} \qquad (5)$$

ความแม่น (accuracy) หมายถึงความใกล้เคียงของผลการทดลองที่ได้กับค่าจริง โดยทั่วไปจะบอกความแม่นเป็นร้อยละของการกลับคืน (percentage recovery) ของสารเป้าหมายที่ทราบปริมาณ นอกจากนี้ความแม่นอาจหาจากการเติมสารเป้าหมาย (spike) ที่ทราบปริมาณลงในตัวอย่างแล้วคำนวณผลที่ได้เป็นค่าการได้กลับคืน การตรวจสอบร้อยละการคืนกลับสามารถหาได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{\text{ปริมาณของสารที่แยกออกมาได้}}{\text{ปริมาณของสารที่มีอยู่เริ่มต้น}} \times 100 \qquad (6)$$

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ตัวตรวจวัดแบบ fluorescence (รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard โดยใช้คอลัมน์ C18 (5 ไมครอน, 3.9x150 mm) จากบริษัท Waters
- เครื่องฟลูออเรสเซนต์สเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น JASCO FP-6200
- ปิเปตต์ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตต์ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB204s) จากบริษัท METTLER TOLEDO
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (รุ่น LaboStar) จากบริษัท SIEMENS
- เครื่องวัดพีเอช (รุ่น Cyberscan 500)
- เครื่องเขย่า (รุ่น Vortex-genie 2) จากบริษัท Scientific
- เครื่องเซ็นตริฟิวจ์ (รุ่น Zentrifugen EBA 8S)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- ไซริงจ์กรองขนาด 0.45 ไมครอน

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- อะซิโตไนไตรต์	(HPLC grade)	
- แอมโมเนียมแอซิเตต	(AR Grade)	จากบริษัท MERCK
- ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์	(AR Grade)	จากบริษัท ACROS
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล	(AR Grade)	จากบริษัท MERCK
- ฮีสตามีนไดไฮโดรคลอไรด์	(AR Grade)	จากบริษัท Fluka
- พิวเทรสซีนไดไฮโดรคลอไรด์	(AR Grade)	จากบริษัท Fluka
- คาร์ดาเวรีนไดไฮโดรคลอไรด์	(AR Grade)	จากบริษัท Sigma Aldrich
- กรดอะมิโนฮีสติดีน	(AR Grade)	จากบริษัท Fluka
- กรดอะมิโนออร์นิทีน	(AR Grade)	จากบริษัท Fluka
- กรดอะมิโนไลซีน	(AR Grade)	จากบริษัท Fluka
- โซเดียมไฮดรอกไซด์	(AR Grade)	จากบริษัท CARLO ERBA

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

- กรดไฮโดรคลอริก (AR Grade) จากบริษัท MERCK
- โซเดียมคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- กรดไตรคลอโรแอซิติก (AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich
- กรดเปอร์คลอริก (AR Grade) จากบริษัท Ajax Finechem
- บอแรก (AR Grade) จากบริษัท APS Finechem
- กรดบอริก (AR Grade) จากบริษัท Fluka
- เมทานอล (HPLC Grade) จากบริษัท MERCK
- เอทานอล (AR Grade) จากบริษัท Mallinckrodt
- กรดแอซิติก (AR Grade) จากบริษัท QRëC

3. ตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมือง

- ไส้กรอกอีสาน ตลาดนัดมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
- ไส้อั่ว ตลาดนัดจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- หม่ำ จังหวัดขอนแก่น

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ โดยการชั่งสารมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์มา 25.0000 mg ละลายด้วยเมทานอล 1.0 mL เติม 20 µL ของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 5 mL ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.4 M (pH 9.5 ปรับ pH ด้วย 1.0 M โซเดียมไฮดรอกไซด์)

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยการชั่งสารมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนแยกกันอย่างละ 0.1000 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออนเก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ -4 ^{O}C

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน โดยการชั่งสารมาตรฐานกรดอะมิโนฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน แยกกันอย่างละ 0.1000 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำ ปราศจากไอออน เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ -4 ^{O}C

1.1 การศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธุ์ระหว่างฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์

1.1.1 ตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ที่ควาเข้มข้นอย่างละ 20 ppm โดยเตรียมปริมาตร 50 mL

1.1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานฮีสตามีนความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 3 mL ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายมาตรฐานฮีสตามีนเข้มข้น 20 ppm อยู่ ผสมสารละลายให้ผสมกันด้วยเครื่อง vortex

1.1.3 ตั้งสารละลายผสมที่เตรียมได้ในมี่มืดเพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยา พร้อมทั้งจับเวลาให้เกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที

1.1.4 นำสารอนุพันธ์ที่ได้ไปสแกนสเปกตรัมเพื่อหาค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) โดยการสแกนที่ค่าความยาวคลื่น 200 – 800 nm บันทึกสเปกตรัมที่ได้

1.1.5 หาค่าความยาวคลื่นในการวาวแสงของพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 1.1.1-1.1.4

ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่

- คอลัมน์เป็น C18 (5 μm, 3.9x150 mm)
- วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ 100 mM แอมโมเนียมแอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 (A) : อะซิโตไนไตรต์ (B) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A : B เริ่มต้นที่อัตราส่วน 75:25 v/v ถึงอัตราส่วน 82:18 v/v
- ควบคุมอัตราการไหลตั้งแต่ 0.9 - 1.5 mL/min
- ใช้ฟลูออเรสเซ็นต์ดีเทคเตอร์เป็นตัวตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่น λ_{ex} และ λ_{em} ที่ได้จากหัวข้อ 1.1.4
- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์อยู่ที่ 20 μL
- ฉีดสารอนุพันธุ์ที่ปริมาตร 20 μL เข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยครั้งแรกจะทำการตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อน A : B เป็น 75 : 25 v/v และมีอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เตอนเริ่มต้นเป็น 0.9 mL/min โดยทำการทดสอบกับสารอนุพันธุ์ทั้งหมด จำนวน 3 ครั้ง

1.2 การศึกษา pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์

1.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM pH 4.5 ปริมาตร 1 L

1.2.2 วัดค่า pH ให้ได้ค่า pH 5.8 ด้วยเครื่อง pH meter ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮ ดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 M จากนั้นกรองสารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์ด้วยชุดกรอง วัฏภาคเคลื่อนที่

1.2.3 ตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่คือแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 4.5) ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนตอนเริ่มต้นเป็น 81:19 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 mL/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งค่า pH

1.2.4 เปลี่ยนค่า pH เป็น แอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM pH 5.0, pH 5.4, pH 5.8 และ 6.2 ตามลำดับ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์เป็น 81:19 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 mL/min และแต่ละค่า pH จะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

1.2.5 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

1.2.6 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH (แกนนอน) กับพื้นที่พีค (แกนตั้ง)

1.3 การศึกษาหาอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์

1.3.1 เตรียมสารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ปริมาตร 1 L

1.3.2 วัดค่า pH ให้ได้ค่า pH 5.8 ด้วยเครื่อง pH meter ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 M จากนั้นกรองสารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์ด้วยชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่

1.3.3 ตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนตอนเริ่มต้นเป็น 75:25 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 mL/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.3.4 เปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่จาก 75:25 v/v เป็นอัตราส่วน 77:23 v/v 78:22 v/v 80:20 v/v 81:19 v/v และ 82:18 v/v ตามลำดับและมีอัตราการไหลคงที่ที่ 1.1 mL/min จะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำต่อหนึ่งอัตราส่วน

1.3.4 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

1.3.5 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ (แกนนอน) กับพื้นที่พีค (แกนตั้ง)

1.4 การศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

1.4.1 เตรียมสารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ปริมาตร 1 L

1.4.2 วัดค่า pH ให้ได้ค่า pH 5.8 ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 M จากนั้นกรองสารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์ด้วยชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่

1.4.3 ตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แอซิเตตบัฟเฟอร์ 100 mM (pH 5.8) ต่อ

อะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนตอนเริ่มต้นเป็น 81:19 v/v และมีอัตราการไหลคงที่ที่ 0.9 mL/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.4.4 เปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จาก 0.9 mL/min เป็น 1.0 1.1 1.2 และ 1.5 mL/min ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งอัตราการไหล

1.4.5 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์

1.4.6 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหล (แกนนอน) กับเวลารีเทนชัน (แกนตั้ง)

1.5 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดปริมาณ

1.5.1 เตรียมสารละลายแบลงค์ (blank) จำนวน 10 ขวด โดยการปิเปตน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 3 ml ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ จากนั้นเติมสารละลายออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ 20 μL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งในที่มืดให้เกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที

1.5.2 กรองสารละลายแบลงค์ด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 μm แล้วเก็บสารละลายที่ได้ใส่ใน vial ทึบแสงจำนวน 10 ขวด ติดฉลาก

1.5.3 ฉีดสารละลายแบลงค์เข้าสู่ระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จำนวน 10 ครั้ง

1.5.4 บันทึกโครมาโทแกรมของแบลงค์

1.5.5 ปิเปตสารละลายใสของตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5) มาปริมาตร 3 mL ลงในหลอดทดลอง

1.5.6 เติมสารละลายออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 1 นาที จะได้สารอนุพันธ์เป็นสารละลายใส กรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 μm เก็บสารละลายที่กรองได้ลงใน vial ทึบแสง

1.5.7 ฉีดสารละลายของอนุพันธ์เข้าสู่ระบบเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จำนวน 7 ครั้ง

1.5.8 บันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำข้อมูลของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD; S/N>3) และขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (LOQ; S/N> 10)

1.6 การหาค่าความถูกต้องของวิธี

1.6.1 ชั่งสารละลายตัวอย่างนำหนัก 5 ± 0.0500 g เติมสารละลายมาตรฐานของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ให้มีความเข้มข้นเป็น 40 ppm โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

1.6.2 เติมสาละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5) ปริมาตร 5 mL จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 5.8) ลงไปอีก 5 mL

1.6.3 นำสารละลายไปเย่านาน 5 นาที จากนั้นนำปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซ็นตริฟิวจ์ขณะเย็น 5 นาที เพื่อกำจัดไขมัน ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5)

1.6.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (spike) มา 3 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 1 นาที

1.6.5 กรองสารอนุพันธ์ด้วยตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.45 μm ใส่ลงใน vial ทึบแสง

1.6.6 ฉีดสารอนุพันธ์เข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.6.7 บันทึกโครมาโทแกรม แล้วนำข้อมูลของสัญญาณการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

โดยคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับจะคำนวณ จากสมการ

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_{\text{spiked}} - C_{\text{in sample}}}{C_{\text{added}}} \times 100$$

การสร้างกราฟมาตรฐาน ปิเปตสารละลายผสมของฮีสตามีน พิวเมรสซีน และคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 0.25 ppm ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดพลาสติกแล้วเติมสารละลายออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ 20 μL เขย่าให้ผสมกันนาน 2 นาทีนำสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นใช้วิธีการเดียวกันนี้เพื่อวิเคราะห์สารละลายผสมที่ความเข้มข้น 1, 2, 5, 10, 20, และ 40 ppm ตามลำดับ

ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์

2.1 การศึกษากรดอะมิโนฮีสติดีนที่ส่งผลต่อการแยก

2.1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนฮีสติดีน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 40 ppm อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลองผสมด้วยเครื่อง Vortex

2.1.2 ปิเปตสารละลายผสมมา 1 mL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL รอให้เกิดปฏิกิริยา 1 นาที

2.1.3 นำสารอนุพันธ์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้ระบบที่ได้ทำการศึกษาแล้วตามตอนที่ 1

2.2 การศึกษากรดอะมิโนออร์นิทีนที่ส่งผลต่อการแยก

2.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนออร์นิทีน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 40 ppm อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่อง Vortex

2.2.2 ปิเปตสารละลายผสมมา 1 mL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL รอให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที

2.2.3 นำสารอนุพันธ์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้ระบบที่ได้ทำการศึกษาแล้วตามตอนที่ 1

2.3 การศึกษากรดอะมิโนไลซีนที่ส่งผลต่อการแยก

2.3.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไลซีน ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 40 ppm อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่อง Vortex

2.3.2 ปิเปตสารละลายผสมมา 1 mL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL รอให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที

2.3.3 นำสารอนุพันธ์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ภายใต้ระบบที่ได้ทำการศึกษาแล้วตามตอนที่ 1

2.4 การศึกษากรดไฮโดรคลอริกที่ส่งผลต่อการเกิดอนุพันธ์

2.4.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ฮีสตามีน พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 40 ppm อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่อง Vortex

2.4.2 ปิเปตสารละลายผสมมา 1 mL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 mL รอให้เกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลาย มาตรฐารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 μL รอให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที

2.4.3 นำสารอนุพันธุ์ที่ได้ไปมำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้ระบบที่ได้ทำการศึกษาแล้วตามตอนที่ 1

2.4.4 ทำการทดลองตามข้อ 2.4.2 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 M ตามลำดับ

2.4.5 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (แกนนอน) กับความเข้มแสง (แกนตั้ง)

2.5 การศึกษาโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ส่งผลต่อการเกิดอนุพันธ์

2.5.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ฮีสตามีน พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 20 ppm อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่อง Vortex

2.5.2 ปิเปตสารละลายผสมมา 1 mL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 M ปริมาตร 1 mL รอให้เกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 µL รอให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที

2.5.3 นำสารอนุพันธ์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ภายใต้ระบบที่ได้ทำการศึกษาแล้วตามตอนที่ 1

2.5.4 ทำการทดลองตามข้อ 2.5.2 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 M ตามลำดับ

2.5.5 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (แกนนอน) กับความเข้มแสง (แกนตั้ง)

2.6 การศึกษาเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ส่งผลต่อการเกิดอนุพันธ์

2.6.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน ฮีสตามีน พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 20 ppm อย่างละ 1 mL ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่อง Vortex

2.6.2 ปิเปตสารละลายผสมมา 1 mL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 w/v ปริมาตร 1 mL รอให้เกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 µL รอให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที

2.6.3 นำสารอนุพันธุ์ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้ระบบที่ได้ทำการศึกษาแล้วตามตอนที่ 1

2.6.4 ทำการทดลองตามข้อ 2.6.2 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 4 6 8 และ 10 w/v ตามลำดับ

2.6.5 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (แกนนอน) กับความเข้มแสง (แกนตั้ง)

ตอนที่ 3 ศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมือง

3.1 การเตรียมตัวอย่างไส้กรอก

3.1.1 การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 5 mL จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M ลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 นำตะกอนที่เหลือไปสกัดอีก 2 ครั้งกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M ครั้งละ 5 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M

3.1.2 การสกัดด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกแอซิด

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5 % ปริมาตร 5 mL จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติมกรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5 % ลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 นำตะกอนที่เหลือไปสกัดอีก 2 ครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5 % ครั้งละ 5 mL ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วย กรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5 %

3.1.3 การสกัดด้วยกรดเปอร์คลอริก

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 5 mL จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M ลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 นำตะกอนที่เหลือไปสกัดอีก 2 ครั้งด้วยด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M

3.1.4 การสกัดด้วยบอเรตบัฟเฟอร์

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 5 mL จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ นำตะกอนที่เหลือไปสกัดอีก 2 ครั้งด้วยด้วยบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M

3.1.5 การสกัดด้วยเมทานอล

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมเมทานอลปริมาตร 5 mL จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติม เมทานอลลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 ± 5 ^{O}C นาน 15 นาทีนำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอีก 2 ครั้ง

ด้วยเมทานอล กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเมทานอล

3.1.6 การสกัดด้วยเอทานอล

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมเอทานอลปริมาตร 5 mL จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติมเอทานอลลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 ± 5 ^{O}C นาน 15 นาที นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอีก 2 ครั้งด้วยเอธานอล กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยเอธทานอล

3.1.7 การสกัดด้วยน้ำ

ชั่งตัวอย่างไส้กรอกที่บดละเอียดด้วยเครื่องปั่นอาหาร 5.0000 ± 0.0500 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL เติมน้ำปริมาตร 5 mL จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 2-3 นาที ระหว่างนี้เติมน้ำลงไปอีก 5 mL นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ นาน 5,10,15 นาทีจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นก่อนจะทำการเซนตริฟิวจ์นาน 5,10,15 และ 20 นาทีตามลำดับ นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอีก 2 ครั้งด้วยน้ำ กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยน้ำ

ตอนที่ 4 การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิคแผ่นบางโครมาโทกราฟี (TLC)

4.1 เตรียมสารละลายนินไฮดรินโดยการชั่งสารนินไฮดริน 1.5 g จากนั้นเติม n-butanol 100 mL และเติมกรดแอซิติก 3 mL

4.2 เตรียม TLC plate โดยการตัด TLC plate ชนิดซิลิกาให้มีขนาดความกว้าง 5 cm และยาว 10 cm

4.3 เตรียมสารละลายผสมเพื่อใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังตารางที่ 17

4.4 เติมวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เตรียมตามตาราง 17 ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 mL จากนั้นปิดด้วยกระจกนาฬิกา

4.5 ทำการจุด (spot) สารมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนความเข้มข้น 50 ppm ลงบนซิลิกาเพลท จากนั้นนำไปวางไว้ในบีกเกอร์ที่บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อรอให้เกิดการแยกสาร

4.6 เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ไปยังจุดสูงสุดของซิลิกาเพลทจึงนำซิลิกาเพลทออกจากบีกเกอร์ บันทึกระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

4.7 ใช้ไดรด์เป่าให้แผ่นซิลิกาแห้งจากนั้นสเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินและใช้ไดรด์เป่าเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น สังเกตุสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับนินไฮดริน

ตาราง 17 วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารด้วยแผ่นบางโครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	อัตราส่วน (v/v)
เอทิลแอซิเตต : คลอโรฟอร์ม	60:40
เบนซีน : เมทานอล : ไซโคลเฮกเซน	85:5:10
เอทิลแอซิเตต : ไซโคลเฮกเซน	60:40
เบนซีน : เมทานอล	90:10
เบนซีน : อะซิโตน	50:50
แอมมิลแอลกอฮอล์ : กรดแอซิติก : น้ำ	40:10:50
เมทานอล : แอมโมเนีย	50:50
100% เมทานอล	100
100% แอมโมเนีย	100

บทที่ 4
ผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการวิจัยตามลำดับต่อไปนี้

1. สภาวะที่ศึกษาในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน 3 ชนิด คือ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่
   1.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมสารอนุพันธ์
   1.2 ช่วง pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์
   1.3 อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรล์
   1.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
   1.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน
   1.6 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดปริมาณ
2. การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ ได้แก่
   2.1 กรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน
   2.2 รีเอเจนต์ที่ใช้ทดลอง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมคลอไรด์
3. ศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทย ได้แก่
   3.1 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดไตรคลอโรแอซิติก กรดเปอร์คลอริก บอเรตบัฟเฟอร์ เมทานอล เอทานอล และน้ำ
   3.2 วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการสกัดด้วยวิธีทางกายภาพ คือ การเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์และการเซนตริฟิวจ์
   3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการดำเนินการตามข้อ 3.2
4. การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิคแผ่นบางโครมาโทกราฟี

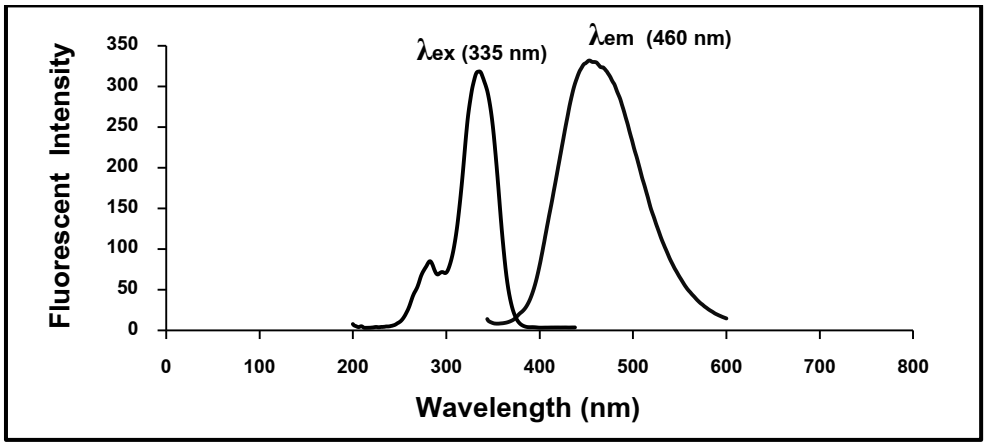
ตอนที่ 1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนพร้อมกันด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์

ปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์/2-เมอร์แคปโตเอทานอล สามารถเกิดขึ้นได้สามช่องทาง ได้แก่ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์ ปฏิกิริยาสเตบิไลเซชัน (stabilization) ของออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์โดย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล และปฏิกิริยาของออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์/ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลกับเอมีนและ/หรือกรดอะมิโนได้สารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงแต่เป็นสารที่ไม่เสถียร (ตามภาพประกอบ 6) ในการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ pH ของสารละลายตัวกลางในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลายตัวกลางโดย pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยานั้น มีผลให้เกิดสารอนุพันธ์ที่เสถียรสามารถวาวแสงได้ดี นอกจากนี้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยามีความสำคัญต่อความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์กับเอมีน และความเข้มข้นของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเนื่องจากการเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอลจะลดปริมาณของสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ที่จะเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดอะมิโนหรือสารเอมีน (R.C. Dorresteijn; et al. 1996: 160)

ในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์สารไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนซึ่งเป็นสารไบโอจีนิกเอมีนที่มักพบในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ สารทั้งสามนี้มีความสามารถในการดูดกลืนแสงต่ำเนื่องจากมีโครงสร้างขนาดเล็ก มีมวลโมเลกุลน้อย การตรวจวัดโดยตรงด้วยตัวตรวจวัดแบบไดโอดแอเรย์หรือตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์นั้นไม่สามารถทำได้ แต่การตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซ็นต์ทำได้โดยอาศัยหลักการเตรียมอนุพันธ์ก่อนนำสารอนุพันธ์ที่ได้ฉีดเข้าคอลัมน์แยกสาร (precolumn derivatization) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ

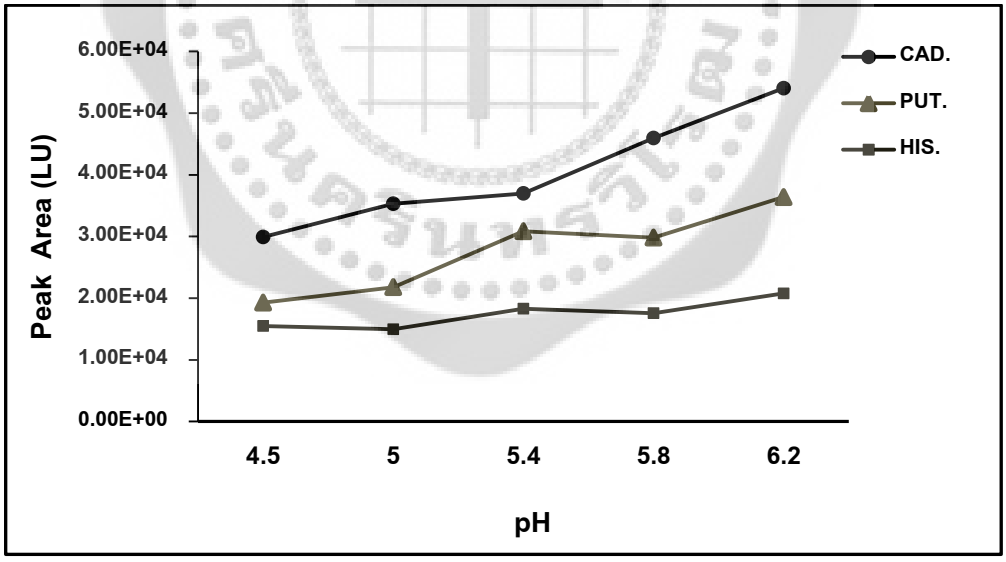
เมื่อนำสารละลายผสมของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนไปทำปฏิกิริยากับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์/2-เมอร์แคปโตเอทานอลเกิดเป็นสารอนุพันธ์ไอโซอินโดล จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปสแกนสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโตฟลูออร์โรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 200-800 nm ให้ความเข้มฟลูออร์เรสเซนต์สูงซึ่งให้ค่าความยาวคลื่นของการกระตุ้น (excitation) อยู่ที่ 335 nm และความยาวคลื่นของการวาวแสง (emmission) อยู่ที่ 460 nm



ภาพประกอบ 8 สเปกตรัมการวาวแสงของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

1.2 ผลการศึกษา pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของ pH ที่ส่งผลต่อการแยกและการวิเคราะห์ปริมาณสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 9 ผลของ pH แอซิเตตบัฟเฟอร์ต่อการแยกสารอนุพันธ์

จากการศึกษาค่า pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์ที่ส่งผลต่อการแยกสารอนุพันธ์ทั้งสามโดยใช้อัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมแอซิเตตเข้มข้น 100 mM ต่ออะซิโตไนไตรต์ ที่อัตราส่วน 82:18 v/v และ ควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.1 mL/min

ผลการทดลองพบว่าค่าพื้นที่พีคของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ของสารอนุพันธ์ของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนที่ค่า pH 4.5 วัดได้น้อยและเมื่อค่า pH เพิ่มมากขึ้นพบว่าสารทั้งสามให้ค่าพื้นที่พีคของสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าที่ค่า pH 4.5 5.0 และ 5.4 นั้นการแยกพีคของสารทั้งสามชนิดสามารถแยกจากกันได้แต่ให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจเช่นที่ pH 4.5 พีคของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนไม่สามารถทีจะแยกจากกันอย่างเด็ดขาดเนื่องจากเกิดการซ้อนทับที่ฐานพีค และที่ pH 5.4 พบว่าสารพิวเทรสซีนถูกชะออกจากคอลัมน์ช้าลงทำให้ความสามารถในการแยกสารพิวเทรสซีนออกจากคาร์เวรีนได้ไม่ดี และเมื่อเปรียบเทียบสำหรับการทดลองที่ค่า pH 5.8 และ pH 6.2 พบว่าที่ pH ทั้งสองค่านี้สามารถแยกสารทั้งสามชนิดออกจากกันได้เป็นอย่างดีและมีค่าการตอบสนองต่อสัญญาณการวิเคราะห์แบบฟลูออเรสเซ็นต์ได้เป็นอย่างดีและเมื่อทำการทดลองซ้ำพบว่าที่ค่า pH 6.2 นั้นเวลารีเทนชันของสารทั้งสามเกิดการเคลื่อนที่มีค่าไม่คงที่ในแต่ละครั้งของการทดลอง (shift) เมื่อใช้ค่า pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์เป็น 6.2 และที่ค่า pH 6.2 การวิเคราะห์ไม่แม่นยำ (reproducibility) เนื่องจากแอซิเตตบัฟเฟอร์มีความจุบัฟเฟอร์ที่ช่วง pH 3.8-5.8 เท่านั้น ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่ค่า pH 5.8 ให้ค่าสัญญาณการตรวจวิเคราะห์ดีที่สุดและมีระยะเวลารีเทนชันที่มีความเหมาะสม สารทั้งสามสามารถแยกจากกันอย่างชัดเจนและมีรูปร่างของพีคที่แหลมคม ดังนั้นแอซิเตตบัฟเฟอร์ที่ค่า pH 5.8 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ปริมาณสารอนุพันธ์ทั้งสามด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เนื่องจากสารประกอบบางชนิดไม่เสถียรสามารถที่จะเกิดการแตกตัวได้ง่ายและเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเมื่อค่า pH ของระบบเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารรวมทั้งความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาของสารกับวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ สำหรับสารที่แตกตัวเป็นไอออนได้ง่ายนั้นค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากเนื่องจากส่งผลต่อรีเทนชันแฟกเตอร์ (retention factor; k') และส่งผลต่อความจำเพาะและรูปร่างของพีคที่ปรากฏ (Panagiota Agrafiotou; et al. 2011: 4995) สิ่งเหล่านี้จะส่งผลต่อปริมาณของสารที่ทำการวิเคราะห์รวมทั้งประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ด้วย ในรีเวิร์สเฟสการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารและวัฏภาคนิ่งจะแรงมากเนื่องจากในวัฏภาคนิ่งนั้นจะมีหมู่ไซลินัลอิสระ (-SiOH) เหลืออยู่ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรดเล็กน้อยจึงสามารถแตกตัวเป็นไอออนได้เมื่อค่า pH มากกว่า 4 ไอออนของหมู่ไซลินัลจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่อะมิโน ($-NH_2$) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของสารตัวอย่างได้ซึ่งจะทำให้เกิดพีคที่มีหางได้และเพิ่มเวลารีเทนชันของสารให้คงอยู่ในคอลัมน์ได้นานขึ้นทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานขึ้นจึงทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นน้ำไม่สามารถที่จะชะสารออกได้ ดังนั้นองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่จะมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการชะสารออกจากคอลัมน์ วัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีส่วนในการเกิดอันตรกิริยากับสารที่ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวัฏภาคนิ่ง การปรับ

pH เพียงเล็กน้อยสามารถที่จะเปลี่ยนพฤติกรรมการคงอยู่ของสารบนวัฏภาคนิ่งได้มาก การเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์มีสิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ชนิดของบัฟเฟอร์ ความแรงของไอออนิกและความจุบัฟเฟอร์สิ่งเหล่านี้ส่งผลต่อระยะเวลารีเทนชันและการให้สัญญาณพีคที่มีหาง (Martí Rosés; 2004: 283)

1.3 การศึกษาหาอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์

สำหรับผลการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ทำการศึกษาแสดงดังตาราง 18

ตาราง 18 อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชัน

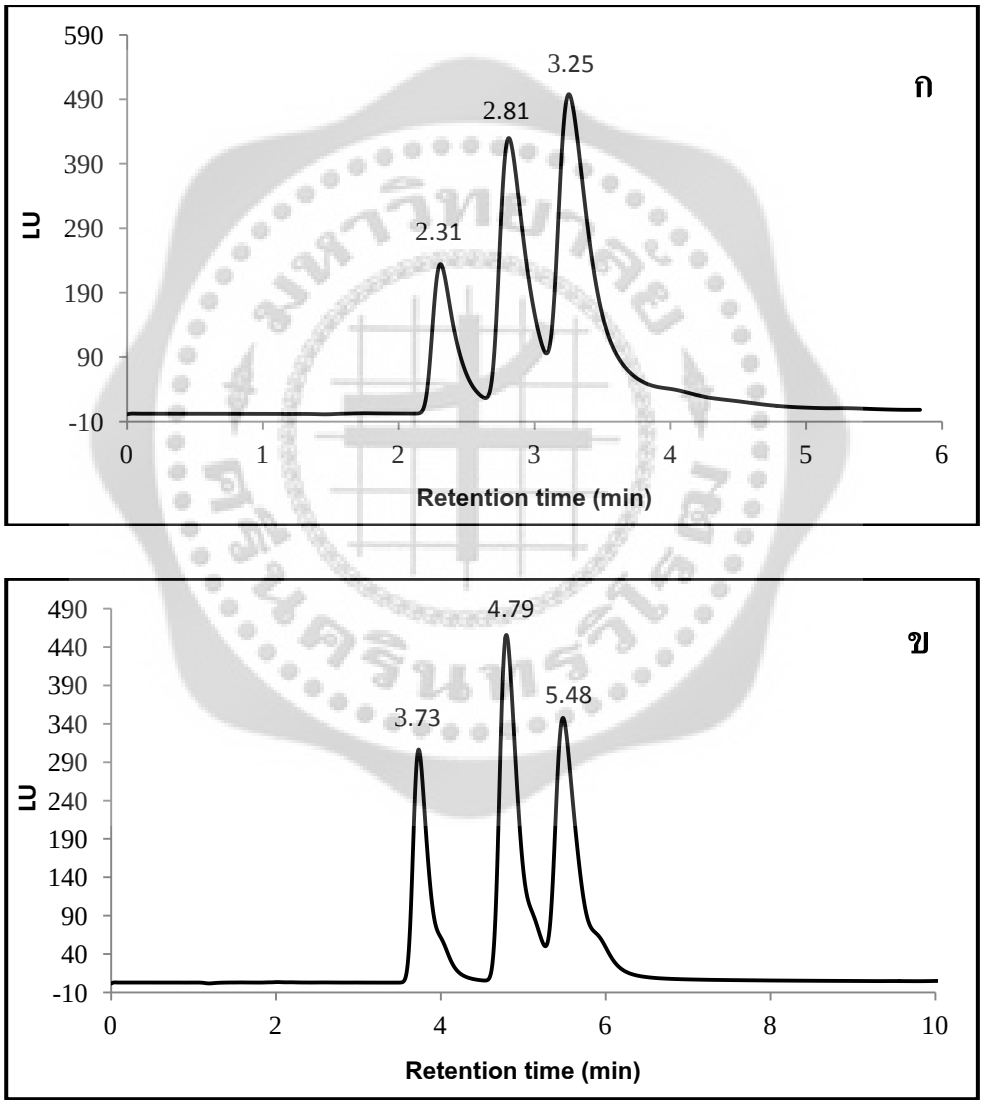
แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 (%)	อะซิโตไนไตรต์ (%)	เวลารีเทนชัน (นาที)		
		พิวเทรสซีน	ฮีสตามีน	คาร์ดาเวรีน
75	25	2.30	2.81	3.25
77	23	3.73	4.79	5.48
78	22	4.78	6.66	7.21
80	20	6.50	8.90	10.42
81	19	7.89	10.83	13.14
82	18	9.20	12.30	15.62

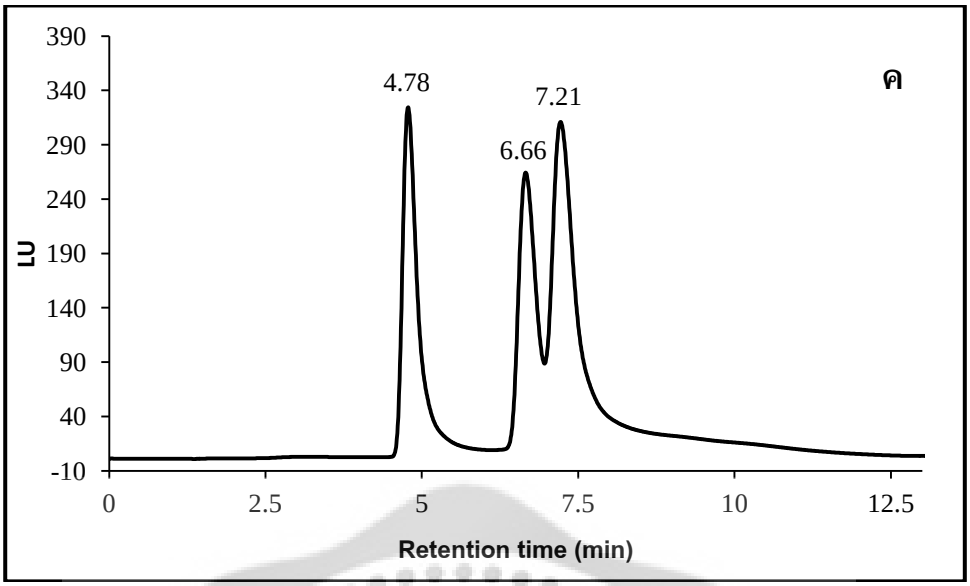
งานวิจัยนี้ทำการชะสารด้วยระบบไอโซเครติก (isocratic) ซึ่งจะทำการเตรียมสารละลายผสมระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนโดยปริมาตร (v:v) การชะสารด้วยระบบไอโซเครติกสามารถที่จะใช้ในการแยกอนุพันธ์ของสารผสมฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนและระบุชนิดของสารอนุพันธ์ทั้งสามชนิดที่ตรวจพบในตัวอย่างด้วยการเปรียบเทียบระยะเวลารีเทนชันกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้การชะสารแบบไอโซเครติกยังสามารถหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของบัฟเฟอร์ภายในคอลัมน์ได้เนื่องจากใช้อะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วนคงที่ตลอดการทดลอง

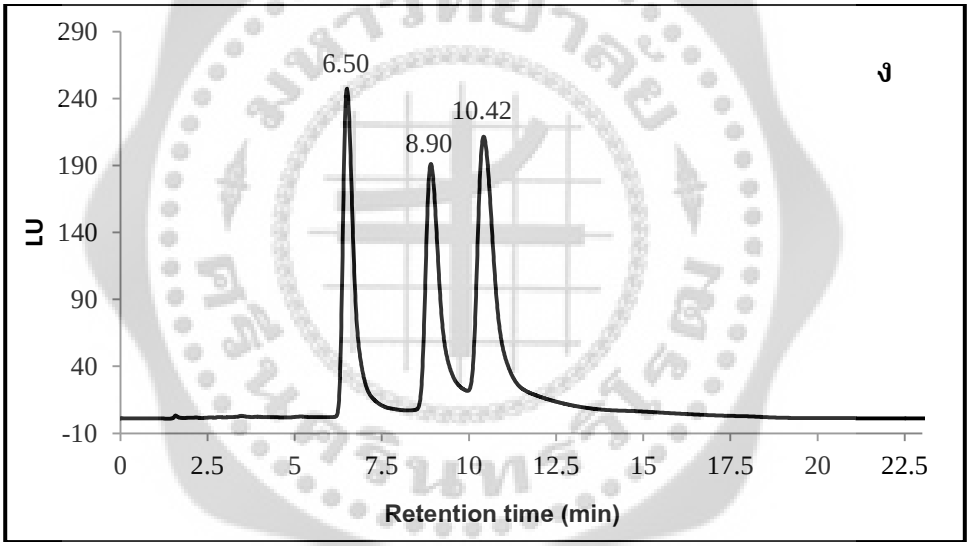
จุดประสงค์หนึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงคือรูปร่างของพีคสามารถทำได้โดยการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความเหมาะสม เช่น อะซิโตไนไตรต์ เมทานอล หรือ THF เป็นต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าอะซิโตไนไตรต์ก็เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการนิยมใช้เป็นองค์ประกอบในวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับกระบวนการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เนื่องจากมีความหนืดน้อยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ทำให้ลดความดันย้อนกลับ (back pressure) ที่เกิดขึ้น

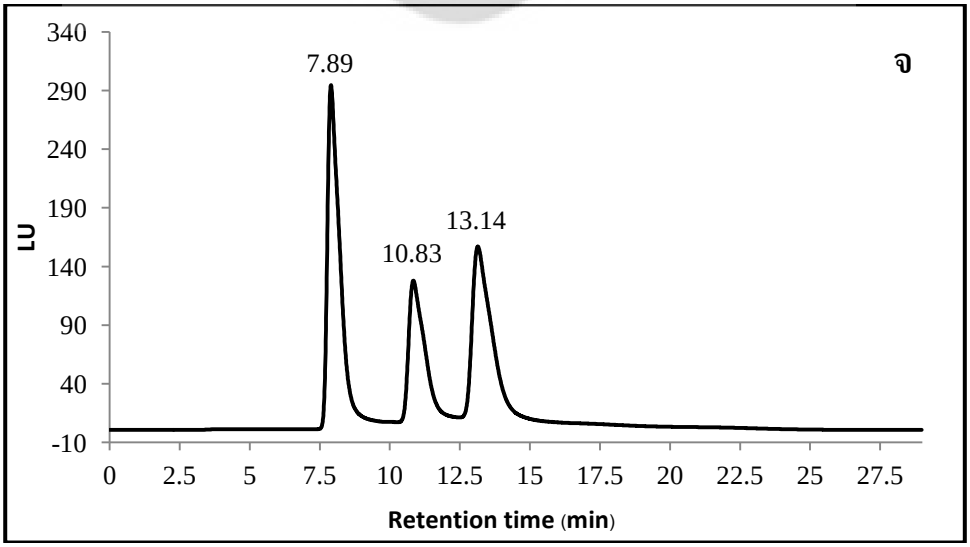
ในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และอะซิโนไนไตรต์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่จะมีประสิทธิภาพในการแพร่มากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ให้รูปร่างพีกมีลักษณะคมชัด แต่อย่างไรก็ตามการใช้อะซิโตไนไตรต์ก็ส่งผลด้านความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

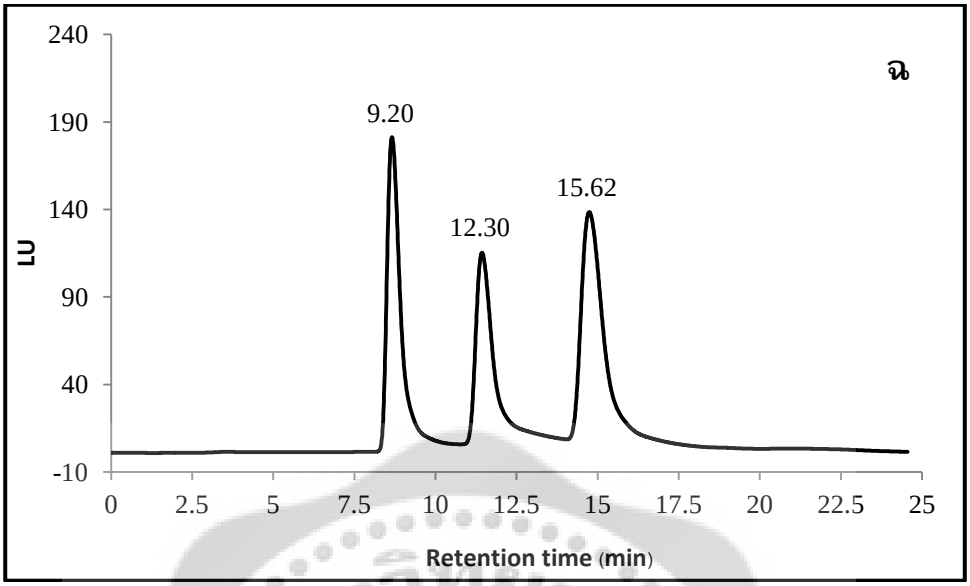
สำหรับการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ทำการทดลองในงานวิจัยนี้เริ่มต้นด้วยการเลือกใช้อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 75:25 v/v (ภาพประกอบ 9 (ก))




ค
4.78
6.66
7.21
LU
390
340
290
240
190
140
90
40
-10
0
2.5
5
7.5
10
12.5
Retention time (min)


ง
6.50
8.90
10.42
LU
290
240
190
140
90
40
-10
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
22.5
Retention time (min)


จ
7.89
10.83
13.14
LU
340
290
240
190
140
90
40
-10
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
22.5
25
27.5
Retention time (min)



ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมจากผลการทดลองศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่

ก องค์ประกอบของแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 75:25 v/v

ข องค์ประกอบของแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 77:23 v/v

ค องค์ประกอบของแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 78:22 v/v

ง องค์ประกอบของแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 80:20 v/v

จ องค์ประกอบของแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 81:19 v/v

ฉ องค์ประกอบของแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 82:18 v/v

พบว่าสารทั้งสามชนิดถูกชะออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 5 นาที แต่พบว่าพีคของสารทั้งสามไม่สามารถที่แยกจากกันอย่างเด็ดขาดเนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันที่บริเวณฐานพีค จึงทำการทดลองด้วยการลดปริมาตรของอะซิโตไนไตรต์เป็น 23%

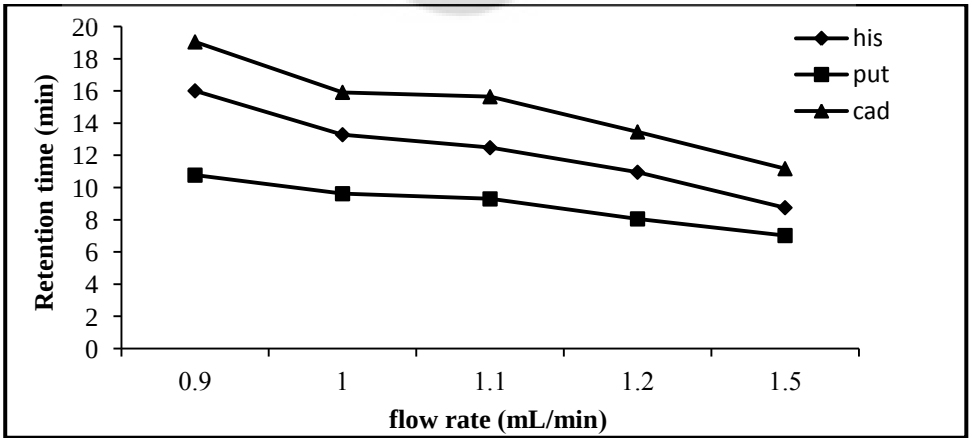
(ภาพประกอบ 9 (ข)) พบว่าพีคของสารทั้งสามสามารถที่จะแยกออกจากกันได้ดีขึ้นแต่ไม่สามารถที่จะแยกจากกันได้อย่างเด็ดขาดเนื่องจากยังมีการซ้อนทับกันของฐานพีค และที่อัตราส่วนนี้ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 8 นาที จากนั้นลดปริมาตรของอะซิโตไนไตรต์เป็น 22% (ภาพประกอบ 9 (ค)) พบว่าสารทั้งสามสามารถที่จะแยกออกจากกันได้ดีขึ้นโดยที่สารพิวเทรสซีนสามารถแยกออกจากสารฮีสตามีนและคาร์ดาเวรีนได้อย่างเด็ดขาด แต่พบว่าการแยกจากกันของพีคของสารฮีสตามีนและคาร์ดาเวรีนยังไม่สามารถที่จะแยกออกจากกันอย่างเด็ดขาด ต่อมาทำการลดอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรต์เป็น 20% (ภาพประกอบ 9 (ง)) พีคของสารทั้งสามสามารถที่จะแยกออกจากกันอย่างชัดเจน แต่พีคของสารฮีสตามีนกับคาร์ดาเวรีนยังไม่สามารถที่จะแยกออกจาก

กันได้เป็นอย่างดีที่เบสไลน์ ต่อมาจึงได้ทำการลดอะซิโตไนไตรต์เป็น 19% (ภาพประกอบ 9 (จ)) พบว่าพีคของสารทั้งสามสามารถที่จะแยกออกจากกันได้อย่างเด็ดขาดโดยใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 15 นาที และลำดับสุดท้ายลดอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรต์เป็น 18% (ภาพประกอบ 9 (ฉ)) พบว่าพีคของสารทั้งสามสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และสามารถแยกได้ดีกว่าที่อัตราส่วนของอะซิโตไนไตรต์ 18 % แต่มีข้อเสียคือใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน

สรุปจากภาพประกอบ 9 พบว่าการเพิ่มหรือการลดอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรต์เพียงเล็กน้อยก็จะส่งผลอย่างมากต่อความสามารถในการชะสารออกจากคอลัมน์เนื่องจากสภาพขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่เกิดการเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ยังส่งผลต่อการแยกสารทั้งสาม ส่งผลต่อเวลารีเทนชันและรูปร่างของพีค สำหรับการแยกสารอนุพันธ์ทั้งสามชนิดให้แยกออจากกันอย่างเด็ดขาดเมื่อเลือกใช้อัตราส่วนของอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8) ต่ออะซิโตไนไตรต์ในอัตราส่วน 82:18 (v/v) และในอัตราส่วน 82:18 (v/v) ตามลำดับ เนื่องจากพบว่าสารทั้งสามชนิดสามารถที่จะแยกออกจากกันได้เป็นอย่างดีและมีค่ารีโซลูชัน (resolution; R_S) เป็นที่น่าพอใจ แต่เมื่อเปรียบเทียบเวลารีเทนชันของการแยกทั้งสองระบบพบว่าควรลือกใช้ที่อัตราส่วน 82:18 v/v เนื่องจากสารทั้งสามสามารถที่จะชะออกจากคอลัมน์ได้เป็นอย่างดี และมีค่าการแยกที่เหมาะสมแม้ว่าจะใช้เวลาในการชะสารนานกว่าการใช้อัตราส่วน 81:19 v/v

1.4 ผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากนั้นทำการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 0.9 1.0 1.1 1.2 และ 1.5 ml/min ตามลำดับ โดยพิจารณาระยะเวลารีเทนชันของสารอนุพันธ์ จากผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 11 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ส่งผลต่อเวลารีเทนชัน

อัตราการไหลส่งผลต่อระยะเวลารีเทนชันของสารเนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลจะทำให้สารถูกชะออกจากคอลัมน์เร็วขึ้นเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ให้มีความรวดเร็วยิ่งขึ้น เหตุเนื่องจากโมเลกลุของสารทั้งสามเกิดการถ่ายโอนมวลสารระหว่างวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่เกิดได้น้อยลง และจะทำให้ประสิทธิภาพของการแยกไม่ดี ในการทดลองเริ่มทำการศึกษาโดยใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.9 mL/min พบว่าสารถูกชะออกจากคอลัมน์ช้ามากใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานถึง 20 นาที จากนั้นลดอัตราการไหลเป็น 1.0 mL/min และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน 18 นาทีจากนั้นจึงเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1.1 1.2 และ 1.5 mL/min ตามลำดับ และพบว่าอัตราการไหลที่มีความเหมาะสมต่อการแยกและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารคืออัตราการไหล 1.1 mL/min สาเหตุเนื่องจากที่อัตราการไหล 1.2 และ 1.5 mL/min นั้นเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในไส้กรอกพื้นเมืองไทยทั้งสามชนิดเพราะในตัวอย่างไส้กรอกจะมีสารรบกวนการวิเคราะห์ เช่น กรดอะมิโนอิสระและสารไบโอจีนิกเอีนชนิดอื่น ๆ ปะปนเป็นจำนวนมากและมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการซ้อนทับระหว่างพีกของสารอนุพันธ์กับสารรบกวนเนื่องจากกรดอะมิโนและเอมีนที่เป็นสารรบกวนสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เกิดปีนสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงได้

แม้ว่าทฤษฎีเพลท (plate theory) จะเป็นหลักการที่มีประโยชน์และให้ข้อมูลเบื้องต้น แต่ไม่สามารถที่จะอธิบายปัจจัยต่าง ๆ ได้ จึงจำเป็นต้องทฤษฎีอัตรา (rate theory) อธิบายพฤติกรรมของโครมาโทกราฟี ทฤษฎีนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อัตราการถ่ายเทมวลระหว่างวัฏภาคนิ่งกับวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการกระจายตัวของวัฏภาคเคลื่อนที่ในคอลัมน์ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งอัตราการแพร่ของวัฏภาคเคลื่อนที่จะเกิดการแพร่ตามทิศทางทางการไหลนั่นคือการแพร่ตามแนวยาวของคอลัมน์ รวมทั้งสามารถที่จะเกิดการแพร่ของวัฏภาคเคลื่อนที่เข้าสู่อนุภาคของวัฏภาคนิ่ง เนื่องจากภายในคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคนิ่งที่มีขนาดไม่เท่ากันจึงเกิดช่องว่างระหว่างอนุภาคเมื่สารเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่แตกต่างกันเรียกว่ากระบวนการแพร่แบบแอดดี้ (eddy diffusion) ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในคอลัมน์ และการเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ยังส่งผลทำให้เกิดความไม่สมดุลเฉพาะแห่ง (local equilibrium) ซึ่งมีสาเหตุจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันกระบวนการแพร่เหล่านี้เรียกว่าการแพร่แบบสุ่ม

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (7)$$

Van Deemter equation

H = HETP

A = eddy diffusion term

B = longitudinal diffusion term

u = linear velocity

C = resistance to mass transfer coefficient

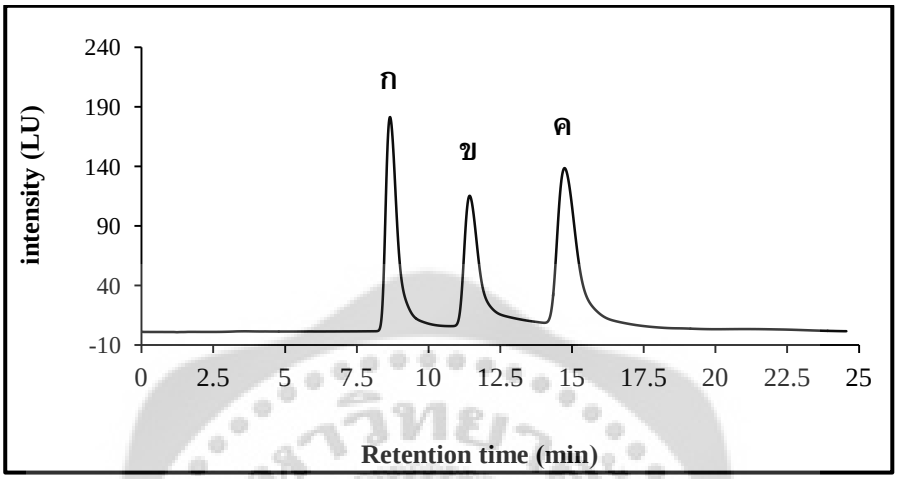
ตามสมการแวนดีมเทอร์เป็นสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของเพลทกับอัตราเร็วเชิงเส้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ ภายหลังจากการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์รวมทั้งการศึกษาค่า pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเหมาะสมต่อการแยกสารอนุพันธ์ทั้งสามพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะของแอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM ต่ออะซิโตไนไตรต์คือ 82:18 v/v และค่า pH ที่เหมาะสมคือ 5.8 ในการศึกษาอัตราการไหลจึงเลือกใช้แอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM ต่ออะซิโตไนไตรต์ pH 5.8 ต่ออะซิโตไนไตรต์ที่อัตราส่วน 82:18 v/v ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสารแล้วนั้นการปรับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร

ดังนั้นจากการทดลองข้างต้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสรุปดังนี้

ตาราง 19 สภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสารอนุพันธุ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน

ตัวแปร	**สภาวะที่ใช้ในการทดลอง**
ระบบการแยก	ไอโซเครติก
คอลัมน์	5 µL; 3.9 mm x 150 mm
วัฏภาคนิ่ง	C18
วัฏภาคเคลื่อนที่	A: แอซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM (pH 5.8)
	B: อะซิโตไนไตรต์
อัตราส่วน	A:B = 82:18 v/v
อัตราการไหล	1.1 mL/min
เครื่องตรวจวัด	ฟลูออเรสเซนต์
ความยาวคลื่น	λ_{ex} = 335 nm; λ_{em} = 460 nm

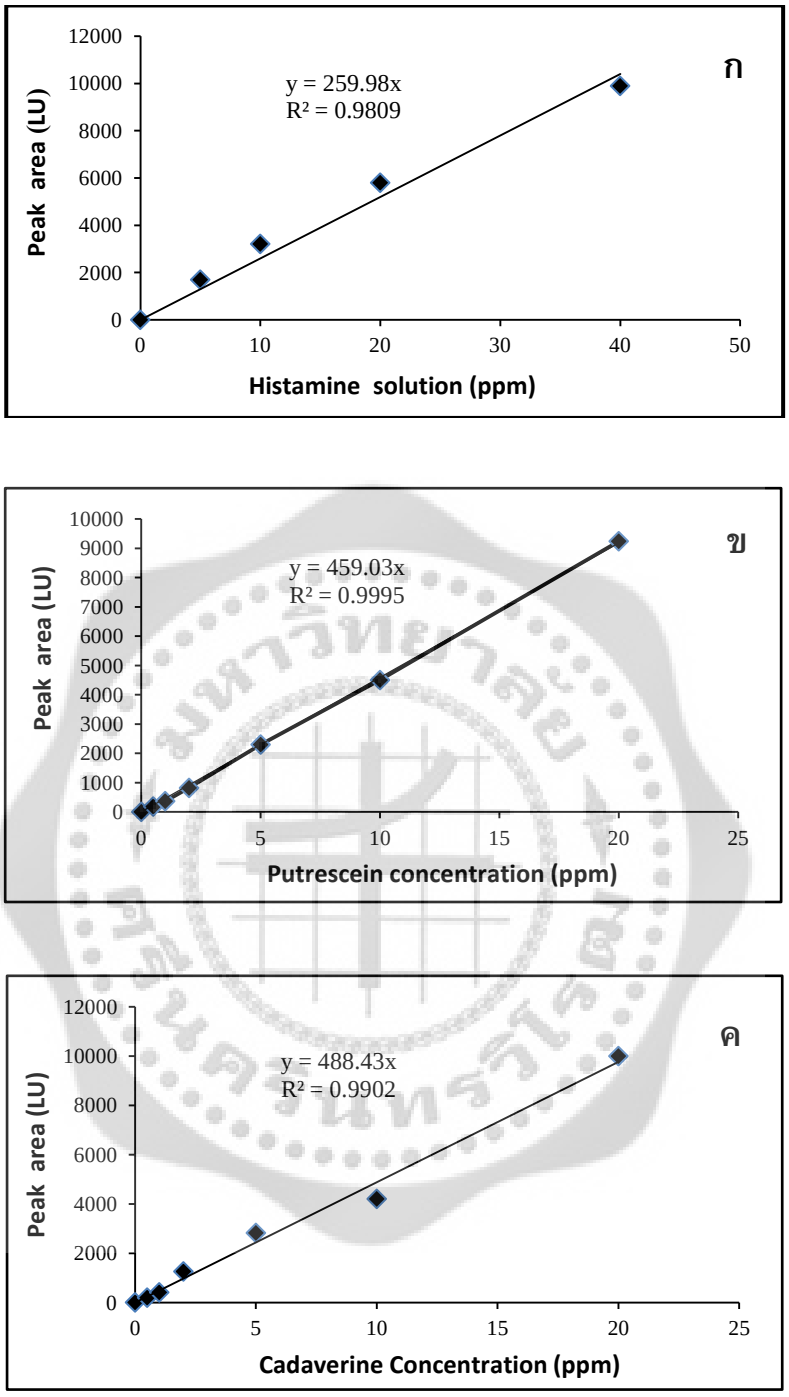
จากตารางแสดงสภาวะในการแยกสารอนุพันธ์ของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ซึ่งลำดับการแยกของสารทั้งสามมีค่าเวลารีเทนชันสำหรับพิวเทรสซีน ฮีสตามีน และคาร์ดาเวรีน เป็น 9.29 12.47 และ 15.64 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมการแยกอนุพันธ์ของสารผสม (ก) พิวเทรสซีน (ข) ฮีสตามีน และ (ค) คาร์ดาเวรีน

1.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนแล้วจะนำเอาสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารทั้งสามในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทยทั้งสามชนิดได้แก่ไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ ในการวิเคราะห์ปริมาณในสารตัวอย่างนิยมใช้วิธีเทียบกับกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ปริมาณสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกโดยเปรียบเทียบสัญญาณที่วัดได้จากตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเพราะให้ความสะดวก รวดเร็ว และมีความถูกต้อง การสร้างกราฟมาตรฐานใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 - 40 ppm หลังจากทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้งสามด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงจากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับพื้นที่พีค (แกนตั้ง) ได้กราฟเส้นตรงแสดงดังภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีกกับช่วงความเข้มข้น

ก กราฟมาตรฐานของสารฮีสตามีน-OPA

ข กราฟมาตรฐานพิวเทรสซีน-OPA

ค กราฟมาตรฐานคาร์ดาเวรีน-OPA

ตาราง 20 เวลารีเทนชัน สมการเส้นตรง และ R^2 ของสารมาตรฐาน

ไบโอจีนิกเอมีน	เวลารีเทนชัน (นาที)	สมการเส้นตรง	r^2
พิวเทรสซีน	9.295	y = 459.03x	0.9995
ฮีสตามีน	12.475	y = 259.98x	0.9809
คาร์ดาเวรีน	15.641	y = 488.43x	0.9902

1.6 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวัดปริมาณ

เพื่อวิเคราะห์หาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD; S/N=3) และค่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ (LOQ; S/N=10) แสดงในตาราง 21

ตาราง 21 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่สกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5)

สารที่วิเคราะห์	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
ฮีสตามีน	0.02	0.07
พิวเทรสซีน	0.06	0.21
คาร์ดาเวรีน	0.05	0.17

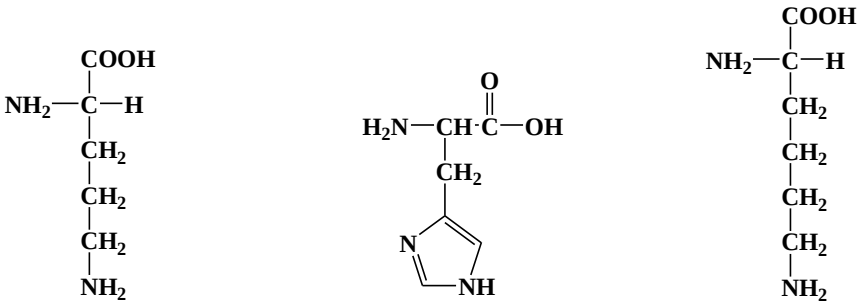
ตอนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์

กระบวนการวิเคราะห์ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในอาหารนั้นเป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากในการบ่งชี้ปริมาณซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยในการบริโภคอาหารซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณนั้นมีความเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น การเลือกวิธีการสำหรับการวิเคราะห์ การสุ่มตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างก่อนกระบวนการวิเคราะห์ การเตรียมสารละลายของตัวอย่าง น้ำหนักและปริมาตรของสารตัวอย่าง การกำจัดสารรบกวนต่าง ๆ กระบวนการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องในการวิเคราะห์ปริมาณ และการประมวลผลจากการวิเคราะห์ ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์และการประมวลผลจะมีความถูกต้องมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับน้ำหนักและปริมาตรของสารตัวอย่าง และกระบวนการกำจัดสารรบกวนต่าง ๆ เพื่อให้การวิเคราะห์ปริมาณสารอีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนมีความถูกต้องมากที่สุด

ไส้กรอกเป็นอาหารที่ทำมาจากเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบหลัก และเนื้อสัตว์ถือเป็นแหล่งอาหารที่มีโปรตีนสมบูรณ์ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้สารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์มาใช้ในการทำอนุพันธ์เพื่อทำการตรวจหาปริมาณสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกพื้นเมืองไทย และเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของโปรตีนเกิดจากกรดอะมิโนเพียง 20 ชนิดเท่านั้นซึ่งโครงสร้างทั่วไปของกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดจะประกอบไปด้วยหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) เกาะกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นโครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดจะแตกต่างกันที่โซ่ข้าง (side chain, R) ทำให้โครงสร้างดังกล่าวมีสภาพมีขั้วที่แตกต่างกัน

2.1 ผลการศึกษากรดอะมิโนฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน

เพื่อให้สามารถมั่นใจได้ว่าการแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนจะปราศจากซึ่งพีกรบกวนจากสารอื่น (interferences) ที่เกิดจากกรดอะมิโน ฮีสตีดีน ออร์นิทีน และไลซีน ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสามชนิดนี้เป็นสารตั้งต้น (precursor) ในการเกิดสารไบโอจีนิกเอมีน กรดอะมิโนทั้งสามชนิดสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ได้เช่นเดียวกับไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิด จึงมีความเป็นไปได้ที่ในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนจะมีการรบกวนการวิเคราะห์เนื่องจากการเกิดอนุพันธ์ร่วมของกรดอะมิโนอิสระฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีน ในการวิเคราะห์จึงทำการแยกกรดอะมิโนทั้งสามชนิดด้วยสภาวะที่ใช้ในการแยกสารอนุพันธ์ของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน เพื่อให้ทราบระยะเวลารีเทนชันของกรดอะมิโนทั้งสามชนิด จากนั้นนำเวลารีเทนชันของกรดอะมิโนทั้งสามชนิดมาเปรียบเทียบกับเวลา รีเทนชันของสารไบโอ จีนิกเอมีนทั้งสามชนิด



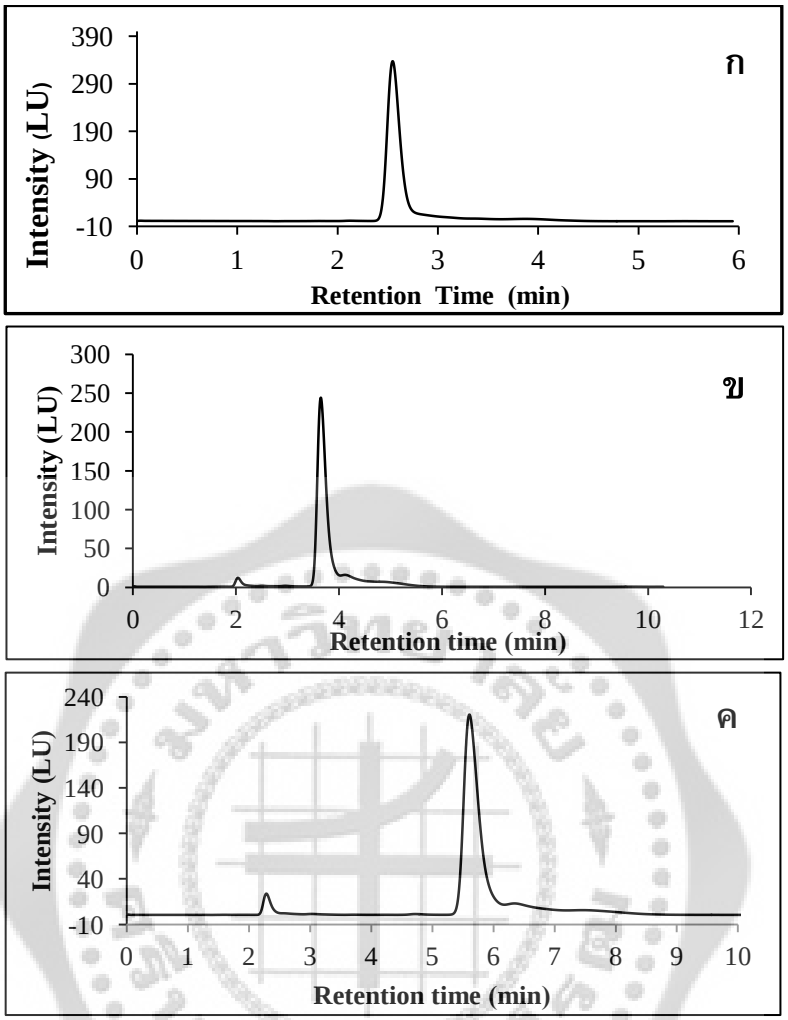
Ornithine **Histidine** **Lysine**

ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของกรดอะมิโนออร์นิทีน ฮีสติดีน และไลซีน

ผลจากการแยกสารภายใต้สภาวะเดียวกันนี้พิสูจน์ให้เห็นว่ากรดอะมิโนทั้งสามชนิดสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์แล้วเกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงได้เช่นเดียวกับสารไบโอจีนิกเอมีน แต่จากการเปรียบเทียบเวลารีเทนชันพบว่ากรดอะมิโนทั้งสามชนิดนี้ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดแต่อย่างใด เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสามชนิดถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วและมีระยะเวลารีเทนชันน้อยกว่าสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิด ทั้งนี้เกิดจากลักษณะทางธรรมชาติของกรดอะมิโนมีความเป็นขั้วมากกว่าสารไบโอจีนิกเอมีน จึงพบว่ากรดอะมิโนทั้งสามชนิดนี้ไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทยเนื่องจากไม่ได้เกิดการซ้อนทับกันของพีคในโครมาโทแกรม

ตาราง 22 เวลารีเทนชันของกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	เวลารีเทนชัน (นาที)
ฮีสติดีน	2.54
ออร์นิทีน	3.64
ไลซีน	5.60



ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมการที่ได้จากการแยกอนุพันธ์ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน

ก พีคของสารอนุพันธ์ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ – ฮีสติดีน

ข พีคของสารอนุพันธ์ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ – ออร์นิทีน

ค พีคของสารอนุพันธ์ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ – ไลซีน

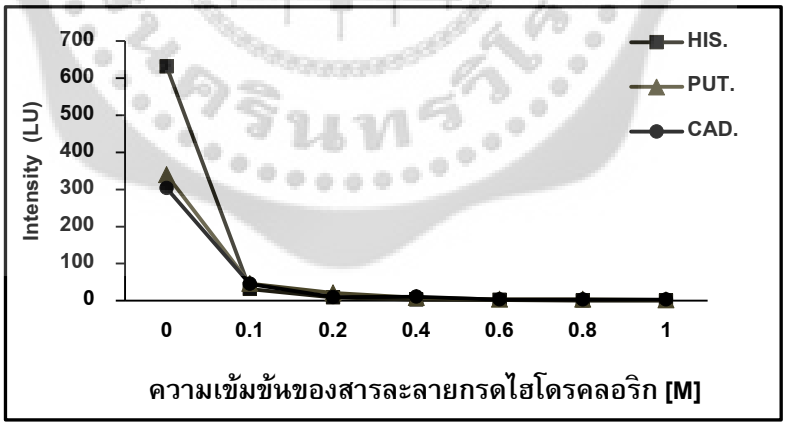
2.2 รีเอเจนต์ที่ใช้ทดลอง ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมคลอไรด์

เนื่องจากปฏิกิริยาในการเกิดสารอนุพันธ์ระหว่างฮีสตามีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ และปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างพิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์นั้น ในงานวิจัยอาศัยเทคนิคการทำอนุพันธ์ซึ่งค่า pH ของสารละลายตัวกลางจะส่งผลต่อความสามารในการเกิดปฏิกิริยาเป็นสารอนุพันธ์เนื่องจากค่า pH ของระบบเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไป เมื่อพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์พบว่าสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาได้ดีใน

สภาวะที่เป็นเบส ในงานวิจัยเลือกใช้สารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2-9.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา (Jin-feng Peng; et al. 2008: 73)

การศึกษาผลกระทบของของสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาและส่งผลต่อสารอนุพันธ์ต่อเนื่องไปจนถึงความสามารถในการวาวแสง สภาวะดังกล่าวนี้ ได้แก่ ตัวทำละลาย pH อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ หรือการเกิดพันธะไฮโดรเจน เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาระบบของสภาวะที่เกี่ยวข้องในการเกิดปฏิกิริยา และความสามารถในการวาวแสงของสารอนุพันธ์ไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิด โดยทำการศึกษากรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงในตาราง 23

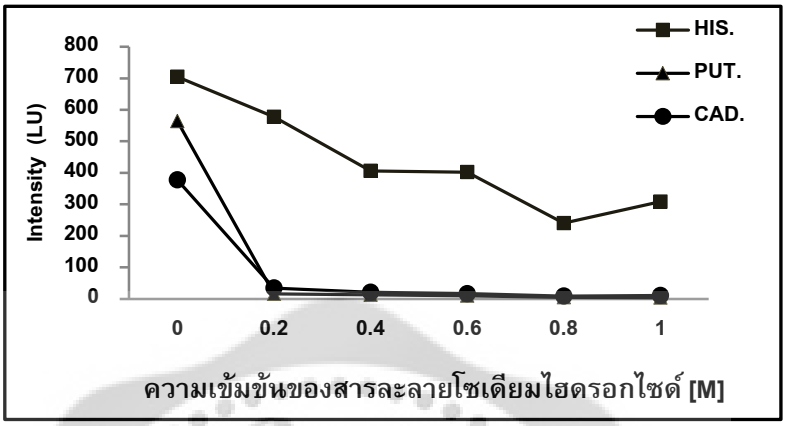
งานวิจัยนี้ทำการศึกษาคุณสมบัติการวาวแสงของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในสารละลายตัวกลางทั้งสิ้นสามชนิดดังตาราง 23 ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดในสารละลายตัวกลางที่แตกต่างกัน และเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อสัญญาณการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ของสารทั้งสาม เนื่องจากสภาวะแวดล้อมจะส่งผลต่อความเสถียรของโครงสร้าง ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ความเสถียรของสารอนุพันธ์ ความสามารถในการวาวแสง เป็นต้น เหล่านี้เป็นสาเหตุให้ความสามารถในการวาวแสงของสารลดลงทำให้การวิเคราะห์ปริมาณมีประสิทธิภาพลดลงด้วย



ภาพประกอบ 16 ผลของความเข้มข้นของกรดไฮโรคลอริกต่อความเข้มแสง

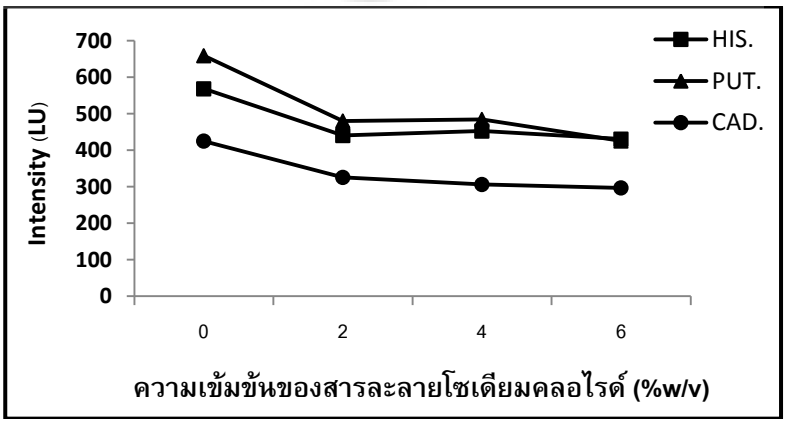
จากภาพประกอบ 15 เป็นผลที่เกิดจากการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากการศึกษาพบว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมกรดไฮโดรคลอริกสารอนุพันธ์สามารถตอบสนองต่อสัญญาณการตรวจวัดได้ดี จากนั้นมีการศึกษาโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 ตามลำดับพบว่าความสามารถในการตอบสนองต่อสัญญาณลดลง

อย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน กับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่มีสารละลายตัวกลางเป็นกรด



ภาพประกอบ 17 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อความเข้มแสง

จากภาพประกอบ 16 เป็นการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ในสารละลายตัวกลางที่เป็นเบสเพื่อศึกษาการเกิดปฏิกิริยาและความเสถียรของโครงสร้างฟลูออโรฟอร์ จากการติดตามการตอบสนองต่อสัญญาณการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์พบว่าอนุพันธ์สารฮีสตามีนมีการตอบสองต่อสัญญาณการตรวจวัดค่อย ๆ ลดลงเนื่องจากมีความเข้มของสัญญาณลดลง แต่สำหรับอนุพันธ์ของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนพบว่าเมื่อมีการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นเพียง 0.2 M ค่าความเข้มของการตอบสนองต่อสัญญาณลดลงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาในการเกิดสารอนุพันธ์ที่ไม่มีการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์



ภาพประกอบ 18 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อความเข้มแสง

จากการศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเกิดปฏิกิริยาและค่าความเข้มแสงพบว่าในภาพประกอบ 17 พบว่าที่ความเข้มข้น 0-6 %w/v นั้นค่าความเข้มแสงของสารอนุพันธ์ทั้งสามลดลงอย่างต่อเนื่อง

ตอนที่ 3 ผลการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองไทย

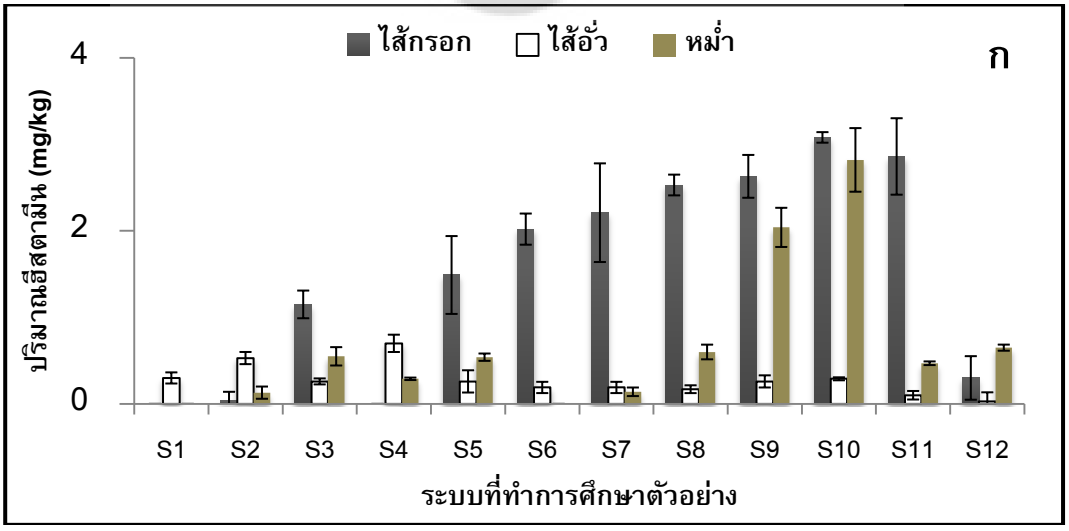
ตัวอย่างไส้กรอกที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน จะต้องมีการเตรียมตัวอย่างเสียก่อนเพื่อความเหมาะสม อย่างน้อยก็เพื่อให้ตัวอย่างมีความสะอาดขึ้นเนื่องจากปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกมีปริมาณน้อยเกินไปรวมทั้งในตัวอย่างไส้กรอกมีสารรบกวนอื่นปะปนเป็นจำนวนมาก เช่น ไขมัน กรดอะมิโน โปรตีน และอื่น ๆ ไม่เหมาะที่จะทำการวิเคราะห์โดยตรงด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพราะจะทำให้การวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างจึงมีความจำเป็นเพื่อความเหมาะสมต่อวิธีการวิเคราะห์ กระบวนการแยกสารที่สนใจออกจากสารที่ปนเปื้อนเบื้องต้นสามารถทำได้ด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนหรือใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นิยมใช้กันทั่วไป

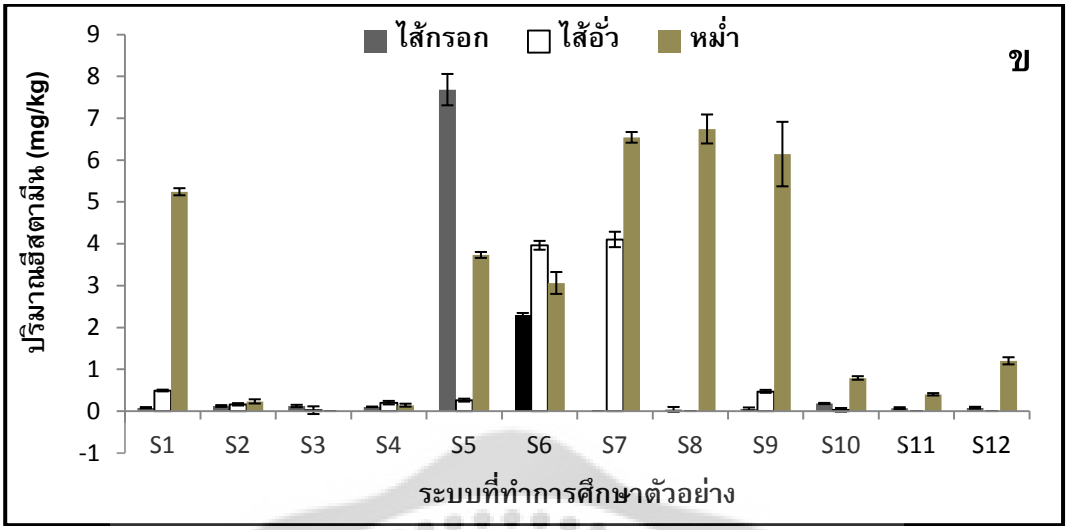
เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์และเป็นวิธีการสกัดที่มีความจำเพาะสำหรับการสกัดสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอก ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารเป็นเรื่องที่มีความสำคัญมาก ในงานวิจัยนี้มีการศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเนื่องจากตัวทำละลายสามารถที่จะกำจัดไขมันและโปรตีนบางส่วนออกจากตัวอย่างไส้กรอกได้และให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาชนิดของสารละลายทั้งสิ้น 7 ชนิด คือ การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M, กรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5 %, กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M, บอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5), เมทานอล เอทานอล และน้ำตามลำดับ ร่วมกับการการเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์และการเซ็นตริฟิวจ์ นอกจากนี้ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดยังเกี่ยวข้องกับความเสถียรของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนที่สกัดได้จากตัวอย่าง การสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนด้วยตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดไตรคลอโรแอซิติก (TCA) และกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) พบว่าสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนจะถูกล้อมรอบด้วยคลอไรด์ (chlorohydrates) การเติมสารละลายกรดเหล่านี้ซึ่งมีประจุลบลงในตัวอย่างไส้กรอก ประจุลบของสารละลายกรดจะจับกับประจุบวกของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนรวมตัวกันแล้วตกตะกอนออกมา ในสารละลายที่เป็นกรดแรง (Valeria Frattini & Claudia Lionetti. 1998: 244) สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลาย

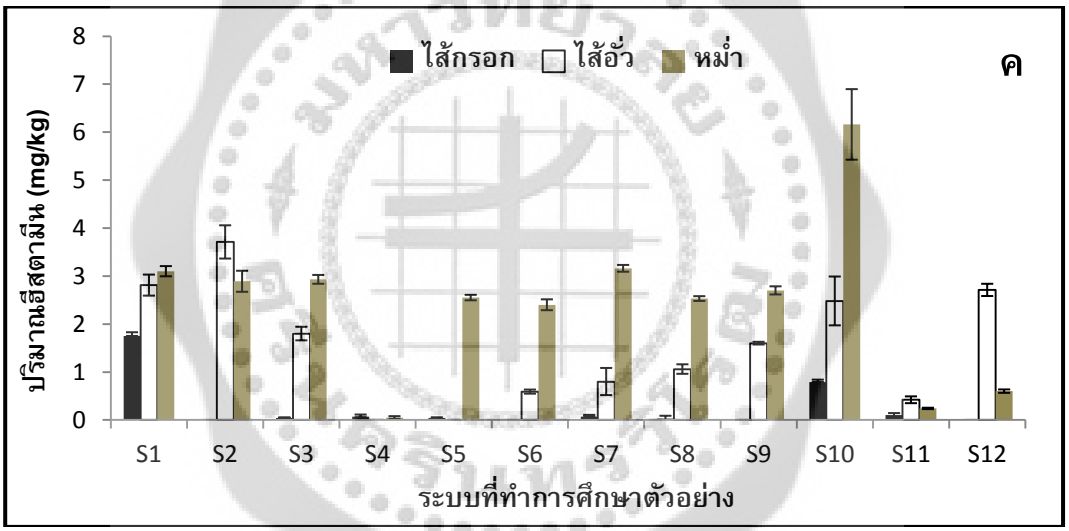
อินทรีย์นั้นมีข้อดีคือสามารถตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล จะทำให้โปรตีนจับกับน้ำได้น้อยลงและโปรตีนจะตกตะกอนออกมาและสามารถสกัดฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนได้ในคราวเดียวกัน กรดและเบสทำให้โปรตีนมีประจุเปลี่ยนแปลงไป บางครั้งอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพ และ ตกตะกอนลงมา จนไม่สามารถเกิด renaturation ได้

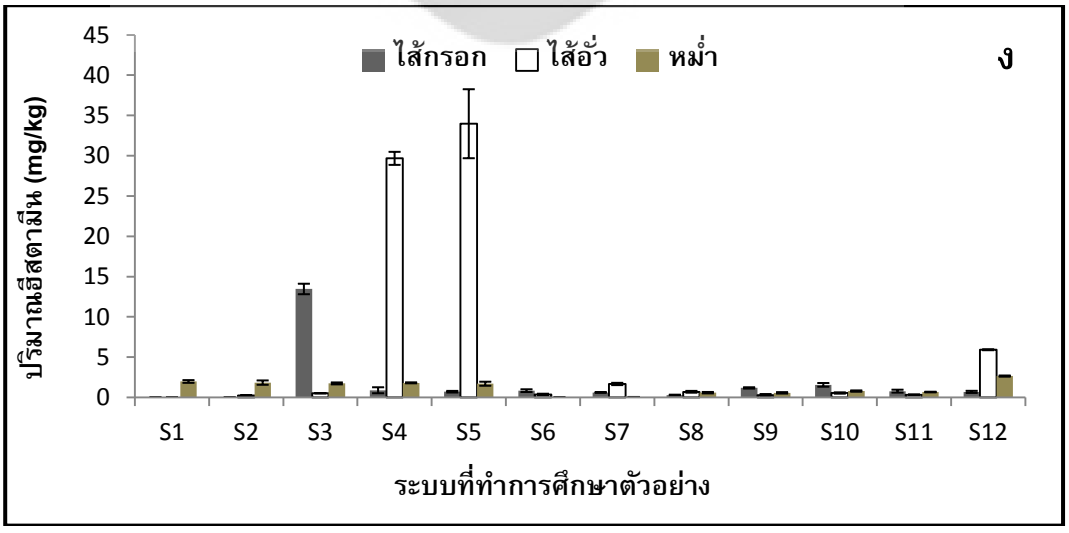
การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้หรือใช้ตัวอย่างน้อยที่สุดซึ่งผลที่ต้องการ คือ สามารถกำจัดสารที่ไม่ต้องการและสามารถรบกวนกระบวนการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ซึ่งวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับการใช้เทคนิคการเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์นั้น (ultrasonication assisted extraction (UAE)) เนื่องจากเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมและเป็นวิธีการที่ง่ายและมีความสะดวกมีความเป็นมาตรฐานและนิยมใช้อย่างกว้างขวาง แต่ก็มีข้อเสีย คือ ช้าและใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวิธีการกำจัดสารรบกวน ทำความสะอาดตัวอย่าง (clean-up) และเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี การปรับปรุงประสิทธิภาพและความจำเพาะของการสกัดถือเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการวิเคราะห์ ซึ่งกระบวนการเตรียมตัวอย่างประกอบไปด้วยการเก็บตัวอย่าง การลดขนาดของตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างประกอบไปด้วยการปั่นเพื่อลดขนาดของตัวอย่าง (grinding) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) และการแช่แข็ง (freeze-thaw) เป็นต้น โปรตีนที่ถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของสารละลายแล้ว จะเรียกว่า “crude extract” ขั้นตอนต่อมาทำการตกตะกอนโปรตีนออกมาจากสารละลาย

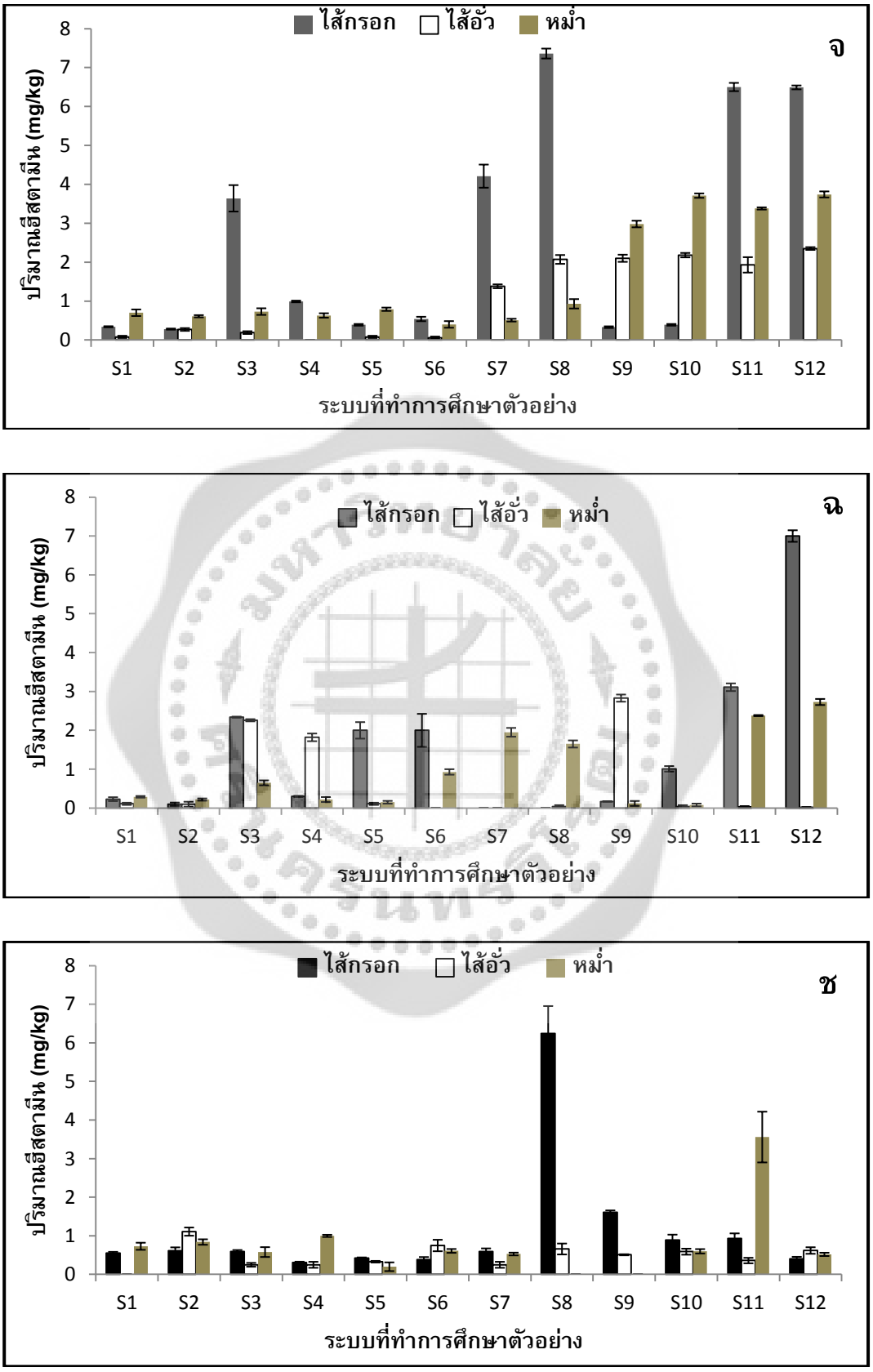
3.1 ปริมาณสารฮีสตามีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ




ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ข
ปริมาณฮีสตามีน (mg/kg)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง


ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ค
ปริมาณฮีสตามีน (mg/kg)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง


ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ง
ปริมาณฮีสตามีน (mg/kg)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง



ภาพประกอบ 19 ปริมาณสารฮีสตามีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ

ก การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M

ข การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5%

ค การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M

ง การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5)

จ การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย 60^{O}C เมทานอล

ฉ การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย 90^{O}C เอทานอล

ช การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย น้ำ

<u>กำหนดให้แกนนอน</u>

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

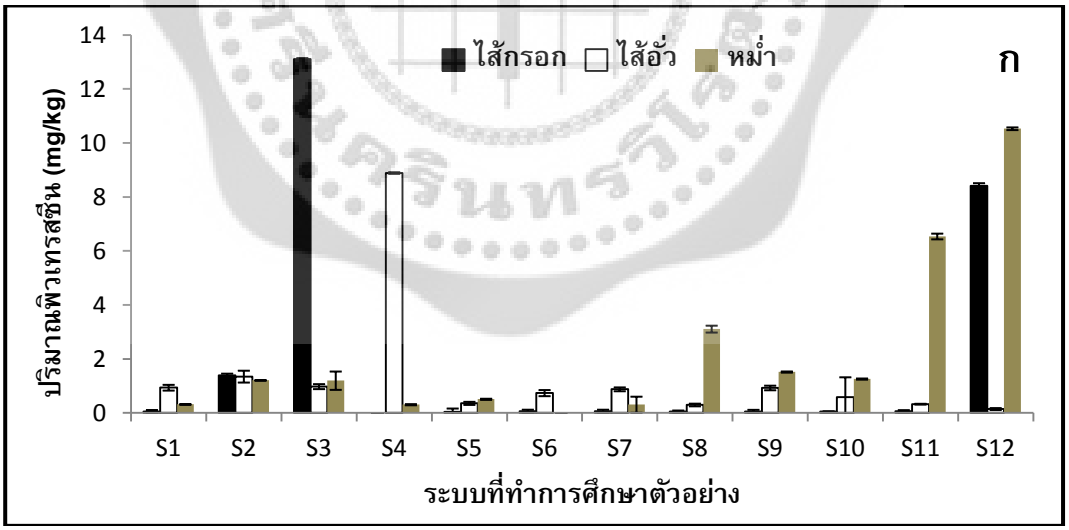
S9 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที

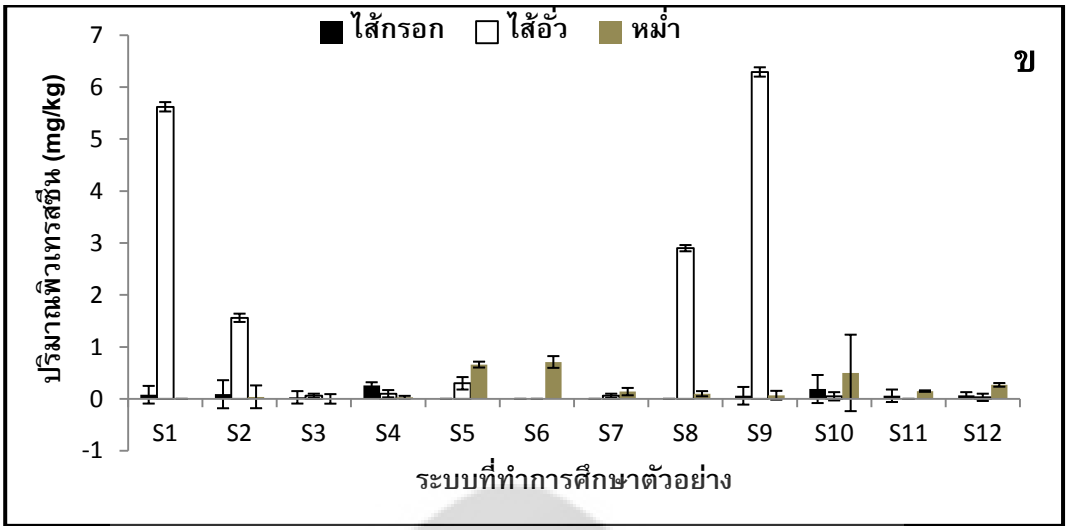
S10 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที

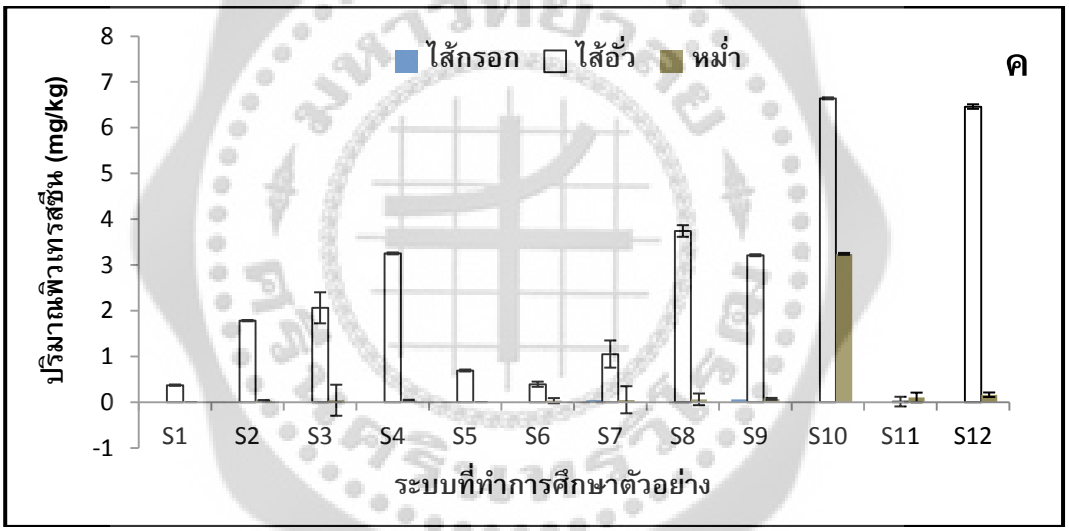
S11 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที

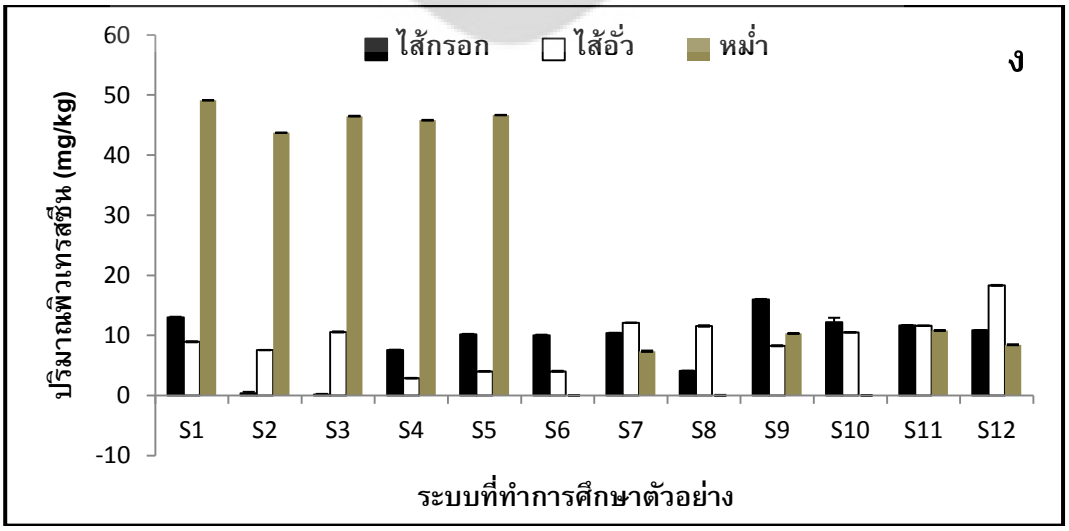
S12 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที

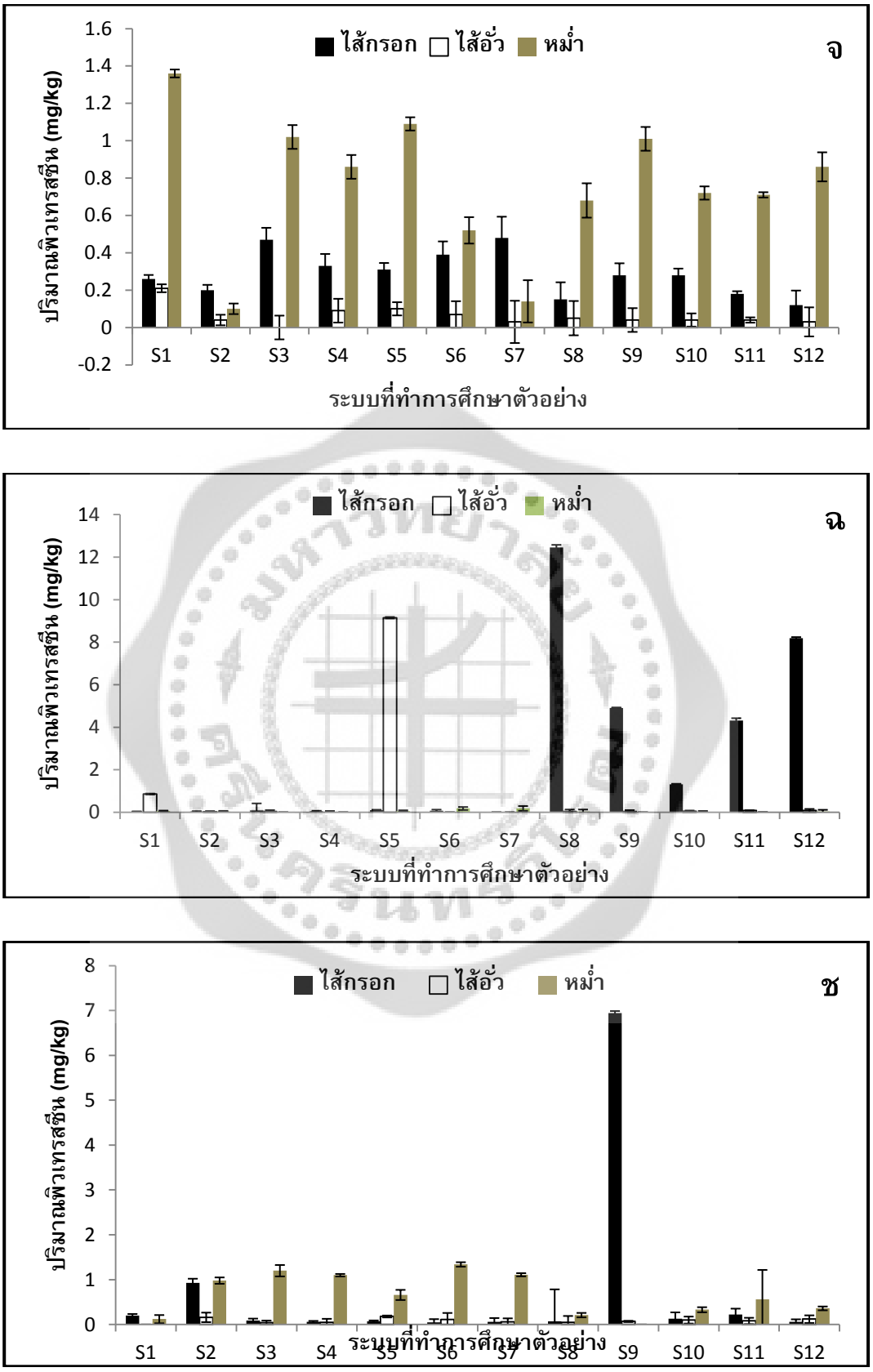
3.2 ปริมาณสารพิวเทรสซีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ




ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ข
ปริมาณพิวเทรสซีน (mg/kg)
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง


ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ค
ปริมาณพิวเทรสซีน (mg/kg)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง


ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ง
ปริมาณพิวเทรสซีน (mg/kg)
60
50
40
30
20
10
0
-10
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง



ภาพประกอบ 20 ปริมาณสารพิวเทรสซีนในตัวอย่างไส้กรอก ไส้อั่ว และหม่ำ

ก การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M

ข การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5%

ค การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M

ง การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5)

จ การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย 60^{O}C เมทานอล

ฉ การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย 90^{O}C เอทานอล

ช การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย น้ำ

<u>กำหนดให้แกนนอน</u>

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

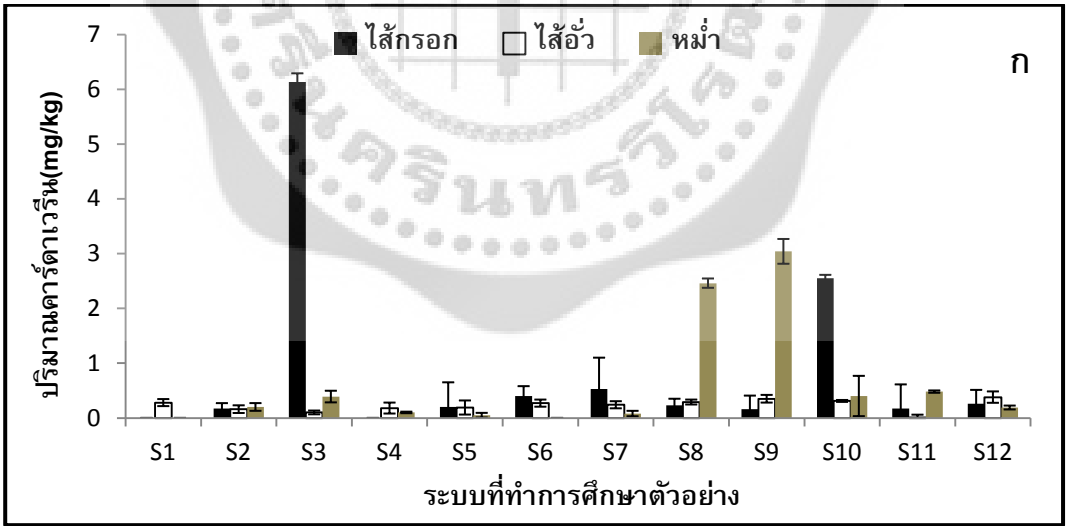
S9 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที

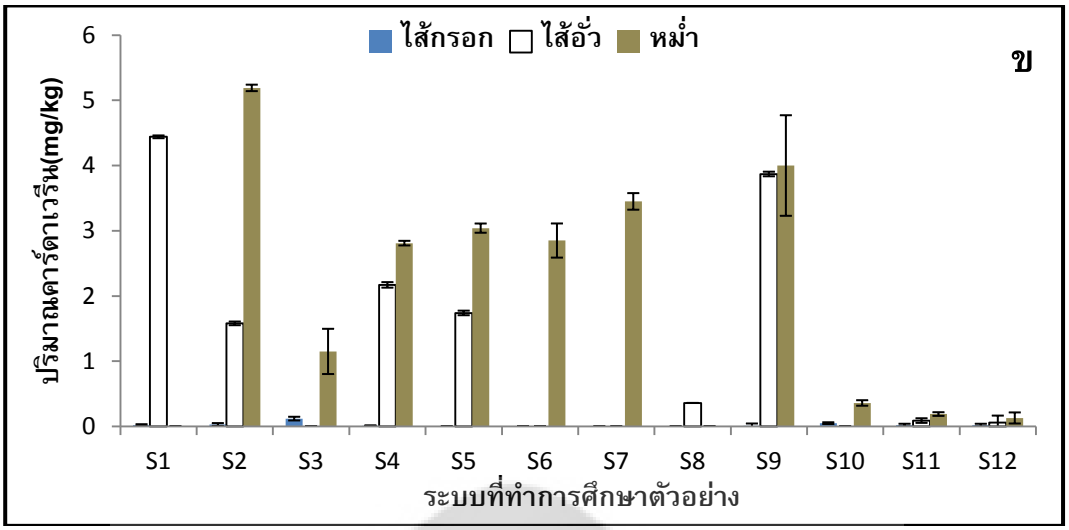
S10 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที

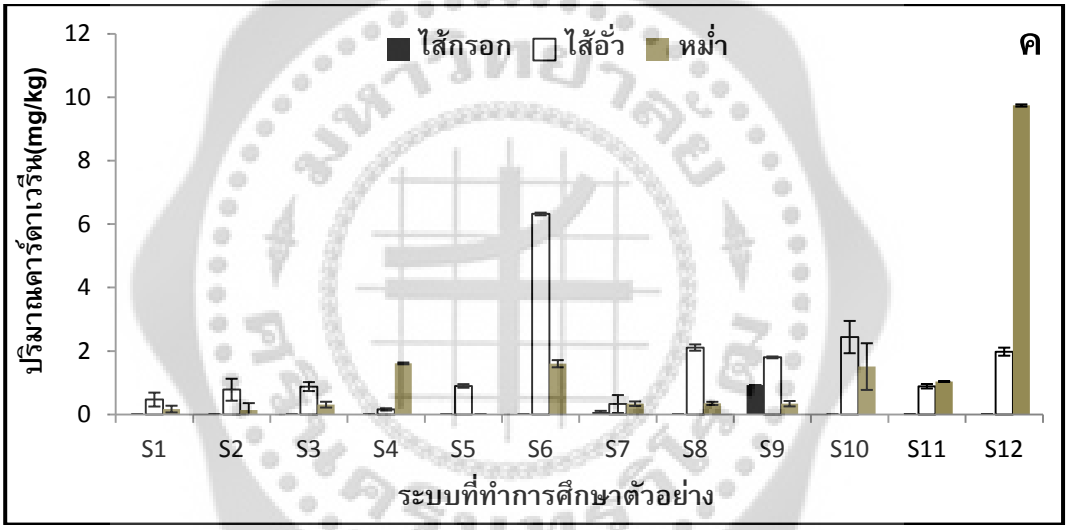
S11 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที

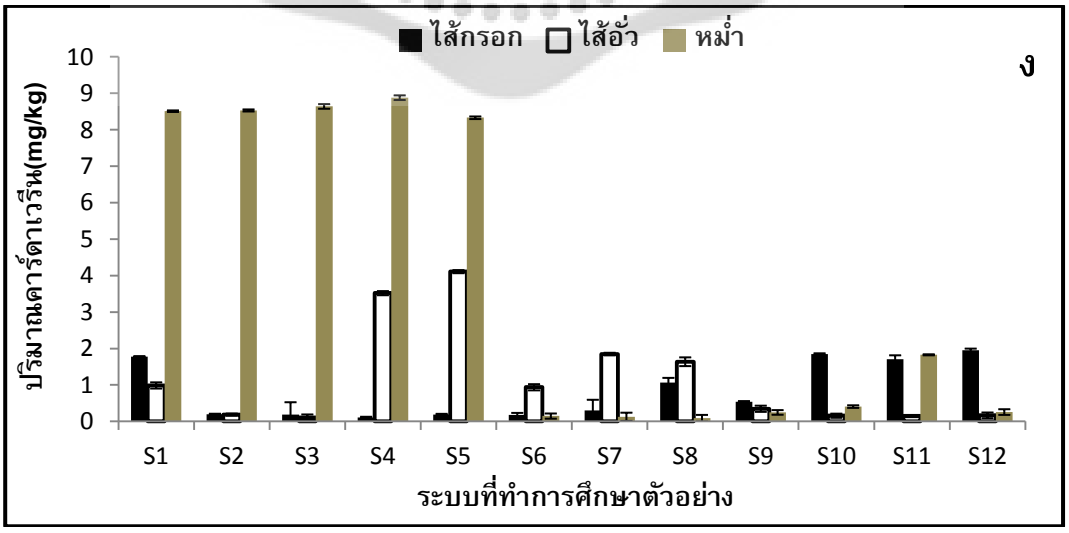
S12 คือ เขย่า 15 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที

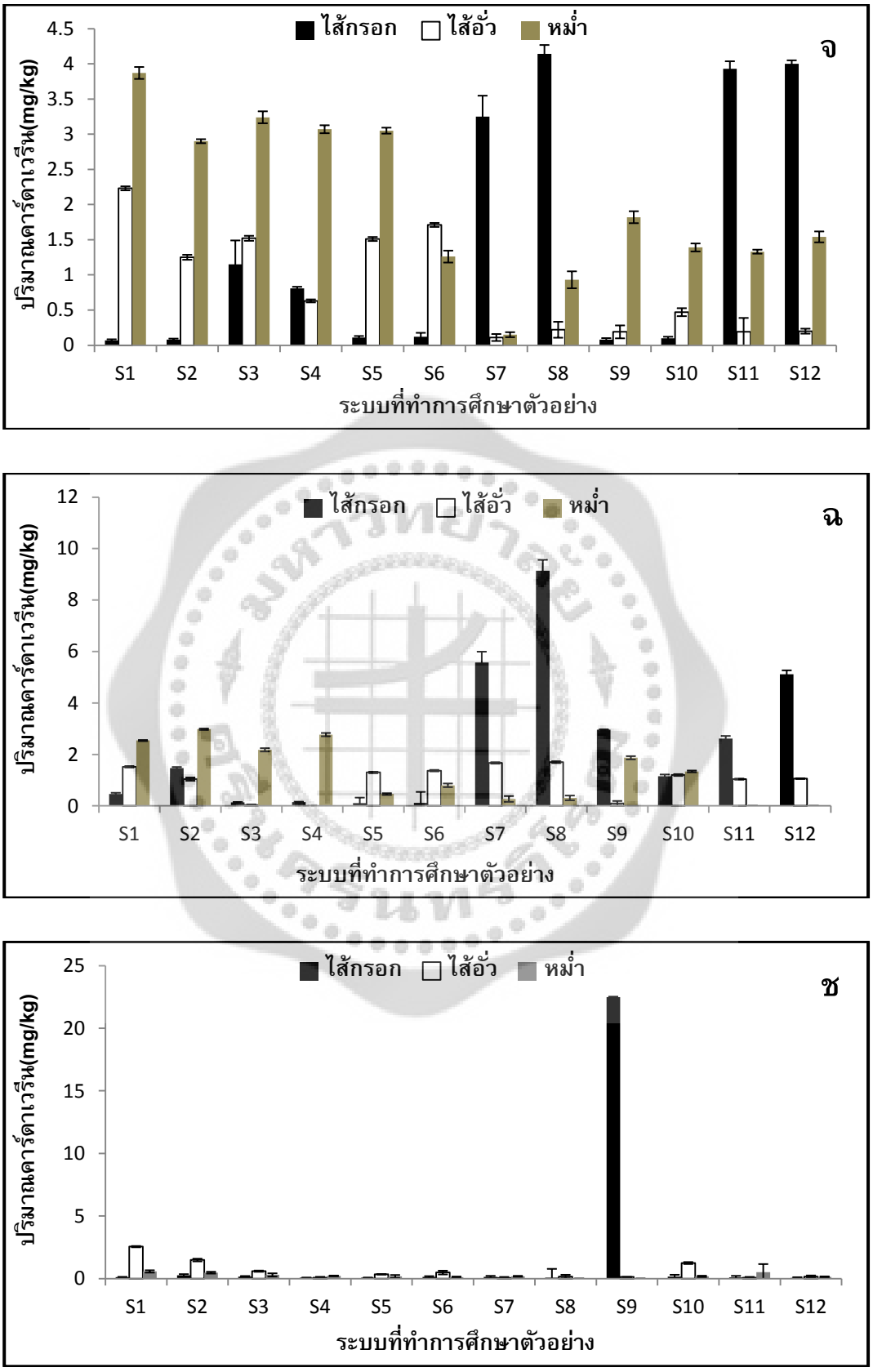
3.3 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำ




ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ข
ปริมาณคาร์ดาเวรีน(mg/kg)
0
1
2
3
4
5
6
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง


ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ค
ปริมาณคาร์ดาเวรีน(mg/kg)
0
2
4
6
8
10
12
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง


ไส้กรอก
ไส้อั่ว
หม่ำ
ง
ปริมาณคาร์ดาเวรีน(mg/kg)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
ระบบที่ทำการศึกษาตัวอย่าง



ภาพประกอบ 21 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอก ไส้อั่ว และหม่ำ

ก การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M

ข การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเข้มข้น 5%

ค การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 M

ง การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วยบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M (pH 9.5)

จ การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย 60^{O}C เมทานอล

ฉ การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย 90^{O}C เอทานอล

ช การสกัดตัวอย่างไส้กรอกด้วย น้ำ

<u>กำหนดให้แกนนอน</u>

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

จากผลการศึกษาความเหมาะสมในการสกัดไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างไส้กรอก ไส้อั่ว และหม่ำพบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนคือ 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.5 ร่วมกับการเขย่า 5 นาทีและเซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าค่า pH เป็นปัจจัยสำคัญและส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดด้วยตัวทำละลาย และค่า pH ของสารละลายที่ใช้ในการสกัดจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดนอกจากนี้ pH ยังส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์

ตาราง 23 ปริมาณมากสุดของฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ฮีสตามีน (mg/kg)	พิวเทรสซีน (mg/kg	คาร์ดาเวรีน (mg/kg)
0.1 M HCl	ไส้กรอก	3.08	13.11	6.13
	ไส้อั่ว	0.07	8.89	0.38
	หม่ำ	2.82	10.53	3.04
5% TCA	ไส้กรอก	7.68	0.26	0.12
	ไส้อั่ว	4.10	6.29	4.44
	หม่ำ	6.74	0.71	5.19

ตาราง 23 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ตัวอย่าง	ฮีสตามีน (mg/kg)	พิวเทรสซีน (mg/kg	คาร์ดาเวรีน (mg/kg)
0.4 M $HClO_4$	ไส้กรอก	1.75	0.06	0.93
	ไส้อั่ว	3.71	6.64	6.32
	หม่ำ	6.16	3.24	9.74
0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5)	ไส้กรอก	13.46	15.97	1.95
	ไส้อั่ว	33.97	18.31	4.11
	หม่ำ	2.65	49.11	8.88
60 ^{O}C MeOH	ไส้กรอก	7.36	0.48	4.14
	ไส้อั่ว	2.35	0.21	2.23
	หม่ำ	3.74	1.36	3.87
90 ^{O}C EtOH	ไส้กรอก	7.0	12.45	9.14
	ไส้อั่ว	2.83	9.15	1.70
	หม่ำ	2.73	0.18	2.98
น้ำ	ไส้กรอก	6.24	6.94	22.48
	ไส้อั่ว	1.11	0.18	2.56
	หม่ำ	3.65	1.34	0.58

ซึ่งประสิทธิภาพในการสกัดสามารถยืนยันได้ด้วยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) โดยทั่วไปร้อยละการคืนกลับสามารถหาได้จากตัวอย่างที่ทราบปริมาณที่แน่นอนหรือจากสารมาตรฐาน และเนื่องจากตัวอย่างที่จะทำการศึกษาเป็นของแข็งจะทำให้ยุ่งยากมากกว่า เพราะอาจทำให้ร้อยละการคืนกลับผิดพลาดได้ ซึ่งการบดตัวอย่างที่เป็นของแข็งให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการเตรียมตัวอย่างขั้นแรกเพราะขั้นตอนของการสกัดจะมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อตรวจสอบผลของ matrix effect เนื่องจากในตัวอย่างไส้กรอกมีสารรบกวนจำนวนมาก เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และไขมันซึ่งส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิก เพราะฉะนั้นตัวอย่างไส้กรอกหมักจะทำการเติมสารละลายมาตรฐาน (spike) ด้วยสารละลายลลายมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนและร้อยละการคืนกลับคำนวณได้โดยการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้พีก (peak area) ของตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน เนื่องจากในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างจะทำให้สารที่สนใจสูญหายไปบ้างระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

ตาราง 24 ปริมาณสารฮีสตามีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำสกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) (n=3)

ระบบที่ศึกษา	ปริมาณสารฮีสตามีน (mg/kg) ±SD		
	ไส้กรอก	ไส้อั่ว	หม่ำ
S1	nd	nd	1.98 ± 0.17
S2	nd	0.23 ± 0.07	1.84 ± 0.27
S3	13.46 ± 0.65	0.52 ± 0.02	1.74 ± 0.12
S4	0.89 ± 0.37	29.67 ± 0.81	1.81 ± 0.06
S5	0.71 ± 0.10	33.97 ± 4.28	1.7 ± 0.25
S6	0.84 ± 0.17	0.36 ± 0.10	nd
S7	0.62 ± 0.03	1.67 ± 0.14	0.05 ± 0.01
S8	0.30 ± 0.04	0.70 ± 0.11	0.59 ± 0.09
S9	1.18 ± 0.08	0.30 ± 0.12	0.57 ± 0.09
S10	1.56 ± 0.23	0.55 ± 0.08	0.79 ± 0.08
S11	0.78 ± 0.18	0.34 ± 0.04	0.67 ± 0.04
S12	0.69 ± 0.13	5.92 ± 0.06	2.65 ± 0.07

หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบสารด้วยวิธีที่ทดลองในงานวิจัยนี้

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

ตาราง 25 ปริมาณสารพิวเทรสซีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำสกัดด้วย 0.1 M บอเรต บัฟเฟอร์ (pH 9.5) (n=3)

ระบบที่ศึกษา	ปริมาณสารพิวเทรสซีน (mg/kg) ±SD		
	ไส้กรอก	ไส้อั่ว	หม่ำ
S1	12.99 ± 0.66	8.93 ± 1.22	49.11 ± 1.34
S2	0.38 ± 0.23	7.55 ± 0.63	43.71 ± 4.15
S3	0.17 ± 0.05	10.57 ± 0.76	46.47 ± 6.06
S4	7.59 ± 2.24	2.87 ± 1.32	45.79 ± 1.85
S5	10.19 ± 3.68	4.01 ± 0.04	46.65 ± 0.44
S6	10.00 ± 3.21	4.02 ± 0.22	nd
S7	10.36 ± 1.73	12.09 ± 1.02	7.36 ± 1.55
S8	4.08 ± 1.75	11.56 ± 0.80	Nd
S9	15.97 ± 3.52	8.27 ± 0.85	10.31 ± 0.83
S10	12.19 ± 1.75	10.50 ± 0.72	nd
S11	11.64 ± 3.67	11.60 ± 0.54	10.81 ± 0.66
S12	10.85 ± 0.67	18.31 ± 1.18	8.44 ± 1.00

หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบสารด้วยวิธีที่ทดลองในงานวิจัยนี้

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

ตาราง 26 ปริมาณสารคาร์ดาเวรีนในไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำสกัดด้วย 0.1 M บอเรต บัฟเฟอร์ (pH 9.5) (n=3)

ระบบที่ศึกษา	ปริมาณสารคาร์ดาเวรีน (mg/kg) ±SD		
	ไส้กรอก	ไส้อั่ว	หม่ำ
S1	1.78 ± 0.29	0.99 ± 0.08	8.51 ± 0.66
S2	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.51	8.53 ± 0.29
S3	0.19 ± 0.03	0.11 ± 0.03	8.64 ± 0.25
S4	0.11 ± 0.03	3.52 ± 0.05	8.88 ± 0.23
S5	0.19 ± 0.03	4.11 ± 0.12	8.33 ± 0.11
S6	0.18 ± 0.04	0.94 ± 0.05	0.15 ± 0.03
S7	0.30 ± 0.02	1.85 ± 0.07	0.13 ± 0.03
S8	1.07 ± 0.04	1.64 ± 0.07	0.09 ± 0.03
S9	0.54 ± 0.07	0.35 ± 0.05	0.25 ± 0.07
S10	1.85 ± 0.10	0.16 ± 0.02	0.41±0.02
S11	1.71 ± 0.05	0.15 ± 0.08	1.83 ± 0.07
S12	1.95 ± 0.17	0.17 ± 0.04	0.26 ± 0.03

หมายเหตุ nd หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบสารด้วยวิธีที่ทดลองในงานวิจัยนี้

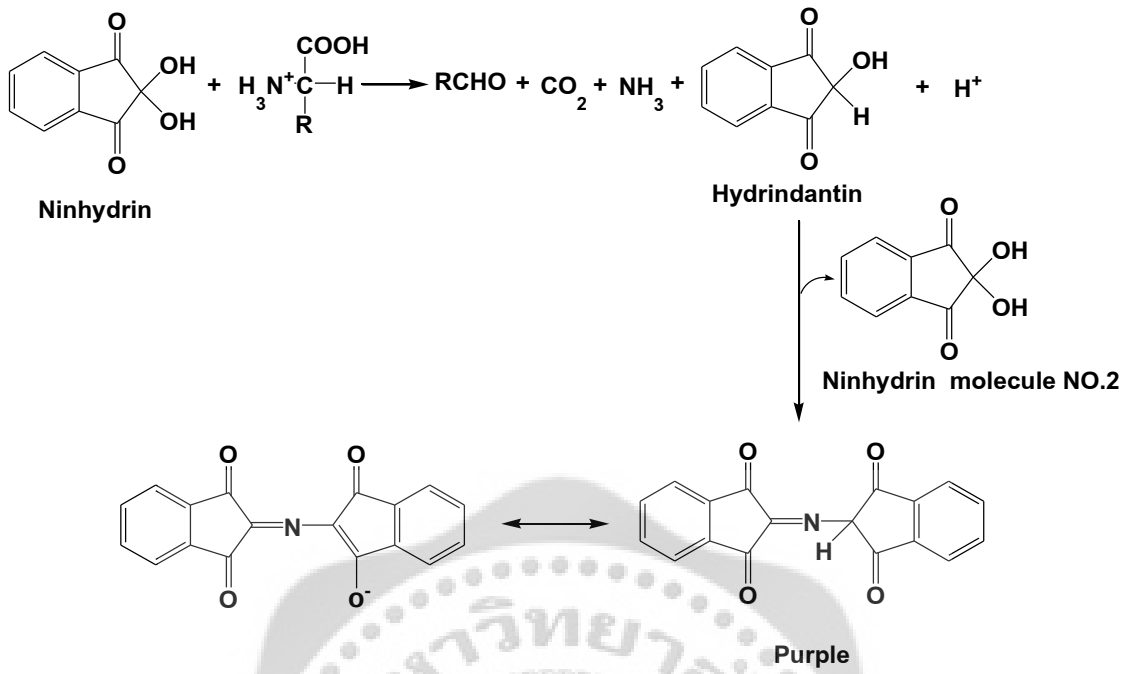
S1 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
S2 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
S3 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
S4 คือ เขย่า 5 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 20 นาที
S5 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 5 นาที
S6 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 10 นาที
S7 คือ เขย่า 10 นาที/เซ็นตริฟิวจ์ 15 นาที
S8 คือ เขย่า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

ตาราง 27 ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ของสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในตัวอย่างไส้กรอกที่สกัดด้วย 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) (n=3)

ตัวอย่าง	ไบโอจีนิกเอมีน	เติม (ppm)	ตรวจพบ (ppm)	% การคืนกลับ
ไส้กรอก	ฮีสตามีน	40	29.00	72.51
	พิวเทรสซีน	40	39.32	98.30
	คาร์ดาเวรีน	40	37.02	92.55
หม่ำ	ฮีสตามีน	40	34.12	85.30
	พิวเทรสซีน	40	34.48	86.20
	คาร์ดาเวรีน	40	33.12	82.80
ไส้อั่ว	ฮีสตามีน	40	34.24	85.60
	พิวเทรสซีน	40	39.62	99.05
	คาร์ดาเวรีน	40	40.76	101.90

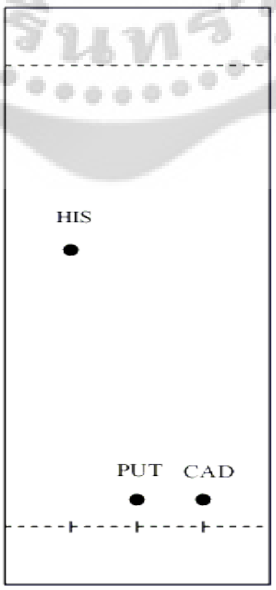
ตอนที่ 4 การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิคแผ่นบางโครมาโทกราฟี (TLC)

งานวิจัยได้นำเอาสารนินไฮดริน (ninhydrin) มาใช้เป็นรีเอเจนต์สำหรับการสเปรย์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ปฏิกิริยานินไฮดรินใช้ในการตรวจหาปริมาณกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโน 1 โมเลกุลทำปฏิกิริยากับนินไฮดริน 2 โมเลกุล เรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีแอมิเนชัน (oxidative deamination) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลดีไฮด์ แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อมกับได้นินไฮดรินรูปรีดิวซ์เรียกว่าไฮดรินแดนทริน (hydrindantin) แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกับไฮดรินแดนทิน และนินไฮดรินอีกโมเลกุลหนึ่ง กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงดังปฏิกิริยา สารสีม่วงที่เกิดขึ้นจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm (รัตนา สัมพันธชิต. 2548: 187)



ภาพประกอบ 22 ปฏิกิริยาระหว่างนินไฮดรินกับกรดอะมิโนหรือเอมีน
ที่มา: ดัดแปลงจากรัตนา สัมพันธชิต; 2548: 187

จากตารางพบว่าสภาวะที่สามารถแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนคือการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย MeOH : Ammonia ในอัตราส่วน 50 : 50 v/v



ภาพประกอบ 23 การแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิค TLC

ตาราง 28 ค่า R_f ในการแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยเทคนิค TLC ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น MeOH : Ammonia ในอัตราส่วน 50 : 50 v/v

ไบโอจีนิกเอมีน	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (mm)	ระยะทางที่สารละลายเคลื่อนที่ (mm)	R_f
ฮีสตามีน	4.10	6.85	0.60
พิวเทรสซีน	0.30	6.60	0.06
คาร์ดาเวรีน	0.40	7.00	0.05

จากการศึกษาการแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนด้วยแผ่นบางโครมาโทกราฟีโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามตาราง 17 พบว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ที่สามารถพาสารทั้ง 3 ให้เคลื่อนที่ได้ คือ การใช้เมทานอลต่อแอมโมเนียในอัตราส่วน 50 : 50 โดยปริมาตร ซึ่งสารฮีสตามีนเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลที่สุด ส่วนสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนนั้นสามารถเคลื่อนที่ได้ใกล้กว่า และสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนไม่สามารถแยกจากกันได้อย่างชัดเจนเนื่องจากมีค่า R_f ใกล้เคียงกันอย่างมากจึงทำให้การแยกสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนด้วยแผ่นบางโครมาโทกราฟีไม่ประสบผลสำเร็จ

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีนในตัวอย่างไส้กรอกพื้นเมืองของไทยจำนวนทั้งสิ้นสามชนิด ได้แก่ ไส้กรอกอีสาน ไส้อั่ว และหม่ำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดนี้ทำให้ทราบถึงขั้นตอนที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างที่เป็นของแข็งโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมร่วมกับการใช้เครื่อโซนิเคเตอร์มาใช้ร่วมกับการสกัด เนื่องจากสารทั้งสามชนิดนี้เป็นสารก่อภูมิแพ้ที่พบในอาหารประเภทหมักดอง การบ่งชี้ปริมาณนั้นมีความสอดคล้องหลายด้าน เช่น คุณภาพของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต กระบวนการเก็บรักษาอาหารหมัก และอันตรายที่เกิดจากการรับประทานอาหาร ทั้งนี้เพื่อให้ผู้บริโภคได้ตระหนักถึงการเลือกบริโภคอาหาร รวมทั้งผู้ผลิตจะต้องคำนึงถึงกระบวนการต่าง ๆ ในขั้นตอนของการผลิตให้ได้อาหารที่มีค่าทางโภชนาการสูงและมีความปลอดภัย

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัย สรุปผลได้ดังนี้

1. สารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิด ได้แก่ ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮีสติดีน ออร์นิทีน และไลซีนตามลดับปฏิกิริยาดังกล่าวรู้จักกันดีในชื่อของปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน การเกิดสารไบโอจีนิกเอมีนเกิดผลหลายอย่าง เช่นการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นและสีของอาหาร และประเด็นสำคัญคือสารฮีสตามีนเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ ส่วนสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนนั้นเป็นสารที่บ่งบอกถึงการเน่าเสียของอาหารและสามารถเกิดปฏิกิริยาเกิดเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสามชนิดนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการบ่งบอกถึงคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารประเภทหมักดอง

วิธีการทางด้านเคมีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารฮีสตามีน พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีน คือ เทคนิครีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเนื่องจากสามารถแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามได้ในคราวเดียวกัน แต่เนื่องจากข้อจำกัดในความสามารถของการดูดกลืนแสง พฤติกรรมของสารต่อความสามรถในการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และความจำเพาะต่อสัญญาณของการตรวจวัดจึงมีความจำเป็นที่จะต้องอาศัยรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์ไอโซอินโดลที่มีคุณสมบัติในการวาวแสง ในงานวิจัยนี้ใช้สารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เป็นรีเอเจนต์ในการทำปฏิกิริยาการควบแน่นกับสารไบโอ

จีนิกเอมีน โดยมี 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเป็นรีดิวซิงเอเจนต์ โดยสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นเรียกว่าไอโซอินโดลที่สามารถวาวแสงจึงทำให้สามารถตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ได้ นอกจากนี้โครงสร้างของสารยังมีพฤติกรรมเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ทำให้ความเป็นขั้วของสารลดลงในการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยสารอนุพันธุ์ที่เกิดขึ้นพบว่ามีลักษณะเป็นสารละลายใส

ทั้งสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน และออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เป็นสารที่ไม่มีคุณสมบัติในการวาวแสงแต่เมื่อทำปฏิกิริยากันแล้วจะเกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงได้ เรียกว่ามีหมู่ฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ในโครงสร้างของสารอนุพันธุ์ที่เกิดขึ้นทำให้อนุพันธ์ของสารนี้สามารถดูดกลืนความยาวคลื่นกระตุ้นที่ค่าความยาวคลื่น 335 nm และมีความสามารถในการวาวแสงที่ค่าความยาวคลื่น 460 nm

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารอนุพันธุ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่

2.1 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเตรียมสารอนุพันธ์

2.2 ช่วง pH ของแอซิเตตบัฟเฟอร์

2.3 อัตราส่วนระหว่างแอซิเตตบัฟเฟอร์ต่ออะซิโตไนไตรต์

2.4 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่าในการแยกสารอนุพันธ์ทั้งสามชนิดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100 mM แอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 ต่ออะซิโตไนไตรต์ที่อัตราส่วน 81 : 19 v/v อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.1 mL/min และตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์พบว่าสามารถแยกสารทั้งสามชนิดนี้ได้โดยที่สารพิวเทรสซีนถูกชะออกมาจากคอลัมน์เป็นลำดับแรกตามด้วยสารฮีสตามีนและสารพิวเทรสซีนโดยมีระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 9.29 12.47 และ 15.64 นาที ตามลำดับซึ่งใช้ระยะเวลาในการทดลองต่อหนึ่งโครมาโทแกรมเท่ากับ 20 นาที

3. จากผลการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ในการเกิดสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ได้แก่ กรดอะมิโนฮีสติดีน กรดอะมิโนออร์นิทรีน และกรดอะมิโนไลซีน เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสามสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงได้เช่นเดียวกับสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดจึงมีความเป็นไปได้ที่กรดอะมิโนทั้งสามจะเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดเนื่องจากอาจจะเกิดการซ้อนทับกันของพีก (overlap) บนโครมาโทแกรมทำให้การวิเคราะห์ปริมาณเกิดความคลาดเคลื่อนได้ จากการวิเคราะห์พบว่ากรดอะมิโนทั้งสามสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ได้สารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติวาวแสงแต่เมื่อทำการ

แยกสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนทั้งสามชนิดภายใต้ภาวะที่ใช้ในการแยกอนุพันธ์ของสารไบโอจีนิกเอมีนพบว่าไม่เกิดการซ้อนทับกันของพีกทั้งนี้เนื่องจากอนุพันธ์ของกรดอะมิโนทั้งสามชนิดมีเวลารีเทนชันน้อยกว่าอนุพันธ์ของสารไบโอจีนิกเอมีน โดยอนุพันธ์ของกรดอะมิโนฮีสติดีน กรดอะมิโนออร์นิทีน และกรดอะมิโนไลซีนมีระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 2.54 3.64 และ 5.60 นาที ตามลำดับและพบว่าสภาวะดังกล่าวสามารถที่จะใช้ในการแยกและวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนทั้งสามชนิดได้พร้อมกับการวิเคราะห์ปริมาณของสารไบโอจีนิกเอมีน

4. สารละลายตัวกลางมีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ และผลต่อความเสถียรของสารอนุพันธ์และความสามารถในการตอบสนองต่อสัญญาณการตรวจวัดแบบฟลูออเรสเซนต์ จากการศึกษาพบว่ากรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของสารไบโอจีนิกเอมีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ เนื่องจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมกรดไฮโดรคลอริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ค่า pH ของสารละลายเกิดการเปลี่ยนแปลงนั่นหมายถึงว่าสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาลดลงและเป็นผลให้การเปลี่ยนแปลงของสัญญาณลดลงอย่างมาก และจากการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์สารละลายกรดไฮโดรคลอริกด้วยเครื่องฟลูออร์โรมิเตอร์พบว่าค่าความเข้มแสงลดลงอย่างต่อเนื่อง สำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารไบโอจีนิกเอมีนกับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยเครื่องฟลูออร์โรมิเตอร์พบว่าค่าความเข้มมีค่าเพิ่มขึ้นที่เวลา 0 - 8 นาทีจากนั้นค่าความเข้มแสงจึงมีค่าลดลงแสดงว่าสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นไม่เสถียรในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และลำดับสุดท้ายศึกษาการเกิดปฏิกิริยาในเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่าค่าความเข้มแสงลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

5. การสกัดตัวอย่างไส้กรอกซึ่งเป็นตัวอย่างของแข็งและมีสารรบกวนอื่น ๆ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน รวมทั้งสารเติมแต่งในอาหารปะปนอยู่เป็นจำนวนมากในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างสำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมร่วมกับการเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ จากการศึกษาความเหมาะสมของตัวทำละลายและความเหมาะสมของระยะเวลาที่ใช้ในการเขย่าพบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดคือ 0.1 M บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.5 ร่วมกับการเขย่าเป็นเวลานาน 5 นาที

6. ในการทำคุณภาพวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และสเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินเพื่อให้เกิดเป็นจุดสีม่วง-แดงพบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการแยกสารฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน คือเมทาลอน : แอมโมเนียที่อัตราส่วน 50 : 50 v/v

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเตรียมตัวอย่างไส้กรอกจะต้องมีการเติมเฮกเซนเพื่อแยกไขมันออกจากตัวอย่างไส้กรอกจากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นเพื่อให้ไขมันแข็งตัวและจับกันเป็นก้อนและทำการเซ็นตริฟิวจ์ขณะเย็นและกรองเอาไขมันออกด้วยกระดาษกรองก่อนที่จะนำเอากากของแข็งที่เหลือไปสกัดด้วยตัวทำละลาย และการบดตัวอย่างให้ละเอียดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด
2. ในงานวิจัยนี้ใช้สารละลายแอซิเตตบัฟเฟอร์กับอะซิโตไนไตรต์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ การใช้บัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นสูงควรทดสอบความสามารถในการละลายซึ่งกันและกันก่อนนำไปใช้ในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อป้องกันการตกตะกอนในคอลัมน์
3. ควรเตรียมสารมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน และออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ทุก ๆ หนึ่งสัปดาห์เนื่องจากสารดังกล่าวไม่เสถียรและเกิดการสลายตัวได้ง่าย

บรรณานุกรม

เติมศักดิ์ ส่งวัฒนา. “ม.ป.ป.”. *เอกสารประกอบการสอน วิชา โภช 322 การถนอมอาหาร.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

จันทนา ว่องสันตติวานิช. “ม.ป.ป.”. *หลักการถนอมอาหารเบื้องต้น.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสวนดุสิต.

ชมภู่ ยิ้มโต. (2550). *การถนอมอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ถาวร จันทโชติ และ วาสนา มู่สา. (2553). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเนื้อแพะหมักกึ่งแห้ง.* สงขลา: คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ทองใบ เศรษฐีธร. (2537). *การถนอมอาหาร.* ปทุมธานี: สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

ธนากร ทองประยูร. (2541). *ศึกษาการทำซอสหมักปรุงรสสำหรับเนื้อหมูและเนื้อไก่.* กรุงเทพฯ: วิชาเอกคหกรรมศาสตร์ สาขาอาหารและโภชนาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

ธนาวุธ จารุทัศน์; และคนอื่นๆ. (2519). *การถนอมอาหารเล่ม1.* พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี.

นฤดม บุญ-หลง. (2532). *รายงานสถานการณ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ปลา และผลิตภัณฑ์ทะเล.* กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมอุตสาหกรรมกระทรวงอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์. “ม.ป.ป.”. *เภสัชวิทยา เล่ม 3.* กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปาริฉัตร หงสประภาส. “ม.ป.ป.”. *เอกสารประกอบการสอน อภ.311 การแปรรูปอาหาร1.* กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก. (2532). *กรรมวิธีการแปรรูปอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. (2537). *เภสัชวิทยา.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สมใจ ศิริโภค. (2537). *เทคโนโลยีการหมัก.* กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ

รังสินี โสธรวิทย์. (2550). *เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: สำนักพิพม์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัฒนา ประทุมสินธุ์. (2522). *ตำราวิชาการถนอมอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ปัตตานี.

ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. (2522). *หลักการถนอมอาหารและการควบคุมอาหาร.* นนทบุรี: โรงพิมพ์บำรุงนุกูลกิจ.

สุธีรา ผ่องศรี. “ม.ป.ป.”. *เอกสารประกอบการสอนวิชา คส 313 การถนอมอาหาร 1*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

สุภรณ์ ลิ้มอารีย์. (2530). *การถนอมอาหาร*. มหาสารคาม: ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2549). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สรจักร ศิริบริรักษ์ และ จิราธร จิรประวัติ. (2544). *เภสัชโภชนา 4*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์กรุงเทพ.

สุวิมล กีรติพิบูล. (2546). *จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี.

อุตรภิชาติ. (2552). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. พิมพ์ครั้งทที่ 4. สงขลา: นำศิลป์โฆษณา

A. Marcobal et al. (2005). Biogenic Amine Content of Red Spanish Wines: Comparison of a Direct ELISA and an HPLC Method for the Determination of Histamine in Wines. *Food Research International*, 38: 387–394.

Alain Bouchereau et al. (2000). Review Analysis of Amine in Plant Materials. *Journal of chromatography B.* 747. 49-67.

Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland. (1995). *Meat and Meat Products Technology, Chemistry and Microbiology*.

A.L. Cinquina et al. (2004). Validation and Comparison of Analitical Methods for the Determination of Histamine in Tuna Fish Samples. *Journal of Chromatography A,* 1032: 79-85.

Alfred K. Anderson. (2008). Biogenic and Volatiles Amine-Related Qulities of Three Popular Fish Spicies Sold at Kuwait Fish Markets. *Food chemistry,* 107: 761-767.

A.M. Pearson and T.A. Gillett. (1996).*process meat*. 3rd ed. USA : Chapman and Hall.

Armağan Ünal. (2007). A review: Current Analytical Methods for the Determination of Biogenic Amines in foods. *Food Chemistry*, 103: 1475–1486.

A. R. Shalaby. (1995). Multidetection, Semiquantitative Method for Determining Biogenic Amines in Foods. *Food Chemistry 52. 361-312.*

Bao-Shyung Hwang, Jih-Terng Wang & Youk-Meng Choong. (2003). A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Histamine in Fish and Fish Products. *Food Chemistry, 82.* 329–334.

Bover-CiD, Sara et al. (2001). Amino Acid-Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated from Fermented Pork Sausages. *International Journal of Food Microbiology.* 66: 185–189.

Bover-CiD, Sara et al. (2001). Biogenic Amine Accumulation in Ripened Sausages Affected by the Addition of Sodium Sulphite. *Meat Science*. 59: 391–396.

Bover-Cid, Sara; Izquierdo-Pulido, Maria; & Vidal-Carou, M. Carmen. (2001). Changes in Biogenic Amine and Polyamine Contents in Slightly Fermented Sausages Manufactured with and Without Sugar. *Meat Science.* 57: 215-221.

Capillas, Ruiz et al. (2012). Konjac Gel as Pork Backfat Replacer in Dry Fermented Sausages: Processing and Quality Characteristics. *Meat Science.* doi: 10.1016/j.meatsci.2012.04.028

Cinquina, A.L. et al. (2004). Validation and Comparison of Analytical Methods for the Determination of Histamine in Tuna Fish Samples. *Journal of Chromatography A* 1032: 79–85.

Custódio, Flávia Beatriz; Tavares, Érico; & GlÓria, Maria Beatriz Abreu. (2007). Extraction of Bioactive Amines from Grated Parmesan Cheese Using Acid, Alkaline and Organic Solvents. *Journal of Food Composition and Analysis.* 20: 280–288.

De Mey, E. et al. (2012). Dabsyl Derivatisation as an Alternative for Dansylation in the Detection of Biogenic Amines in Fermented Meat Products by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry.* 130: 1017–1023.

DR. CLAUDIA RUIZ-CAPILLAS & FRANCISCO JIMÉNEZ-COLMENERO. (2004). Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 489–499.

E. De Mey, G. Drabik-Markiewicz, H. De Maere, M.-C. Peeters, G. Derdelinckx, H. Paelinck & T. Kowalska. (2012).Dabsyl Derivatisation as an Alternative for Dansylation in the Detection of Biogenic Amines in Fermented Meat Products by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*, 130. 1017–1023.

Ekaterini J. Papavergou. (2011). Biogenic Amine Levels in Dry Fermented Sausages Produced. *Procedia – Food Science. 1*. 1126-1131.

Ekici, Kamil et al. (2004). A Note on Histamine Levels in Turkish Style Fermented Sausages. *Meat Science*. 68: 123–125.

Ehr, I. J.; & Tronsky, T. L.. “n.d.”. *HOME SAUSAGE MAKING*. 2nd ed. Department of Animal Science University.

Elena Peñas et al. (2010). Impact of Fermentation Conditions and Refrigerated Storage on Microbial Quality and Biogenic Amine Content of Sauerkraut. *Food Chemistry*, 123: 143–150.

Etienne, Monique; Ifremer;& Nantes. (2006). Methods for Chemical Quality Assessment Methodology for Histamine and Biogenic Amines Analysis.

Eva Dádaková, Martin Křížek *, Tamara Pelikánová. (2009). Determination of Biogenic Amines in Foods Using Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116: 365–370.

Fernández et al. (2000). Accelerated Ripening Dry Fermented Sausages. *Trends in food science & Technology*. 11: 201-209.

Frattini, Valeria; and Lionetti, Claudia. (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.

Han M.I., J. Joosten, & Manuel Nuñez. (1996). Prevention of Histamine Formation in Cheese by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology. Vol. 62*, No. 4: 1178–1181.

H.K. Mayer, G. Fiechter & E. Fischer. (2010). A New Ultra-Pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*, 1217: 3251–3257.

Huang, Ke-Jing et al. (2011). Development of an Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Liquid–Liquid Microextraction Method for Sensitive Determination of Biogenic Amines: Application to the Analysis of Octopamine, Tyramine and Phenethylamine in Beer Samples. *Journal of Chromatography B*. 879: 579–584.

Hungerford, James M.. (2010). Scombroid Poisoning: A Review. *Toxicon.* 56: 231–243.

Hungerford, James M.; Hollingworth, Thomas A.; & Wekell, Marleen M.. (2001). Automated Kinetics-Enhanced Flow-Injection Method for Histamine in Regulatory Laboratories: Rapid Screening and Suitability Requirements. *Analytica Chimica Acta.* 438: 123–129.

Hwi-Chang Chen et al. (2010). Determination of Histamine and Biogenic Amines in Fish Cubes (*Tetrapturus angustirostris*) Implicated in a Food-Borne Poisoning. *Food Control*, 21: 13–18.

Innocente, N. et al. (2007). Determination of Biogenic Amines in Cheese Using HPLC Technique and Direct Derivatization of Acid Extract. *Food Chemistry*. 101: 1285–1289.

James M. Hungerford, Thomas A. Hollingworth & Marleen M. Wekell. (2001). Automated Kinetics-Enhanced Flow-Injection Method for Histamine in Regulatory Laboratories: Rapid Screening and Suitability Requirements. *Analytica Chimica Acta*, 438. 123–129.

Jette Emborg, Birgit Groth Laursen & Paw Dalgaard (2005). Significant Histamine Formation in Tuna (*Thunnus albacares*) at 2^{O}C-Effect of Vacuum and Modified Atmosphere-Packaging on Psychrotolerant Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 101. 263– 279.

J. Karovičová & Z. Kohajdova. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chem. Pap.* 59(1). 70-79.

Joon Shik Park et al. (2010). Monitoring the Contents of Biogenic Amines in Fish and Fish Products Consumed in Korea. *Food Control,* 21: 1219–1226.

José M. Lorenzo et al. Biogenic Amine Content During the Manufacture of Dry-Cured Lacón, A Spanish Traditional Meat Product: Effect of some Additive. *Meat Science,* 77: 287-293.

Judite Lapa-Guimarães & Jana Pickova. (2004). New Solvent Systems for Thin-Layer Chromatographic Determination of Nine Biogenic Amines in Fish and Squid. *Journal of Chromatography A,* 1045. 223–232.

KAROVIČOVA, J. and KOHAJDOVA, Z.. (2003). Biogenic Amines in Food. *Chem. Pap*. 59: 70—79.

Ke-Jing Huang et al. (2009). Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for Sensitive Determination of Biogenic Amines in Rice Wine S.amples. *Journal of Chromatography A*, 1216. 6636–6641.

Kim, Jae-Hyun et al. (2005). Reduction of the Biogenic Amine Contents in Low Salt-Fermented Soybean Paste by Gamma Irradiation. *Food Control*. 16: 43–49.

Kim, Min-Ki; Mah, Jae-Hyung; & Hwang Han-Joon. (2009). Biogenic Amine Formation and Bacterial Contribution in Fish, Squid and Shellfish. *Food Chemistry*. 116: 87–95.

Komprda, T.; Sladkova, P.; & Dohnal V.. (2009). Biogenic Amine Content in Dry Fermented Sausages as Influenced by a Producer, Spice Mix, Starter Culture, Sausage Diameter and Time of Ripening. *Meat Science.* 83: 534–542.

Latorre-Moratalla, M.L. et al. (2008). Biogenic Amines in Traditional Fermented Sausages Produced in Selected European Countries. *Food Chemistry*. 107: 912–921.

Laura Maintz and Natalija Novak. (2007). Histamine and Histamine Intolerance. *Am J.Clin Nutr.* 85: 1185-1196.

Lehane, Leigh and Olley, June. (2000). Histamine Fish Poisoning Revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 1–37.

Leigh Lehane & June Olley. Review Histamine Fish Poisoning Revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58: 1–37.

Lorenzo, José M. et al. (2007). Biogenic Amine Content During the Manufacture of Dry-Cured LacÓn, a Spanish Traditional Meat Product: Effect of some Additives. *Meat Science*. 77: 287–293.

L. Victor et al. (n.d.).Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines.

Mah, Jae-Hyung et al. (2002). Biogenic Amines in Jeotkals, Korean Salted and Fermented Fish Products. *Food Chemistry*. 79: 239–243.

Mah, Jae-Hyung et al. (2009). Inhibitory Effects of Garlic and Other Spices on Biogenic Amine Production in Myeolchi-jeot, Korean Salted and Fermented Anchovy Product. *Food Control.* 20: 449–454.

Maintz, Laura; & Novak, Natalija. (2007). Histamine and Hidtamine Intolerance. *American Journal Clinical Nutrition.* 85: 1185-1196.

Mardiana Saaid et al. (2009). Determination of Biogenic Amines in Selected Malaysian Food. *Food Chemistry,* 113: 1356–1362.

Marks, Heidi S.; & Anderson, Collin R.. (2005). Determination of Putrescine and Cadaverine in Seafood (finfish and shellfish) by Lliquid Chromatography using Pyrene Excimer Fluorescence. *Journal of Chromatography A*. 1094: 60–69.

Mary T. Kellya, Alain Blaise, & Michel Larroque. (2010). Rapid Automated High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines in Wine, Fruit and Honey. *Journal of Chromatography A*, 1217. 7385–7392.

Mitchell, J. L. A. (2003). Regulation of Polyamine Metabolism. *Health implications of dietary amines, Vol 1.* 89-100.

M.L. Latorre-Moratallaa et al. (2009). Validation of an Ultra High Pressure Liquid Chromatographic Method for the Determination of Biologically Active Amines in Food. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7715–7720.

Molins-Legua, C.; & Campins-FalcÓ, P.. (2005). Solid Phase Extraction of Amines. *Analytica Chimica Acta*. 546: 206–220.

Moret, Sabrina; & Conte, Lanfranco S.. (1996). High-Performance Liquid Chromatographic Evaluation of Biogenic Amines in Foods an Analysis of Different Methods of Sample Preparation in Relation to Food Characteristics. *Journal of Chromatography A*. 729: 363-369.

Moret, Sabrina et al. (2005). A survey on Free Biogenic Amine Content of Fresh and Preserved Vegetables. *Food Chemistry*. 89: 355–361.

Muhammad Zukhrufuz Zaman, Fatimah Abu Bakar & S. Jinap a, Jamilah Bakar. (2011). Novel Starter Cultures to Inhibit Biogenic Amines Accumulation During Fish Sauce Fermentation. *International Journal of Food Microbiology,* 145: 84–91.

Nine Countries. *Food Control*. 22: 430-432.

N. Innocente et al. (2007). Determination of Biogenic Amines in Cheese using HPLC Technique and Direct Derivatization of Acid Extract. *Food Chemistry*, 101. 1285–1289.

Oguri, Shigeyuki et al. (2007). Selective Analysis of Histamine in Food by Means of Solid-Phase Extraction Cleanup and Chromatographic Separation. *Journal. Chromatography A.* 1139: 70–74

O. Vandenabeele et al. (1998). Use of 2-Chloroethylnitrosourea, A New Type of Pre-Column Derivatizing Agent for the Measurement of Biogenic Amines, by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography A*, 795. 239–250.

Özgül Özdestan & Ali Üren. (2009). A Method for Benzoyl Chloride Derivatization of Biogenic Amines for High Performance Liquid Chromatography. *Talanta 78*. 1321–1326.

Tao Tang et al. (2009). Determination of Biogenic Amines in Beer with Pre-Column Derivatization by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877. 507–512.

Panagiota Agrafiotou et al. (2011). Simultaneous Effect of pH, Temperature and Mobile Phase Composition in the Chromatographic Retention of Ionization Compound. *Journal of Chromatography A.* 1218: 4995-5009.

Papavergou. (2011). Biogenic Amine Levels in Dry Fermented Sausages Produced and Sold in Greece. *Procedia Food Science*. 1: 1126-1131.

Pavel Kalač & Petra Krausová. (2005). A Review of Dietary Polyamine: Formation, Implication for Growth and Health and Occurrence in Foods. *Food chemistry.* 90: 219-230.

Peng, Jin-feng et al. (2008). Development of an Automated On-Line Pre-Column Derivatization Procedure for Sensitive Determination of Histamine in Food with High-Performance Liquid Chromatography–Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography A*. 1209: 70–75.

Pereira, V. et al. (2008). Simultaneous Analysis of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Honey and Wine Samples Using in Loop Orthophthalaldeyde Derivatization Procedure. *Journal of Chromatography A*. 1189: 435–443.

Proestos, Charalampos; Loukatos, Paul; & Komaitis, Michael. (2008). Determination of Biogenic Amines in Wines by HPLC with Precolumn Dansylation and Fluorimetric Detection. *Food Chemistry.* 106: 1218–1224.

R.C. Dorresteijn et al. (1996) Determination of Amino Acid Using *O* – Phthalaldehyde - 2 – Mercaptoethanol Derivatization Effect of Reaction Condition. *Journal of Chromatography A*. 724: 159-167.

R. Jeya Shakila, T.S. Vasundhara & K.V. Kumudavally. (2001). Comparison of the TLC-Densitometry and HPLC Method for the Determination of Biogenic Amines in Fish and Fishery Products. *Food Chemistry*, 75: 255–259.

Robertis, Alessandro De et.al. (1998). Binding of Polyanions by Biogenic Amines. I. Formation and Stability of Protonated Putrescine and Cadaverine Complexes with Inorganic Anions. *Talanta*. 46: 1085–1093.

Ruiz-Capillas, C. et al. (2007). Biogenic Amine Production in Spanish Dry-Cured ‘‘chorizo’’ Sausage Treated with High-Pressure and Kept in Chilled Storage. *Meat Science*. 77: 365–371.

Saaid, Mardiana et al. (2009). Determination of Biogenic Amines in Selected Malaysian Food. *Food Chemistry.* 113: 1356–1362.

Saarinen, M. T. (2002). Determination of Biogenic Amines as Dansyl Derivatives in Intestinal Digesta and Feces by Reversed Phase HPLC. *Journal Chromatographia*. 55: 297-300.

Sadain, Salma K.; Koropchak; John A.. (1999). Condensation Nucleation Light Scattering Detection for Biogenic Amines Separated by Ion-Exchange Cromatography. *Journal of Chromatography A*. 844: 111–118.

Saeed Tahmouzi, Ramin Khaksar , & Mehran Ghasemlou. (2011). Development and ฮ alidation of an HPLC-FLD Method for Rapid Determination of Histamine in Skipjack Tuna Fish (Katsuwonus pelamis) *Food Chemistry*. 126. 756–761.

Santos, M.H. Silla. (1996). Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *Food Microbiology* . 29: 213-231.

Sevim Köse et al. (2011). Commercial Test Kits and the Determination of Histamine in Traditional (ethnic) Fish Products-Evaluation Against an EU Accepted HPLC Method. *Food Chemistry*, 125. 1490–1497.

S.B Patange, M.K. Mukunda & K. Ashok Kumar. (2005). A Simple and Rapid Method for Colorimetric Determination of Histamine in Fish Flesh. *Food Chemistry,* 16: 465-472.

Shalaby, Ali R. (1996). Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International.* Vol. 29 No. 7, pp. 675-690.

Shukla, Shruti et al. (2010). Determination of Biogenic Amines in Korean Traditional Fermented Soybean Paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1191–1195.

S. Loret, P. Deloyer & G. Dandrifosse. (2005). Levels of Biogenic Amines as a Measure of the Quality of the Beer Fermentation Process: Data from Belgian Samples. *Food Chemistry,* 89: 519–525.

Smith, J. Scott and Hui, Y.H.. (2004). Food Processing : Principles and Application. 1st ed. Australia.

Stute, R. et al. (2002). Biogenic Amines in Fish and Soy Sauces. *Eur Food Res Technol*. 215: 101–107.

Tahmouzi, Ramin Khaksar & Mehran Ghasemlou. (2011). Development and Validation of an HPLC-FLD Method for Rapid Determination of Histamine in Skipjack Tuna Fish (*Katsuwonus pelamis*). *Food chemistry*. 126: 756-761.

Tang, Tao et al. (2009). Determination of Biogenic Amines in Beer with Pre-Column Derivatization by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B*. 877: 507–512.

Tao Tang et al. (2011). Monitoring the Contents of Biogenic Amines in Sufu by HPLC with SPE and Pre-Column Derivatization. *Food Control*. 22: 1203-1208.

Tarliane M. Silva et al. (2011). Occurrence of Histamine in Brazilian Fresh and Canned Tuna. *Food Control*, 22: 323-327.

Tasić, Tatjana et al. (2012). Biogenic Amines Content in Traditional Dry Fermented Sausage Petrovská Klobása as Possible Indicator of Good Manufacturing Practice. *Food Control*. 23: 107-112.

Tsikas, Dimitrios et al. (1993). Ion-Pair Extraction of Histamine from Biological Fluids and Tissues for Its Determination by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography.* 614: 37-41.

You, Jinmao et al. (1999). Fluorescence Properties of Carbazole-9-yl-acetyl chloride and Its Application for the Simultaneous Determination of Amino Acids and Biogenic Amines via Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytica Chimica Acta*. 382: 51-65.

Yung-Hsiang Tsai et al. (2005). Determination of Histamine in Canned Mackerel Implicated in a Food Borne Poisoning. *Food Control*, 16. 579–585.

Yung-Hsiang Tsai et al. (2006). Histamine Contents of Fermented Fish Products in Taiwan and Isolation of Histamine-Forming Bacteria. *Food Chemistry,* 98. 64–70.

Yung-Hsiang Tsai et al. (2007). Determination of Histamine and Histamine-Forming Bacteria in Dried Milkfish (Chanos chanos) Implicated in a Food-Borne Poisoning. *Food Chemistry*, 105. 1289–1296.

Valentin Lozanov, Stefan Petrov & Vanio Mitev. (2004). Simultaneous Analysis of Amino Acid and Biogenic Polyamines by High-Performance Liquid Chromatography After Pre-Column Derivatization with *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide. *Journal of Chromatography A*, 1025: 201–208.

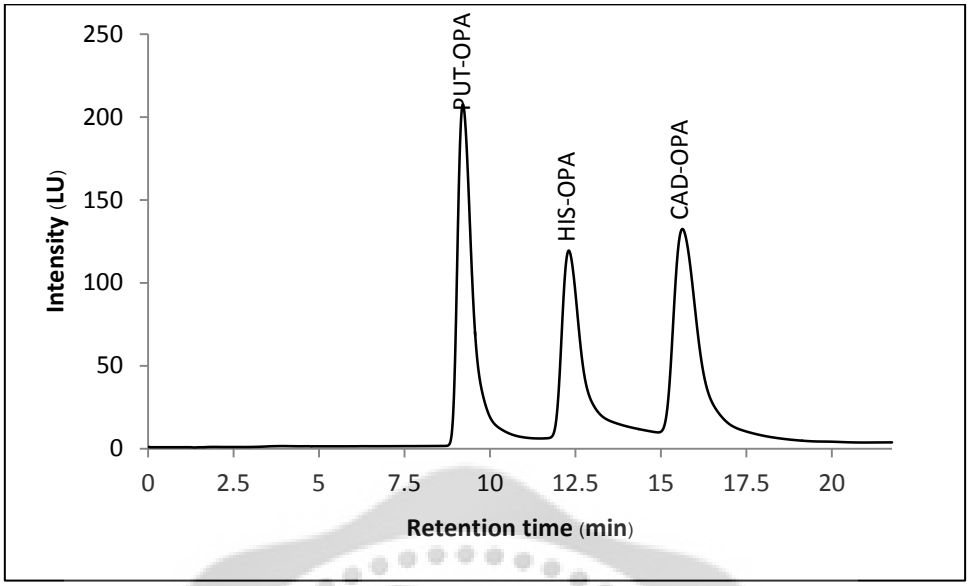
V. Pereira et al. (2008). Simultaneous Analysis of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Honey and Wine Samples Using in Loop Orthophthalaldeyde Derivatization Procedure. *Journal of Chromatography A*, 1189: 435–443.

Zaman, Muhammad Zukhrufuz et al. (2011). Novel Starter Cultures to Inhibit Biogenic Amines Accumulation During Fish Sauce Fermentation. *International. Journa. of Food Microbiology.* 145: 84–91.

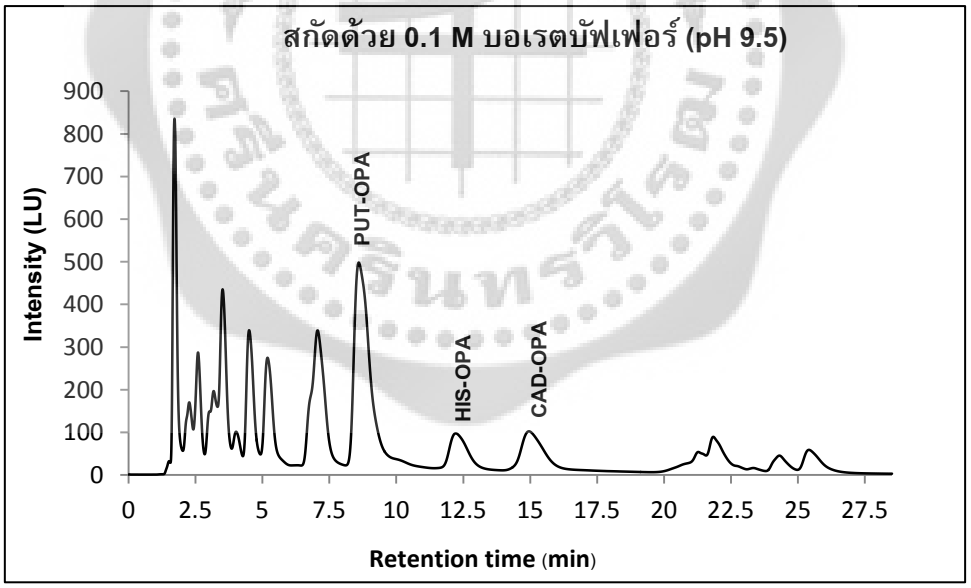
Zhihua Tao et al. (2011). A survey of Histamine Content in Seafood Sold in Markets of Nine Countries. *Food Control*. 22: 430-432.

ภาคผนวก ก

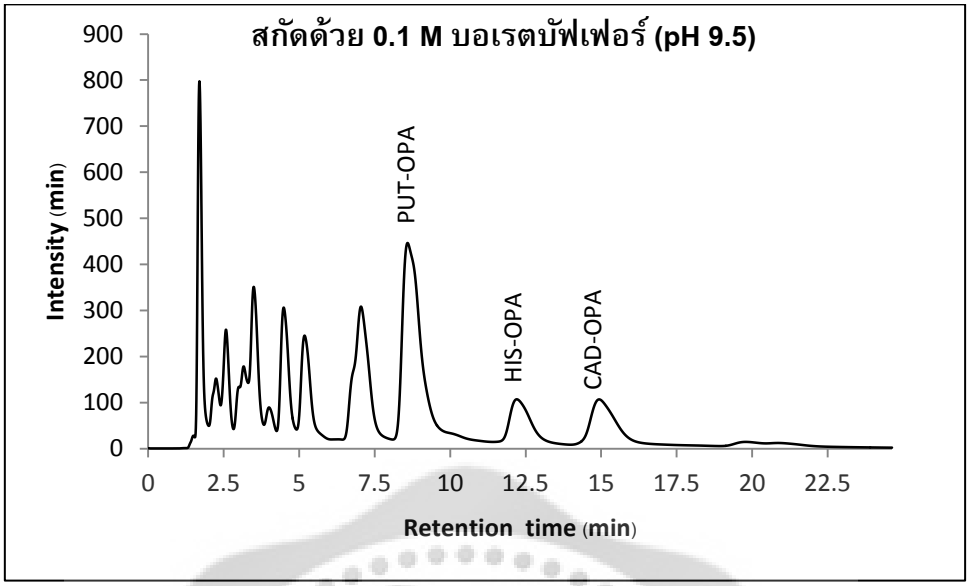
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



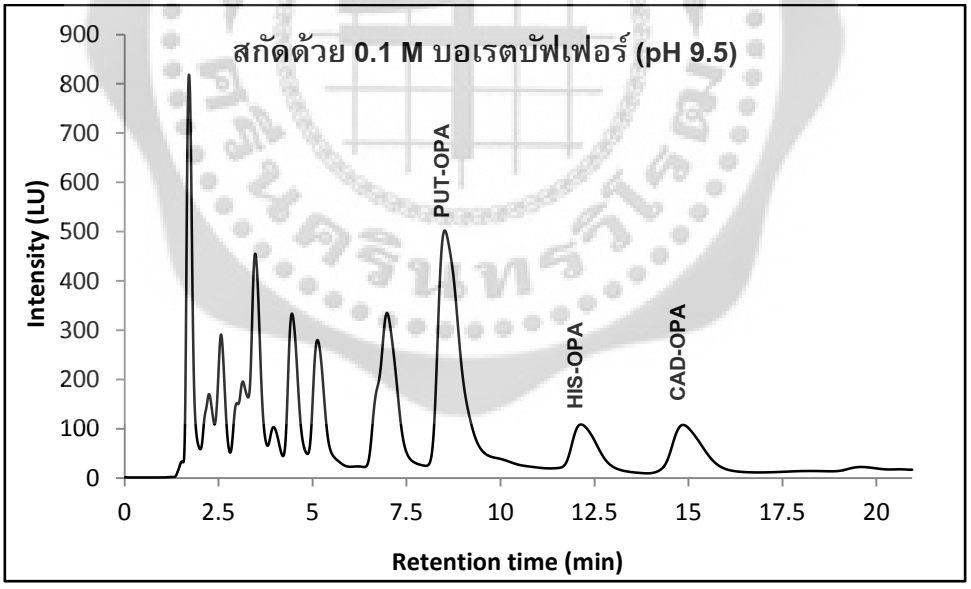
ภาพประกอบ 24 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ความเข้มข้น 40 ppm



ภาพประกอบ 25 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการ spike ตัวอย่างไส้กรอกด้วยสารละลายมาตรฐาน 40 ppm



ภาพประกอบ 26 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการ spike ตัวอย่างไส้อั่วด้วยสารละลายมาตรฐาน 40 ppm



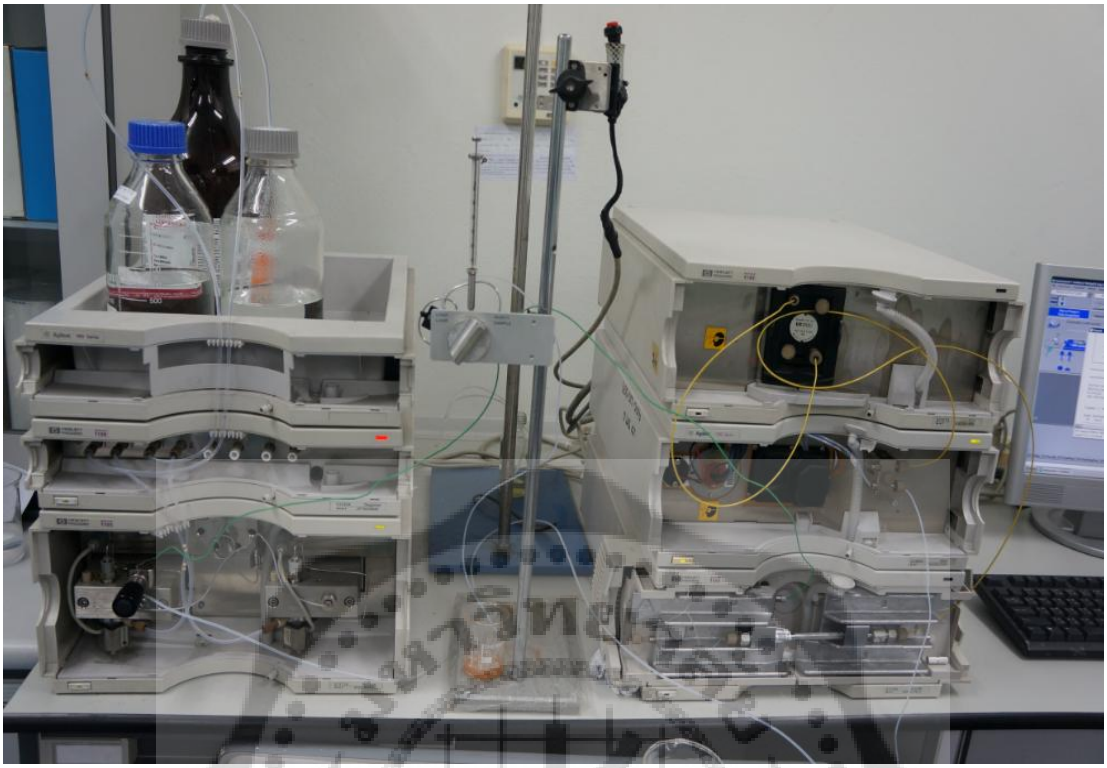
ภาพประกอบ 27 แสดงตัวอย่างโครมาโทแกรมที่ได้จากการ spike ตัวอย่างหม่ำด้วยสารละลายมาตรฐาน 40 ppm

ภาคผนวก ข

รูปเครื่องมือ และอุปกรณ์

ภาพประกอบ *28* เครื่องอังไอน้ำที่สามารถควบคุมอุณภูมิได้ใช้ในการให้ความร้อนในการเตรียมอนุพันธ์

ภาพประกอบ 29 ชุดกรองที่ใช้ในการกรองสารมาตรฐานและสารตัวอย่างก่อนนำไปฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



ภาพประกอบ 30 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ภาพประกอบ 31 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายวีรชัย สิงห์ทอง
วันเดือนปีเกิด	16 ตุลาคม 2530
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 76 หมู่ที่ 1 ตำบลบัวหุ่ง อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีษะเกษ 33160
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	จากโรงเรียนสตรีสิริเกศ จังหวัดศรีสะเกษ
พ.ศ. 2552	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2556	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร