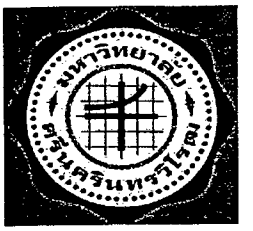
553.93
พ249ก
2556

139/2555



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในซอสปรุงรส

Determination of Histamine Putrescine and Cadaverine content in Seasoning Sauces

ส.ค. พ.ย. 2556

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2556

S 400 691

บทคัดย่อ

สารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน จัดเป็นสาร เป็นสารพิษประเภทสารไบโอจีนิคเอมีน ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพของอาหาร ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะทำการศึกษาหา ชนิด และ ปริมาณสารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเ วรีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างซอสปรุงรส ทั้งนี้ได้ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณสารเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคสเปกโทรฟลออโรเมตรีกับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารไบโอจีนิคเอมีนได้แก่ ระย ะเวลาการเก็บ ลักษณะการเก็บตัวอย่างในที่เย็นเปรียบเทียบกับเก็บที่อุณหภูมิห้อง การเก็บตัวอย่างในที่มืด และที่สว่าง ท้ายสุดได้มีการนำผลการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์มาปรับเป็นชุดทดสอบแบบง่าย ผลการทดลองทางคุณภาพวิเคราะห์พบว่าระบบการแยกด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟีที่ดีเวลลอปสารด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล: แอมโมเนียในอัตราส่วน 80: 20 โดยปริมาตร ทำการตรวจหาตำแหน่งจุดบนโครมาโทแกรมด้วยไอของไอโอดีน ผลการศึกษาหาเทคนิคที่ใช้ตรวจหาปริมาณสาร พบว่า สามารถใช้เทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรีในการตรวจวัดสารไบโอจีนิคเอมีน ด้วยการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร และตรวจวัดการวาวแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะของสารมาตรฐานแต่ละชนิด วิธีการตรวจสอบนี้ใช้เวลาตรวจสอบรวดเร็วกว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการตรวจหาปริมาณสารไบโอจีนิคเอมีนในตัวอย่างซอสปรุงรส 24 ตัวอย่าง การทดสอบทางคุณภาพวิเคราะห์ สามารถตรวจพบแต่ สารฮิสตามีนเท่านั้น และเมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีน พบว่า กลุ่มตัวอย่างน้ำปลาเป็นตัวอย่างที่มีสารฮิสตามีนน้อยที่สุด ในช่วง 7.5 -10.6 ppm ส่วนกลุ่มตัวอย่างซอสถั่วเหลืองมีปริมาณฮิสตามีนสูงสุดในช่วง 48 – 51.8 ppm ผลการตรวจปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารฮิสตามีนในตัวอย่างซอสปรุงรสที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นกว่าซอสที่เก็บในที่อุณหภูมิต่ำกว่า ปริมาณฮิสตามีนเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาในการเก็บ โดยการเก็บนาน 2 เดือนจะมีปริมาณฮิสตามีนสูงที่สุด ต่อจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลง ส่วนผลของการเก็บในที่มืดและสว่างไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฮิสตามีน ท้ายที่สุดได้นำความรู้จากการตรวจคุณภาพวิเคราะห์พบว่า สามารถจะประยุกต์เป็นชุดทดสอบหาปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างได้ชัดเจนที่สุดซึ่งใช้เวลาทดสอบประมาณ10-15นาทีขึ้นกับชนิดตัวอย่าง

Abstract

Histamine , putresine and cadaverine are biogenic amine toxic substances. These substance indicate the quality of food.The aim of this research was to identify type and histamine, putresine and cadaverine content in seasoning sauces.The appropriate method was chosen from the result of comparative method between spectrofluorometry and high performance liquid chromatography.The storage effects from storage in room temperature and in refrigerator, in the dark place and brightness place were also studied.Finally,the result study from qualitative analysis was prepared a simple test kit for biogenic amine analysis. The result from qualitative study showed the the mixture solvent between methanol : ammonia as 80 :20 v/v was the best developing solvent.The iodine vapor was the detected substance on the chromatogram.The spectrofluorometry technique was the using method for determination of biogenic amine by excited the system at 350 nm and measured the fluorescence intensity at specific emission wavelength of each standard. This method took shorter time in analysis than high performance liquid chromatography.From the qualitative test in 24 sauces samples showed only histamine in all samples.The group of fish sauce samples contained the least histamine about 7.5 - 10.6 ppm and the group of soy sauce samples showed the highest histamine content about 48-51.8 ppm.The histamine in sample sauce that stored at room temperature trend to increase higher than storage in refrigerator.The histamine content depend on storage time,after storage for 2 months also the highest histamine content and trend to decrease after that.The light was not effected on the histamine content.Finally , the knowledge fron qualitative study showed the trend to develop the kit for histamine testing within 10-15 min. in analysis.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตรที่ได้อนุมัติเงินทุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555 เป็นเงินทุนอุดหนุนการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้จนทำให้ผู้วิจัยมีปัจจัยหลักทางทุนทรัพย์ที่ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ ทางเคมี ขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องในการวิจัยนี้ทุ กท่านที่มีส่วนช่วยผลักดันให้สามารถดำเนินการวิจัยได้สำเร็จอย่างดี

รศ.ดร.พรพิมล ม่วงไทย

ผู้วิจัย

มิถุนายน 2556

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก

ABSTRACT.....ข

ประกาศคุณูปการ.....ค

สารบัญ.....ง

บัญชีรูป .....จ

บัญชีรูปภาคผนวก .....ฉ

บัญชีตาราง .... ช

บทที่ 1...บทนำ.....1

บทที่ 2...เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

บทที่ 3...วิธีดำเนินการวิจัย.....14

สารเคมีตัวอย่าง..... 14

อุปกรณ์ เครื่องมือ..... . 14

สารตัวอย่าง..... 15

วิธีทดลอง.....15

บทที่ 4...ผลการทดลอง 22

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 40

บรรณานุกรม.....48

ภาคผนวก.....54

ประวัติย่อหัวหน้าโครงการ.....60

บัญชีรูป

ภาพประกอบที่		หน้า
1	ตัวอย่างการเกิดสารไบโอจีนิคเอมีนชนิด ไทรามีน (tyramine)	3
2	ตัวอย่างการเกิดสารไบโอจีนิคเอมีนชนิด ฮิสตามีน	5
3	โครงสร้างสารฮิสตามีน	5
4	การย่อยสลายสารฮีสตามีน	6
5	โครงสร้างสารพิวเตรสซีน	7
6	การเกิดสารพิวเตรสซีน	7
7	กระบวนการสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนในร่างกาย	8
8	การเกิดสารคาร์ดาเวรีน	8
9	การดีเวลลอปโครมาโทแกรมในแทงค์โครมาโทกราฟี	16
10	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน	22
11	การตรวจสอบชนิดของสารไบโอจีนิคเอมีนในตัวอย่างซอสปรุงรส	24
12	สเปกตรัมการวาวแสงของสารมาตรฐานฮิสตามีน	25
13	สเปกตรัมการวาวของสารมาตรฐานพิวเตรสซีน	25
14	สเปกตรัมการวาวของสารมาตรฐานคาร์ดาเวรีน	26
15	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไบโอจีนิค	26
16	ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างซอสปรุงรสชนิดต่าง ๆ	30
17	ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างซอสชนิดต่าง ๆที่เก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน	32
18	ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างซอสชนิดต่าง ๆที่เก็บรักษา ในตู้เย็นเป็นเวลานาน 6 เดือน	32
19	ปริมาณฮิสตามีนในซอสตัวอย่าง S1 และ S2 ที่เก็บในสภาวะแตกต่างกัน	33
20	ปริมาณฮิสตามีนในซอสตัวอย่างชนิดต่าง ๆที่เก็บในที่มืด	34
21	ปริมาณฮิสตามีนในซอสตัวอย่างชนิดต่าง ๆที่เก็บในที่สว่าง	35
22	อุปกรณ์ชุดตรวจสอบ	39
23	ปฏิกิริยาระหว่างออร์โท – พทาลไดอัลดีไฮด์ กับสาร ไบโอจีนิกเอมีนและ 2 – เมอร์แคปโตเอทานอล	45

บัญชีรูปภาคผนวก

ภาพประกอบภาคผนวกที่		หน้า
ภาพประกอบภาคผนวก ก ที่		
1	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานฮิสตามีน	55
2	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพิวเตรสซีน	55
3	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานคาร์ดาเวรีน	56
4	แยกสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน บนแผ่นเพลททินแลร์ขนาด 2.5 x 5 cm. ด้วยสารผสมของเมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80 : 20	56
5	ตัวอย่างการตรวจสอบน้ำปลาตัวอย่างเปรียบเทียบกับฮิสตามีน แยกด้วยสารผสมของเมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80 : 20	57
ภาพประกอบภาคผนวก ข ที่		
1	ตัวอย่างซอสตัวอย่างที่นำมาทดลองบางชนิด	58
2	การเตรียมสารสกัดจากซอสปรุงรส	58
3	สารละลายที่ใช้ดีเวลลอปสารและเตรียมตัวอย่างในชุดทดสอบ	59
4	แผ่นเพลทซิลิกาสำเร็จรูป	59

บัญชีตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนกับไบโอจีนิคเอมีน	4
2	วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี	17
3	ค่า Rf ของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน	23
4	ค่า ความยาวคลื่นในการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารมาตรฐาน ฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน	24
5	ระยะเวลารีเทนชันของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน	27
6	ผลการวัดค่าความเข้มของการวาวแสง	28
7	ค่า Rf ของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ในตัวทำละลายต่าง ๆ	39
8	สารตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปครั้งเดียว (single development – solvent system)	43

บทที่1

บทนำ

ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amines; BAs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง มีน้ำหมักโมเลกุลต่ำ มีคุณสมบัติเป็นเบส ซึ่งสารเอมีนนั้นสามารถเกิดได้ในระหว่างกระบวนการเมทาบอลิซึม(metabolism)ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จึงสามารถที่จะพบสารเอมีนได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Stute. 2002: 101); (Shalaby. 1996: 675); (Cinquina; et al. 2004: 79) (DR. CLAUDIA RUIZ-CAPILLAS & FRANCISCO JIMÉNEZ-COLMENERO; 2004: 489) ซึ่งโครงสร้างของสารไบโอจีนิกเอมีนสามารถแบ่งได้เป็นอะลิฟาติกเอมีน(Aliphatic amine) อะโรมาติกเอมีน (Aromatic amine) และเฮเทอโรไซคลิกเอมีน (Heterocyclic amine) (Molins-Legua; & Campins-FalcÓ. 2005: 206)

ฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน เป็นสารไบโอจีนิคเอมีน ที่น่าสนใจกลุ่มหนึ่งที่สารประกอบเอมีนที่พบได้ในอาหารเกือบทุกชนิดโดยเกิดเองตามธรรมชาติ ตามปกติแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีปริมาณสารไบโอจีนิคเอมีนสูง นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังเป็นตัวบ่งชี้ความเสื่อมเสียของปลา แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการตรวจพบสารประกอบไบโอจีนิคเอมีนในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารจากการหมัก การดอง เนื่องจากมีรายงานถึงความเป็นพิษของสารในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะสารชนิดหนึ่งที่มีรายงานการพบมาก คือ ฮิสตามีนที่พบมากในอาหารต่างๆ โดยเฉพาะในกลุ่มอาหารปลา อาการที่แสดงออกเมื่อได้รับสารกลุ่มนี้ คือ nausea, respiratorial discomfort, hot flushes, cold sweat, palpitations, headaches, red rash, high or low blood pressure สารกลุ่มไบโอจีนิคเอมีนนี้ เป็นสารที่ถูกควบคุมปริมาณในอาหารโดยเฉพาะปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา

ประเทศไทยมีการวิจัยที่เกี่ยวข้องการศึกษาปริมาณสารฮิสตามีนในปลาค่อนข้างมาก แต่สำหรับรายงานการศึก ษาวิจัยเกี่ยวกับปริมาณสารกลุ่มไบโอจีนิคในอาหารอื่นๆยังไม่แพร่หลาย โดยเฉพาะในการรายงานผลการวิจัยในปีนี้เองมีผลการวิจัยเกี่ยวกับผลสำรวจปริมาณฮิสตามีนในอาหารทะเลที่มีจำหน่ายใน 9 ประเทศ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ถูกอ้างถึง ดังนั้นเพื่อเป็นการติดตามคุณภาพอาหารประเภทซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในประเทศไทย โดยศึกษาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน จึงนับว่าเป็นงานที่น่าสนใจ ทั้งนี้เป็นการรองรับเกี่ยวกับคุณภาพสินค้าที่มีจำหน่ายในประเทศอีกชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณสาร พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีนยังมีน้อย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจจะศึกษาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ในซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในประเทศ ซึ่งจะเป็นการติดตามคุณภาพซอสปรุงรส

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1. ศึกษาหาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ที่เหมาะสม
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ได้แก่ ระยะเวลาและอุณหภูมิ ในการเก็บรักษาซอส แสงสว่าง
3. ศึกษาปริมาณของปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในท้องตลาด
4. พัฒนาวิธีการตรวจสอบสารฮิสตามีน ด้วยวิธีทางคุณภาพวิเคราะห์แบบง่าย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาหาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในซอสปรุงรสได้แก่ น้ำปลา ซีอิ๊ว น้ำมันหอยนางรม
2. ศึกษาหาปริมาณของฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ทำโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือวิธีอื่นที่เหมาะสม
3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ได้แก่
   3.1 ระยะเวลาการเก็บหลังจากจัดซื้อตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆได้แก่ 1 2 4 และ 6 เดือน
   3.2 อุณหภูมิในการเก็บ เปรียบเทียบการเก็บที่ ในตู้เย็น และ ที่อุณหภูมิห้อง
   3.3 แสงสว่าง ศึกษาเปรียบเทียบผลการเก็บในที่มีแสงแดดส่องสว่าง กับการเก็บในที่มืดเช่นในตู้เก็บที่แสงส่องไม่ได้ เป็นระยะเวลานาน 1 สัปดาห์

4.การหาวิธีตรวจสอบทางคุณภาพวิเคราะห์ในการตรวจหาสารฮิสตามีนแบบง่าย

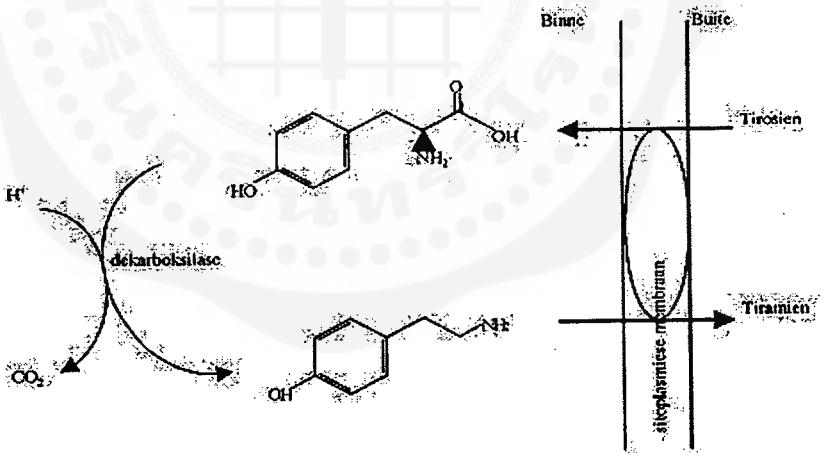
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีนซึ่งเป็นสารในกลุ่มหนึ่งของสารไบโอจีนิคเอมีน ดังนั้นจะขอกล่าวถึงสารไบโอจีนิคเอมีน พอสังเขป

สารไบโอจีนิคเอมีน (biogenic amine) เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ที่เกิดจากการดึงหมู่คาร์บอกซิลจากกรดอะมิโน หรือจากการเติมหมู่เอมีน และการย้ายหมู่ของอัลดีไฮด์และคีโตน สารกลุ่มไบโอเจนิกเอมีน สามารถแบ่งได้เป็น อะลิฟาติกเอมีน (aliphatic amine) อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) เช่น พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน และเฮเทอโรไซคลิกเอมีน (heterocyclic amine) เช่น ฮีสตามีน (Molins-Legua และ Campins-Falcó. 2005: 206)

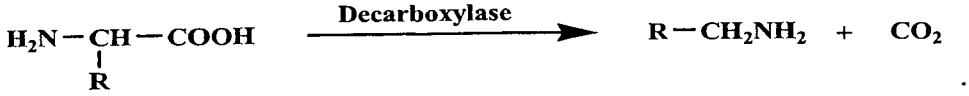
สารไบโอจีนิคเอมีนจึงมีหลายประเภท ได้แก่ ฮิสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน ไทรามีน สเปอร์มีนและสปอร์มีดิน สารกลุ่มนี้จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ผ่านกระบวนการที่ใช้เอนไซม์เฉพาะ คือ เอ็นไซม์ดีคาร์บอกซีเลต (decarboxylase enzymes) เช่น การเกิดไทรามีน ตามภาพประกอบที่ 1



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างการเกิดสารไบโอจีนิคเอมีนชนิด ไทรามีน (tyramine)

ที่มา : Rawles ,et al., 1996

โดยทั่วไปอาจเขียนแสดงการเกิดสารเอมีนจากสมการที่ 1 ดังนี้



.....1)

กรดอะมิโน เอมีน

เราอาจสรุปชนิดกรดอะมิโนและสารไบโอจีนิคเอมีนตามตารางที่ 1

ตาราง 1 ความสัมพันธ์ของกรดอะมิโนกับไบโอจีนิคเอมีน

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

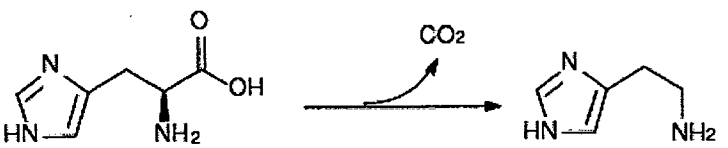
ที่มา: Santos M.H. Silla. (1996).

สารเหล่าไบโอจีนิคเอมีนเหล่านี้นี้พบได้ตามธรรมชาติทั้งในเซลล์พืชและสัตว์รวมทั้งจุลินทรีย์ เป็นแหล่งของไนโตรเจนในการสังเคราะห์ฮอร์โมน อัลคาลอยด์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีน (Bover-Cid., et al, 2001) สารไบโอจีนิคเอมีนนี้ล้วนส่งผลต่อร่างกายมนุษย์ มีผลต่ออุณหภูมิร่างกาย ความดันโลหิต ควบคุมการหลั่งของกรดในกระเพาะอาหาร สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของกรดไขมัน (Laura Maintz และ Natalija Novak. (2007) มีผลต่อความคงสภาพของเซลล์เมม เบรน (Alain Bouchereau; et al. 2000. 49)

เนื่องจากสารกลุ่มไบโอจีนิคเอมีนมีหลายประเภท แต่ที่จะกล่าวถึงในที่นี้ คือ ฮิสตามีน พิวเทรสซีน คาร์ดาเวรีน

ฮิสตามีน

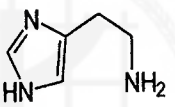
ฮิสตามีนเป็นไบโอจีนิคเอมีนที่ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1910 โดย Dale และ Laidlaw และได้รับการยืนยันว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้เมื่อปี ค.ศ. 1932 สารฮิสตามีนที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮิสทิดีนตามภาพประกอบที่ 2



ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างการเกิดสารไบโอจีนิคเอมีนชนิด ฮิสตามีน

ที่มา : Alvarez, E. O. (2009).

ฮิสตามีนมีสูตรโครงสร้างตามภาพประกอบที่3 มีสูตรโมเลกุลคือ $C_5H_9N_3$



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างสารฮิสตามีน

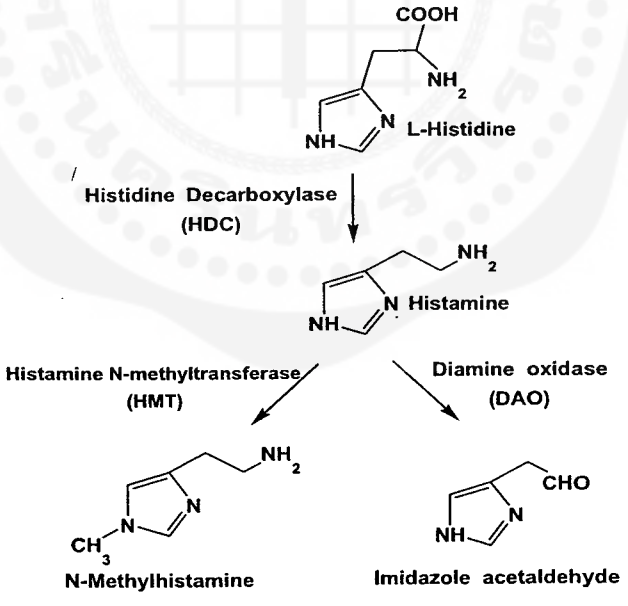
ที่มา: Alvarez, E. O. (2009).

ฮิสตามีนมีลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกใสไม่มีสี หลอมเหลวได้ที่ 84°C, ละลายได้ดีในน้ำหรือแอลกอฮอลล์ เมื่ออยู่ในน้ำจะสามารถอยู่ได้ 2รูปแบบ N^{π}-*H*-histamine และ N^{τ}-*H*-histamine. พบมากตามเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย ปฏิกิริยาในภาพที่2 นี้เกิดมากในแม็สเซลล์ (mast cell) แม็สเซลล์เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีอยู่ตามเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ขนานกับหลอดเลือด นอกจากเราจะพบฮิสตามีนอยู่ภายในแม็สเซลล์ของเนื้อเยื่อแล้ว ยังพบฮิสตามีนได้ในระบบเลือดอีกด้วย โดยอยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง เรียกว่า "เบโซฟิลส์" (basophils) ฮิสตามีนมีผลการออกฤทธิ์ต่ออวัยวะต่างๆ ที่สำคัญได้แก่ ระบบหัวใจและหลอดเลือด กล้ามเนื้อเรียบต่อมมีท่อ และปลายประสาทรับสัมผัส การที่ฮิสตามีนจะออกฤทธิ์ต่อ เนื้อเยื่อได้ เนื้อเยื่อนั้นต้องมีตัวรับ (receptor) กับฮิสตามีนก่อน ปัจจุบันพบว่าตัวรับฮิสตามีนมีอยู่ 2 ชนิด คือ ตัวรับเอช-1 และ ตัวรับเอช-2 สำหรับตัวรับเอช-1 ได้แก่ ตัวรับที่พบมากตามอวัยวะคือ กล้ามเนื้อเรียบ หลอดลม หลอดเลือด ผลของฮิสตามีนต่ออวัยวะที่มีตัว รับเอช-1 คือ ทำให้กล้ามเนื้อเรียบ เช่น กล้ามเนื้อเรียบ ในกระเพาะอาหาร ลำไส้ มดลูก หลอดลม หดตัว ถ้าการกระตุ้นเกิดที่หลอดลม จะทำให้หลอดลมตีบตัน หายใจลำบาก ซึ่งพบว่ามีอาการมากในคนที่เป็นโรคหอบหืด แต่บางครั้งก็ทำให้หลอดเลือดเกิดการ

ขยายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลอดเลือดฝอย จึงช่วยเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของสารละลายต่างๆเข้าสู่หลอดเลือดฝอยด้วย ส่งผลให้บริเวณที่เส้นเลือดฝอยไปเลี้ยงเกิดอาการบวม เป็นผื่นแดง คัน บางครั้งอาจปวดแสบ ปวดร้อน บางครั้งฮิสตามีนก็ทำให้ความดันเลือดลดลงต่ำ (ยุพิน สังวรินทะ ; และคนอื่นๆ. 2537: 262-265)

ฮีสตามีนมีอยู่เป็นปริมาณไม่มากนักตามธรรมชาติในตัวปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลากะตัก ปลาทูน่า และปลาแม็คเคอเรล แต่ปริมาณของสารฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อปลาเริ่มเสื่อมสภาพอันเนื่อง จากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ (มาลีและจันทร์ฉาย, 2538) การบริโภคอาหารที่มีปริมาณฮีสตามีนสูงทำให้เกิดอาการแพ้ หรือที่เรียกว่าอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีน (Scombrotoxism) สารฮีสตามีนนั้นสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิดทั้งเนื้ อสัตว์ เนื้อปลา เนยแข็ง และผักดอง เกิดจากแบคทีเรีย บางชนิดที่สร้างเอนไซม์ไปสลายฮีสตีดีน ในอาหารให้กลายเป็นสารฮิสตามีน และแม้ว่าจะนำไปปรุงโดยผ่านความร้อนจนแบคทีเรียตายแล้ว ผู้ที่รับประทานฮิสตามีนในปริมาณมากเกินไปจะก่อให้เกิดอาการแพ้ มีผื่นคัน หน้าแดง แสบร้อนบริเวณปาก ความดันเลือดต่ำ ปวดศีรษะ บางรายอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสียการรักษาทำได้โดยให้ยาแอนติฮิสตามีน (antihistamine)

โดยทั่วไปถ้าร่างกายได้รับสารฮีสตามีนเข้าสู่ร่างกายอันเนื่องมาจากการรับประทานอาหารที่มีสารฮีสตามีนปนเปื้อนในปริมาณต่ำ สารนี้จะถูกกำจัดออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วทางปัสสาวะด้วยการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพของเอนไซม์เอมีนออกซิเดส ตามกลไกในภาพประกอบที่ 4



ภาพประกอบ 4 การย่อยสลายสารฮีสตามีน

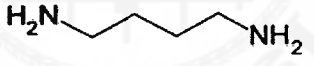
ที่มา: ดัดแปลงจาก Alvarez, E. O. (2009).

โดยปริมาณฮิสตามีนที่ พบในอาหารบ่งบอกถึงคุณภาพของอาหาร เนื่องจากปริมาณที่พบจะสัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางคืออยู่ระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส

ปัจจุบันหลายประเทศให้ความสำคัญกับปริมาณฮิสตา มีนโดยใช้เป็นข้อกำหนดบ่งชี้คุณภาพอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์ทางทะเลแต่ละชนิด ได้แก่ ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ และอิสราเอล กำหนดให้สามารถตรวจพบ ในปลาทูน่า ปลาทู ปลาหลังเขียว และปลาซาบะ ได้ไม่เกิน 200 ppm ประเทศแคนาดา ประเทศในเครือสหภาพยุโรป หรือ EU และประเทศอื่นๆกำหนดให้ สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 ppm ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 50 ppm ประเทศญี่ปุ่นกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 ppm ข้อกำหนดใน ปลากระตักตากแห้ง (dried anchovy) และปลาทูน่าตากแห้ง (dried tuna) ทุกประเทศกำหนดให้ สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm สำหรับผลิตภัณฑ์ น้ำปลา ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 500 ppm ยกเว้นประเทศแคนาดา ที่กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 ppm

พิวเตรสซีน

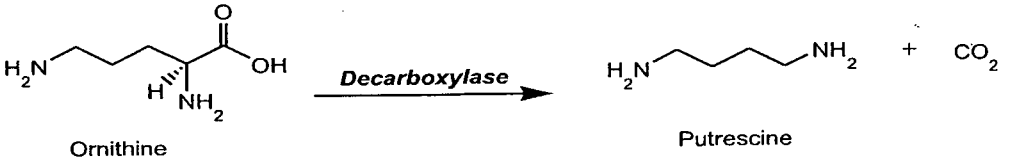
พิวเตรสซีนเป็นสารไบโอจีนิคเอมีนที่มีสูตรโมเลกุล $C_4H_{12}N_2$ มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 1,4-diaminobutane or butanediamine มีโครงสร้างดังภาพประกอบที่ 5



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างสารพิวเตรสซีน

ที่มา: Haglund, William (1996).

พิวเตรสซีน เกิดจากการสลายตัวของกรดอะมิโนออร์นิทีน ตามภาพประกอบที่ 6



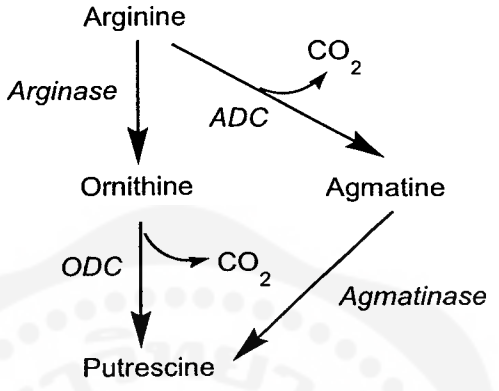
Ornithine Putrescine

ภาพประกอบ 6 การเกิดสารพิวเตรสซีน

ที่มา: (Molins-Legua และ Campins-Falcó. 2005)

สารนี้ให้กลิ่นเหม็นเน่า และมีความเกี่ยวพันกับคาร์ดาเวอรีน(Lewis, R. A ,1998)

สารพิวเทรสซีนในร่างกายมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งเซลล์ (Pavel Kalač; และ Petra Krausová. 2005) สามารถสังเคราะห์ภายในร่างกายมนุษย์ ตามกลไกใน ภาพประกอบที่ 7

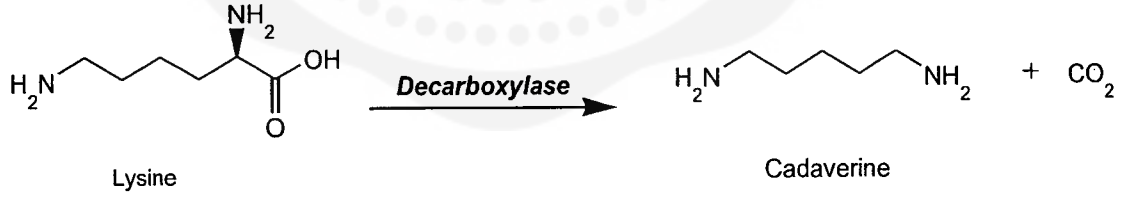


ภาพประกอบ 7 กระบวนการสังเคราะห์สารพิวเทรสซีนในร่างกาย

ที่มา : Mitchell, J. L. A. (2003)

คาร์ดาเวรีน

คาร์ดาเวรีน มีสูตรเคมี คือ $NH_2(CH_2)_5NH_2$ ชื่อทางเคมี คือ 1,5-pentanediamine and pentamethylenediamine. เป็นสารที่ให้กลิ่นเหม็นเน่า เช่นเดียวกับ พิวเตรสซีน สารนี้เกิดจากการสลายตัวของกรดอะมิโนไลซีน(Glenewinkel T.S .,et al. , 1977) ตามแสดงในภาพประกอบที่8



ภาพประกอบ 8 การเกิดสารคาร์ดาเวรีน

ที่มา: Molins-Legua และCampins-Falcó.(2005)

ถ้าร่างกายเราได้รับสารคาร์ดาเวรีนนี้มากถึง 2000 mg/kg น้ำหนักตัวจะเกิดพิษ

สารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนจะเสริมความเป็นพิษของสารไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสริมความเป็นพิษของสารฮีสตามีน ความเป็นพิษของสารพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนนั้นทำได้โดยการศึกษาความสามารถในการยับยั้งของเอนไซม์ DAO และ HMT ในหนู จากการศึกษาในหนูพบว่าทั้งสารพิวเทรสซีนละคาร์ดาเวรีนสามารถทำให้ปริมาณสารฮีสตามีนในร่างกายมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น (Mitchell, J. L. A. ,2003).

พิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนเป็นสารที่พบในอาหารหมักดองเช่นเดียวกับสารฮีสตามีน และพบได้บ่อยครั้งในเนื้อปลาและยังเป็นสารที่ใช้บ่งบอกถึงการเน่าเสียของอาหาร

สารทั้งสามชนิดข้างต้นที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารมีหลายชนิด อาหารที่มีไบโอจีนิกเอมีนปนเปื้อนทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ได้หลายรูปแบบ สำหรับงานวิจัยในประเทศเรามีการวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่นงานวิจัยของมาลี และ จันทร์ฉาย (2538) ได้ศึกษาทำการศึกษาปริมาณฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูป ได้เลือกศึกษาในตัวอย่างน้ำปลา ปลาร้า และปลาไส้ตันตากแห้ง ซึ่งมีโอกาสที่จะเกิดสารฮีสตามีนสูงและเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณการส่งออกเป็นที่น่าสนใจ การหาปริมาณฮีสตามีนทำโดยวิธีฟลูออโรเมตริกซึ่งมีค่าปริมาณต่ำสุดที่วัดได้ (detection limit) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การศึกษานี้ได้ดำเนินการในช่วงพฤศจิกายน 2536 ถึง มีนาคม 2537 ตัวอย่างที่ศึกษาประกอบด้วยน้ำปลาแท้จำนวน 26 ตัวอย่าง ปลาร้า จำนวน 15 ตัวอย่าง และปลาไส้ตันตากแห้ง จำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างมีสารฮีสตามีนโดยมีค่าเฉลี่ยของฮีสตามีนคือ 292.8 มก./กก. 114.7 มก./กก. และ 174.9 มก./กก. และช่วงของฮีสตามีนที่พบได้แก่ 36.7-1,031.1 มก./กก. 10.5-443.7 มก./กก. และ 5.0-1,424.1 มก./กก. ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า 23 ตัวอย่างจาก 65 ตัวอย่าง (ร้อยละ 35.4) ที่ศึกษามีสารฮีสตามีนสูงกว่า 200 มก./กก. อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการเกิดอันตรายในผู้บริโภคชาวไทย แต่อย่างไรก็ตามมีข่าวการประเทศเดนมาร์กตรวจพบสารฮีสตามีนหรือสารที่ทำให้เกิดการแพ้ในปลาทูน่ากระป๋องนำเข้าจากไทยในปริมาณ 40-50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากกำหนดระดับสูงสุดของสารดังกล่าวที่สา มารถปนเปื้อนในสินค้าประมงได้ไม่เกิน 100มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้มีหลายหน่วยงานได้ทำการศึกษาปริมาณสารฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาอีกมาก สำหรับในการรายงานผลการวิจัยในต่างประเทศพบว่า อาหารที่มีสารพิษฮิสตามีนมีรายงานครั้งแรกในสัตว์ปีก รู้จักกันดีในนาม Grizzard erosion หรือ Black vomiting(Koseและ George,2000) โดยมีรายงานก่อนหน้านี้โดย Shrine .,et al.(1959) ที่ทำการเลี้ยงไก่ด้วยปลาทูน่าที่เน่าเสียแล้วนาน 12 วัน พบว่า ไก่มีอัตราการเจริญเติบโตช้าลง โดยเป็นสัดส่วนกับปริมาณอาหารที่เลี้ยง ต่อมาในปี 1996 Malleและคณะได้ทำการตรวจสารไบโอจีนิคเอมีนโดยวิเคราะห์หาปริมาณพิวเตรสซีน คาร์ดาเวรีน ฮิสตามีน สเปอร์มิดิน และ สเปอร์มิน โดยสกัดจากเนื้อปลาส่วนต่างๆ พบว่าการตรวจหาสารไบโอจีนิคเอมีนต่างๆนั้นสามารถบ่งบอกความเสื่อมเสียของปลาได้ดี

อย่างไรก็ตามมักพบว่า สารฮิสตามีน ในกลุ่มนี้ มีความโ ดดเด่นมาก การที่ได้รับสารฮิสตามีนในปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/100กรัม จะเป็นพิษต่อผู้บริโภคมาก (Leigh,L.and

June,O.,2000) ปริมาณฮิสตามีนพบมากในปลาตระกูล scombroid (Arnold และBrown,1978) ในระยะหลังก็มีรายงานพบสารนี้ในหอย(Rawles.etal.,1996). ในปลาสดที่สดมากมักจะมีปริมาณสารฮิสตามีนต่ำ (Fernandez และ Mackie,1987) สารฮิสตามีนจึงถูกเสนอให้เป็นดัชนีบอกความสดของปลา(Lopez,S ,.etal.,1994) ตามคำแนะนำของUS FDA กำหนดไว้ให้ปลาทั่วไปที่จะบริโภคควรมีปริมาณฮิสตามีนไม่เกิน 5 มิลลิกรัม /100 กรัม ปลาที่ถูกตรวจพบว่ามีปริมาณฮิสตามีนสูงกว่านี้จะถูกห้ามจำหน่าย ดังนันจึงมีความพยายามจากนักวิจัยต่าง ๆค้นคว้าหาวิธีการตรวจสอบฮิสตามีนในตัวอย่างปลากันอย่างกว้างขวาง (Bao,S.H.,et al.,2003).(Shu-Chen Chang ,.et al.,2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการตรวจฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลากระป๋อง(Yung.H.T.,2005) นอกจากนี้พบผลการวิจัยหาสารฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์อื่นๆอีก เช่น ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก(Hsien,F.K.et al.,2007) กิมจิ (Yung-Hsiang Tsai ,et al.,2005) ชีส (Innocente,N .et al.,2007)

จากที่กล่าวมาจะพบการรายงานผลการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคร าะห์ปริมาณสารฮิสตามีนค่อนข้างมากในอาหารต่าง ๆ และยังไม่มีรายงานการวิจัยในซอสปรุงรส โดยเฉพาะการตรวจสารไบโอจีนิคเอมีนพิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีนยังมีรายงานน้อยมาก ผู้วิจัยคิดว่า ควรทำการตรวจวิเคราะห์สารทั้งสามชนิด ในซอสปรุงรส เพราะใช้ปรุงแต่งอาหารแทบทุกชนิดในครัวไทย และครัวของชาวเอเชีย

ในที่นี้จะขอกล่าวถึงผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสพอสังเขป

ซอสปรุงรส

ซอสปรุงรส เป็นเครื่องปรุงรสอาหารให้มีรสเค็ม หวาน ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารไทย ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักโดยวิธีธรรมชาติหรือการย่อยด้วยทางกระบวนการทางเคมี ตัวอย่าง เช่น น้ำปลา ซีอิ๊ว ซอสหอยนางรม เป็นต้น

น้ำปลา (fish sauce)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นเครื่องปรุงรส มีรสเค็ม เกิดจาก การนำปลาไปผสมกับเกลือและใส่ถังหมัก การผลิตน้ำปลาเป็นการถนอมอาหาร ด้วยวิธีการหมักเกลือ (salt curing)

น้ำปลาสามารถแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆ ตามลักษณะของกรรมวิธีการผลิต ได้ดังนี้

น้ำปลาแท้ คือ น้ำปลาที่ได้จากการหมัก หรือย่อยปลา หรือส่วนของปลา หรือกาก ของปลาที่เหลือจากการหมักตามกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา

น้ำปลาที่ทำมาจากสัตว์อื่น คือ น้ำปลาที่ได้จากการหมัก หรือย่อยสัตว์อื่น ที่ไม่ใช่ปล า หรือส่วนของสัตว์อื่น หรือกากของสัตว์อื่น ที่เหลือจากการหมักตามกรรม วิธีการผลิตน้ำปลา และให้หมายความรวมถึงน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น ที่มีน้ำปลาแท้ ผสมอยู่น้ำปลาผสม คือ น้ำปลาแท้ หรือน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น ที่มีสิ่งอื่นที่ไม่เป็น อันตรายต่อผู้บริโภคเจือปน หรือมีการปรุงแต่งกลิ่นรส

<u>กรรมวิธีการผลิตน้ำปลาแท้</u>

วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตน้ำปลา คือ ปลาสด การผลิตเพื่อให้ได้น้ำปลาคุณภาพดีนิยมใช้ได้แก่ ปลากะตักใหญ่ หรือ เรียกว่าปลาไส้ตัน ขั้นตอนที่สำคัญคือ การนำปลาไปผสมกับเกลือและใส่ถังหมักให้เร็วที่สุด

การผลิตน้ำปลา เป็นการถนอมอาหาร ด้วยวิธีการหมักเกลือ (salt curing) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลา คือ การใช้เกลือในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ที่จะติดมากับปลา น้ำทะเล และเกลือ รวมทั้งควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่จะก่อให้เกิดการเน่าเสียของปลา และป้องกันการเกิดสารฮีสตามีน

จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้และมีบทบาทสำคัญในการหมักน้ำปลา เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) ซึ่งสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ขึ้นมา ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส ที่มาจากทางเดินอาหารของปลา จะย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลา เนื้อปลาที่ใช้หมักน้ำปลาใช้ได้ทั้งปลาน้ำจืด หรือปลาทะเลเพราะเป็นโปรตีนที่ย่อยสลายได้ง่ายกว่าโปรตีนจากเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ การหมักทิ้งไว้เป็นเวลานาน เนื้อปลาจะถูกย่อยได้หมดได้เปลี่ยนโปรตีนในเนื้อปลาเป็นกรดอะมิโน ทำให้น้ำปลามีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายทั้งทำให้เกิดกลิ่นหอมและเกิดรสอูมามิได้รสชาติที่อร่อย ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการหมักอาจแตกต่างกันไปบ้างขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของปลา

น้ำปลาที่ผ่านการหมักจะเกิดน้ำตาลทอง จากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวกับเอนไซม์ (non enzymatic browning reaction) เรียกว่า เมลลาร์ด (maillard reaction) ซึ่งเกิดจาก กรดอะมิโนกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆในส่วนผสม

<u>คุณค่าทางโภชนาการของน้ำปลา</u>

น้ำปลาประกอบด้วยเกลือ 27-28 กรัม สารอินทรีย์ไนโตรเจน 0.6-2 กรัม แอมโมเนียไนโตรเจน 0.2-0.7กรัม ใน100 มิลลิลิตรของน้ำปลา ซึ่งจะให้ไนโตรเจน แก่ร่างกาย 7.5% จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ร่างกายได้รับเข้าไป 40 กรัมต่อคนต่อวัน น้ำปลาเป็นแหล่งใหญ่ของแร่ธาตุ และกรดอะมิโนที่จำเป็น โดยเฉพาะ ไลซีนซึ่งมีปริมาณสูง จากการที่มีไลซีนสูงจึงทำให้อาจสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอจีนิคเอมีนคาร์ดาเวรีนได้

ซีอิ๊ว (soy sauce)

ซีอิ๊วหมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนของถั่วเหลืองหรือส่วนผสมของถั่วเหลืองและแป้งสาลีโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ จะนำมาแต่รสและ /หรือสีหรือไม่ก็ได้ ตามชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนก่อนการบรรจุ

ซีอิ๊ว ที่ผลิตโดยทั่วไปมี 4 ชนิด คือ ซีอิ๊วขาว ซีอิ๊วดำเค็ม ซีอิ๊วดำ และ ซีอิ๊วหวาน

ซีอิ๊วขาว หมายถึง ซีอิ๊วที่ไม่ได้แต่งรสและสี

ซีอิ๊วดำเค็ม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำซีอิ๊วขาวมาเก็บต่อตามก รรมวิธีผลิตเพื่อให้ได้ความเข้มข้นและสีตามกำหนด

ซีอิ๊วดำ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากซีอิ๊วขาวผสมกับสารให้ความหวานในอัตราส่วนที่พอเหมาะจนกระทั่งได้ความหวานและความเค็มตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้

ซีอิ๊วหวาน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากซีอิ๊วขาวในปริมา ณน้อย ผสมกับสารให้ความหวานจนได้ความหวานตามเกณฑ์ที่กำหนด

โดยทั่วไปอาจ ประเภทของซีอิ๊ว ซีอิ้วมี3 ประเภท ตามกระบวนการผลิต ได้แก่

ซีอิ๊วหมัก (Fermented Soy Sauce) หมายถึงซีอิ๊วที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองหรือส่วนผสมของถั่วเหลืองและแป้งสาลีโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของจุรินทรีย์ 3 ชนิด คือ เชื้อรา, bacteria, yeast

ซีอิ๊วเคมี (Chemical Soy Sauce) หมายถึงซีอิ๊วที่ได้จากการใช้กรดเกลือเข้มข้นมาย่อยถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว

ซีอิ๊วกึ่งเคมี (Semichemical Soy Sauce หมายถึง ผลิ ตภัณฑ์ที่ได้จากการดัดแปลงนำเอาวิธีการผลิตซีอิ๊วหมักกับซีอิ๊วเคมีมารวมกันเพื่อให้ได้ซีอิ๊วที่มีคุณภาพ กลิ่น รสดี และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น

เนื่องจากการผลิตซีอิ๊วจะใช้ถั่วเป็นวัตถุดิบหลัก หมัก กับแป้ง และมีกิจกรรมจาก จุลินทรีย์ มาเกี่ยวข้อง จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง จุลินทรีย์ที่ใช้หมักซีอิ๊ว ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* (หรือ *Aspergillus soyae*) ซึ่งผลิต เอนไซม์โปรตีเอส ย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นกรดอะมิโนและอ ะไมเลส (amylase) ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ รวมทั้งได้สารที่สามารถ ระเหยได้ ทำให้ซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสดี และแบคทีเรีย ในกลุ่ม Lactic acid Bacteria เช่น *Lactobacillus delbrueckii* หรือ *Pediococcus soyae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนเกลือ สร้างกรดโคจิ (koji acid) ทำให้เป็นซีอิ๊วมีความเป็นกรด หรือมี pH ลดลง เป็นการป้องกันการเน่าเสีย และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้ กรดโคจิที่สร้างขึ้นจะช่วยกระตุ้นการเจริญของยีสต์เช่น *Saccharomyces rouxii* และ

Zygosaccharomyces soyae ซึ่งย่อยน้ำตาลให้เป็นเอทิลอัลกอฮอล์ จากนั้นเป็นช่วงการบ่ม เพื่อพัฒนากลิ่นและรสชาติที่ทำให้เกิดการสร้างกลิ่นรสของซีอิ๊วดีขึ้น

จากที่กล่าวมามีรายงานถึงสารอินทรีย์ที่พบในซีอิ๊วแบ่งได้ดังนี้

1. สารประกอบพวกไนโตรเจน (Nitrogen Compounds) อยู่ในรูป กรดอะมิโน 40-50% แอมโมเนีย10-15% เปปไทด์ และ เปปโทน 40-50% กรดอะมิโนที่พบมากอยู่ในรูปกรดกลูทามิค จะเป็นตัวบ่งบอกว่า ซีอิ๊วที่ได้จากการหมักมีระยะเวลาในก ารหมักที่เหมาะสมและมีคุณภาพ ดีหรือไม่ กล่าวคือ ถ้ามีกรดกลูทามิค ปริมาณมากแสดงว่าซีอิ๊วนั้นหมักได้นานและมีคุณภาพดี

2. คาร์โบไฮเดรต อยู่ในรูปกลูโครส (0.75%) กาแลคโทส(0.30-0.48%) อะราบิโนส(0.17-0.39%) ไซโลส (0.08 -0.34 %) นอกจากนั้นยังพบ มอลโทส และ น้ำตาลแอลกอฮอลล์อีกด้วย

3. กรดอินทรีย์ (Organic acid) ที่สำคัญได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซัคซินิค กรดฟอร์มิก ทั้งนี้ กรดแลคติกเป็นกรดที่มีปริมาณมากที่สุดและสำคัญมากกว่ากรดชนิดอื่น

4. Organic base ที่สำคัญได้แก่ adenine, guanine, cytosine, uracil, hypoxanthine และ xanthine

นอกจากนี้แล้ว ยังมีสารที่ให้กลิ่นและรสชาติ

จากที่กล่าวถึงองค์ประกอบที่มีรายงานพบในซีอิ๊ว จะเห็นว่าไม่มีแหล่งของกรดอะมิโนที่จะก่อให้เกิดสารไบโอจีนิคเอมีนที่ทำการวิจัยในที่นี้ แต่ก็ยังมีรายงานการตรวจสอบฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก(Hsien,F.K.et al.,2007) ซอสถั่วเหลืองดำ Jajang .ของเกาหลี (Xuezhi Bai, Bo Young Byun, and Jae-Hyung Mah.(2013)

ซอสหอยนางรม

ซอสหอยนางรม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเนื้อหอยนางรมมาบดให้ละเอียดแล้วทำให้สุกหรือใช้หอยนางรมสกัดหรือใช้หอยนางรมย่อยสลาย มาผสมกับเครื่องปรุงรสเช่น ซอสปรุงรส ซีอิ๊ว น้ำตาลและส่วนประกอบอื่น เช่น แป้งดัดแปรต้มให้เดือด บรรจุในภาชนะบรรจุขณะร้อน แล้วทำให้เย็นทันที

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม จะมีเนื้อหอย ซึ่งเป็นอาหารทะเลชนิดหนึ่งเป็นส่วนผสม นอกจากนี้ยังมีซอสปรุงรสเช่น ซีอิ๊วมาเป็นส่วนประกอบด้วย ดังนั้นแม้จะไม่มีรายงานการตรวจสารไบโอจีนิคเอมีนในซอสชนิดนี้ แต่ก็จัดว่าน่าจะมีโอกาสตรวจพบสารไบโอจีนิคเอมีนได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย
อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี สารตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

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
- เครื่อง pH meter (รุ่น Cyberscan 500)
- เครื่องเขย่า (รุ่น Vortex-genie 2) จากบริษัท Scientific
- เครื่อง Centrifuge (รุ่น Zentrifugen EBA 8S)
- เครื่อง Water bath
- เครื่องอัลตราโซนิค
- ไซริงจ์กรอง ขนาด 0.45 ไมครอน
- TLC plate(Silica gel: DC-Fertigfolien ALUGERAM® SIL G/UV_{254}) ขนาด 2x8 cm
- Capillary tube(VERTICAL®Drummondmicrocap 5.0 µL, 100/PK)
- Solvent Tank
- Needle syringes, 100 µL, N, 22S, 51 mm, 3; VERTIC L®
- NIPRO DISPOSABLE SYRINGE, 5 mL
- Verticlean™ NYLON Syringe Filter, 13 mm, 0.2 micron, 100/PK VERTICAL®

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- อะซิโตไนไตรล์ (HPLC grade) จากบริษัท Mallinckrodt
- แอมโมเนียมแอซิเตต (AR Grade) จากบริษัท MERCK
- ออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ (AR Grade)จากบริษัท ACROS
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (AR Grade) จากบริษัท MERCK

- สารมาตรฐานฮีสตามีนไดไฮโดรคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท Fluka
- สารมาตรฐานพิวเทรสซีนไดไฮโดรคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท Fluka
- สารมาตรฐานคาร์ดาเวรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (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
- กรดไฮโดรคลอริก (AR Grade) จากบริษัท MERCK
- โซเดียมคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (AR Grade) จากบริษัท Sigma Aldrich
- กรดไตรคลอโรแอซิติก จากบริษัท Sigma Aldrich
- กรดเปอร์คลอริก (AR Grade) จากบริษัท Ajax Finechem
- บอแรกซ์ (AR Grade) จากบริษัท APS Finechem
- กรดบอริก จากบริษัท Fluka
- เมทานอล (HPLC Grade) จากบริษัท MERCK
- เอทานอล (AR Grade) จากบริษัท Mallinckrodt
- กรดแอซิติก (AR Grade) จากบริษัท QRëC

3. สารตัวอย่าง

ตัวอย่างซอสปรุงรส 8 กลุ่ม

S1 : น้ำปลาผสม	S5 : ซีอิ้วขาว
S2 : น้ำปลาแท้	S6 : ซอสถั่วเหลือง
S3 : น้ำปลาเกรดคุณภาพ	S7 : ซอสหอยนางรม
S4 : ซีอิ้วขาว	S8 : ซอสเห็ดหอม

ตัวอย่างทั้งหมดทำการเลือกสุ่มจากกลุ่มของซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในซุปเปอร์มาเกตของห้างสรรพสินค้าใน กรุงเทพมหานคร

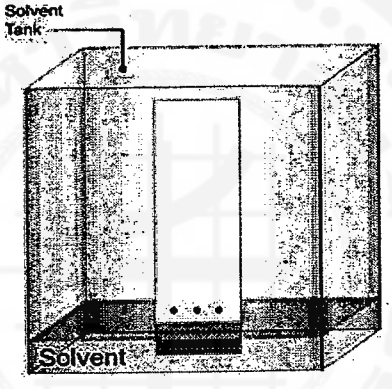
วิธีดำเนินการทดลอง

ตอนที่ 1 : การศึกษาหาวิธีการตรวจสอบสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาดาเวอรีน ทางคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี (ดัดแปลงจาก Shalaby. A. R.,1995).

1. หยดสารละลายมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน เข้มข้น 1 mg/mL จำนวน 15 µL ลงบนแผ่นซิลิกาเพลท DC-Fertigfolien ALUGERAM® SIL G/UV_{254} ขนาด 2x8 cm

2. เตรียมระบบ วัฏภาคเคลื่อนที่ เมทานอล : แอมโมเนีย โดยแปรผันอัตราส่วนทั้งหมด 7 อัตราส่วน ได้แก่ 95:5 , 90:10, 85:15,80:20,75:25 , 70:30 ,50:50 และ 5 : 95 โดยปริมาตร นำสารละลายแต่ละชุดบรรจุ ใน แทงค์โครมาโทกราฟี พร้อมปิดภาชนะเพื่อให้ไอของสารละลายในแทงค์ระเหยเพื่อให้ไออิ่มตัวในภาชนะ

3. นำ เพลทที่หยดสารมาตรฐานจุ่มลงในแทงค์โครมาโทกราฟีตามภาพประกอบที่ 9 รอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงขีดกำหนด



ภาพประกอบ 9 การดีเวลลอปโครมาโทแกรมในแทงค์โครมาโทกราฟี

4. นำเพลทที่ผ่านการดีเวลลอปแล้วออกจากแทงค์ เป่าให้แห้ง แล้วจึงนำเพลทไปใส่ในแทงค์ที่มีไอของไอโอดีนอิ่มตัว จะสังเกตว่ามีจุดสีน้ำตาลของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเทรสซีนและคาร์ดาร์เวรีนปรากฏอยู่

5. นำมาวัดระยะทางที่สารเคลื่อนที่และระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แล้วคำนวณหาค่าR_f ตามสมการ3)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad \text{.....3)}$$

6. ทำการดีเวลลอปโครมาโทแกรมกับสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราส่วนต่างๆ เพื่อพิเคราะห์หาตัวทำละลายที่เหมาะสม

7. เมื่อได้ระบบเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม นำไปทดสอบกับตัวอย่างซอสปรุงรส

หมายเหตุ

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาระบบตัวทำละลายต่าง ๆตามแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี

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

นอกจากนี้ได้ทดลองเปลี่ยนวิธีการตรวจสอบจุดบนโครมาโทแกรมด้วยการใช้สารนินไฮดรินในการทำปฏิกิริยา เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบ

ตอนที่2. การทดลองศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาสารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน

2.1 การศึกษาหาปริมาณโดยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี

2.1.1 นำสารละลายมาตรฐานฮิสตามีนเข้มข้น 8.0×10^{-4} M ปริมาตร 5 μl ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8.0×10^{-4} M ปริมาตร 5 μl ทิ้งให้ส่วนผสมทำ ปฏิกิริยากันในที่มืดเป็นเวลานาน 5 นาทีจากนั้นเติมสารละลายสารละลายออร์โท – พทาลไดอัลดีไฮด์ (OPA)ใน 2-เมอร์แคปโทเอทานอล(2-mercaptoethanol)เข้มข้น 8.0×10^{-4} M ปริมาตร 5 μl รอให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 3 นาทีจากนั้น นำส่วนผสมมา เจือจางด้วย น้ำดีไอออไนซ์ครบปริมาตร เป็น 25 ml. บรรจุสารละลายสารมาตรฐานลงในเซลล์บรรจุสารทำด้วยควอทซ์ นำไปวัดค่าความเข้มของแสงจากการวาวแสง (I_f) เพื่อ

หาค่าความยาวคลื่นแสงที่ใช้กระตุ้น λex (excitation wavelength) และ ความยาวคลื่นแสง ที่ปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ λem (emission wavelength)

ทำการทดลองเช่นเดิมแต่ใช้สารมาตรฐานพิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองด้วยเทคนิคฟลูออโรเมตรี

2.1.2 เตรียมกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยการเตรียมสารละลายของสารมาตรฐานแต่ละตัวเป็นชุดความเข้มข้น ได้แก่ 1.6×10^{-5}, 3.2×10^{-5}, 6.4×10^{-5}, 9.6×10^{-5} และ 12.8×10^{-5} M ปิเปตสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมา 5 µL ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8.0×10^{-4} M ปริมาตร 5 µL ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 5 นาที (ทำครั้งละความเข้มข้น) เติมสารอนุพันธ์ OPA เข้มข้น 8.0×10^{-4} M ปริมาตร 5 µL ตั้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 3 นาที จากนั้นเจือจางด้วย DI Water เป็น 25 ml นำไปวัดค่าความเข้มของแสงจากการวาวแสง (I_f)

นำค่าการวาวแสงที่ได้ไปพลอตกราฟกับความความเข้มข้นของสารมาตรฐานชุดจะได้กราฟมาตรฐานเพื่อใช้คำนวณหาปริมาณสารไบโอจีนิคเอมีนที่สนใจ

2.2 การศึกษาหาปริมาณโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน ที่ควา มเข้มข้นอย่างละ 20 ppm โดยเตรียมปริมาตร 50 mL

2.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐ านฮีสตามีนความเข้มข้น 20 ppm ปริมาตร 3 mL ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานออร์โท- พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 µL ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายมาตรฐาน 20 ppm ฮีสตามีนอยู่ ผสมสารละลายให้ผสมกันด้วยเครื่องเขย่าผสม

2.2.3 ตั้งสารละลายผสมที่เตรียมได้ในมื่ มืดเพื่อรอให้เกิดปฏิกิริยา พร้อมทั้งจับเวลาให้เกิดปฏิกิริยานาน 1 นาที

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

2.2.5 หาค่าความยาวคลื่นในการวาวแสงของพิวเทรสซีนและคาร์ดาเวรีนด้วยวิธีการเดียวกัน

2.2.6 ฉีดสารอนุพันธุ์ที่ปริมาตร 20 µL เข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยครั้งแรกจะทำการตั้งค่าอัตราส่วนของวัฏภาค เคลื่อน A : B เป็น 75 : 25 v/v และมีอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เตอนเริ่มต้นเป็น 0.9 mL/min โดยทำการทดสอบกับสารอนุพันธุ์ทั้งหมด จำนวน 3 ครั้ง

สภาวะการจัดระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้ทดลอง ได้แก่

- คอลัมน์เป็น C18 (5 µm, 3.9x150 mm)
- วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ 100 mM แอมโมเนียมแอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 (A) : อะซิโตไนไตรล์ (B) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A : B เริ่มต้นที่อัตราส่วน 75:25 โดยปริมาตร ถึงอัตราส่วน 82:18 โดยปริมาตร
- ควบคุมอัตราการไหลตั้งแต่ 0.9 - 1.5 mL/min
- ใช้ตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซ็นต์ โดยใช้ความยาวคลื่น λ_{ex} และ λ_{em} ที่ได้จากข้อ 2.2.4

เปรียบเทียบ ประสิทธิภาพของวิธีการทั้ง 2 เพื่อเลือกทดลองต่อไป

ตอนที่ 3. ศึกษาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

จากการทดลองตอนที่ 2 จะเลือกวิธีที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาสาร 3 ชนิด ในซอส จึงเก็บตัวอย่างซอสปรุงรส ตามกำหนดในขอบเขต มาวิเคราะห์หาปริมาณสาร 3 ชนิด

<u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

นำตัวอย่างซอสตัวอย่าง มาสกัดสารไบโอจีนิค โดยเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่าง 4 วิธีดังนี้

<u>วิธีที่1</u> ชั่งตัวอย่างซอส 3 กรัม ทำการปั่นกับ 10 ml 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA) นาน 30 วินาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง ปรับปริมาตรด้วย TCA (ดัดแปลงจาก วิธี Sevim Köse and George Hall .(2000)

<u>วิธีที่2</u> ชั่งตัวอย่างซอส 3 กรัม ทำการปั่นกับ 5 ml 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA) อุ่น 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีแล้วนำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M 5 ml เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง ปรับปริมาตรด้วย TCA(ดัดแปลงจาก Yung-Hsiang Tsai .et al., 2005)

<u>วิธีที่3</u> ชั่งตัวอย่างซอส 3 กรัม ทำการปั่นกับ 2.5 ml 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA)นำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M 2.5 ml นำไปเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิคนาน 5 นาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง ปรับปริมาตรด้วย TCA (ดัดแปลงจากวิธีที่ 2)

วิธีที่4 ชั่งตัวอย่างซอส 3 กรัม ทำการปั่นกับ 2.5 ml 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA)นำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M 2.5 ml นำไปผสมด้วยเครื่องผสมhand mixer 5 นาที แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง ปรับปริมาตรด้วย TCA(ดัดแปลงจากวิธีที่ 3)

นำสารสกัดที่ได้แต่ละวิธีไปตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ตามการทดลองตอนที่ 1

จากการทดลองตอนที่ 2 เลือกวิธีที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาสาร3 ชนิด ในซอส จากสารสกัดที่เตรียมแต่ละวิธีข้างต้น มาวิเคราะห์หาปริมาณสาร 3 ชนิด

ตอนที่ 4 .ทำการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของฮีสตามีน พิวเตรสซีนและคาร์ดาเวรีน

ได้แก่

1.ระยะเวลาการเก็บหลังจากจัดซื้อตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆได้แก่ 1 2 4 และ 6 เดือน

2.อุณหภูมิในการเก็บ เปรียบเทียบการเก็บที่ ในตู้เย็น และ ที่อุณหภูมิห้อง

3.แสงสว่าง ศึกษาเปรียบเทียบ ผลการเก็บในที่มีแสงแดดส่องสว่าง กับที่มืดในตู้เก็บ เป็นระยะเวลานาน 1 สัปดาห์

การศึกษาผลของการเก็บรักษากับอุณหภูมิการเก็บ

นำตัวอย่างซอสปรุงรสทุกชนิดที่จัดซื้อมาแบ่งกลุ่มตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่ม โดยนำ 1 กลุ่ม จำนวนตัวอย่าง 3 ชุดตัวอย่าง ชุดละ 5 ขวด ตัวอย่างมี 8 กลุ่มตัวอย่างได้แก่

S1 : น้ำปลาผสม 3 ยี่ห้อ
S2 : น้ำปลาแท้ 3 ยี่ห้อ
S3 : น้ำปลาแท้ 3 ยี่ห้อ
S4 : ซีอิ้วขาว 3 ยี่ห้อ
S5 : ซีอิ้วขาว 3 ยี่ห้อ
S6 : ซอสถั่วเหลือง 3 ยี่ห้อ
S7 : ซอสหอยนางรม 3 ยี่ห้อ
S8 : ซอสเห็ดหอม 3 ยี่ห้อ

นำตัวอย่างซอสปรุงรสไปเก็บในที่เย็นในตู้เย็นช่องแช่เย็นธรรมดา อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส และ นำอีก 1 กลุ่ม (เป็นตัวอย่างชนิดเดิม) นำไปวางบนชั้นวางของในห้องปฏิบัติการ จัดเป็นการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างทั้งหมดจะเก็บรักษาไว้ตามสภาวะข้างต้นนาน 6 เดือน โดยจะทำการสุ่มตรวจแต่ละกลุ่มตัวอย่างตามระยะเวลา 1 2 4 และ 6 เดือน

หมายเหตุ การจัดหาตัวอย่าง S1 –S8 เช่น ตัวอย่างน้ำปลาผสมจะจัดหาตัวอย่างน้ำปลาผสมทั้งหมด 15 ขวด / 1 ยี่ห้อ การเก็บ ทั้งหมด 15 ขวดนี้ จะถูกสุ่มตรวจในเดือนที่ 1 จำนวน 5 ขวด ตรวจเดือนที่ 2 อีก 5 ขวด และเดือนที่ 4 ตรวจที่เหลืออีก 5 ขวด ในทำนองเดียวกันก็ดำเนินการกับตัวอย่าง S2 – S8 การตรวจวิเคราะห์นี้ต้องทำทั้งหมด 120 ตัวอย่าง /1 ยี่ห้อ

การศึกษาผลของการเก็บรักษากับสภาพการถูกแสง

นำตัวอย่างซอสปรุงรส S1 –S8 จัดเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งตัวอย่างละ 5 ขวด รวม 40 ขวด นำไปวางบนชั้นวางในห้องปฏิบติการให้ถูกแสง อีกกลุ่มหนึ่ง 40 ขวด เข้าเก็บในตู้ห้องปฏิบัติการที่ไม่ให้ถูกแสง สุ่มตรวจหาค่าสารทั้ง 3 ที่ระยะเวลา 1 เดือน

ตอนที่ 5: การศึกษาหาวิธีการตรวจสอบสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน แบบรวดเร็ว

นำวิธีการตอนที่ 1 มาปรับและพัฒนาจัดเป็นชุดทดสอบ เพื่อตรวจหาสารไบโอจีนิคเอมีน ปรับหาแนวทางประกอบวิธีการข้างต้นเพื่อเป็นกระบวนการที่ดีในการตรวจสอบสารทั้ง 3ชนิด อย่างง่ายและรวดเร็ว

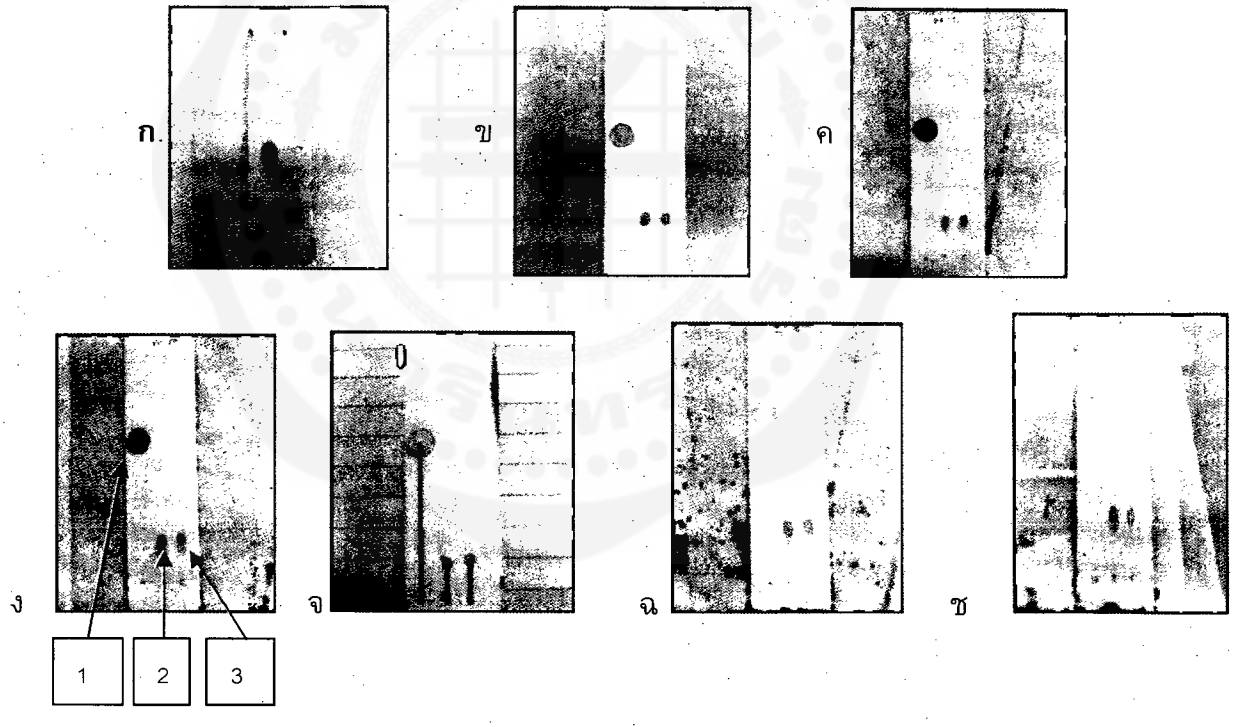
S 440691

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้จะได้รายงานผลตามที่ได้ดำเนินการในบทที่ 3 ดังนี้

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาหาวิธีการตรวจสอบสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาดาเวอรีน ทางคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี

จากการทดลองทางคุณภาพวิเคราะห์โดยตรวจสอบกับสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน พบว่า การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามตารางที่ 2 นั้น พบว่า การใช้ เมทานอล : แอมโมเนีย ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ทั้งนี้พิจารณาจากลักษณะของหยดที่ได้ ดังนั้นเมื่อทำการศึกษาให้ละเอียดโดยการแปรผนอัตราส่วนของเมทานอลต่อแอมโมเนีย 7 ระบบ ย่อย ได้ผลของตัวอย่างโครมาโทแกรมตามภาพประกอบ10



ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน

<u>หมายเหตุ</u> จุดที่แสดงจุดที่1 ของทุกภาพย่อย คือ ตำแหน่งฮิสตามีนมาตรฐาน จุดที่ 2 คือตำแหน่งของพิเตรสซีน และจุดที่ 3 คือคาร์ดาเวรีน

ก = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 95 :5

ข = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 90 :10

ค = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 85 : 15

ง = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80 :20

จ = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 75 :25

ฉ = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 70 :30

ช = โครมาโทแกรมที่ดีเวลลอปด้วยตัวทำละลาย เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 50 :50

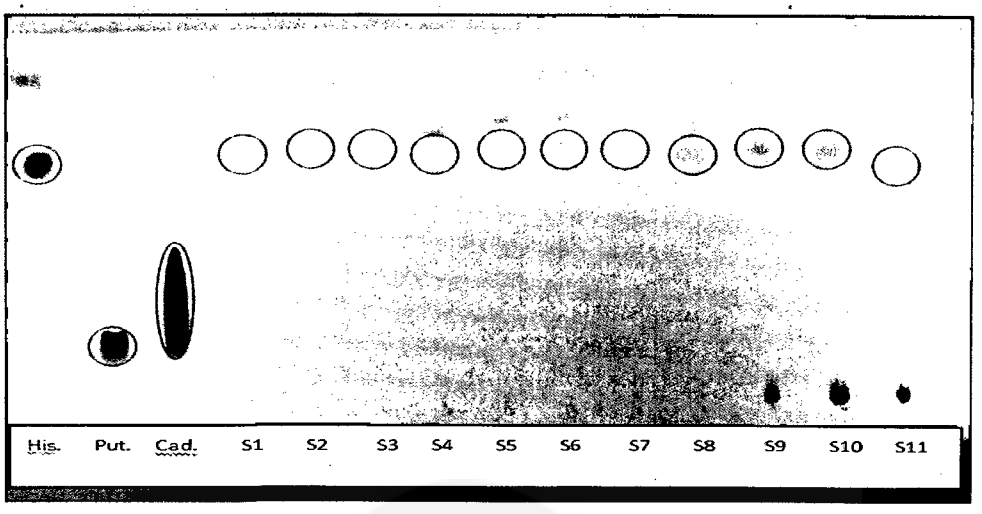
จากโครมาโทแกรมจะเห็นว่า จุดที่ชัดเจนบนโครมาโทแกรมมากที่สุดคือ ฮิสตามีน ส่วนพิวเตรสซีนและคาร์ดาเวรีน ส่วนใหญ่จะใกล้กันแยกออกจากกันได้ค่อนข้างยาก อย่างไรก็ตาม A. R. Shalaby. ,1995 ได้เสนอชนิดตัวทำละลายไว้หลายชนิด ซึ่งจากการทดลองนี้ ก็ได้ลองทดลองเช่นกัน ผลคือ การใช้เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80: 20เป็นสารละลายที่เหมาะสมสามารถใช้ได้ในการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์เหมาะสมที่สุด สำหรับผลการคำนวณหาค่า R_f ได้แสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 ค่า Rf ของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน

สารมาตรฐาน	R_f
ฮิสตามีน	0.50
พิวเตรสซีน	0.13
คาร์ดาเวรีน	0.11

สำหรับการเลือกชนิดของสารที่ช่วยในการเกิดจุดบนโครมาโทแกรมซึ่งในการทดลองนี้ได้ทดลองโดยใช้ ไอไอโอดีน และ สารละลายนินไฮดริน พบว่าสามารถใช้สารทั้งสองในการตรวจสอบได้เหมือนกัน แต่เนื่องจากการใช้ไอไอโอดีนจะมีราคาต้นทุนต่ำกว่า จึงน่าจะใช้ไอไอโอดีนในการทำให้มองเห็นจุดบนโครมาโทแกรม

ผลการศึกษาทางคุณภาพวิเคราะห์เพื่อหาไบโอจีนิคเอมีนในซอสได้ผลตามโครมาโทแกรมในภาพประกอบที่ 11



ภาพประกอบ 11 การตรวจสอบชนิดของสารไบโอจีนิคเอมีนในตัวอย่างซอสปรุงรส

หมายเหตุ S1 – S11 ซอสตัวอย่างชนิดต่างๆ

ตามภาพประกอบ 11 จะเห็นว่า ซอสตัวอย่างส่วนใหญ่จะแสดงตำแหน่งจุดบยโครมาโทแกรมเป็นฮิสตามีน ไม่สามารถตรวจเห็นจุดของพิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน จึงอาจกล่าวได้ว่าในซอสตัวอย่างส่วนใหญ่ตรวจพบฮิสตามีน

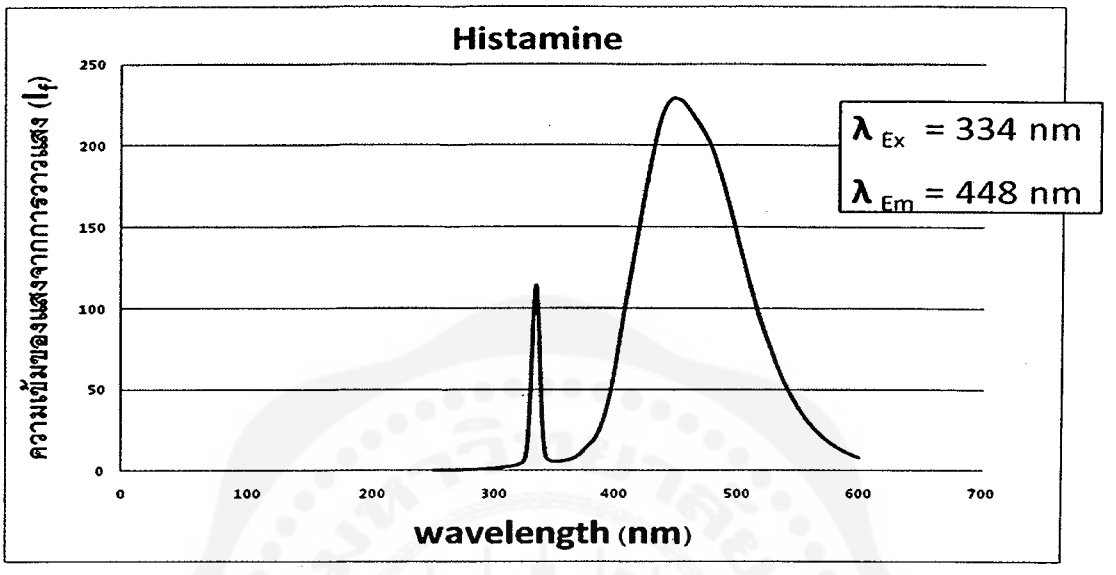
ตอนที่2. ผลการทดลองศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาสารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน

ในการวิจัยนี้ได้ เลือกวิธีการตรวจสอบหาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี และ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยผลการตรวจสอบด้วยวิธีสเปกโทรฟลูออโรเมตรี ได้ทำการตรวจสอบกับสารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด ได้หาค่าความยาวคื่นในการปลดปล่อยฟลูออเรสเซนต์ตามแสดงในตารางที่ 4

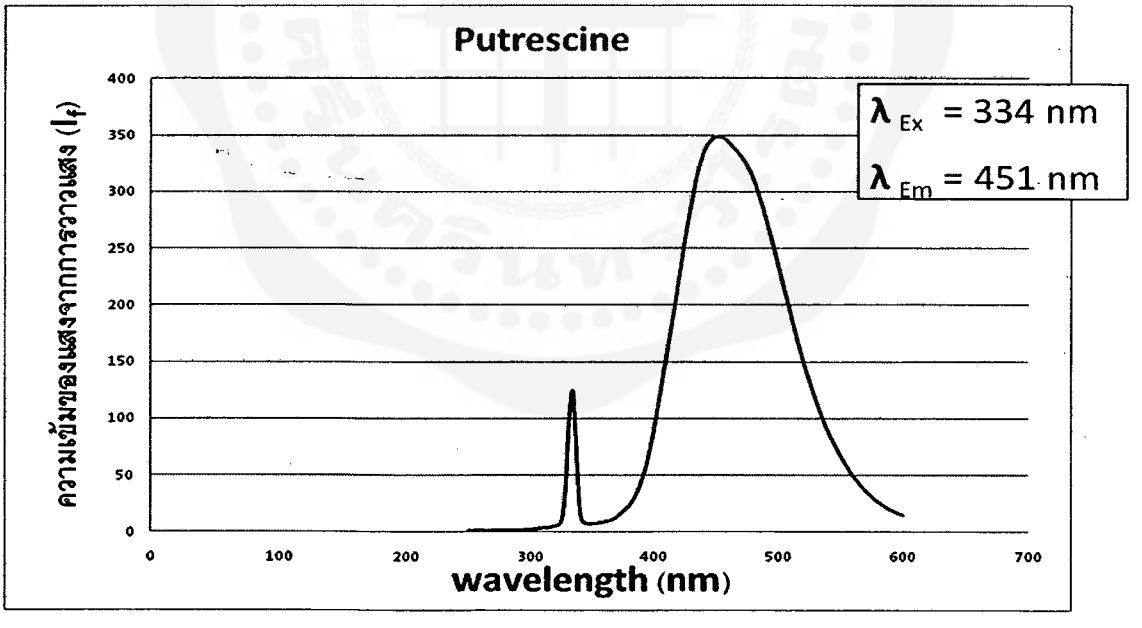
ตาราง 4 ค่า ความยาวคลื่นในการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน

สารมาตรฐาน	λem (นาโนเมตร)
ฮิสตามีน	448
พิวเตรสซีน	451
คาร์ดาเวรีน	454

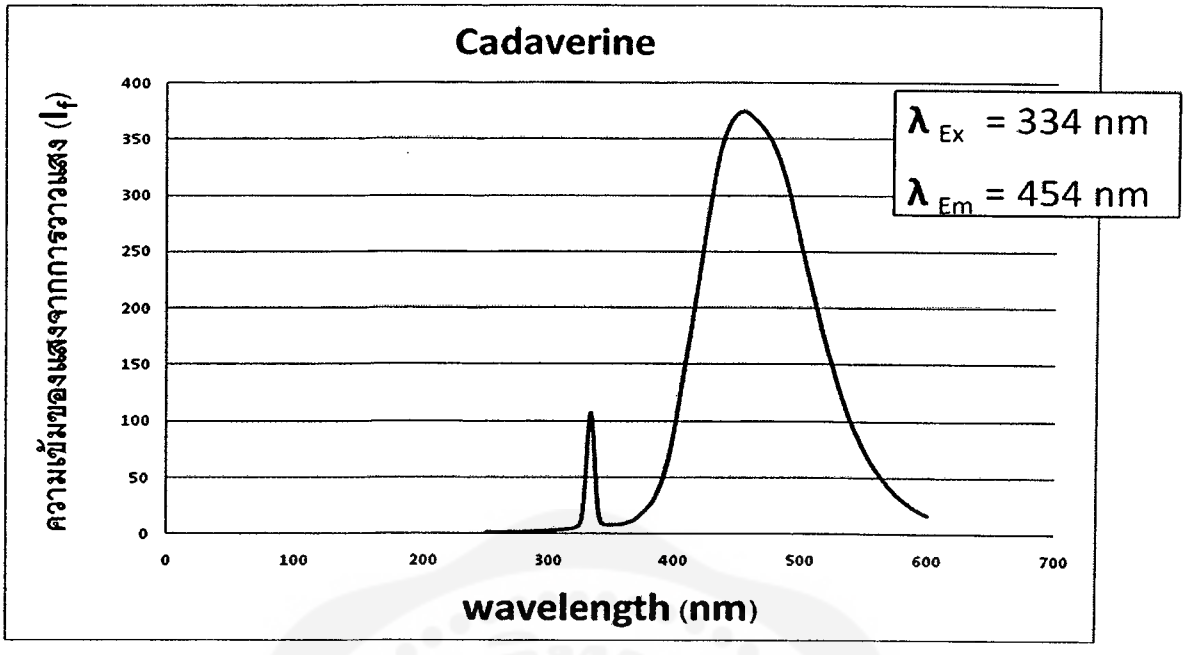
ผลการบันทึกสเปกตรัมของสารมาตรฐานที่ความยาวคลื่นในการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด ตามแสดงในภาพประกอบ 12 - 14



ภาพประกอบ 12 สเปกตรัมการวาวแสงของสารมาตรฐานฮิสตามีน

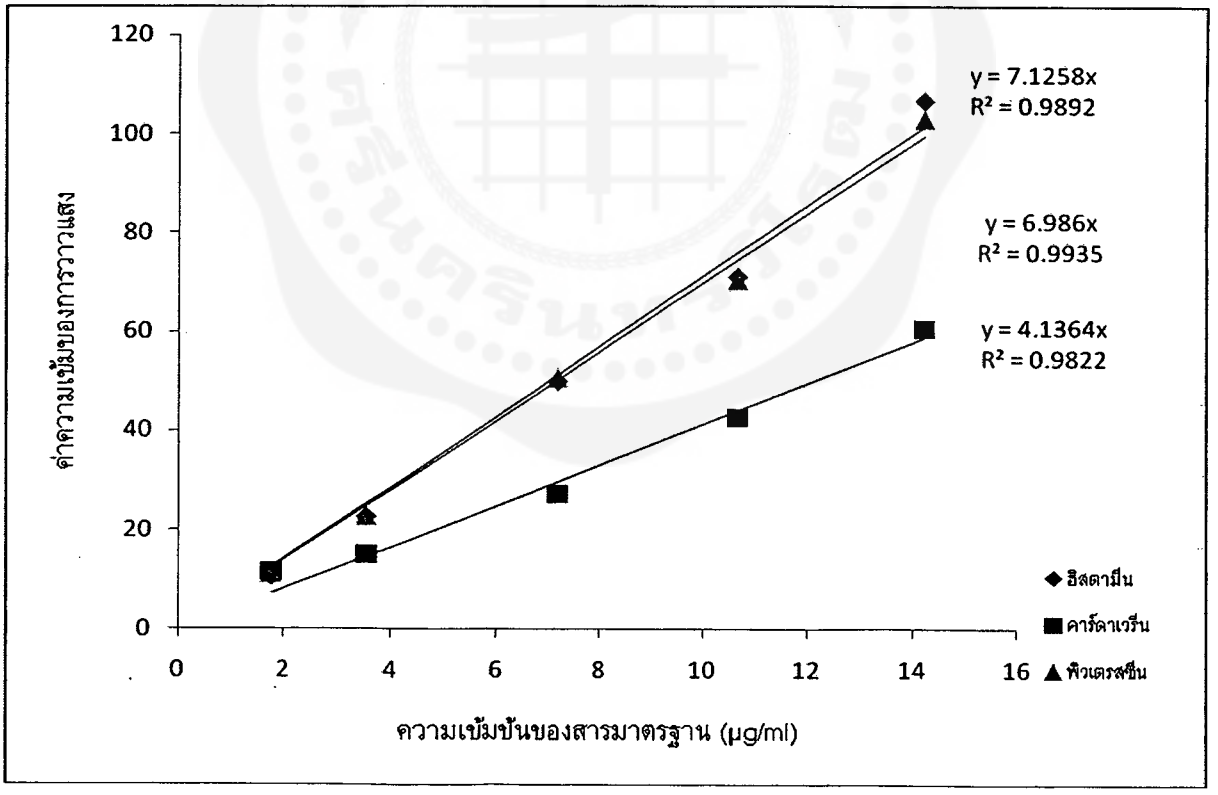


ภาพประกอบ 13 สเปกตรัมการวาวของสารมาตรฐานพิวเตรสซีน



ภาพประกอบ 14 สเปกตรัมการวาวแสงของสารมาตรฐานคาร์ดาเวรีน

ผลการทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 3 ชนิด ดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไบโอจีนิค

จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ที่พลอตระหว่างค่าความเข้มข้นกับสัญญานความเข้มของการวาวแสงฟลูออเรสเซนต์ พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นตรงตามสมการ 4 – 6) ตามลำดับ

$$Y = 7.1258x \quad : R^2 = 0.99 \quad .....4)$$

$$Y = 6.9860x \quad : R^2 = 0.99 \quad .....5)$$

$$Y = 4.1364x \quad : R^2 = 0.97 \quad .....6)$$

ผลจากการทดลองวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี พบว่า ใช้เวลาในการตรวจสอบต่อตัวอย่างประมาณ 10 นาที และผลการหาค่า ขีดจำกัดการวิเคราะห์ (Limit of Detection,LOD) พบว่ามีค่า 1.25 ppm

ผลตรวจสอบหาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้ทำการศึกษากับ สารมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สภาวะของการทดลองดัดแปลงจาก Kuda ,T.Mihara, T. and. Yano,T. (2007) ทั้งนี้ได้ทดลองแปรผันชนิดวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ชะ สาร เป็น 2 ระบบ คือระบบที่ 1 อะซีโตรไนทริล : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 5.5) อัตราส่วน 60 : 40 ควบคุมให้มีอัตราการไ หลที่ 1.5 ml /min และระบบที่ 2 จะทดลองใช้ สารละลายผสมของ 100 mM แอมโมเนียมแอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 (A) : อะซิโตไนไตรต์ (B) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A : B เริ่มต้นที่อัตราส่วน 75:25 โดยปริมาตร ถึงอัตราส่วน 82:18 โดยปริมาตร ควบคุมให้มีอัตราการไหลที่ 0.9 ml /min พบว่า ใน 2 ระบบให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน ตามแสดงในตารางที่ 5

ตาราง 5 ระยะเวลารีเทนชันของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน

สารมาตรฐาน	เวลารีเทนชัน (นาที) ระบบที่1	เวลารีเทนชัน (นาที) ระบบที่ 2
ฮิสตามีน	3.45	2.81
พิวเตรสซีน	1.50	2.30
คาร์ดาเวรีน	6.11	3.25

หมายเหตุ

ระบบที่ 1 หมายถึง ใช้ตัวทำละลายอะซีโตรไนไตร์ : ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 5.5) อัตราส่วน 60 : 40

ระบบที่ 2 หมายถึง สารละลายผสมของ 100 mM แอมโมเนียมแอซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.8 (A) : อะซิโตไนไตรต์ (B) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง A : B เริ่มต้นที่อัตราส่วน 75:25 v/v ถึง อัตราส่วน 82:18 v/v

ลักษณะของโครมาโทแกรมที่ใช้ในระบบที่ 1 จะเห็นว่าสามารถแยกสารไบโอจีนิคเอมีนทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าระบบที่ 2 เนื่องจากค่าระยะเวลารีเทนชันแตกต่างกันมาก จึงเลือกระบบที่หนึ่งในการตรวจวิเคราะห์ แต่เมื่อนำไปตรวจสอบกับสารสกัดจากตัวอย่างซอสที่จัดหามาวิจัยพบว่า ใช้เวลานานในการทดลอง 1 ตัวอย่างประมาณ 20 นาที เนื่องจากต้องรอให้สารอื่นๆที่อยู่ในสารสกัดจากซอสตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์จนหมด ก่อนที่จะเริ่มทำการทดลองใหม่ได้

จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ ผู้วิจัยพิเคราะห์แล้วว่าควรเลือกวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ สารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี เนื่องจากตัวอย่างที่ต้องทำการตรวจวิเคราะห์มีจำนวนมากตามการวางแผนการทดล อง ประกอบกับช่วงเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สั้นกว่า

ตอนที่ 3. ผลศึกษาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

เมื่อจัดสุ่มซื้อตัวอย่างซอสปรุงรส โดยแบ่งเป็นประเภทน้ำปลา ซีอิ๊ว ซอสถั่วเหลือง ซอสหอยนางรม นำมาสกัดตามตอนที่ 3 ทำวิธีการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง 4 วิธี แล้วนำไปทดสอบคุณภาพวิเคราะห์ตามตอนที่ 1 พบว่า ตัวอย่างซอสสามารถตรวจพบแต่ฮิสตามีนเท่านั้น จึงนำซอสตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีน ผลจากวัดค่าการวาวแสงของสารที่ได้ พบว่า การสกัดสารสกัดที่มีฮิสตามีนในตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีการสกัดสารฮิสตามีน 4 วิธี จะให้ค่าการวาวแสงตาม ตารางที่ 6

ตาราง 6 ผลการวัดค่าความเข้มของการวาวแสง

ตัวอย่าง	ค่าความเข้มของแสงจากการวาวแสง (I_f) เฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนเฉลี่ย			
	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3	วิธีที่ 4
น้ำปลา	18.03±0.23	11.73±1.53	19.56 ±0.10	14.77±4.22
ซีอิ๊วขาว	11.75±1.64	14.47±1.49	19.80±0.01	11.89±2.27
ซอสหอยนางรม	17.64±0.13	17.02±0.06	23.87±0.05	16.65±1.16

หมายเหตุ

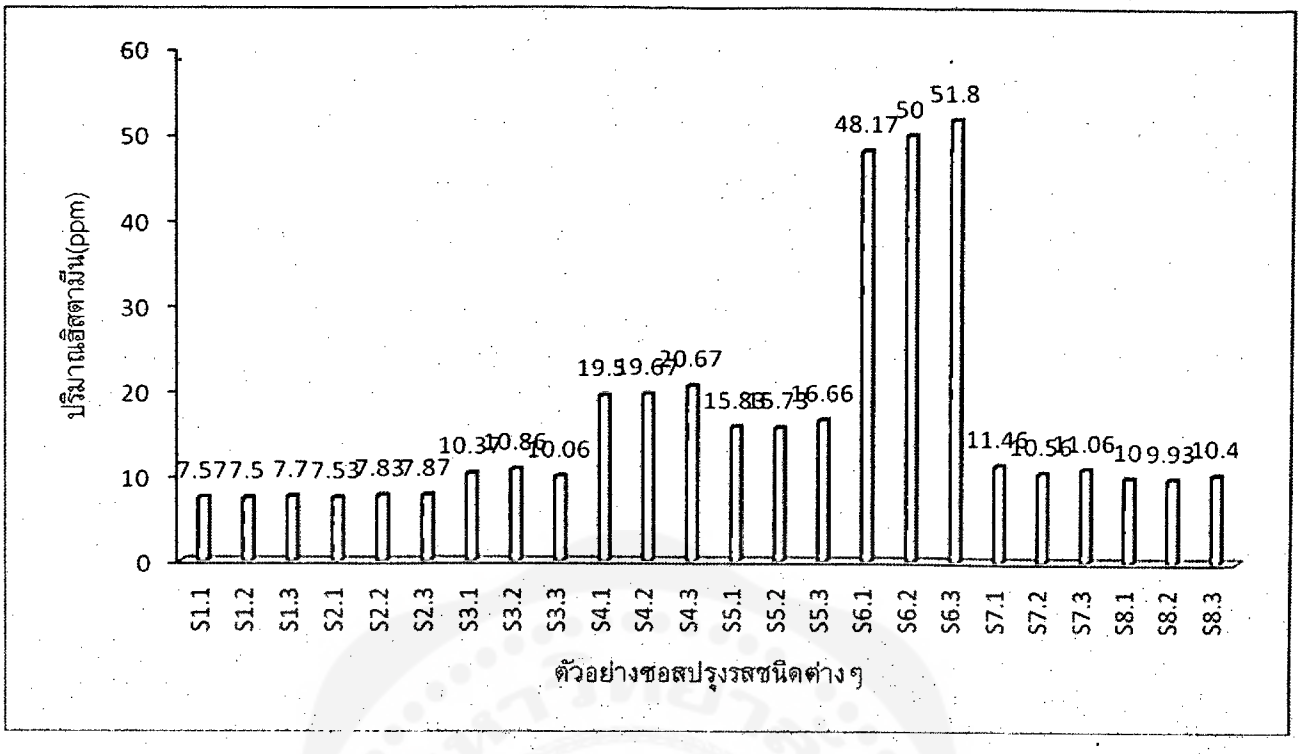
วิธีที่1 ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก นาน 30 วินาที เซนตริฟิวจ์และ กรองกากทิ้ง (ดัดแปลงจาก วิธีSevim Köse and George Hall .(2000)

วิธีที่2 ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก อุ่น 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง (ดัดแปลงจาก Yung-Hsiang Tsai .et al., 2005)

วิธีที่3 ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก นำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M นำไปเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิคนาน 5 นาที เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง (ดัดแปลงจากวิธีที่ 2)

วิธีที่4 ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติกนำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M นำไปผสมด้วยเครื่องผสมhand mixer 5 นาที เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง (ดัดแปลงจากวิธีที่ 3)

ผลการวัดค่าความเข้มของแสงที่เกิดจากการวาวแสง พบว่า การนำตัวอย่างซอสไปทำตามวิธีที่ 3 ส่วนใหญ่จะให้ความเข้มแสงสูงที่สุด พร้อมทั้งมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ ทั้งนี้เพราะการใช้เครื่องอัลตราโซนิคช่วยสกัดสาร จะช่วยทำลายเซลล์สารตัวอย่างให้แตกออกได้ และอาจเป็นการปลดปล่อยสารที่สนใจจะวิเคราะห์ได้มากกว่าวิธีอื่นๆ ทำให้สารไบโอจีนิคเอมีนสามารถทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับสาร โอพทาลไดอัลดีไฮด์ได้ดียิ่งขึ้น จึงวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ที่วาวออกมาได้มากที่สุด การทดลองตอนนี้จึงพิสูจน์ว่า วิธีการสกัดสารไบโอจีนิคเอมีนมีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง ดังนั้นในการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณสารฮิสตามีนในตัวอย่างจะเลือกใช้การเตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ 3 โดยการนำตัวอย่างซอส ปั่นกับ สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 6 นำไป ผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M นำไปเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิค นาน 5 นาที เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้งจึงนำสารละลายใสไปทำปฏิกิริยาต่อไป โดยผลการตรวจหาปริมาณฮิสตามีนตามแสดงในภาพที่ 16



ภาพประกอบ 16 ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างซอสปรุงรสชนิดต่างๆ

หมายเหตุ S 1.1-1.3 แทน กลุ่มตัวอย่างน้ำปลาผสม 3 ยี่ห้อ

S 2.1-2.3 แทน กลุ่มตัวอย่างน้ำปลาน้ำปลาแท้ 3 ยี่ห้อ

S 3.1-3.3 แทน กลุ่มตัวอย่างน้ำปลาเกรดพรีเมี่ยม สำหรับผู้ต้องการสุขภาพดี 3 ยี่ห้อ

S 4.1 -5.3 แทน กลุ่มตัวอย่างซีอิ้วขาว

S 6.1 -6.3 แทน กลุ่มซอสถั่วเหลือง

S 7.1 -7.3 แทน กลุ่มซอสหอยนางรม

S 8.1 – 8.3 แทน กลุ่มซอสเห็ดหอม

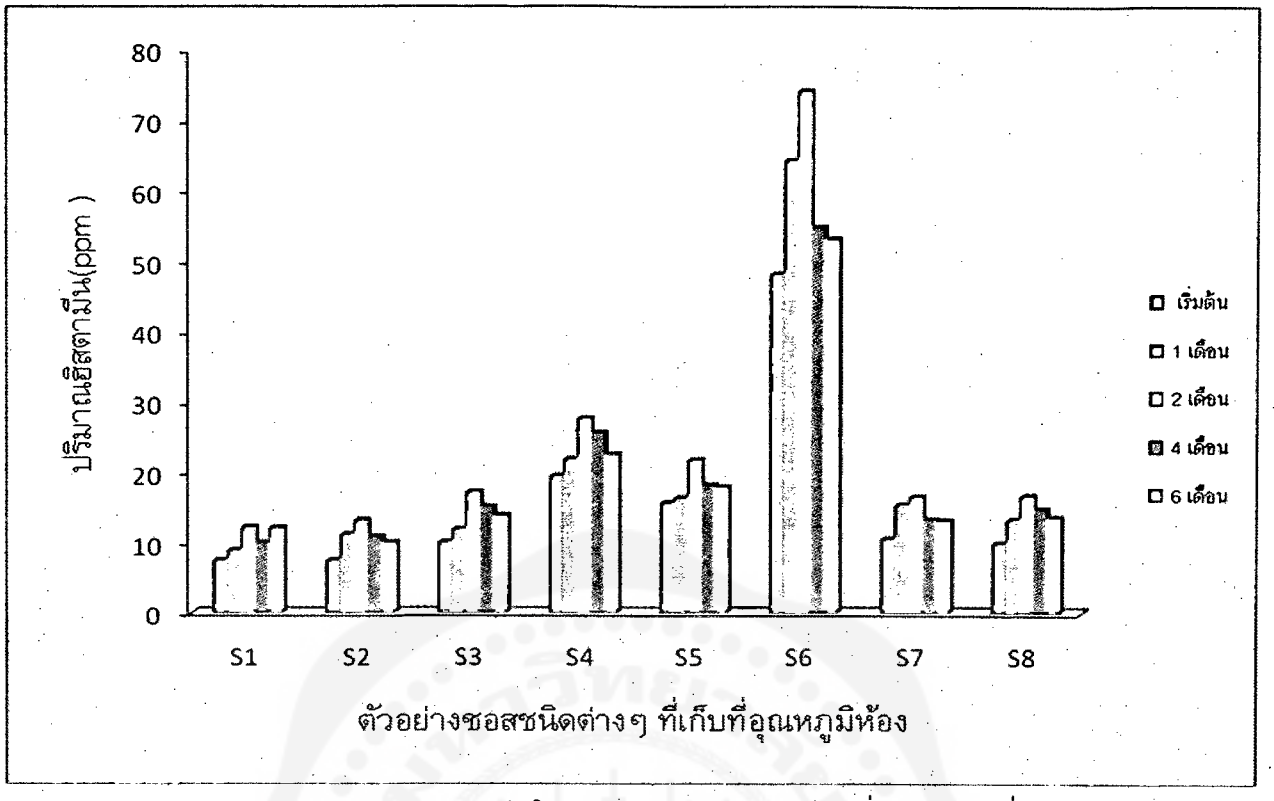
จากผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนจะเห็นว่า ตัวอย่างซอสมีปริมาณฮิสตามีนอยู่ในช่วง 7.5 -51.8 ppm โดยในแต่ละกลุ่มที่นำมาตรวจจะตรวจหาปริมาณฮิสตามีนทันทีที่จัดซื้อตัวอย่างมาทำการวิจัย ก่อนที่จะวางระบบในการเก็บรักษาในการทดลองตอนต่อไป แสดงว่า ผู้บริโภคสามารถจะรับฮิสตามีนได้จากการใช้ซอสปรุงรสต่างๆได้ ในการนี้พบว่า ซอสกลุ่มที่เป็นน้ำปลา ในชุด S1 – S3 พบปริมาณฮิสตามีนค่อนข้างน้อยประมาณช่วง 7.5-10.6 ppm โดยน้ำปลาแท้จะมีฮิสตามีนมากกว่าน้ำปลาผสม โดยเฉพาะน้ำปลาเกรดดีมาก จะมีฮิสตามีนประมาณ 10 ppm ทั้งนี้อาจเป็นผลจากน้ำปลา

ดีทำจากปลาปริมาณมาก ไม่มีการผสมดังนั้นโอกาสจะมีสารฮิสตามีนในน้ำปลาดีมากก็ย่อมอาจมีโอกาสตรวจพบได้มาก สอดคล้องงานวิจัยของ Zhihua Tao,et al.,(2011) และ Bao-Shyung Hwang,et al., 2003). อย่างไรก็ตามที่น่าสนใจคือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มซอสถั่วเหลือง สามารถตรวจพบฮิสตามีนสูงสุด ประมาณ 48.17 – 51.80 ppm แม้ว่าซอสนี้จะไม่ได้มีปลาเป็นองค์ประกอบ แต่กลับมีฮิสตามีนสูง น่าจะเป็นผลจาก กิจกรรมของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก ตามรายงานของGuirard และ Snel (1987) ได้รายงานผลการมีแบคทีเรียแกรมลบในอาหารหมัก จะช่วยผลักดันให้เกิดฮิสตามีนได้มากขึ้น ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก ก็มีผลเช่นกันตามรายงานของ Recsei และ Snel (1984) โดยมีผู้รายงานสายพันธุ์ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณฮิสตามีนในอาหารหมัก ได้แก่ *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvalus*, *Pediococcus damnosus*, *Tetragenococcus* species, *Leuconostoc* species, *Lactobacillus saerimneri* 30a, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchnerii* และ *Lactobacillus curvatus* (Spano et al., 2010)(Kimura et al., 2001)(Lucas et al., 2005).

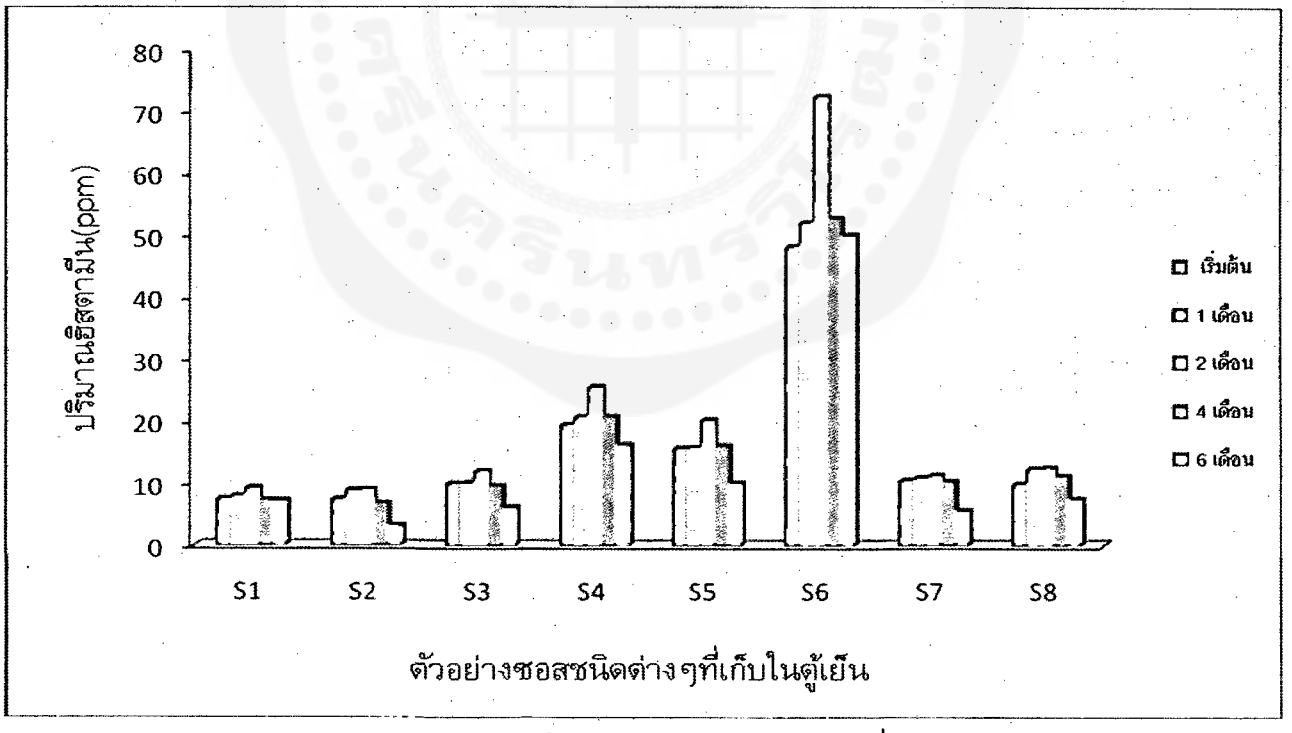
ตอนที่ 4 .ผลการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของฮีสตามีน พิวเตรสซีนและคาร์ดาเวรีน

ผลการศึกษาผลอุณหภูมิการเก็บรักษา

จากนำตัวอย่างซอสปรุงรสทุกชนิดที่จัดซื้อมาแบ่งกลุ่มตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่ม นำตัวอย่างซอสปรุงรสไปเก็บในที่เย็นในตู้เย็นช่องแช่เย็นธรรมดา อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส และ นำอีก 1 กลุ่ม (เป็นตัวอย่างชนิดเดิม) นำไปวางบนชั้นวางของในห้องปฏิบัติการ จัดเป็นการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างทั้งหมดจะทดลองกับซอสตัวอย่าง ในกลุ่มทั้ง 8 กลุ่ม กลุ่มละ 1 ยี่ห้อ เท่านั้น โดยการเก็บรักษาไว้ตามสภาวะข้างต้นนาน 6 เดือน โดยจะทำการสุ่มตรวจแต่ละกลุ่มตัวอย่างตามระยะเวลา 1 เดือน 2 4 และ 6 เดือน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำตัวอย่างซอสไปสกัดสารฮิสตามีน เนื่องจากตัวอย่างได้ผ่านการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์และพบแต่สารฮิสตามีนเท่านั้น ผลการตรวจสอบตามแสดงในภาพที่ 17 และภาพประกอบที่ 18



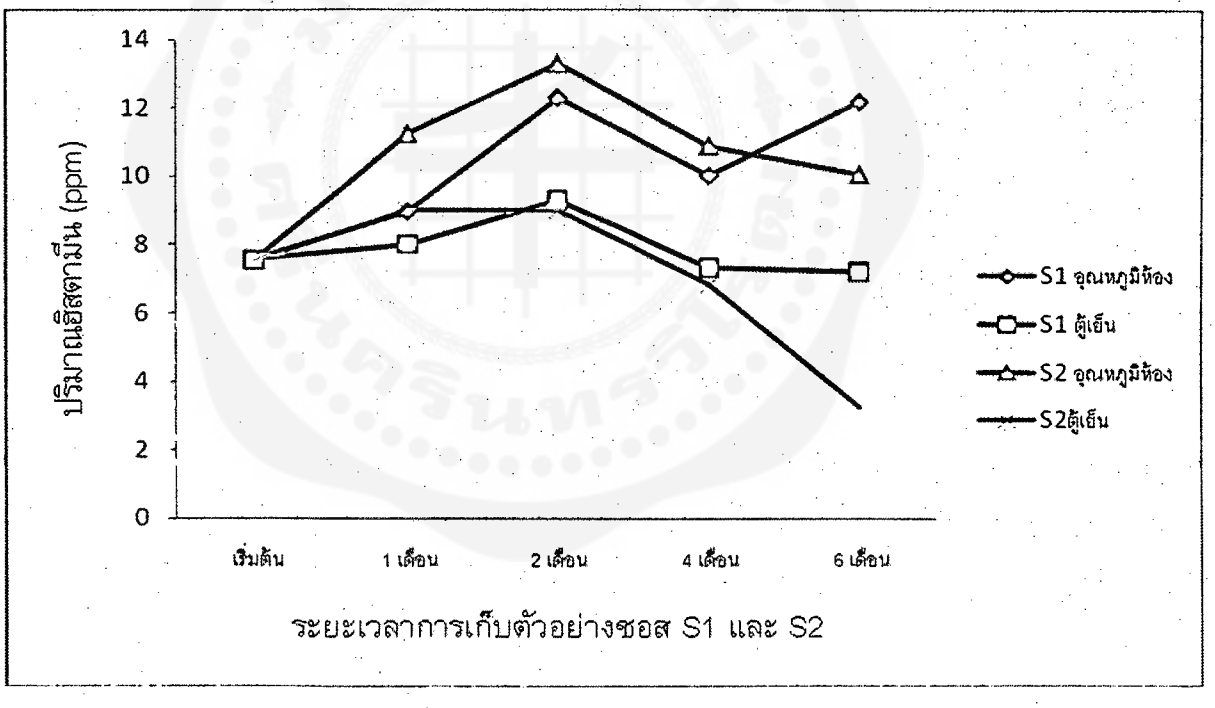
ภาพประกอบ 17 ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างซอสชนิดต่างๆที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน



ภาพประกอบ 18 ปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่างซอสชนิดต่างๆที่เก็บรักษาในตู้เย็นเป็นเวลานาน 6 เดือน

จากผลการเก็บรักษาซอสปรุงรสชนิดต่างๆในสถานที่แตกต่างกัน คือที่อุณหภูมิห้อง และในตู้เย็นเป็นเวลานาน 6 เดือน และทำการสุ่มตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีน พบว่า ปริมาณของสารฮิสตามีนขึ้นกับอุณหภูมิในการเก็บ โดยพบว่าแนวโน้มการเก็บในที่เย็นจะเกิดสารฮิสตามีนได้ในปริมาณน้อยกว่า ที่พบในตัวอย่างซอสที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามการที่เป็นเช่นนี้แสดงว่า ที่ระดับอุณหภูมิห้องมีผลให้จุลินทรีย์ที่ทนเค็มบางชนิดสามารถดำเนินกิจกรรมได้ดี จึงอาจกระตุ้นให้เกิดฮิสตามีนได้มากกว่าอุณหภูมิเย็น ที่ระดับอุณหภูมิต่ำๆทำให้กิจกรรมของ โปรติโอไลติกเอนไซม์ และ ดีคาร์บอกซีเลตลดลง (Hernández-Orte et al., 2008; Rezaei et al., 2007) ผลการตรวจสอบตอนนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Zaman et al.,(2009).ซึ่งได้ทำการทดลองตรวจสารไบโอจีนิคเอมีนในน้ำปลาเช่นกัน และ รายงานว่าปริมาณของสารไบโอจีนิคเอมีนทั่วไปขึ้นกับอุณหภูมิและเวลา

ข้อที่น่าสังเกต คือ ทุกตัวอย่างซอสปรุงรสที่เก็บในทั้ง 2 สภาวะ มีแนวโน้มที่ตรวจพบปริมาณฮิสตามีนสูงสุดในเดือนที่ 2 ต่อจากนั้นก็มีแนวโน้มลดปริมาณฮิสตามีนลง ตัวอย่างตามภาพประกอบที่ 19



ภาพประกอบ 19 ปริมาณฮิสตามีนในซอสตัวอย่าง S1 และ S2 ที่เก็บในสภาวะแตกต่างกัน

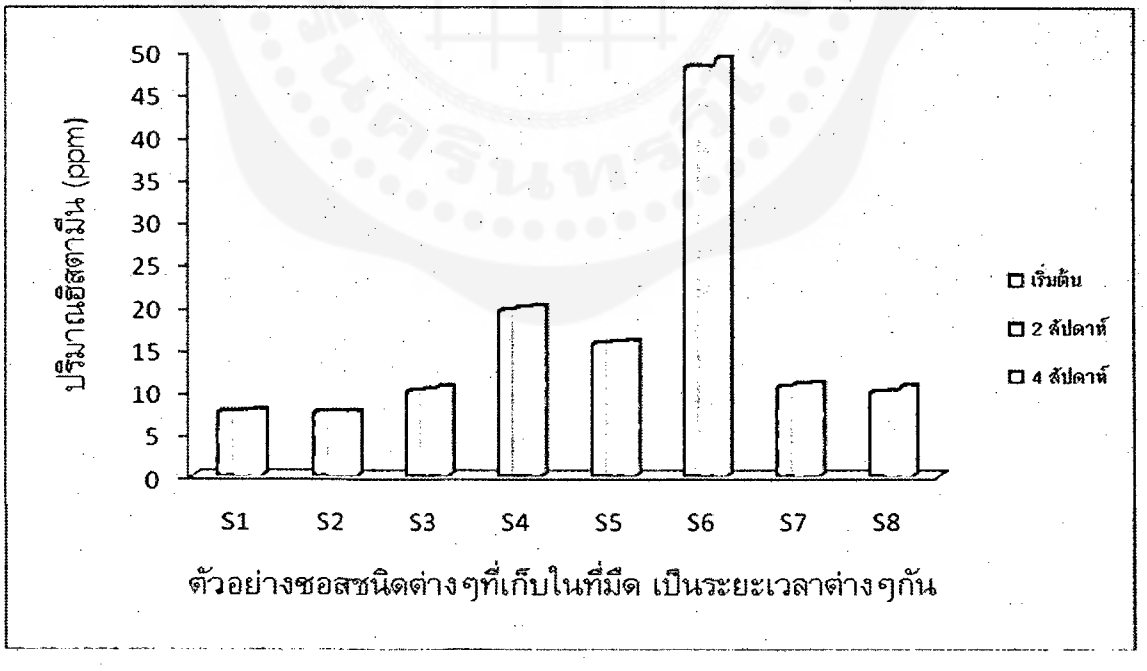
แม้จะไม่มีรายงานวิจัยใดๆกับการตรวจสอบผลการเก็บรักษาอาหารนาน ถึง 6 เดือนมาก่อน แต่คาดว่าฮิสตามีนที่ลดลงอาจเป็นเพราะฮิสตามีนอาจเกิดปฏิกิริยากับสารที่อยู่ในระบบอาหารเกิดเป็นสารเชิงซ้อนชนิดอื่น โดยเฉพาะเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีอิทธิพลมากในการต้านการเกิดกิจกรรมของดี

คาร์บอกซีเลต ตามรายงานของ Taylor and Woychik, 1982; Taylor and Speckard, 1984; Hernandez-Herrero et al., 1999; Rodriguez-Jerez et al., 1994) ซึ่งอาหารที่ทำวิจัยนี้จัดเป็นอาหารหมักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์มาเกี่ยวข้องอย่างมาก โดยเฉพาะการเก็บซอสชนิดต่างๆเป็นเวลานานๆ ยิ่งทำให้เกลือโซเดียมคลอไรด์ในซอสเข้มข้นมากขึ้น

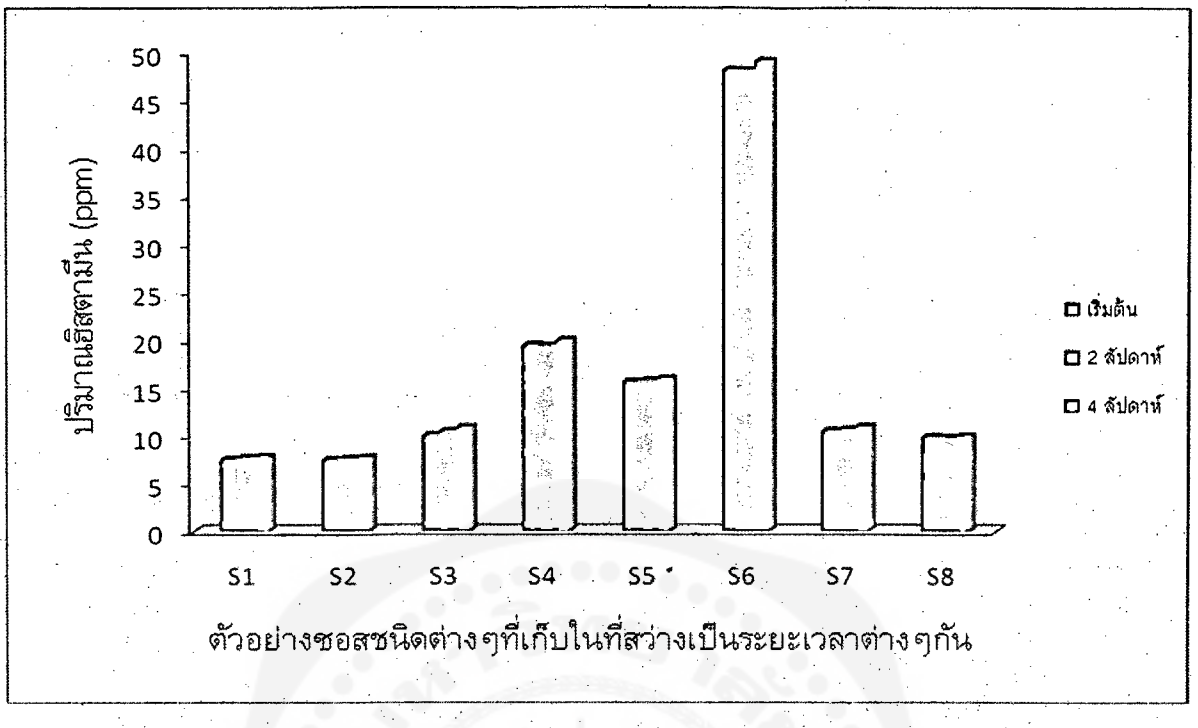
ผลการทดลองนี้เมื่อพิจารณาที่ตัวอย่างกลุ่มที่ 6 ซึ่งมีปริมาณฮิสตามีนสูงสุด ก็มีปริมาณฮิสตามีนเพิ่มมากขึ้นจากเดิม เป็น 74.22 ppm ในเวลา 2 เดือน แม้จะมีปริมาณมาก แต่ก็ยังจัดอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดในน้ำปลา แต่เนื่องจากตัวอย่างกลุ่มนี้เป็นซอสถั่วเหลือง ยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์ของปริมาณฮิสตามีน

การศึกษาผลของการเก็บรักษากับสภาพการถูกแสง

นำตัวอย่างซอสปรุงรส S1 –S8 จัดเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งตัวอย่างละ 5 ขวด รวม 40 ขวด นำไปวางบนชั้นวางในห้องปฏิบติการให้ถูกแสง อีกกลุ่มหนึ่ง 40 ขวด เข้าเก็บในตู้ห้องปฏิบัติการที่ไม่ให้ถูกแสง สุ่มตรวจหาค่าสารทั้ง 3 ที่ระยะเวลา 1 เดือน ดังภาพประกอบที่ 20 และ 21



ภาพประกอบ 20 ปริมาณฮิสตามีนในซอสตัวอย่างชนิดต่างๆที่เก็บในที่มืด



ภาพประกอบ 21 ปริมาณฮิสตามีนในซอสตัวอย่างชนิดต่างๆที่เก็บในที่สว่าง

ผลการตรวจสอบปริมาณสารฮิสตามีนในตัวอย่างซอสต่างๆที่เก็บในที่มืด ในการทดลองนี้เลือกเก็บในตู้ป้องปฏิบัติการที่แสงไม่สามารถผ่านได้ ผลตามภาพที่ 20 จะเห็นว่าแนวโน้ม พบปริมาณการเปลี่ยนแปลงฮิสตามีนน้อยมาก เนื่องจากใช้เวลาทดสอบนานเพียง 4 สัปดาห์ โดยปริมาณฮิสตามีนพบในช่วง 7.53 -49.2 ppm ส่วนผลการเก็บในที่สว่าง พบปริมาณฮิสตามีนในช่วง 7.53 – 48.77 ppm ผลการตรวจสอบปริมาณฮิสตามีนในการทดลองตอนนี้ อาจกล่าวได้ว่า ระดับแสงไม่ได้มีผลต่อปริมาณฮิสตามีนแต่อย่างใด และไม่มีผลงานวิจัยใดๆรายงานการทดลองเรื่องปัจจัยของแสง อย่างไรก็ตามคาดว่าที่แสงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮิสตามีน อาจเป็นผลจากการที่แสงไม่ได้มีส่วนช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส

ตอนที่ 5: ผลการศึกษาหาวิธีการตรวจสอบสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีนแบบรวดเร็ว

นำวิธีการตอนที่ 1 มาปรับและพัฒนาจัดเป็นชุดทดสอบ เพื่อตรวจหาสารไบโอจีนิคเอมีน ปรับหาแนวทางประกอบวิธีการข้างต้นเพื่อเป็นกระบวนการที่ดีในการตรวจสอบสารทั้ง 3ชนิด อย่างง่ายและรวดเร็ว

สำหรับความรู้จากการศึกษาการตรวจสอบทางคุณภาพวิเคราะห์หาชนิดของไบโอจีนิคเอมีน ทั้ง 3 ชนิด ผลสรุปที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 ประมวลความรู้โดยรวมดังนี้

ระบบการตรวจสอบหาสารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีนแบบรวดเร็วนิยมใช้เทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี ประกอบด้วย

1. แผ่นทินแลร์ ในการทดลองเลือกแผ่นซิลิกาเจลสำเร็จรูป (Silica gel: DC-Fertigfolien ALUGERAM® SIL G/UV_{254}) ปกติขนาด 20 x 20 cm

2. ระบบตัวทำละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ ได้ทดลองระบบต่างๆ หลายระบบ คันคว้าจากแหล่งอ้างอิงต่างๆ ที่น่าสนใจ คือ เมทานอล : แอมโมเนีย เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่หาได้ไม่ยากมีจำหน่ายทั่วไป

3. ระบบการตรวจวัดจุดบนโครมาโทแกรม ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลอง 2 ระบบ คือ สารละลายนินไฮดริน และ ไอของไอโอดีน พบว่า สามารถใช้ได้ทั้ง 2 ระบบ แต่ระบบหลังจะมีราคาต่ำกว่า

4. แทงค์โครมาโทกราฟี ปกติถ้าทดลองขนาดใหญ่ขึ้นกับขนาดเพลทที่ใช้ ขนาดมาตรฐานจะมีขนาดที่ให้แผ่นทินแลร์ขนาด 20 X 20 cm สามารถใส่ลงในแทงค์ได้

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดจุด ขึ้นกับ วิธีการตรวจวัดจุดบนโครมาโทแกรม

   กรณีที่เลือกใช้ สารละลายนินไฮดริน จะต้องมีขวดบรรจุสารละลายที่สา มารถพ่นเป็นละอองฝอยได้ แต่กรณีที่เลือกไอไอโอดีน จะใช้แทงค์หรือภาชนะที่มีฝาปิดสำหรับบรรจุสารเคมีเกล็ดไอโอดีน เพื่อให้ระเหิดกลายเป็นไอไอโอดีน

ผลการประมวลความรู้ข้างต้นจากการทดลองตอนที่ 1 ทำให้ผู้วิจัยได้นำมาประยุกต์ เพื่อทดลองตรวจสอบขนาดสเกลเล็ก จะสามารถตรวจสอบได้รวดเร็ว ผลการวางระบบต้นแบบชุดทดสอบ ทำดังนี้

1 จัดหาอุปกรณ์ ที่จะทดลองตรวจสอบเร็ว ดังนี้

1.1 แผ่นเพลทซิลิกาสำเร็จรูป ตัดขนาด 2.5 x 5 เซนติเมตร

1.2 แทงค์โครมาโทกราฟีขนาดเล็ก 8 x 3 x 10 เซนติเมตร จำนวน 2 แทงค์

กรณีจะให้ลดต้นทุนใช้บีกเกอร์ขนาด 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร 3 ใบ พร้อมกระจกปิด และแผ่นเทปกาว

1.3 หลอดแก้วแคปิลารี VERTIC L® Drummond microcap 5.0 µL, 100/PK) 4 อัน

1.4 หลอดหยดสาร 2 อัน

1.5 ช้อนขนาดเล็ก ขนาดช้อนชา 1 คัน

1.6 หลอดทดลองขนาด กลาง 2 หลอด

1.7 กระดาษกรองเบอร์ 1 จำนวน 2 แผ่น

1.8 กรวยแก้ว 1 อัน

2 จัดเตรียมสารเคมี

2.1 สารละลายมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน เข้มข้นอย่างละ 20 ppm ระบุเป็น สาร I สารII และ สาร III ตามลำดับ บรรจุในขวดขนาดเล็ก จำนวน ชนิดละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.2 สารละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปโครมาโทแกรม 2 ชนิด ได้เขียนระบุไว้เป็น สาร A และ สาร B

ทั้งนี้ สารA จะเตรียมจาก สารผสมของ เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80 :20 โดยปริมาตร เตรียมสาร A จำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

สารB จะเตรียมจากสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นร้อยละ 25โดยปริมาตร เตรียมจำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.3 สารที่ใช้ในการทำให้มองเห็นสี ระบุเป็นสาร D บรรจุด้วยเกล็ดไอโอดีนในซองปิด

3. การจัดอุปกรณ์เตรียมสารตัวอย่าง

เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ต้องเตรียมตัวอย่างโดยมีการย่อยด้วยสารเคมี จะบรรจุขวด

ระบุว่า สาร C ในที่นี้จะเป็นสารละลาย ไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 6 บรรจุไว้ประมาณ 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร

อุปกรณ์ชุด ประกอบอีกคือ หลอดหยด ช้อนชา สำลี หลอดแคปิลารี ไซรินจ์

ขั้นตอนการทดสอบกับตัวอย่าง

1. นำสาร A สาร B และ สาร D ใส่ในแทงค์ หรือ บีกเกอร์ ชนิดละแทงค์ ปิดแทงค์หรือบีกเกอร์ด้วยกระจก อุดรอยรั่วด้วยการซีลด้วยเทปกาว ตั้งทิ้งไว้
2. นำตัวอย่างที่จะตรวจ ในการทดลองได้ทดลองกับซอส น้ำปลา เต้าเจี้ยว ซอสห อยนางรม และอาหารสดพวกเนื้อไก่

   กรณีเป็นตัวอย่างน้ำปลา ซีอิ้ว ดูดตัวอย่างซอสด้วยหลอดหยด นำตัวอย่างมาประมาณ 20 หยดใส่ลงในหลอดทดลอง หยดสาร C ลงในตัวอย่างประมาณ 40 หยด เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที

   กรณีเป็นตัวอย่างเต้าเจี้ยว ซอสหอยนางรม นำตัวอย่างมา 1 ช้อนชา ใส่ในหลอดแก้ว หยดสาร C ลงในตัวอย่างประมาณ 2 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที

   กรณีเป็นตัวอย่างอาหารสดเช่นเนื้อไก่ นำตัวอย่างมาขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ใส่ในหลอดแก้วหยดสาร C ลงในตัวอย่างประมาณ 3 ml เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที

   กรองสารละลายใสผ่านสำลี ใส่ในหลอดแก้ว นำสารละลายใสไปวิเคราะห์ทางคุณภาพ
3. ใช้หลอดแคปิลารีดูดสารละลายใส ของตัวอย่างในข้อ 2 หยดลงบนเพลทสำเร็จรูปขนาด 2.5 x 5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น ทั้งนี้หยดสารมาตรฐานสาร I สารII และ สาร III ตามลำดับ ไว้บนแผ่นเพลทด้วย
4. นำแผ่นที่มีสารมาตรฐาน และ สารสกัดจากตัวอย่างไปใส่ในแทงค์หรือบีกเกอร์ที่เตรียมในข้อ 1 ทิ้งไว้ให้ไอตัวทำละลายเคลื่อนที่ห่างจากปลายแผ่นประมาณ 0.5 เซนติเมตร
5. นำเอาแผ่นออก เป่าให้แห้ง นำไปใส่ในแทงค์ที่มี สาร D บรรจุอยู่ตั้งทิ้งไว้จนสามารถสังเกตเห็นจุดสีน้ำตาลของสารมาตรฐาน บนแผ่นเพลทได้ จึงนำเอาแผ่นเพลทออก

6. คำนวณหาค่า R_f หรือ สังเกตตำแหน่งของหยดสีจากตัวอย่าง

ผลจากการคำนวณหาค่า Rf ตามแสดงในตารางที่ 7

ตาราง 7 ค่า Rf ของสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ในตัวทำละลายต่าง ๆ

สารมาตรฐาน	R_f	
	เมทานอล : แอมโมเนีย 80 : 20	แอมโมเนีย ร้อยละ 25
ฮิสตามีน	0.50	0.78
พิวเตรสซีน	0.13	0.23
คาร์ดาเวรีน	0.13	0.21

หมายเหตุ 1. การที่เลือกใช้สารละลาย 2 ชนิดเป็นตัวดีเวลลอปโครมาโทแกรม ก็เพื่อเป็นการยืนยัน

2. ระยะเวลาในการดีเวลลอปโครมาโทแกรมนี้ ถ้าใช้สาร A ใช้เวลาทั้งหมด 7 นาที ถ้าใช้สาร B ใช้เวลาทั้งหมด 9 นาที

ตัวอย่างชุดอุปกรณ์ ตามแสดงในภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 อุปกรณ์ชุดตรวจสอบ

การทดสอบชุดนี้ ใช้เวลาตรวจประมาณ 10 – 15 นาที ก็จะทราบได้ว่า ในสารตัวอย่างมีสารไบโอจีนิคเอมีนหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจสอบนี้ จะตรวจชนิด ฮิสตามีนได้แม่นยำกว่า การตรวจสอบพิวเตรสซีนและคาร์ดาเวรีน เนื่องจากค่าRf ของสาร 2 ชนิดหลังใกล้เคียงกันมาก

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองทั้งหมด 5 ตอน สรุปผลได้ดังนี้

1 ผลการศึกษาหาวิธีการตรวจสอบสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ทางคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี โดยตรวจสอบกับสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน พบว่า การใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามตารางที่ 2 นั้น พบว่า การใช้ เมทานอล : แอมโมเนีย ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ทั้งนี้พิจารณาจากลักษณะของหยดที่ได้ ซึ่งการใช้ เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80: 20เป็นสารละลายที่เหมาะสมสามารถใช้ได้ในการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์เหมาะสมที่สุด เมื่อนำวิธีนี้ไปตรวจกับตัวอย่างซอส พบว่า สามารถตรวจพบฮิสตามีนได้ชัดเจนที่สุด

2. ผลการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสม ในการตรวจสอบหาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ซึ่งเลือกทดลองโดยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี และ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยผลการตรวจสอบด้วยวิธีสเปกโทรฟลูออโรเมตรี เป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบที่มีความไวและจำเพาะเจาะจงได้ดี ไม่ด้อยกว่าวิธีเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แต่มีข้อดีที่สามารถตรวจสอบแต่ละตัวอย่างได้รวดเร็วกว่าวิธีโครมาโทกราฟี ถึง 2 เท่า จึงเลือกใช้วิธีสเปกโทรฟลูออโรเมตรีในการทดลองตอนต่อไปตลอดงานวิจัย

3. ผลศึกษาปริมาณฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในผลิตภัณฑ์ซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

เมื่อจัดสุ่มซื้อตัวอย่างซอสปรุงรส โดยแบ่งเป็นประเภทน้ำปลา ซีอิ๊ว ซอสถั่วเหลือง ซอสหอยนางรม นำมาสกัดตามตอนที่ 3 ทำวิธีการเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง 4 วิธี ได้แก่

<u>วิธีที่1</u> ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก นาน 30 วินาที เซนตริฟิวจ์และ กรองกากทิ้ง

<u>วิธีที่2</u> ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก อุ่น 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง

<u>วิธีที่3</u> ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก นำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M นำไปเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิคนาน 5 นาที เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง

วิธีที่4 ตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติกนำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M นำไปผสมด้วยเครื่องผสมhand mixer 5 นาที เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้ง

ผลการทดสอบคุณภาพวิเคราะห์ตามตอนที่ 1 พบว่า ตัวอย่างซอสมีสารฮิสตามีนเท่านั้น จึงนำซอสตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีน ผลจากวัดค่าการวาวแสงของสารที่ได้ พบว่า การสกัดสารสกัดที่มีฮิสตามีนในตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีการสกัดสารฮิสตามีน 4 วิธี จะให้ค่าการวาวแสงต่างกัน แต่การนำตัวอย่างซอสไปทำตามวิธีที่ 3 ส่วนใหญ่จะให้ความเข้มแสงสูงที่สุด พร้อมทั้งมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ

ผลทดลองที่ได้พบว่า ซอสกลุ่มที่เป็นน้ำปลา ในชุด S1 – S3 พบปริมาณฮิสตามีนค่อนข้างน้อยประมาณช่วง 7.5-10.6 ppm ซอสตัวอย่างกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มซอสถั่วเหลือง สามารถตรวจพบฮิสตามีนสูงสุด ประมาณ 48.17 – 51.80 ppm

4. ผลการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของฮีสตามีน พิวเตรสซีนและคาร์ดาเวรีน

ศึกษาผลอุณหภูมิการเก็บรักษาใน 2 สภาวะ คือ ในตู้เย็นและที่อุณหภูมิห้องโดยการเก็บรักษาไว้ตามสภาวะข้างต้นนาน 6 เดือน โดยจะทำการสุ่มตรวจแต่ละกลุ่มตัวอย่างตามระยะเวลา 1 เดือน 2 4 และ 6 เดือน พบว่า ปริมาณของสารฮิสตามีนขึ้นกับอุณหภูมิในการเก็บ โดยพบว่าแนวโน้มการเก็บในที่เย็นจะเกิดสารฮิสตามีนได้ในปริมาณน้อยกว่าในตัวอย่างซอสที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ทุกตัวอย่างซอสปรุงรสที่เก็บในทั้ง 2 สภาวะ มีแนวโน้มที่ตรวจพบปริมาณฮิสตามีนสูงสุดในเดือนที่ 2 ต่อจากนั้นก็มีแนวโน้มลดปริมาณฮิสตามีนลง ตัวอย่างกลุ่มที่ 6 ซึ่งมีปริมาณฮิสตามีนสูงสุด ก็มีปริมาณฮิสตามีนเพิ่มมากขึ้นจากเดิม เป็น 74.22 ppm ในเวลา 2 เดือน แม้จะมีปริมาณมาก ยังจัดอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าเกณฑ์กำหนดในน้ำปลา

ผลการศึกษาผลของการเก็บรักษากับสภาพการถูกแสง ได้นำตัวอย่างซอสปรุงรส ไปวางบนชั้นวางในห้องปฏิบติการให้ถูกแสง อีกกลุ่มหนึ่ง เก็บในตู้ห้องปฏิบัติการที่ไม่ให้ถูกแสง พบว่าระดับแสงไม่ได้มีผลต่อปริมาณฮิสตามีนแต่อย่างใด

5. ผลการศึกษาหาวิธีการตรวจสอบสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีนแบบรวดเร็ว พบว่า จัดเป็นชุดทดสอบหาชนิดของสารฮีสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ได้ โดยจัดเตรียมเป็นส่วนต่างๆ ได้แก่

5.1 ส่วนอุปกรณ์การทดลอง ประกอบด้วย เพลทสำเร็จรูปตัดขนาดเล็ก 2 x 5 เซนติเมตร แทงค์หรือบีกเกอร์สำหรับบรรจุสารดีเวลลอปโครมาโทแกรม 2 ชุด แทงค์หรือบีกเกอร์สำหรับบรรจุไอ

ไอโอดีน อีก 1 ชุด อุปกรณ์หยดสารแบบแคปิลารี หลอดแก้วสำหรับเตรียมสารตัวอย่าง หลอดหยด และ ช้อนตวงขนาดช้อนชา

5.2 สารมาตรฐาน ฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน เตรียมเข้มข้นชนิดละ 20 ppm ส่วนตัวสารละลาย ที่ใช้ดีเวลลอปมี 2 ชนิด ได้แก่ ชุด 1 เมทานอล : แอมโมเนีย(25%) อัตราส่วน 80 :20 โดยปริมาตร ชุดที่ 2 สารละลายแอมโมเนียร้อยละ 25 สารที่ใช้ตรวจหาจุดบนโครมาโทแกรมคือ ไอไอโอดีน สารทั้ง 3 นี้จะถูกบรรจุไว้ในแทงค์หรือบีกเกอร์ที่ปิดสนิท เพื่อให้เกิดไออิ่มตัวในภาชนะก่อนการใช้งาน จะทำให้การแยกสารเกิดขึ้นรวดเร็ว

5.3 ส่วนการเตรียมตัวอย่าง สามารถใช้ทดสอบกับตัวอย่างของเหลวเป็น น้ำ ของกึ่งเหลวกึ่งแข็งเช่น ซอสหอยนางรม ตัวอย่างชิ้นเนื้อ ทั้งนี้จะใช้สารย่อยโปรตีน คือ ไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 6 ในการสกัดสาร ทั้งนี้ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบกรณีเป็นตัวอย่างน้ำ ใช้ ตัวอย่าง 20 หยด ตัวอย่างของเหลวข้นหนืดใช้ 1 ช้อนชาขนาดเล็ก กรณีเป็นเนื้อสดใช้ตัวอย่างประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร นำมาหั่นหรือบดให้ได้สารละลายชิ้นละเอียด กรองกากออกด้วยการกรองผ่านสำลี

พบว่า การจัดอุปกรณ์อย่างง่ายตามข้างต้นสามารถจะตรวจชนิดสารได้ในเวลา 10 -15 นาที การตรวจสอบใช้ดูเปรียบเทียบ จุดที่เกิดขึ้นตามตำแหน่งของสารมาตรฐาน การมองเห็นจุดได้ของสารตัวอย่างสามารถประเมินได้ว่า ถ้ามีสารทั้ง 3 ชนิดในช่วง 20 ppm หรือมากกว่า 20 ppm สามารถตรวจเห็นสารได้

การอภิปรายผล

ในส่วนนี้ได้อภิปรายไว้แทรกตามผลการทดลองแต่ละตอน ในบทที่ 4 แล้ว แต่ ขอสรุปในส่วนอภิปราย

การทดลองในตอนที่ 1 เป็นการตรวจสอบด้านคุณภาพวิเคราะห์ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่จะเป็นแนวทางให้คิดวิเคราะห์ว่าสมควรจะทำการทดลองอะไรต่อไป อย่างไรก็ตามผลที่ทดลองได้ในตอนที่ 1 ได้ศึกษาข้อมูลจากนักวิจัยที่ได้ทำการตรวจวิเคราห์สารไบโอจีนิคเอมีนมาก่อน ซึ่งมีข้อเสนอระบบในการวิเคราะห์ไว้ โดยเฉพาะระบบตัวทำละลาย มีมากมายหลายชนิด และเมื่อผู้วิจัยได้นำมาทดลองเองจริงก็พบว่า ตัวทำละลายบางตัวไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ ตัวอย่างที่พบในรายงานของ A. R. Shalaby(1995) ตรวจหาสารไบโอจีนิกเอมีน ได้แก่ ฮีสตามีน คาร์ดาเวรีน พิวเทรสซีน ฟีนิลเอทิลลามีน ไทรามีน ทริปตามีน สเพนนิน และสเปอร์มิดีนในอาหาร ได้แก่ ปลาเฮอริงรมควันจำนวน 9 ตัวอย่าง ชีสจำนวน 9 ตัวอย่าง และไส้กรอก 10 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์แบบกึ่งปริมาณวิ เคราะห์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางร่วมกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไบโอจีนิดเอมีนกับแดนซิลคลอไรด์ และใช้ระบบตัวทำละลายในการดีเวลลอป เป็นคลอโรฟอร์ม / เบนซีน / ไตรเอทิลลามีน อัตราส่วน 6:4:1 v/v/v และระบบที่สองใช้ เบนซีน / อะซิโตน /

ไตรเอทิลลามีน อัตราส่วน 10:2:1 โดยปริมาตร วิธีการดังกล่าวสามารถแยกสารไบโอจีนิกเอมีนทั้ง 8 ชนิดได้และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โดยภาพรวมสำหรับสารไบโอจีนิกเอมีนที่ปนเปื้อนในอาหาร ระบบที่ใช้ในการทดลองของ Shalaby ได้ผลดี แต่จะเห็นว่าขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อนไม่เหมาะสมที่จะใช้มาวิเคราะห์แบบรวดเร็ว นอกจากนี้มีรายงานการใช้ตัวทำละลายอื่นๆอีก เช่นที่แสดงในตารางที่ 8

ตาราง 8 สารตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปครั้งเดียว (single development – solvent system)

ระบบสารละลาย	อัตราส่วน
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).

จากข้อมูลในตารางจะเห็นว่ามีรายงานการใช้ตัวสารละลายผสมบางชนิดก็ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เช่นคลอโรฟอร์ม สำหรับงานวิจัยนี้จึงมีข้อดีที่ประยุกต์ใช้สารระบบ binary เท่านั้นนำมาตรวจสอบ แต่ก็มีข้อที่ตรวจสอบระหว่าง พิวเตรสซีน และคารดาเวรีนได้ค่อนข้างยาก เพราะค่า Rf ของสารทั้งสองใกล้กัน แต่เมื่อนำสารสกัดจากตัวอย่างทดลองนำมาทดสอบจะพบว่า สารฮิสตามีนสามารถตรวจสอบได้ง่ายและโดดเด่นกว่า อย่างไรก็ตามการที่อาจไม่สามารถตรวจพบสารพิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน โดยใช้สภาวะที่ทดลองนี้ ก็อาจจะพบว่า ตัวอย่างอาจมีสารทั้งสองก็ได้ แต่ในปริมาณที่ต่ำกว่าขีดความสามารถของวิธีการจะตรวจสอบได้

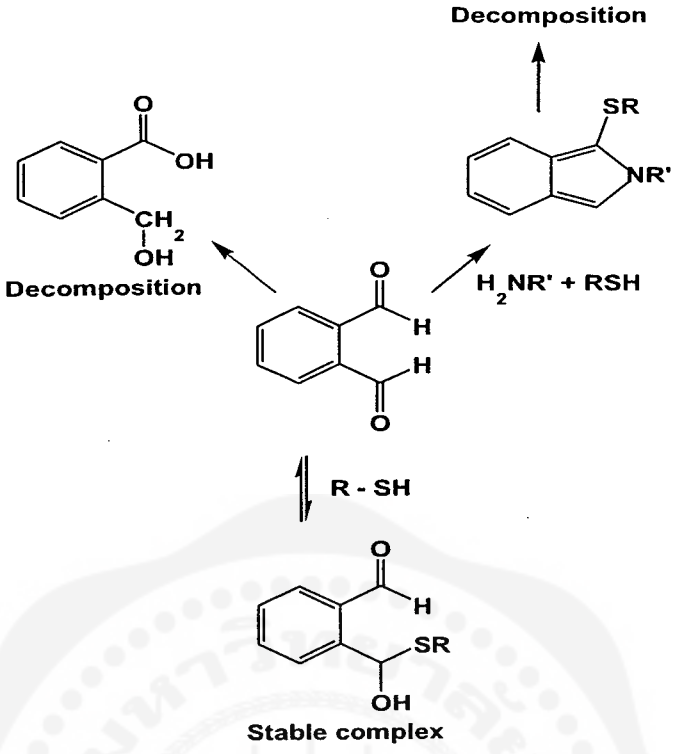
การทดลองตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการทดลองค้นหาว่า ควรจะเลือกวิธีใดมาทำการตรวจสอบหาปริมาณ ของสารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน จากที่ตรวจสอบผลการวิจัยในด้านนี้ พบว่าที่จริงมีหลายเทคนิคที่ใช้ตรวจหาปริมาณ เช่น เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี (Patange S.B,.et al.,2005). เทคนิค สเปกโทร ฟลูออโรเมตรี เทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary

electrophoresis) เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Cinquina, A.L.et al.,2004) โดยทั่วไปจะนิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการตรวจวิเคราะห์ แต่ก็พบรายงานหลายฉบับที่มีการเลือกใช้เทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี ทั้งนี้นักวิจัยแต่ละท่านต่างก็สรุปว่า ตรวจได้รวดเร็วกว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตามที่กล่าวในการทดลองตอนที่ 2 ซึ่งผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิคเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรีศึกษาเปรียบเทียบกับ เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพราะในห้องปฏิบัติการมีเครื่องมือทั้ง 2 ชนิดอยู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเครื่องที่มีตารางการใช้งานเต็มเวลา เมื่อทำการวางแผนการทดลองวิจัยเรื่องนี้ พบว่าต้องทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นเวลาเป็นสิ่งสำคัญมากในการเลือกวิเคราะห์ จึงได้เลือกศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการทดลองการสารมาตรฐานฮิสตามีนพิวเตรสซีน และ คาร์ดาเวรีน ด้วย 2 เทคนิคก่อน

การประเมินการใช้งานจริง สำหรับเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรีที่นำมาประยุกต์ในการวิจัยนี้ ได้ศึกษาตามวิธีการของAOAC. 1995b การทดลองนี้จะให้สาร ฮีสตามีน พิวเทรสซีน และคาร์ดาเวรีน กับทำปฏิกิริยากับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์เกิดสารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการวาวแสงได้ ในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอมีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนิลนั้นจัดเป็นปฏิกิริยาการควบแน่น (condensation reaction) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์กับสารไบโอจีนิกเอมีนทั้งสามชนิดจะใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ ปกติปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนและเอมีน ซึ่งรีเอเจนต์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือเอมีน คือ สารออร์โท–พทาลไดอัลดีไฮด์ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนและเอมีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รวมทั้งมีการศึกษาผลกระทบต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เช่น การศึกษาชนิดของตัวสารรีดิวซ์ ได้แก่ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล อีเทนไทอัล หรือ 3-เมอร์ แคปโตโพรพิโอนิกแอซิด เป็นต้น

ปฏิกิริยานี้เกิดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้องในสภาวะที่เป็นเบสและมีสารประกอบไทอัล (thiol; -SH) เป็นรีดิวซิงเอเจนต์ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาประมาณ 1 นาที เท่านั้น และ ไม่ต้องใช้ความร้อนในการทำให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งถือเป็นข้อดีเนื่องจากช่วยประหยัดเวลาในการทดลองและลดขั้นตอนของการเตรียมอนุพันธ์ หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นไอโซอินโดล (isoindole derivatives) ดังภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 ปฏิกิริยาระหว่างออร์โท – พทาลไดอัลดีไฮด์ กับสาร ไบโอจีนิกเอมีนและ 2 – เมอร์แคปโตเอทานอล

เมื่อได้สารอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง และวาวแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ ก็นำไปตรวจวัดค่าความเข้มของการวาวแสงดังกล่าว ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

สำหรับการทดลองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงก็ได้ทำการทดลองเตรียมสารตัวอย่างไบโอจีนิคเอมีน ให้เป็นสารอนุพันธุ์กับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ และ2 – เมอร์แคปโตเอทานอล เกิดสารอนุพันธ์ที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ ก่อนแล้วจึงถูกแยกสารอนุพันธ์ของสารทั้งสามชนิดในคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรีเวริส์เฟส ทำการตรวจวัดผลการแยกด้วยหั วตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนต์ การทดลองทั้ง 2 วิธีจะคล้ายกัน ตั้งแต่ช่วง การเตรียมสารอนุพันธ์ระหว่างสารไบโอจีนิคเอมีนกับสารออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ แต่ต่างกันที่ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนั้นต้องผ่านการแยกสารต่าง ๆด้วยคอลัมน์ ซึ่งจะให้ความถูกต้องสูง แต่จัดเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลาในการแยกสารตามระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลนี้เองเมื่อทำการทดลองเลือกวิธีการจึงสอดคล้องกับหลักการ

การทดลองตอนที่ 3 เป็นการศึกษาหาปริมาณสารฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน ในตัวอย่างจริง ซึ่งในตอนนี้จะนำความรู้จากตอนที่ 1 และตอนที่ 2 มาใช้เป็นวิธีการสำคัญในการตรวจผล แต่อย่างไรก็ตามผลจากความรู้ในการตรวจคุณภาพวิเคราะห์ตอนที่ 1 สามารถใช้บอกชนิดสารไบโอจีนิคเอมีนที่มีในตัวอย่าง จัดเป็นการลดกรรมวิธีการตรวจสอบให้เร็วขึ้นวิธีหนึ่ง ก่อ นที่จะไปตรวจหาปริมาณจริง ในการทดลองตอนนี้พบว่ามีการพิสูจน์ผลการเตรียมสกัดสารไบโอจีนิคเอมีนด้วยการเลือกเตรียมสารตัวอย่างต่างๆกัน 4 วิธี ตามกล่าว ปรากฏว่า เมื่อนำไปทดลองวัดค่าความเข้มการวาวแสงฟลูออเรสเซนต์ซึ่งแต่ละวิธีให้ค่าความเข้มการวาวแสงแตกต่างกัน ก็ทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลของการเลือกวิธีการในการเตรียมสารสกัดที่จะนำมาตรวจสอบ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยเลือกที่จะใช้วิธีที่ 3 โดยการนำตัวอย่างซอส ปั่นกับ 6% กรดไตรคลอโรอะซิติก นำไปผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 1 M นำไปเขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิคนาน 5 นาที เซนตริฟิวจ์ กรองกากทิ้งก่อนจะนำสารละลายใสไปทดลองต่อ ผลการใช้เครื่องอัลตราโซนิคมาช่วยนี้ พบในรายงานการสกัดสารในการวิเคราะห์สารอื่นๆไม่เพียงแต่สาร ไบโอจีนิคเอมีนเท่านั้น(Yung-Hsiang Tsai .et al., 2005) เป็นวิธีที่สามารถทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายออกมาได้มาก แต่ก็มีข้อจำกัดที่ในห้องปฏิบัติการต้องมีเครื่องนี้อยู่ เพราะเครื่องมีราคาสูง กรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มีอาจใช้วิธีคนหรือกวนสารให้เข้ากันเป็นเวลานาน

สำหรับผลการตรวจวัดปริมาณสารพบว่า ในตัวอย่างซอสทุกตัวอย่างแสดงผลทางคุณภาพวิเคราะห์ในการพบ สารฮิสตามีนเป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้สะดวกในการจะตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฮิสตามีนด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมตรี ผลที่ได้พบว่า ตัวอย่างกลุ่มน้ำปลามีฮิสตามีนในช่วง 7.5 – 10.6 ppm หรือ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเท่านั้น แสดงว่าผู้ประกอบการธุรกิจน้ำปลาของเรามีการผลิตที่ดีได้คุณภาพ เพราะผลจากการตรวจสอบน้ำปลาในหลายๆประเทศจะพบในปริมาณสูงกว่านี้ ตามรายงานของ EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ);(2011). ได้สรุปปริมาณฮิสตามีนเฉลี่ยที่พบในน้ำปลา 196 -197 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งหลายปีมาแล้วผู้ประกอบการของประเทศไทยเคยได้รับการเตือนถึงระดับอันตรายของสารไบโอจีนิคเอมีนที่อยู่ในระดับสูง อย่างไรก็ตามคาดว่า การที่ซื้อตัวอย่างแล้วนำมาตรวจทันทีจะพบสารฮิสตามีนในปริมาณน้อย ส่วนตัวอย่างกลุ่มซอสถั่วเหลืองจัดเป็นกลุ่มที่ตรวจพบสารฮิสตามีนค่อนข้างสูงที่สุดในการวิจัยนี้ ทั้งนี้ได้กล่าวถึงผลจา กการที่ตัวอย่างนั้นอาจมีจุลินทรีย์ที่ช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส ทำให้ช่วยกระตุ้นให้มีการเกิดฮิสตามีนมากขึ้น

ผลการทดลองตอนที่ 4 เป็นการวิจัยเกี่ยวกับผลการเก็บรักษาตัวอย่างซอสปรุงรสที่ระยะเวลานานถึง 6 เดือน โดยเปรียบเทียบผลการเก็บตัวอย่างซอสในที่เย็นเช่นในตู้เย็น กับวางไว้ที่

อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกับสภาวะที่มีการเก็บตัวอย่างซอสเหล่านี้ในครัวปกติของคนทั่วไป แล้วได้สุ่มตรวจหาปริมาณฮิสตามีนในระยะเวลาต่างๆ ผลที่พบ สรุปได้ว่าปริมาณฮิสตามีนขึ้นกับสภาพในการเก็บ โดยการเก็บที่เย็นจะทำให้ปริมาณฮิสตามีนไม่เพิ่มขึ้นมากเท่าการเก็บที่ระดับอุณหภูมิห้อง ผลการวิจัยตอนนี้จัดว่าสามารถแนะนำให้ ผู้บริโภคซื้อซอสมาบริโภคในขนาดขวดบรรจุที่ไม่ใหญ่มากนัก ถ้าเป็นครอบครัวเล็กๆ กับการเก็บเมื่อเปิดใช้แล้วควรเก็บในตู้เย็น จะช่วยชลอไม่ให้เกิดฮิสตามีนมากขึ้น อย่างไรก็ตามผลการทดลองก็สอดคล้องกับนักวิจัยหลายท่านที่กล่าวว่า ปริมาณไบโอจีนิคเอมีนส่วนใหญ่ขึ้นกับอุณหภูมิในการเก็บ แต่ข้อน่าสนใจคือ ปริมาณฮิสตามีนจะสูงสุดที่เก็บไว้นานเพียง 2 เดือน ต่อจากนั้นมีแนวโน้มลดลง การลดลงคาดว่า ฮิสตามีนอาจมีการเกิดปฏิกิริยากับสารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารกลายเป็นสารอื่นได้

ส่วนผลการศึกษาปัจจัยเรื่องแสงสว่าง พบว่า ในช่วง 4 สัปดาห์ จะไม่มีผลต่อปริมาณฮิสตามีนในตัวอย่าง เนื่องจากปริมาณที่ตรวจพบในสภาวะเก็บตัวอย่างซอสในที่มืด กับในที่สว่างไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก จัดเป็นข้อดี แต่อย่างไรก็ตามถ้าเกินเวลา 1 เดือนต่อไป ก็ยังไม่อาจทำนายผลได้ เพราะไม่ได้ตั้งเป้าประสงค์ไว้ในการตรวจสอบ

การทดลองตอนที่ 5 เป็นการประมวลความรู้จากการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์จากการทดลองตอนที่ 1 ทำให้จัดเป็นชุดทดสอบแบบง่ายและรวดเร็ว โดยทำการทดลองบนเพลทสำเร็จรูปขนาด 2.5 x 5 เซนติเมตร และเลือกดีเวลลอปโครมาโทแกรมด้วยสารละลาย 2 ระบบ เพื่อใช้ช่วยยืนยัน ตัวสารละลายเลือก เมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80:20 และสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นร้อยละ 25 ส่วนขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างแม้จะไม่ได้ใช้การทดลองตอนที่ 3 ทั้งหมด แต่ก็ประยุกต์ให้ง่ายสะดวก เพียงผสมตัวอย่างที่ละเอียดกับ กรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 6 ทิ้งระยะเวลาในการสกัดไม่เกิน 3 นาที แล้วแยกกากอาหารออก โดยรวมสามารถตรวจหาสารไบโอจีนิคเอมีนในเวลาตัวอย่างละประมาณ 10 – 15 นาที

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการทดลองกับสารไบโอจีนิคเอมีนชนิดอื่นๆเพิ่มเติม
2. ควรมีการศึกษาหาสารไบโอจีนิคเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทอื่นๆที่มีวางจำหน่ายในประเทศ

บรรณานุกรม

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

มาลี เจริญวิทย์วรกุล; จันทร์ฉาย แจ้งสว่าง,2538) การศึกษาฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์ปลาบางชนิด.วารสารอาหาร, 25(1) หน้า 35-42

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

Alvarez, E. O. (2009). The role of histamine on cognition. *Behavioral Brain Research*, 199(2):183-189.

AOAC. 1995b. Histamine in seafood: Fluorometric method. Sec. 35.1.32, Method 977.13. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.), p. 6-17. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Arnold,S.H. and Brown,W.D.(1978).Histamine toxicity from fish products.*Advances in Food Research*,24,113-154.

Bao-Shyung,W.,Jih-Terng,W., and Youk-Meng,C.,(2003).A rapid gas chromatographic method fpr determination of histamine in fish and fish products.*Food Chemistry*.82:329-334.

Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Alvarez M, Fernandez M, Lopez P, Barcelo P,Corbi A and Lolkema JS, 2010. Risk assessment of biogenic amines in fermented food. EuropeanJ. Clin. Nutrition, 64, 95-100.

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.

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.

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.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ);(2011). Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal 2011;9(10):2393.

Fernandez,S andMackie,I.M.(1987).Technical note:Preliminary survey of the content of

histamine and other higher amine in some samples of Spanish canned fish. *International Journal of Food Science and Technology*,22,409 -412.

Guirard BM and Snel EE, 1987. Purification and properties of Pyridoxal-5'-Phosphate-dependent histidine decarboxylases from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes*. J. Bacteriol. 169, 9, 3963-3968.

Haglund, William (1996). *Forensic taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*. CRC Press. pp. 100.

Hernández-Orte P, Lapeña A C, Peña-Gallego A, Astrain J, Baron C, Pardo I, Polo L, Ferrer S, Cacho J and Ferreira V, 2008. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels. Factorsaffecting formation. Food Res. Int. 41, 697–706.

Hernandez-Herrero MM, Roig-Sagues AX, Rodriguez-Jerez JJ and Mora-Ventura MT, 1999. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies. J. Food Prot. 62, 5, 509–514.

Hsien-Feng Kung , Yiing-Horng Lee , Shu-Chen Chang , Cheng-I Wei and Yung-Hsiang Tsai (2007).Histamine contents and histamine-forming bacteria in sufu productsinTaiwan .*Food Control.* 18 :381–386.

Innocente,N.,Biasutti, M.,Padovese,M., and Moret.S.(2007).Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract.*Food Chemistry.*101(3):1285-1289.

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

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

Kimura B, Konagaya Y and Fujii T, 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, ahalophilic lactic acid bacterium isolated from fish sausae. Int. J. Food Microbiol. 70, 71-77.

Kose,S. and George,H.(2000).Modification of a colorimetric method for histamine analysis in fish meal. *Food Research International* . 33:839-845.

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

Lewis, Robert Alan (1998). *Lewis' Dictionary of Toxicology*. CRC Press. pp. 212.

Lopez-Sabater,E.I.,Rodriguez-Jerez,J.J.,Roig-Sagues,A.X. and Ventura,M.T.(1994). Bacterio -logical quantity of tuna fish(Thunnus thynnus)destined for canning: effect of tuna

handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level.*Journal of Food Protection*,57:318-323.

Lucas PM, Wolken WAM, Claisse O, Lolkema JS and Lonvaud-Funel A, 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. Appl. Environ.Microbiol. 71, 1417-1424.

Malle,P.,Valle,M.and Bouquelet,S.(1996).Assay of Biogenic Amines Involved in Fish Decomposition.*Journal of AOAC International.* 79(1):43-49.

Molenaar D, Bosscher JS, Ten Brink B, Driessen, AJM and Konings WN, 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in*Lactobacillus buchneri*. J. Bacteriol. 175, 2864–2870.

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

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.

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

Rawles,D.D., Flick,G.J and Martin,R.E.(1996).Biogenic amines in fish and shelfish. *Advances in Food and Nutrition Research*,39.:329-364.

Recsei PA and Snell EE, 1984. Pyruvoyl Enzymes. *Annual Rev. Biochem*. 53, 357-387.

Rezaei M, Montazeri N, Langrudi H E, Mokhayer B, Parviz M and Nazarinia A, 2007. The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. *Food Chem*istry. 103, 150–154.

Rodriguez-Jerez JJ, Mora-Ventura MT, Lopez-Sabater EI and Hernandez-Herrero M, 1994. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in spanish salted semi-preserved anchovies, *J. Food Prot.* 57, 9, 784-787.

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

Schmidt-Glenewinkel,.T., Nomura .Y and Giacobini ,E.(1977)The conversion of lysine into piperidine, cadaverine, and pipecolic acid in the brain and other organs of the mouse .*Neurochemical Research* (2):619-637.

Sevim Köse and George Hall .(2000) Modification of a colorimetric method for histamine analysis in fish meal. Food Research International.33(10):839-845

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

Shifrine,M.,Ousterhout,E.,Grau,R.and Vaughan,H.H.(1959).Toxicity to chicks of histamined formed during microbial spoilage of tuna. *Applied Microbiology*,7,45-50.

Shu-Chen Chang , Hsien-Feng Kung , Hwi-Chang Chen ,Chung-Saint Lin ,and Yung-Hsiang Tsai.(2008) . Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (Xiphias gladius) implicated in a food borne poisoning .*Food Control* .19 :16–21

Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E, Coton M, Barnavon L, Bach B, Rattray F, Bunte A, Magni C, Alvarez M, Fernandez M, Lopez P, Barcelo P,Corbi A and Lolkema JS, 2010. Risk assessment of biogenic amines in fermented food. EuropeanJ. Clin. Nutrition, 64, 95-100.

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

Taylor L and Woychik NA, 1982. Simple medium for assessing quantitative production of histamine by *Enterobacteriaceae*, J. Food Prot. 45, 747-751.

Taylor SL and Speckard M, 1984. Inhibition of bacterial histamine production by sorbate and other antimicrobial agents. J. Food Prot. 47, 508–511.

Xuezhi Bai, Bo Young Byun, and Jae-Hyung Mah.(2013) Formation and destruction of biogenic amines in *Chunjang* (a black soybean paste) and *Jajang* (a black soybean sauce). *Food Chemistry.Article in Press.*

Yung-Hsiang Tsai , Hsien-Feng Kung , Tsong-Ming Lee , Hwi-Chang Chen ,Shin-Shou Chou , Cheng-I Wei and Deng-Fwu Hwang (2005) Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *Food Control* .16 :579–585.

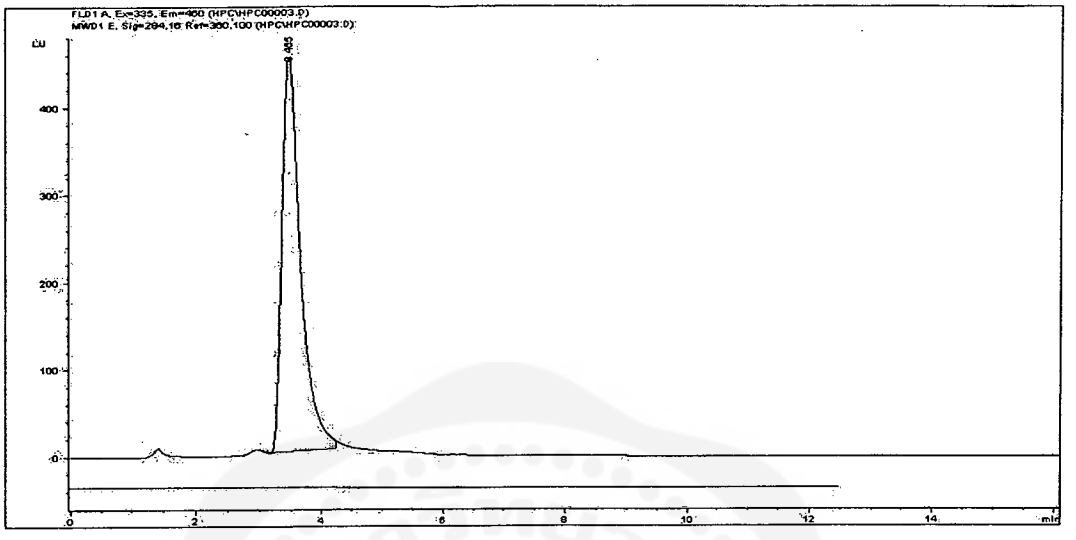
Yung-Hsiang Tsai , Hsien-Feng Kung , Qing-Lin Lin , Jieh-Horng Hwang ,Shou-Hsun Cheng , Cheng-I Wei , and Deng-Fwu Hwang.(2005) Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. *Food Chemistry* .90 :635–641

Zaman MZ, Abdulamir AS, Abu Bakar F, Selamat J and Bakar J, 2009. A review: microbiological,physiological and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. Am. J. Appl. Sci. 6,6, 1199-1211

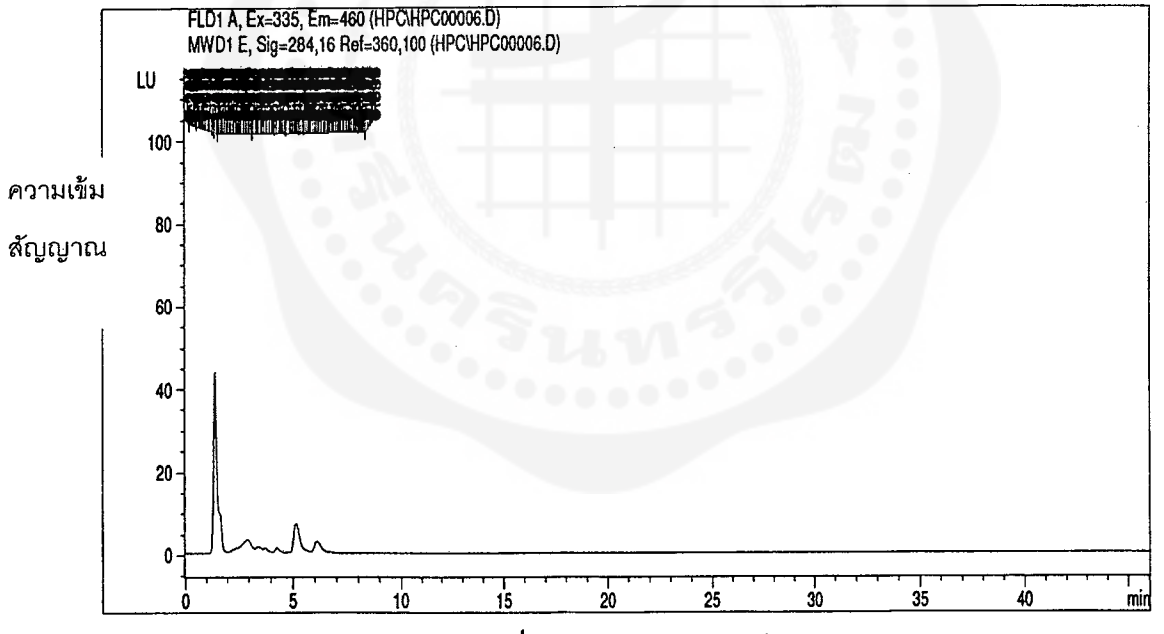
Zhihua Tao,' Minoru Sato, Yali Han, Zhujun Tan, Toshiyasu Yamaguchi, Toshiki Nakano(2011). A simple and rapid method for histamine analysis in fish and fishery products by TLC determination.Food Control.22(8):1154-1157.

ภาคผนวก

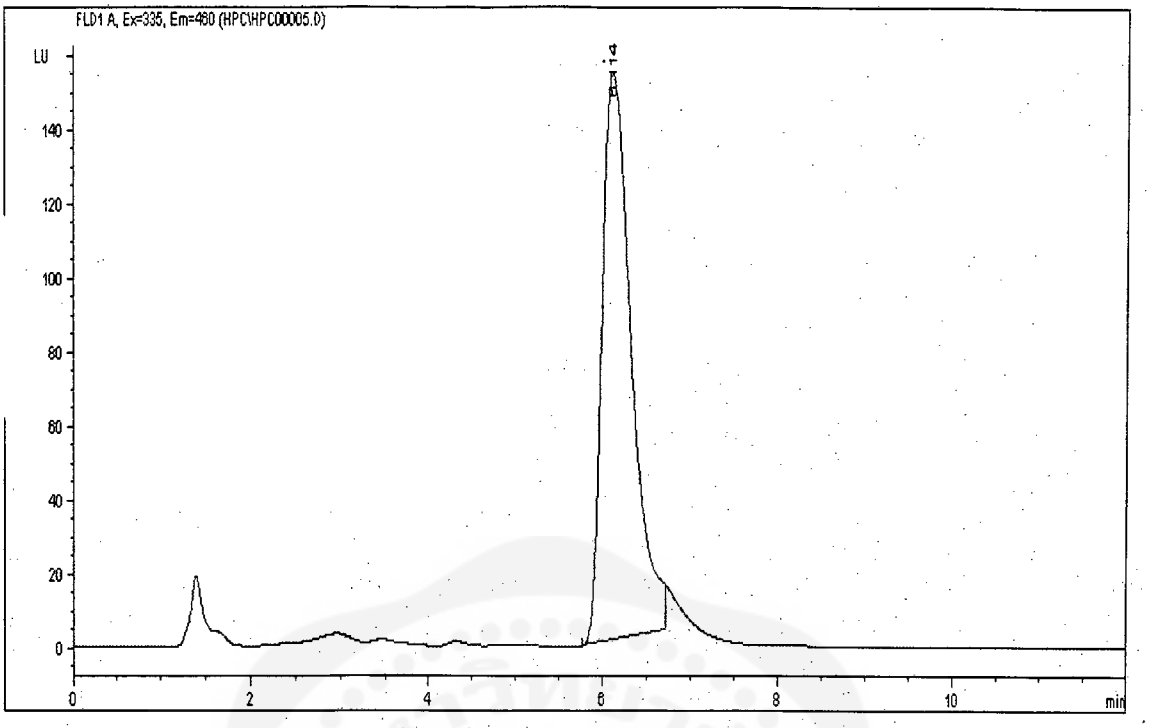
ภาคผนวก ก



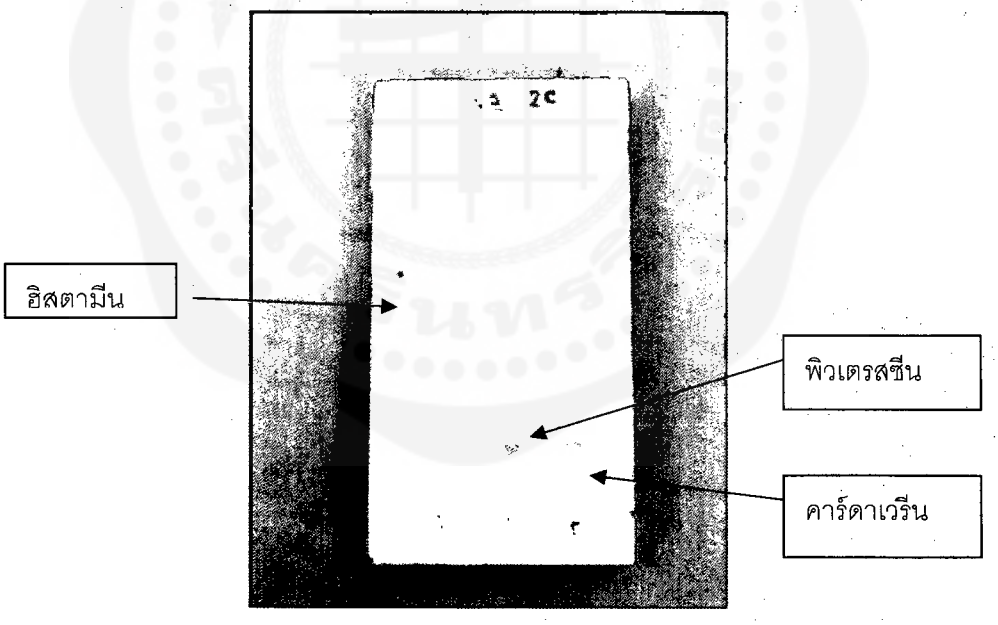
ภาพประกอบภาคผนวก ก 1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานฮิสตามีน



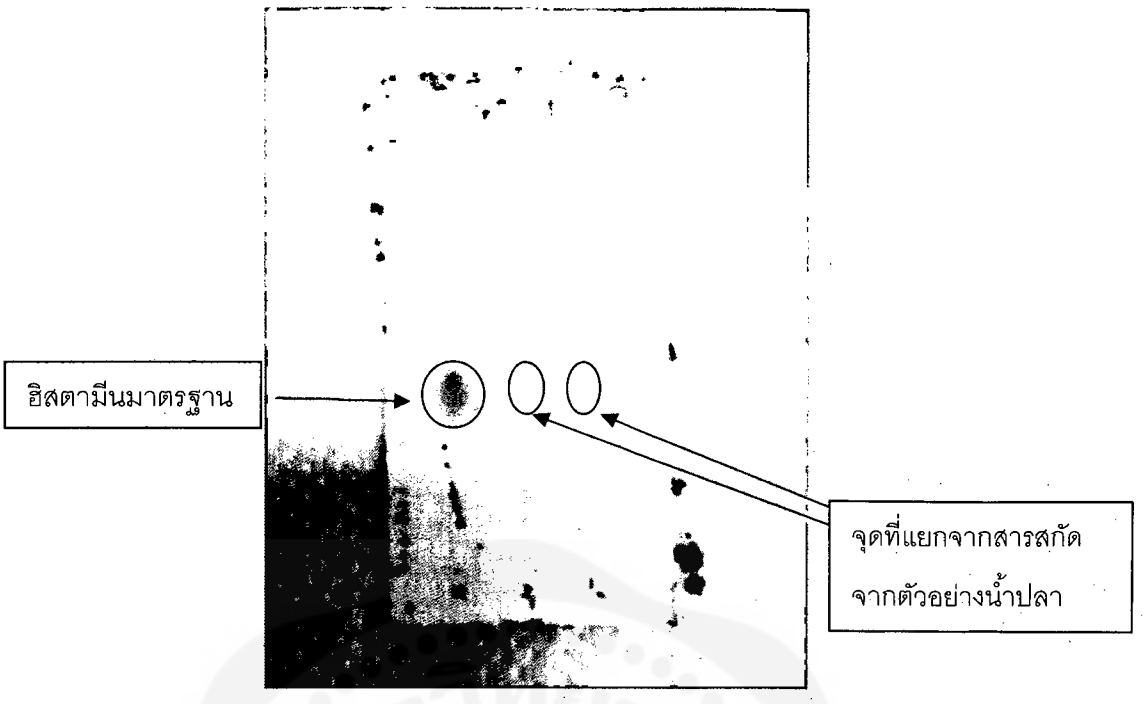
ภาพประกอบภาคผนวก ก 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานพิวเตรสซีน



ภาพประกอบภาคผนวก ก 3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานคาร์ดาเวรีน



ภาพประกอบภาคผนวก ก 4 แยกสารมาตรฐานฮิสตามีน พิวเตรสซีน และคาร์ดาเวรีน บนแผ่นเพลททินแลร์ขนาด 2.5 x 5 cm. ด้วยสารผสมของเมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80 : 20



ภาพประกอบภาคผนวก ก 5 ตัวอย่างการตรวจสอบน้ำปลาตัวอย่างเปรียบเทียบกับฮิสตามีน แยกด้วยสารผสมของเมทานอล : แอมโมเนีย อัตราส่วน 80 : 20

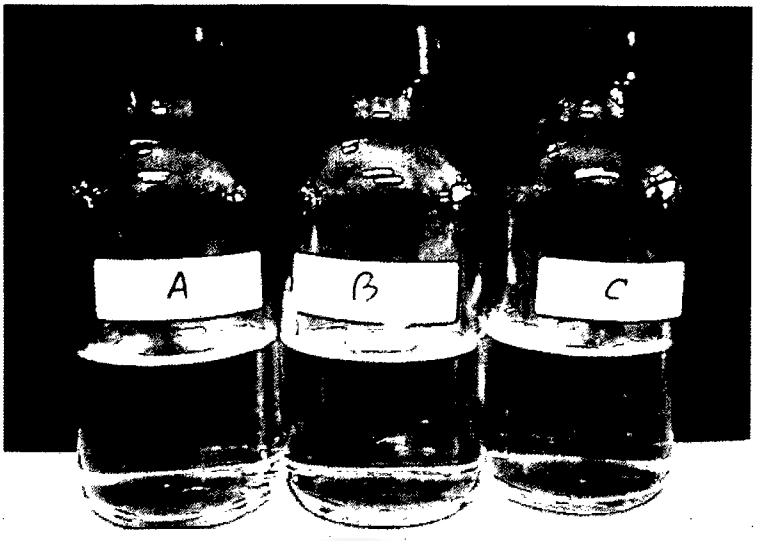
ภาคผนวก ข



ภาพภาคผนวก ข 1 ตัวอย่างซอสตัวอย่างที่นำมาทดลองบางชนิด



ภาพภาคผนวก ข 2 การเตรียมสารสกัดจากซอสปรุงรส



ภาพภาคผนวก ข 3 สารละลายที่ใช้ดีเวลลอปสารและเตรียมตัวอย่างในชุดทดสอบ



ภาพภาคผนวก ข 4 แผ่นเพลทซิลิกาสำเร็จรูป

ประวัติย่อผู้ทำวิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง พรพิมล ม่วงไทย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs Pornpimol Muangthai

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

โทรศัพท์ ทำงาน 02-6641000 ต่อ 8455

มือถือ 084-3285527

บ้าน 02-5520308

โทรสาร 02-2592097

E-mail pornpi @ swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วท.บ.(เคมี) เกียรตินิยม อันดับ 2 จาก มหาวิทยาลัยศิลปากร ปี 2522

ปริญญาโท วท.ม.(เคมีวิเคราะห์) จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2524

ปริญญาเอก ปร.ด.(วิทยาศาสตร์การอาหาร)จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2546