

การวิเคราะห์ปริมาณทอรินและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลา



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สิงหาคม 2559

การวิเคราะห์ปริมาณทอรัสและฮีสเตอร์ร่วมกันในตัวอย่างปลา



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สิงหาคม 2559

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การวิเคราะห์ปริมาณทอรินและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลา



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

สิงหาคม 2559

กาญจนา คล่องงานอุย. (2559). การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลา.
ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์: รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ทอรีนและฮีสตามีนด้วย ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ก่อนทำการตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนำ ตัวอย่างปลาทกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อ ปริมาตร แล้วนำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ จากนั้นทำการแยกสารทั้งสองด้วยคอลัมน์ระบบปริเวอร์สเฟสชนิด C18 ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไตริลในอัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดด้วยความยาวคลื่นของการกระตุ้นและความยาวคลื่นของการเปล่งแสง 333 และ 451 นาโนเมตร ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถแยกสารทั้งสองได้พร้อมกัน ภายในเวลา 10 นาที โดยกราฟมาตรฐานของทอรีน และฮีสตามีนมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความ เข้มข้น 0.0005 ถึง 10 และ 0.03 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ($R^2 > 0.9975$) มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจ วิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) ของทอรีน เท่ากับ 0.0001 และ 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับฮีสตามีนมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเที่ยง ของวิธีวิเคราะห์ให้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าน้อยกว่า 1.35 และความแม่นยำ ของวิธีวิเคราะห์ให้ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 75.83 ถึง 98.45 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้ สามารถแยกทอรีนและฮีสตามีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวในการตรวจวัดสูง มีความจำเพาะ เจาะจง และสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลาสดได้ โดยพบปริมาณทอรีนอยู่ในช่วง 1074.05 ± 8.91 ถึง 1648.45 ± 1.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณ ฮีสตามีนในช่วง 6.60 ± 0.30 ถึง 8.01 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัย วิธีการปรุงตัวอย่างด้วยวิธีต้ม นึ่ง และทอด พบว่า วิธีการปรุงอาหารส่งผลต่อปริมาณทอรีนและ ฮีสตามีนในเนื้อปลา และได้ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิห้องและการแช่แข็ง พบว่า ไม่ส่งผลต่อปริมาณทอรีน แต่ปริมาณฮีสตามีนมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลาการเก็บรักษา ปลาที่อุณหภูมิห้องมากกว่า การเก็บรักษาปลาในที่เย็น

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF TAURINE AND HISTAMINE IN FISH SAMPLES



AN ABSTRACT

BY

KANJANA KLONGNGANCHUI

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

August 2016

Kanjana Klongnganchui. (2016). *Simultaneous analysis of taurine and histamine in fish samples*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai.

This research presented a method for the quantitative analysis of the taurine and histamine contents in fish samples by using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection (HPLC-FLD) in order to determine the *o*-phthalaldehyde derivatives of taurine and histamine. The fish samples were homogenised with 10% trichloroacetic acid, followed by ultrasonication. The taurine and histamine were separated in reversed-phase C-18 column under the optimized HPLC conditions, with a mobile phase system at 0.02 M phosphate buffer pH 4.8 : acetonitrile as 65:35 and a controlled flow rate of 0.8 mL/min. The excitation wavelength and emission wavelengths for the detection of fluorescence were at 333 and 451 nm, respectively. The results showed that both taurine and histamine could be separated within ten minutes. This method of analysis was also validated. The calibration curve showed a linearity range of 0.0005 - 10 and 0.03 - 10 mg/L for taurine and histamine, respectively, with good correlation coefficients ($R^2 > 0.9975$). The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of taurine were 0.0001 and 0.0005 mg/L, respectively and histamine were 0.01 and 0.03 mg/L, respectively. The relative standard deviation (RSD) of the developed method was less than 1.35%. The percentage recoveries were in the range of 75.83 to 98.45%. The approach showed an effective separation of both taurine and histamine with high sensitivity and selectivity. The method was applied to the simultaneous analysis of taurine and histamine in fish samples. The results revealed that taurine and histamine in fish were detected at the levels of 1074.05 ± 8.91 - 1648.45 ± 1.33 and 6.60 ± 0.30 - 8.01 ± 0.26 mg/kg, respectively. The effects of processing the fish samples, such as boiling, steaming and frying, were studied and the results revealed that the levels of taurine and histamine contents depended on the processing method. The storage of fish samples at room and freezing temperatures were also studied, but there was no effect on the taurine content in any of the samples stored in experimental periods. However, the samples stored at room temperature had an increased histamine content compared to the samples stored in freezing conditions.

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและ คำชี้แนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการแก้ปัญหาทุกขั้นตอนในการทำงานวิจัยและให้ คำแนะนำในการเขียนปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.วินัย อวงพิพัฒน์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการใน การสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ ที่ให้ความกรุณา ในการเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่อง เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้การสนับสนุน ทางด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและ ขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัยที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้ กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กาญจนา คล่องงานนุช

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
ความสำคัญของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ปลา	4
ทอรีน	6
ฮีสตามีน.....	11
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	24
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	24
ตัวอย่างปลา	25
วิธีดำเนินการวิจัย	26
ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	26
ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปลา	28
ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์.....	30
ตอนที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา.....	32
ตอนที่ 5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน.....	32
4 ผลการทดลอง.....	34
ตอนที่ 1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

4 (ต่อ)

ศึกษาความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) ที่เหมาะสมในการตรวจวัดทอรีนและฮีสตามีนด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์	34
ศึกษาหาอัตราส่วนของสัญญาณเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	34
ศึกษาอัตราการไหลของสัญญาณเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	36
ศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของสัญญาณเคลื่อนที่	39
ศึกษาผลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฮิสเตอีน เมไทโอนีน ไลซีน และฮีสติดีน	42
ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปลา	43
การศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางเคมี	43
การศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางกล	46
ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์	47
ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์	47
การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ)	48
การหาค่าร้อยละการคืนกลับ	49
ความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์	49
ตอนที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสด	50
ตอนที่ 5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน	53
ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาปลา	53
ศึกษาปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหาร	56

5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	58
--	----

บรรณานุกรม	62
------------------	----

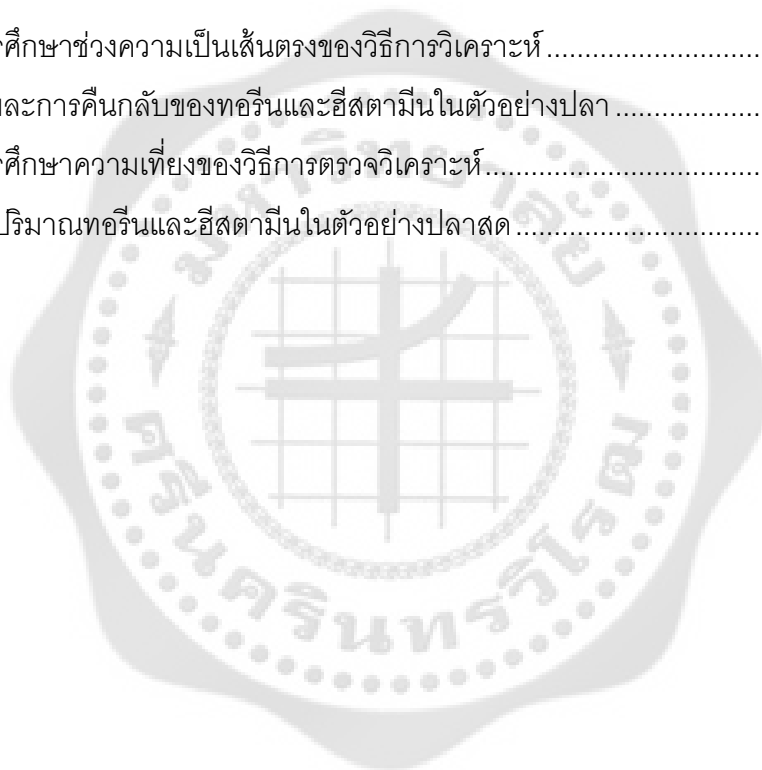
สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	67
ภาคผนวก ก	68
ภาคผนวก ข.....	75
ภาคผนวก ค	78
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	82



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ปริมาณทอรีนในอาหาร.....	9
2 ปริมาณฮีสตามีนในปลาสด.....	13
3 เปรียบเทียบสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์.....	16
4 การวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่าง.....	20
5 การวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่าง.....	23
6 ผลภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน.....	41
7 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์.....	48
8 ค่าร้อยละการคืนกลับของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา.....	49
9 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์.....	50
10 แสดงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสด.....	51



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างของทอริน	6
2 กระบวนการเมตาบอลิซึมของชีสเทอีน	7
3 โครงสร้างของฮีสตามีน	11
4 กระบวนการเมตาบอลิซึมของฮีสตามีนในร่างกาย.....	12
5 การเกิดสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนกับ (1) DNS-Cl (2) OPA (3) fluorescamine	15
6 โครมาโทแกรมผลการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อใช้อัตราการไหลของ วัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	36
7 โครมาโทแกรมผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 4.8 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไนโตรลอัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร.....	37
8 ผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	38
9 โครมาโทแกรมผลการศึกษา pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่.....	39
10 โครมาโทแกรมผลการรบกวนของกรดอะมิโนเมธไทโอนีนต่อฮีสตามีนที่ pH 5.0.....	40
11 โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทอรินและ ฮีสตามีนพร้อมกัน	41
12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมทอรินและฮีสตามีนที่เติมสารละลาย ผสมของสารรบกวนทั้ง 4 ชนิด.. ..	42
13 โครมาโทแกรมของตัวอย่างปลาโอที่เติมสารละลายผสมของทอริน ฮีสตามีน และสารรบกวนทั้ง 4 ชนิด	42
14 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสม.....	44
15 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลาย.....	45
16 ผลการศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสม	46
17 ผลการศึกษาของเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	47
18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ทอรินและฮีสตามีนกับพื้นที่ใต้พีค.....	48
19 ปริมาณทอรินที่ตรวจพบในปลาสด.....	51
20 ปริมาณฮีสตามีนที่ตรวจพบในปลาสด	52
21 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรินในการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิห้อง	53

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิห้อง	54
23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนในการเก็บรักษาปลาที่เย็น	55
24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในการเก็บรักษาปลาที่เย็น	55
25 ปริมาณทอรีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร	56
26 ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร	57
27 ช่วงความยาวคลื่นการเปล่งแสงของสารอนุพันธ์ผสมทอรีน และฮีสตามีน	69
28 โคโรมาโทแกรมสารละลายรบกวนของทอรีน	69
29 โคโรมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.0001 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	70
30 โคโรมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	70
31 โคโรมาโทแกรมสารละลายรบกวนของฮีสตามีน.....	71
32 โคโรมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของฮีสตามีนความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	71
33 โคโรมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของฮีสตามีนความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	72
34 โคโรมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างโอ.....	72
35 โคโรมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทู.....	73
36 โคโรมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาหีบต้ม	73
37 โคโรมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาช่อน.....	74
38 ตัวอย่างปลาโฮสด	76
39 ตัวอย่างปลาทูสด	76
40 ตัวอย่างปลาหีบต้มสด	76
41 ตัวอย่างปลาช่อนสด.....	76
42 ตัวอย่างปลาหีบต้มต้ม.....	76
43 ตัวอย่างปลาหีบต้มนี้	76
44 ตัวอย่างปลาหีบต้มทอด	77
45 วิธีการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ตัวทำละลายกรดไตรคลอโรแอซิดิก.....	77
46 วิธีการสกัดตัวอย่างปลาด้วยวิธีทางทางกลด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	77
47 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	79
48 เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence spectrometer).....	79
49 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน.....	80

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
50 เครื่องซั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง	80
51 เครื่องเขย่า Vortex	81
52 เครื่องอัลตราโซนิก	81



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ทอรีน (taurine หรือ 2-aminoethane sulfonic acid) เป็นกรดอะมิโนอิสระชนิดเบตา (β -amino acid) ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ และเป็นกรดอะมิโนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบของโปรตีน (non protein amino acid) ทอรีนนับเป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ โดยเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีน (cysteine) และเมทไทโอนีน (methionine) ทอรีนมีบทบาทสำคัญต่อร่างกายมนุษย์โดยเป็นหนึ่งในสารที่ส่งผลต่อการพัฒนาระบบประสาทและสมอง ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมนุษย์ ช่วยลดความดันโลหิต ช่วยควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในเลือด และทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนท์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15) ทอรีนเป็นสารที่พบมากในปลา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีความสนใจที่จะวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในปลา

ปลาคือแหล่งสารอาหารโปรตีนที่มีประโยชน์ในทางโภชนาการ โปรตีนในเนื้อปลานอกจากจะย่อยง่าย ยังมีคุณค่าในด้านการบำรุงสมอง การพัฒนาสมองของเด็ก ปลาส่วนใหญ่มีไขมันน้อย จึงเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ทำให้ไม่เกิดการสะสมไขมันในผนังหลอดเลือด ลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ ในปลายังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญต่อร่างกายในกลุ่มโอเมกา-3 และโอเมกา-6 อีกด้วย สำหรับปลาทะเลนอกจากจะมีโปรตีนแล้วยังมีธาตุไอโอดีนที่มีบทบาทในการพัฒนาสมอง และป้องกันการเกิดโรคคอพอกได้ด้วย ส่วนของเครื่องใน เช่น ตับปลา จะมีน้ำมันและวิตามินในกลุ่มที่ละลายได้ดีในไขมัน ได้แก่ วิตามิน A, D, E และ K (ประพันธ์ โนระดี: การบริโภคสัตว์น้ำของไทย)

ถึงแม้ว่าการบริโภคปลาจะให้คุณค่าทางอาหารมากกว่าการบริโภคเนื้อสัตว์ชนิดอื่น แต่ปลาเป็นสัตว์น้ำที่เสื่อมสภาพเร็วและเน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากเกิดการย่อยสลายของกรดอะมิโนฮิสติดีนในเนื้อปลากลายเป็นฮิสตามีน โดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) และจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปลา ซึ่งปริมาณฮิสตามีนที่พบในปลาจะบ่งบอกถึงความสดของปลา อีกทั้งฮิสตามีนยังเป็นสารพิษที่เรียกว่า สคอมโบรอกซิน (scombrototoxin) ที่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้

ฮิสตามีน (histamine หรือ β -aminoethylimidazole) เป็นสารในกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amines) ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ปกติแล้วสารฮิสตามีนพบในร่างกายมนุษย์ โดยเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮิสติดีน ด้วยเอนไซม์ฮิสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) เกิดการสลายเป็นฮิสตามีน และร่างกายสามารถรับสารฮิสตามีนได้จากอาหารที่มีการปนเปื้อนฮิสตามีน โดยเฉพาะ ปลา ผลิตภัณฑ์จากปลา และอาหารทะเล เป็นต้น เมื่อในร่างกายมีปริมาณฮิสตามีนมากเกินไป ฮิสตามีนจะส่งผลกระทบต่อระบบหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือด

เกิดการขยายตัว เกิดการบวมน้ำ ก่อให้เกิดอาการแพ้ มีผื่นคัน แสบร้อนบริเวณปาก และส่งผลต่อระบบหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะได้ (ยุพิน สังวรินทะ; และคณะ. 2537: 262) จึงทำให้หลายประเทศให้ความสำคัญกับปริมาณฮีสตามีนในอาหาร โดยใช้เป็นข้อกำหนดตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกถึงคุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา เนื่องจากปลา และผลิตภัณฑ์ปลาจะมีปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลังจากปลาตาย โดยส่วนใหญ่กำหนดให้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากความสำคัญของสารทั้งสองชนิด พบว่าในการบริโภคปลา ผู้บริโภคจะได้รับสารที่มีประโยชน์คือทอรีน แต่เนื่องจากข้อมูลผลการเสื่อมเสียของปลาจะเกิดเป็นสารฮีสตามีนข้างต้น จึงทำให้การบริโภคปลาของบางคน สามารถเกิดการแพ้จากปลาเนื่องจากสารฮีสตามีน นอกจากนี้ยังไม่พบการรายงานการตรวจวิเคราะห์สารทอรีน และฮีสตามีนแบบพร้อมกัน ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะนำเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลาพร้อมกัน และทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษา ผลของกระบวนการแปรรูปปลาต่อปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลาเพื่อนำผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาประเมินความสัมพันธ์เชิงประจักษ์ โดยความสัมพันธ์ที่ได้นี้สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการชี้แนะให้ผู้บริโภคระมัดระวังในการบริโภคปลา และเป็นข้อมูลแนะนำให้กับผู้ประกอบการทางด้านอาหารทะเลได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์
3. เพื่อประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ในการตรวจสอบปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อทราบถึงวิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์
3. เพื่อทราบถึงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่
 - 1.1 ศึกษาความเหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 1.2 ศึกษาผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 1.3 ศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่
 - 1.4 ศึกษาผลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฮิสเตอีน เมธิไทโอนีน ไลซีน และฮิสติดีน
2. ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม
 - 2.1 ศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางเคมี
 - 2.1.1 ศึกษาชนิดตัวทำละลายในการสกัด ได้แก่ กรดไตรคลอโรแอซิดิก กรดเปอร์คลอริก เมทานอล และอะซิโตนไตริล
 - 2.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม
 - 2.1.3 ศึกษาปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสม
 - 2.2 ศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางกลจะใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic extraction)
3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์
 - 3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีที่ทำการวิเคราะห์
 - 3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD)
 - 3.3 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ)
 - 3.4 ค่าความถูกต้อง รายงานในค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery)
 - 3.5 ความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (precision) รายงานในค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)
4. วิเคราะห์หาปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา ได้แก่ ปลาทับทิม ปลาช่อน ปลาทุ และปลาโอ
5. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน
 - 5.1 ศึกษาผลระยะเวลาในการเก็บปลาที่อุณหภูมิห้อง 0, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง
 - 5.2 ศึกษาผลระยะเวลากการเก็บรักษาปลาแช่เย็นในช่องแช่แข็งเป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน
 - 5.3 ศึกษาปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหาร ได้แก่ การต้ม นึ่ง และทอด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลา ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และขอเสนอแนะดังต่อไปนี้

- ปลา
- ทอรีน
- ฮีสตามีน
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ทอรีน และฮีสตามีน

ปลา

ปลาเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีประโยชน์มากในทางโภชนาการ ซึ่งโปรตีนในเนื้อปลาจะเป็นโปรตีนที่ย่อยง่าย มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด โดยเฉพาะไลซีน ทรีโอนีน และทอรีน ที่มีผลต่อพัฒนาการสมองและการเจริญเติบโตในวัยเด็ก ทั้งยังเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันโรค ปลามีไขมันมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับประเภทและชนิด ของปลา นอกจากนี้ปลายังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญต่อร่างกายในกลุ่มโอเมกา-3 และโอเมกา-6 ที่ช่วยป้องกันการสะสมตัวของไขมันอิ่มตัว หรือคอเลสเตอรอล อันเป็นสาเหตุให้เกิดการอุดตันขึ้นในเส้นเลือด ในส่วนของเครื่องในปลา โดยเฉพาะตับปลา จะมีน้ำมันและวิตามินในกลุ่มที่ละลายได้ดีในไขมัน ได้แก่ วิตามิน A ,D, E, K และแร่ธาตุ ตัวปลาบางชนิดที่สามารถรับประทานทั้งตัว (ก้าง ครีบ และหัวปลา) จะทำให้ผู้บริโภคได้รับแคลเซียมเพิ่มขึ้นอีกด้วย ปลาทะเลนอกจากจะมีโปรตีนแล้ว ยังมีธาตุไอโอดีนที่มีบทบาทในการพัฒนาสมอง และป้องกันการเกิดโรคคอพอกได้อีกด้วย

จากข้อมูลการสำรวจการบริโภคสัตว์น้ำ พบว่าการบริโภคสัตว์น้ำของไทยเฉลี่ยอยู่ที่ 28-30 กิโลกรัมต่อคนต่อปี แสดงให้เห็นว่าคนไทยนิยมบริโภคอาหารทะเล และสัตว์น้ำจืด (ประพันธ์โนระดี. 2558. การบริโภคสัตว์น้ำของไทย.: ออนไลน์) ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ปลาทะเลและปลาน้ำจืด ที่หาซื้อได้จากตลาดสดเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในการเลือกซื้อปลา โดยทำการสุ่มตัวอย่างปลาที่ได้รับความนิยมบริโภคของคนไทยและหาซื้อได้ง่าย ได้แก่ ปลาโอ ปลาหูปลาทับทิม และปลาช่อน นอกจากนี้ ปลาหู และปลาโอเป็นปลาทะเลที่จัดอยู่ในวงศ์ Scombridae ที่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้อาหารทะเลได้ ซึ่งข้อมูลของปลาแต่ละชนิดจะกล่าวต่อไป

ปลาทะเล (Seafish)

ปลาโอ

ชื่ออื่นๆ ปลาโอแถบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Katsuwonus pelamis*

ชื่อสามัญ Skipjack tuna

ลักษณะทั่วไป เป็นปลาผิวน้ำ รูปร่างกลมและยาวเพรียว บริเวณเส้นข้างลำตัวมีแถบสีดำประมาณ 4-6 แถบ อยู่รวมกันเป็นฝูงใหญ่หลายพันตัว ส่วนมากพบในทะเลอันดามัน

ประโยชน์ ปลาโอมีโปรตีนสูง โคเลสเตอรอลต่ำ และมีโอเมกา 3 ที่มีกรดไขมัน EPA จะช่วยกระตุ้นระบบไหลเวียนของโลหิตในร่างกายให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพ ลดภาวะเสี่ยงเป็นโรคหัวใจ และกรดไขมัน DHA มีประโยชน์โดยตรงต่อสมอง เช่น ป้องกันโรคอัลไซเมอร์ เสริมสร้างระบบความจำ ซึ่งกรดไขมันทั้ง 2 ตัวนี้จะช่วยพัฒนาระบบสมองให้ทำงานได้อย่างเต็มที่ บำรุงประสาท และยังช่วยลดคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2530: 124)

ปลาทู

ชื่ออื่นๆ ปลาทูตัวสั้น หรือ ปลาทูสั้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rastrelliger brachysoma*

ชื่อสามัญ Short-bodied mackerel

ลักษณะทั่วไป มีลักษณะลำตัวกว้าง รูปร่างป้อมแบน ปากแหลมมน ด้านบนลำตัวมีสีน้ำเงินแกมเขียว มีจุดสีดำเรียงเป็นแถวตามสันหลัง ท้องมีสีขาวเงิน เนื้อปลาละเอียดและนุ่ม

ประโยชน์ เนื้อปลาทูประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยเฉพาะ ไลซีน และทรีโอนีนซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเด็ก มีปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายโดยเฉพาะกรดไลโนเลอิกซึ่งช่วยในการควบคุมระดับของโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2530: 88)

ปลาน้ำจืด (Freshwater fish)

ปลาทับทิม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus*

ชื่อสามัญ Nile tilapia

ลักษณะทั่วไป ลักษณะของปลาทับทิมเนื้อผนังช่องท้องสีขาวสะอาด ผิวหนังเป็นสีแดงมีลำตัวหนาทำให้มีเนื้อมาก และมีส่วนหัวเล็ก

ประโยชน์ เนื้อปลาทับทิมมีปริมาณไขมันต่ำกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยมีปริมาณไขมันเพียง 0.9 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไม่เกิดการสะสมไขมันในผนังหลอดเลือด ลดความเสี่ยงโรคหัวใจ

โรคความดันโลหิต และมีโอเมกา-3 มากถึง 4.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อย ตามธรรมชาติทั่วไปถึง 4 เท่า ในขณะที่เนื้อสัตว์อื่นๆ ไม่พบหรือพบน้อยมาก (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2530: 164)

ปลาช่อน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Channa striatus*

ชื่อสามัญ Striped snake-head fish

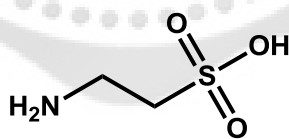
ลักษณะทั่วไป ปลาช่อนลำตัวค่อนข้างกลมและเรียวยาว หัวมีลักษณะค่อนข้างแบน ปลาช่อนมีความอดทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี

ประโยชน์ เนื้อปลาช่อนมีปริมาณโปรตีนสูง มักจะถูกนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บจากอุบัติเหตุ นอกจากนี้ เนื้อปลาช่อนยังมีไขมัน และมีโอเมกา 3 สูงกว่าเนื้อปลาชนิดอื่น (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2530: 148)

นอกจากเนื้อปลาเป็นแหล่งโปรตีน ที่มีกรดอะมิโนครบถ้วนแล้ว ปลาก็มีสารสำคัญคือ ทอรีน ซึ่งทอรีนเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ เป็นหนึ่งในสารที่ส่งผลต่อการพัฒนาระบบประสาท และสมองที่พบมากในปลา จึงขอกล่าวถึงทอรีนพอสังเขปดังนี้

ทอรีน

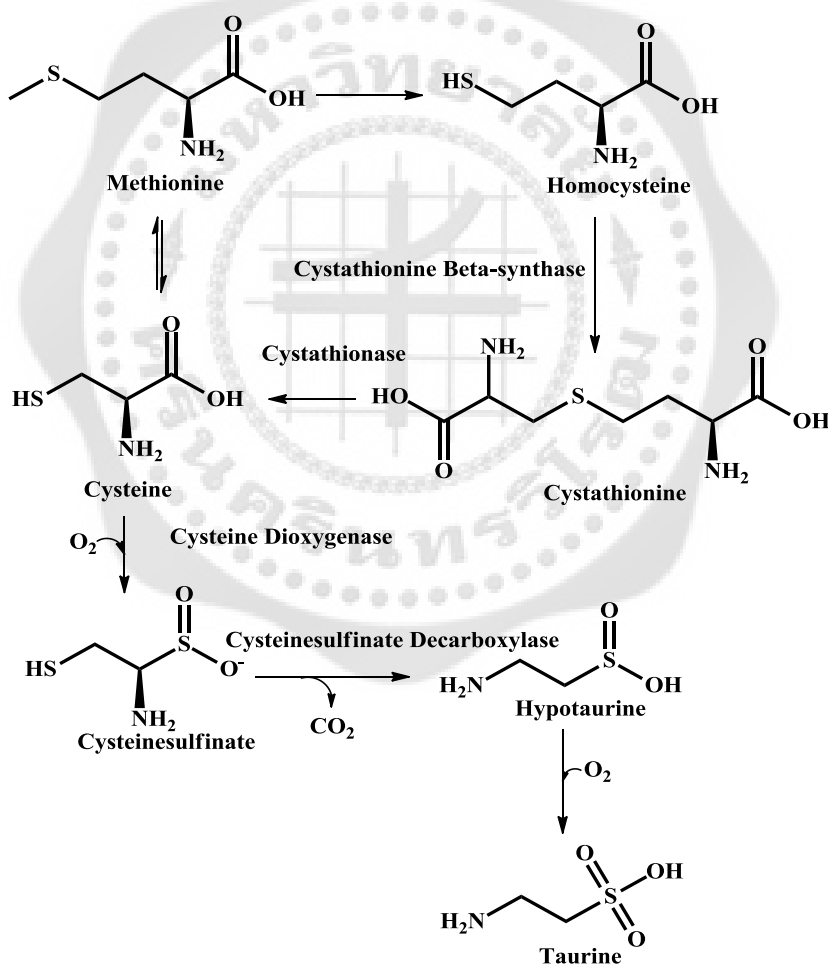
ทอรีนเป็นกรดอะมิโนอิสระชนิดเบตาที่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ มีคาร์บอนสองอะตอมอยู่ระหว่างหมู่อะมิโนกับหมู่ซัลโฟเนต (sulphonate) มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของทอรีน

จากภาพประกอบ 1 จะเห็นว่าภายในโครงสร้างของทอรีนมีหมู่ซัลโฟเนต เข้าไปแทนที่หมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group) ของกรดอะมิโน ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ทอรีนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบของโปรตีน

ทอรีนถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1827 โดยสกัดได้จากน้ำดีของวัว (bos taurus) ทอรีนนี้นั้นเป็นกรดอะมิโนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีนในร่างกาย โดยซิสเทอีนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเอนไซม์ซิสเตอีนไดออกซิจีเนส (cysteine dioxygenase) เกิดเป็นซิสเทอีน ซัลไฟเนต (cysteine sulfinate) จากนั้นซิสเทอีน ซัลไฟเนตเกิดกระบวนการขจัดหมู่คาร์บอกซี หรือดีคาร์บอกซีเลชัน (decarboxylation) ด้วยเอนไซม์ซิสเตอีน ซัลไฟเนต ดีคาร์บอกซีเลส (cysteine sulfinate decarboxylase; CSAD) ที่มี pyridoxal-5'-phosphate หรือวิตามินบี 6 (vitamin B6) เป็นโคเอนไซม์ ทำให้เกิดเป็นไฮโปทอรีน (hypotaurine) และเมื่อไฮโปทอรีนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อด้วยเอนไซม์ไฮโปทอรีน ดีไฮโดรจีเนส (hypotaurine dehydrogenase) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นทอรีน (Redmond; et al. 1998: 599–604) ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 กระบวนการเมตาบอลิซึมของซิสเทอีน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Stipanuk; et al. (2002: 3369–3378).

ร่างกายสามารถสังเคราะห์ทอรีนได้จากกรดอะมิโนเมทไทโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น โดยกรดอะมิโนเมทไทโอนีนสามารถเปลี่ยนเป็นโฮโมซิสเทอีน (homocysteine) ได้ จากนั้นโฮโมซิสเทอีนจะถูกเปลี่ยนเป็นซิสทาไทโอนีน (cystathionine) ด้วยเอนไซม์ซิสทาไทโอนีนเบตาซินเทส (cystathionine β -synthase) และซิสทาไทโอนีนนี้สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นซิสเทอีนได้ด้วยเอนไซม์ซิสเทอีนไทโอนเนส (cystathionase) และเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นทอรีนได้เช่นกัน

คุณสมบัติทอรีน

ทอรีนมีลักษณะเป็นผงผลึกใส ไม่มีสี สามารถละลายในน้ำได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 125 มีจุดหลอมเหลว 300 องศาเซลเซียส ทอรีนมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน มีค่าการแตกตัว $pK_a = 4.96$ และทอรีนสามารถสกัดออกมาได้โดยตรงด้วยน้ำ ทอรีนมีความเสถียรภาพทั้งในสภาวะกรด เบส และยังทนต่อความร้อนสูง แต่ภายในโมเลกุลทอรีนไม่มีหมู่โครโมฟอร์ (chromophore) จึงไม่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตหรือเกิดฟลูออเรสเซนส์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการทำอนุพันธ์ก่อนทำการตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล และฟลูออเรสเซนส์ (Shifen; et al. 2002: 251-267)

ความสำคัญของทอรีนในร่างกาย

ทอรีนเป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ได้ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณทอรีนที่ร่างกายสังเคราะห์ได้นั้นไม่เพียงพอต่อการใช้งาน จึงจำเป็นต้องรับทอรีนเพิ่มจากการบริโภคอาหารที่มีทอรีน โดยในร่างกายสามารถพบทอรีนได้มากในเนื้อเยื่อหัวใจ กล้ามเนื้อลาย ระบบประสาทส่วนกลาง และทอรีนยังเป็นส่วนประกอบของน้ำดี อีกทั้งยังพบทอรีนปริมาณสูงได้ในน้ำนมของแม่ในระยะให้นมบุตร ดังนั้นทอรีนจึงมีบทบาทสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ เช่น ทอรีนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของร่างกาย พัฒนาการของระบบประสาท โดยเฉพาะสมองของทารกแรกเกิด และในวัยทารกมีปริมาณทอรีนมากกว่าผู้ใหญ่ แสดงให้เห็นได้ว่า ในช่วงวัยเจริญเติบโตร่างกายจำเป็นต้องได้รับทอรีนในปริมาณมาก ทอรีนช่วยควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยจะช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจใช้แคลเซียมในการหดตัวได้อย่างสมดุล โดยไม่ทำให้เกิดการใช้แคลเซียมมากเกินไปของหัวใจ (calcium overload) ในสภาวะที่มีระดับแคลเซียมสูง ซึ่งทำให้ทอรีนอาจช่วยในการรักษาภาวะหัวใจวายได้ นอกจากนี้ทอรีนยังช่วยลดความดันโลหิต ช่วยควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในเลือดได้ และยังทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนซ์ช่วยต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย โดยปกติปริมาณทอรีนที่ร่างกายได้รับต่อวันอยู่ที่ประมาณ 40 ถึง 400 มิลลิกรัม ซึ่งหากร่างกายมนุษย์เกิดภาวะขาดทอรีน พบว่าการขาดทอรีนในระดับปานกลางร่างกายจะมีระดับโปรตีนที่สำคัญในเลือดต่ำ ส่งผลให้เด็กมีการเจริญเติบโตช้า แต่ถ้าขาดทอรีนอย่างรุนแรงอาจทำให้เกิดอาการเซื่องซึม อ่อนเพลีย ตัวผอม ผิวหนังแห้ง หรืออักเสบ เส้นผม

เปลี่ยนสี ตับอาจถูกทำลาย และเกิดการสูญเสียกล้ามเนื้อและไขมัน อีกทั้งผู้ที่มีพฤติกรรมบริโภคอาหารประเภทมังสวิรัตโดยไม่รับประทานไข่ จะส่งผลให้ร่างกายได้รับวิตามินบี 6 น้อยเกินไป เนื่องจากวิตามินบี 6 ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในการสร้างทอรีนในร่างกาย และเมื่อสภาพร่างกายขาดวิตามินบี 6 จะเกิดการยับยั้งการสร้างกรดอะมิโนทอรีนของร่างกาย ทำให้ร่างกายเกิดภาวะขาดทอรีนได้เช่นกัน (ประสงค์ เทียนบุญ. 2004: 15)

แหล่งที่พบทอรีน

มนุษย์สามารถสังเคราะห์ทอรีนได้จากกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ คือ กรดอะมิโนเมไธไธโอนีน และซีสเทอีน ตราบใดที่มีวิตามิน บี 6 เพียงพอ ถึงแม้ว่าร่างกายสามารถสังเคราะห์ทอรีนขึ้นมาเองได้ แต่จำเป็นที่ต้องได้รับทอรีนจากแหล่งอาหารภายนอกโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับเด็กทารก ในอาหารทะเล เช่น หอยแมลงภู่ หอยนางรม และในเนื้อสัตว์จะมีปริมาณทอรีนสูง แม้ว่าปริมาณทอรีนในสัตว์จะมีมากกว่าปริมาณทอรีนในพืชมาก แต่ก็มีรายงาน พบทอรีนในสาหร่ายทะเล เห็ด และพืชอื่นๆ (Kataoka; & Ohnishi. 1986: 1887-1888) นอกจากนี้ยังพบทอรีนได้ในอาหารหลายชนิดแสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณทอรีนในอาหาร

อาหาร	ปริมาณทอรีน (มิลลิกรัม/100กรัม)
เนื้อวัว	43
เนื้อไก่	169
ไก่วง	306
เนื้อหมู	61
แฮม	50
ทูน่ากระป๋อง	42
ปลา	1130
กุ้ง	39.4
หอยแมลงภู่	655
หอยนางรม	70
นมวัว	7

ตาราง 1 (ต่อ)

อาหาร	ปริมาณทอรีน (มิลลิกรัม/100กรัม)
นมแปรรูปพาสเจอร์ไรส์	6
โยเกิร์ต	3.3
ไอศกรีมนิลา	1.9

ที่มา: ดัดแปลงจาก Stapleton; et al. (1997: 103-108); และ Wójcik; et al. (2010: 19-25).

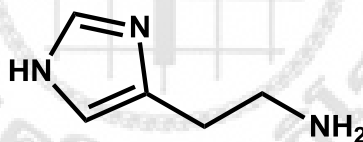
ปี ค.ศ. 1993 นักวิจัยในหลายประเทศได้มีการสังเคราะห์และสกัดทอรีนจากธรรมชาติ เพื่อนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ ได้นำไปประยุกต์ใช้ทางยา (Salze; & Davis. 2000: 215-229) แต่ในปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์ทอรีนเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อเป็นประโยชน์ทางการค้าเชิงพาณิชย์ เช่น ในกระบวนการผลิตอาหารแมว อาหารเสริม นมผงสำหรับทารกแรกเกิด และเครื่องดื่มชูกำลัง แต่จากงานวิจัยพบว่า การบริโภคทอรีนกับสารบางชนิดในปริมาณที่มากเกินไป จะส่งผลข้างเคียงต่อร่างกาย เช่น ในเครื่องดื่มชูกำลังจะมีส่วนผสมของคาเฟอีน (caffeine) กัวรานา (guarana) และทอรีน ซึ่งการได้รับปริมาณทอรีนมากเกินไป จะส่งผลให้เกิดผลข้างเคียง โดยทำให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลงในขณะที่ความดันโลหิตสูงขึ้น ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ เวียนศีรษะ ระบบประสาทและสมองถูกทำลาย (Pencheva, I. P.; & Todorova, K. A. 2015: 1-8) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมปริมาณทอรีนในเครื่องดื่ม โดยองค์กร European Food Safety Authority กำหนดให้ เครื่องดื่มชูกำลังแต่ละยี่ห้อต้องมีปริมาณทอรีนได้ 1000-3000 มิลลิกรัม ในปี ค.ศ. 1979 และ 1981 องค์กรมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ International Food Standards of the CODEX Alimentarius (FAO และ WHO) ได้กำหนดให้ทอรีนเป็นสารอาหารที่สามารถเติมลงในอาหารสำหรับทารกและอาหารสำหรับเด็กเล็กได้ และได้มีการปรับมาตรฐานปริมาณทอรีนในของนมผงสำหรับทารก โดยอนุญาตให้มีทอรีนได้สูงสุดที่ 12 มิลลิกรัมต่อ 100 กิโลแคลอรี แต่ยังไม่มีการระบุขีดจำกัดความเป็นพิษของทอรีน (Salze; & Davis. 2000: 215-229)

ถึงแม้ว่าการบริโภคปลาจะให้คุณค่าทางอาหารมากกว่าการบริโภคเนื้อสัตว์ชนิดอื่น แต่ปลาก็เป็นสัตว์น้ำที่เสื่อมสภาพเร็วและเน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากโปรตีนในตัวปลาเกิดการย่อยสลายเป็นเปปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน เอมีน อัลดีไฮด์ และแอมโมเนียด้วยเอนไซม์ในตัวปลาและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งเป็นสารเหล่านี้ที่ทำให้ปลาเกิดการเน่าเสียง่าย กลิ่นเหม็น ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ปลาบางชนิดที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงจะมีโอกาสเกิดสารฮิสตามีนได้

มากกว่าปลาชนิดอื่นๆ ซึ่งปริมาณฮีสตามีนที่พบในอาหารทะเลจะบ่งบอกถึงคุณภาพของอาหาร เนื่องจากปริมาณที่พบจะสัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส นอกจากนี้ฮีสตามีนยังเป็นสารพิษในกลุ่มที่เรียกว่า Scombroid poisoning ที่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้อาหารทะเล โดยจะพบมากในปลาวงศ์ Scombridae และ Scomberesocidae ปลาอื่นๆ เช่น ปลาซาร์ดีน ปลาทูน่า และปลาแฮริง เป็นต้น (จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล และคณะ. 2546) โดยอาหารที่มีการปนเปื้อนสารฮีสตามีน ส่งผลให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจากฮีสตามีน ผู้วิจัยจึงขอนำเสนอข้อมูลของสารฮีสตามีนดังนี้

ฮีสตามีน

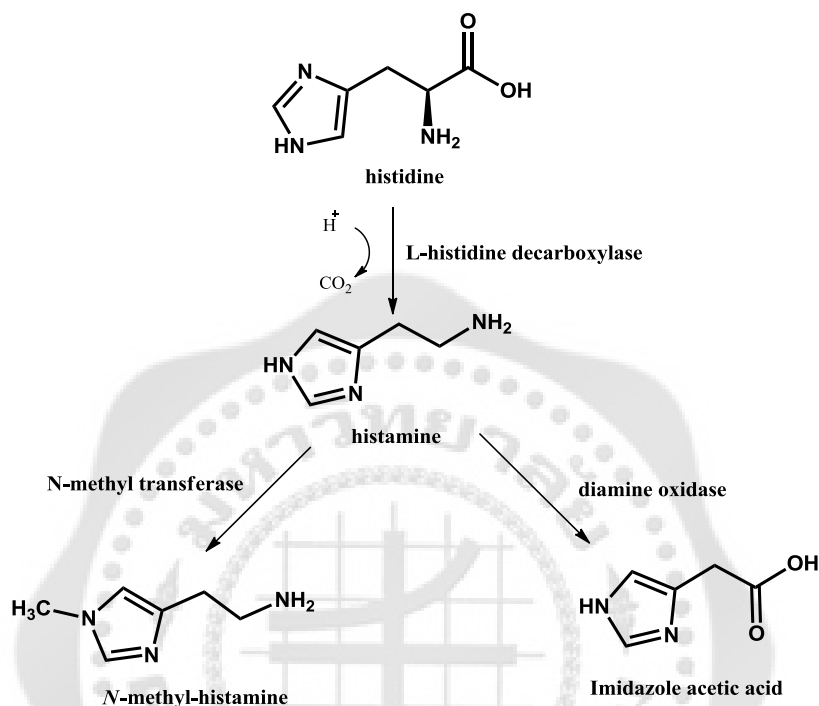
ฮีสตามีน หรือ β -aminoethylimidazole เป็นสารในกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองในการเกิดโรคภูมิแพ้และการอักเสบ การหลังกรดในกระเพาะอาหาร และทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในบริเวณสมอง ฮีสตามีนเป็นเฮเทอโรไซคลิกเอมีนที่มีสูตรโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอิมิดาโซล (imidazole) 1 วง และมีหมู่อะมิโนเชื่อมต่อกับหมู่เมทิลีน (methylene) มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถละลายในน้ำได้ ทนความร้อนได้สูง มีค่า pK_a เท่ากับ 6.04 ของวง imidazole และ 9.75 ของปลาย NH_2 แสดงโครงสร้างดังภาพประกอบ 3 (ยุพิน สังวรินทะ; และคณะ. 2537: 262)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของฮีสตามีน

ฮีสตามีนถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1910 ฮีสตามีนที่มีอยู่ในร่างกายเกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโนฮิสติดีน ด้วยเอนไซม์ฮิสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase; HDC) ที่มี pyridoxal-5'-phosphate หรือวิตามินบี 6 เป็นโคเอนไซม์ ใน mast cell และเกิดการสลายฮีสตามีนโดยปฏิกิริยาเมทิลเลชัน ด้วยเอนไซม์ฮีสตามีนเอ็น-เมทิลทรานสเฟอเรส (histamine N-methyltransferase; HNMT) ได้เป็นเอ็น-เมทิลฮีสตามีน (N-methyl-histamine) และเกิดปฏิกิริยา oxidative deamination ด้วยเอนไซม์ไดเอมีน ออกซิเดส (diamine oxidase; DAO) ได้เป็นกรด imidazole acetic acid ดังภาพประกอบ 4 นอกจากนี้ยังสามารถรับสารฮีสตามีนได้จากอาหารที่มีการปนเปื้อนฮีสตามีน โดยเฉพาะ ปลา ผลิตภัณฑ์จากปลา และอาหารทะเล เป็นต้น โดยฮีสตามีนในปลาหรืออาหารทะเล จะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาหรืออาหารทะเลเกิดการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ที่

ปนเปื้อน ถ้าร่างกายได้รับฮีสตามีนมากเกินไป จนเอนไซม์ DAO หรือ HMNT ไม่สามารถสลายหรือกำจัดฮีสตามีนได้หมด จึงทำให้ฮีสตามีนในร่างกายเกิดการสะสมมากขึ้นจนเกิดการเป็นพิษของฮีสตามีน (Laura; & Natalija. 2007:1185-1196)



ภาพประกอบ 4 กระบวนการเมตาบอลิซึมของฮีสตามีนในร่างกาย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Laura; & Natalija. (2007: 1185-1196).

ฮีสตามีนทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทส่วนกลาง สามารถพบฮีสตามีนได้ใน thalamus hypothalamus และบางบริเวณของ cerebellum และ forebrain โดยมีบทบาทในการตอบสนองของแอนติบอดีที่สำคัญในการเกิดภาวะภูมิแพ้ และกระตุ้นปลายประสาทรับความรู้สึกที่ทำให้เกิดความรู้สึกเจ็บปวดและคัน

เมื่อฮีสตามีนในร่างกายมีปริมาณมากเกินไป ฮีสตามีนจะกระจายเข้าสู่ร่างกายตามระบบไหลเวียนเลือด ส่งผลให้หลอดเลือดเกิดการขยายตัว เกิดการบวม น้ำ ซึ่งถ้าอาการเหล่านี้เกิดขึ้นกับหลอดเลือดบริเวณผิวหนังจะแสดงอาการเกิดรอยแดง (flush) เกิดผื่นแดง (flare) และเกิดเป็นผื่นนูน (wheal) นอกจากนี้ยังส่งผลให้ความดันโลหิตต่ำ เกิดลมพิษ จนถึงขั้นช็อกจากภาวะความดันโลหิตต่ำมาก (histamine shock)

ฮีสตามีนมีฤทธิ์โดยตรงต่อหัวใจ เพิ่มแรงในการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อร่างกายได้รับฮีสตามีนในปริมาณมากเกินไปทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นเสียจังหวะได้ ซึ่งอาการเหล่านี้เป็นอาการที่จะเกิดขึ้นกับคนที่มีอาการแพ้อาหารทะเล (ยุพิน สังวรินทะ; และคณะ. 2537: 262-268)

แหล่งที่พบฮีสตามีน

สารฮีสตามีนสามารถพบได้มากในผลิตภัณฑ์ปลา น้ำปลา และอาหารทะเล นอกจากนี้มีรายงานพบฮีสตามีนในอาหารหมักดองหลายชนิด เช่น เนยแข็ง (cheese) ไวน์ (wine) และกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่า จุลินทรีย์ในกลุ่ม lactic acid bacteria และจุลินทรีย์ทนเค็มบางชนิดในอาหารหมักดอง เป็นสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารมีปริมาณมากขึ้น จากรายงานของ Visciano, P. และคณะ แสดงให้เห็นว่าในปลาชนิดต่างๆมีการปนเปื้อนฮีสตามีน ดังตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณฮีสตามีนในปลาสด

ปลา	ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
ปลาทูน่า	114
ปลาแมกเคอเรล	2123
ปลาซาร์ดีน	1106
ปลาแซลมอน	255
ปลากะตัก	1465

ที่มา: ดัดแปลงจาก Visciano; et al. (2012: 188).

ปัจจุบันหลายประเทศให้ความสำคัญกับปริมาณฮีสตามีนในอาหาร โดยใช้เป็นข้อกำหนดตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกถึงคุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา การกำหนดปริมาณสารฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาที่ยอมรับได้จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของปลา และในแต่ละประเทศมีการกำหนดให้มีปริมาณฮีสตามีนได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้อกำหนดบ่งชี้คุณภาพของปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาแต่ละชนิด มีดังนี้

1. ปลาหูฉลาม สคอมบริดี (Scombridae) ปลาหู ปลาหลังเขียว และปลาซาบะ ในประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และอิสราเอล กำหนดให้สามารถตรวจพบปริมาณสารฮีสตามีนได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ประเทศแคนาดา และประเทศในเครือสหภาพยุโรป กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปลาหูฉลาม ปลาแซลมอน ปลาหู และปลาแฮร์ริง ในประเทศญี่ปุ่นกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

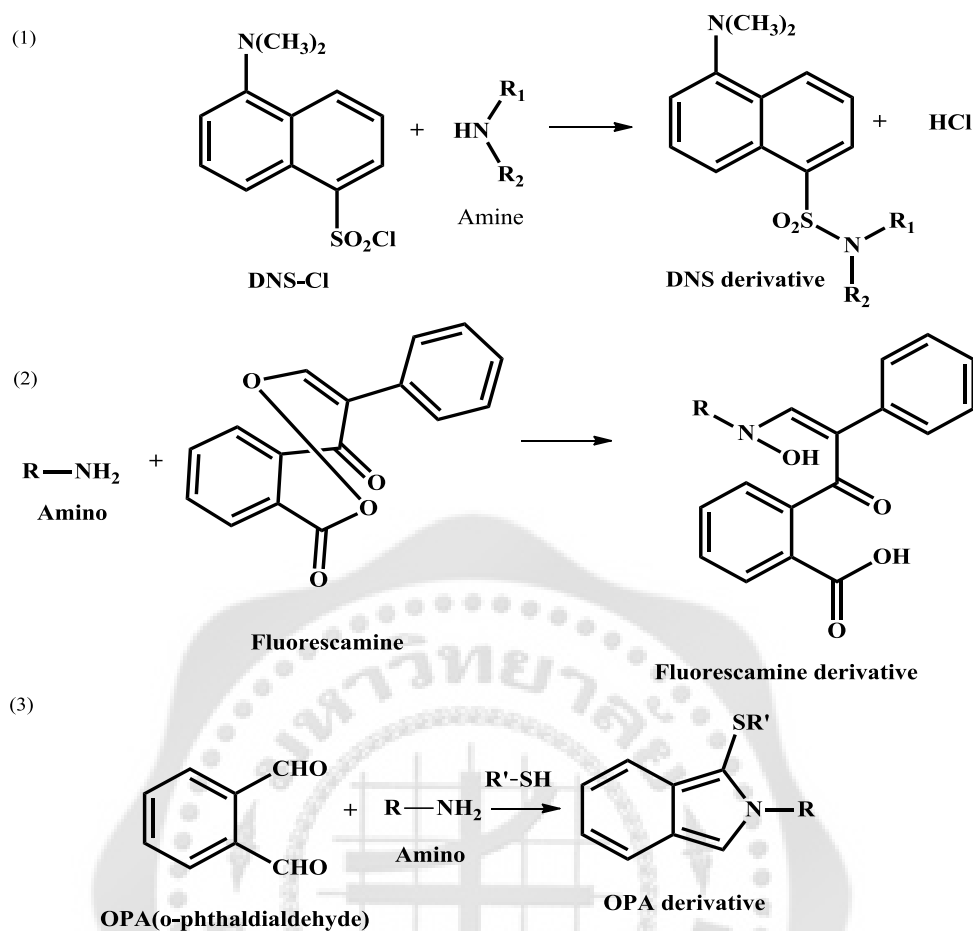
3. ปลากระดูกตากแห้ง และปลาหูฉลามตากแห้ง ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. น้ำปลา ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. ปลานึ่ง ทุกประเทศกำหนดให้สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (อำพรณ ชัยกุลเสวีวัฒน์. 2556: 1-8)

การบริโภคปลาจะได้รับสารทอรีนที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ในขณะเดียวกันอาจได้รับสารพิษฮีสตามีนเข้าไปพร้อมกัน ซึ่งการวิเคราะห์สารทอรีน และฮีสตามีนพร้อมกัน ต้องทำการเตรียมเป็น สารอนุพันธ์เพื่อให้สามารถนำไปตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-visible detector) หรือตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ได้ ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์จึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการวิเคราะห์ปริมาณ เนื่องจากส่งผลให้ความไวในการตรวจวัด (sensitivity) สูงขึ้น ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) สูงขึ้น เวลาในการวิเคราะห์ลดลง และความสามารถในการแยกสารดีขึ้น

สารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีน เช่น ออร์โท-ฟทาลอัลดีไฮด์ (o-phthalaldehyde; OPA) แดนซิลคลอไรด์ (dansyl chloride; DNS-Cl) และฟลูออเรสคามีน (fluorescamine) เป็นต้น พบว่าสารอนุพันธ์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติต่างกัน และทำปฏิกิริยาได้กับกรดอะมิโน เอมีน ลักษณะการเกิดสารอนุพันธ์ของแดนซิลคลอไรด์ ออโท-ฟทาลอัลดีไฮด์ และฟลูออเรสคามีน แสดงดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 การเกิดสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนกับ (1) DNS-Cl (2) Fluorescamine
(3) OPA

จากลักษณะการเกิดสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโน พบว่าสารอนุพันธ์แต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน โดยแดนซิลคลอไรด์ มีข้อเสียคือ สารอนุพันธ์ที่ได้ไม่มีความเสถียร และการเตรียมอนุพันธ์ต้องใช้ความร้อนและใช้เวลานาน และฟลูออเรสคามีนเป็นสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์กับเอมีนได้ง่าย ใช้เวลาในการทำอนุพันธ์น้อยเช่นเดียวกับอโท-พทาลอัลดีไฮด์ แต่สารอนุพันธ์ที่ได้จะให้ความสว่างในการตรวจวัด และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ต่ำ สำหรับอโท-พทาลอัลดีไฮด์เป็นสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์กับเอมีนได้ง่าย ใช้เวลาในการทำอนุพันธ์น้อย และสารอนุพันธ์ที่ได้จะให้ความสว่างในการตรวจวัดสูง (Shifen; et al. 2002: 251-267) แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 เปรียบเทียบสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์

	OPA	Dansyl-Cl	Fluorescamine
เวลาในการทำอนุพันธ์ (นาทีก)	< 1	30	ทันที
ขั้นตอนการเตรียมสารอนุพันธ์	ง่าย	ซับซ้อน	ซับซ้อน
การตรวจวัด	ฟลูออเรสเซนซ์	ฟลูออเรสเซนซ์	ฟลูออเรสเซนซ์
ความไวในการตรวจวัด	เฟมโตโมล	พิโคโมล	พิโคโมล
ความแม่นยำ	สูงมาก	สูง	สูง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Shifen; et al. (2002: 251-267)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน

ในปี ค.ศ. 1957 โซกะ และ อาโอโนะ (Soga; & Aono. 1957) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ทอรีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตริก ซึ่งวิธีวิเคราะห์นี้เป็นการตรวจวัดทอรีนโดยทำการเตรียมอนุพันธ์กับสาร 2,4-ไดไนโตรฟลูออโรเบนซีน (2, 4-dinitrofluorobenzene; 2, 4-DNFB) ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 358 นาโนเมตร โดยพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวในการตรวจวัดที่สูง และมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 94.7–100.4

ในปี ค.ศ. 1994 โพลานูเออร์ และคณะ (Polanuer; et al. 1994: 81-85) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อนำไปตรวจวัดในตัวอย่างปลา โดยเตรียมทอรีนเป็นสารอนุพันธ์ด้วยไดไนโตรฟีนิล (dinitrophenyl; DNP) และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิล พบว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีค่าของขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ 10 พิโคโมล และในตัวอย่างปลามีปริมาณทอรีน 1350 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 100

ในปี ค.ศ. 1994 วอเตอร์ฟิลด์ (Waterfield. 1994: 37-45.) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างทางชีวภาพ ได้แก่ บัสสาวะ น้ำเหลือง เนื้อเยื่อ และตับ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้กลไกการแยกแบบรีเวิร์สเฟส ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.4 ในเมทานอลและน้ำอัตราส่วน 43:57 โดยปริมาตร ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้ทำการสกัดทอรีนออกจากตัวอย่างทาง

ชีวภาพด้วย Ion-exchange resins จากนั้นเตรียมทอรีนเป็นสารอนุพันธ์ด้วยสารออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์/2-เมอร์แคปโตเอทานอล (o-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol; OPA/2-ME) แล้วทำการตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถตรวจวัดปริมาณทอรีนได้ถึง 0.5 พิโคโมล มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 99.59

ในปีค.ศ. 2002 ชิเฟน และคณะ (Shifen; et al. 2002: 251–267) ได้ทำการเปรียบเทียบสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์กับทอรีน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้แก่ ออโท-พทาลอัลดีไฮด์ แคนซิลคลอไรด์ และฟลูออเรสคามีน ซึ่งสารอนุพันธ์แต่ละตัวมีคุณสมบัติต่างกัน โดยแคนซิลคลอไรด์มีข้อเสีย เนื่องจากแคนซิลคลอไรด์เป็นรีเอเจนต์ที่ไม่มีความจำเพาะ สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนได้ทุกตัว เช่น เอมีน แอมโมเนีย และกรดอะมิโนอิสระ รวมทั้งสารอนุพันธ์ที่ได้ไม่มีความเสถียร มีความไวต่อแสง อีกทั้งการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ต้องใช้ความร้อนและใช้เวลานาน สำหรับฟลูออเรสคามีน และออโท-พทาลอัลดีไฮด์เป็นสารที่ใช้เตรียมอนุพันธ์กับทอรีน และเอมีนได้ง่าย ใช้เวลาในการทำอนุพันธ์น้อย แต่สารอนุพันธ์ของออโท-พทาลอัลดีไฮด์ที่ได้จะให้ความว่องไวในการตรวจวัดสูงกว่าฟลูออเรสคามีน และให้ค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ดีกว่า

ในปีค.ศ. 2004 คาทาลดี และคณะ (Cataldi; et al. 2004: 626-630) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในไข่ขาว ไข่แดง น้ำเหลือง ปัสสาวะและในเครื่องดื่มชูกำลังด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบและตรวจวัดด้วยแอมเพอโรมิเตอร์ พบว่าในไข่ขาวและไข่แดงมีปริมาณทอรีน 98 และ 750 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม น้ำเหลืองและ ปัสสาวะมีปริมาณทอรีน 98 และ 1200 ไมโครกรัมต่อลิตร และในเครื่องดื่มชูกำลังมีปริมาณทอรีน 4.06 กรัมต่อลิตร อีกทั้งวิธีวิเคราะห์นี้มีข้อดีคือ สามารถวิเคราะห์ปริมาณทอรีนได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว โดยไม่ต้องเตรียมเป็นสารอนุพันธ์

ในปี ค.ศ. 2006 เชน และคณะ (Chen; et al. 2006: 169-175) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและวิตามินละลายน้ำ 10 ชนิด พร้อมกันในตัวอย่างอาหารเสริม โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและวิตามินละลายน้ำได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจง และมีความไวสูง มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 1.00 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณอยู่ที่ 5.00 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 98.3–102 และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD) อยู่ที่ 1.13

ในปีค.ศ. 2007 กอร์มเลย์ และคณะ (Gormley; et al. 2007: 837–842) ได้ศึกษาปริมาณทอรีนในเนื้อปลาสด และปลาที่ผ่านกระบวนการแปรรูป โดยศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บปลา พบว่าทอรีนสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ และแบคทีเรียในปลาระหว่างการเก็บ แต่การเก็บปลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะไม่เกิดการย่อยสลายของทอรีนในปลา และจากการศึกษาปริมาณทอรีนในเนื้อปลาที่ผ่านกระบวนการแปรรูป พบว่ากระบวนการแปรรูปเนื้อปลาที่ส่งผลต่อปริมาณทอรีนน้อยที่สุดคือกระบวนการย่าง ให้ความร้อนจากไมโครเวฟ และนึ่ง ตามลำดับ

ในปีค.ศ. 2008 เป็ปปา และคณะ (Pappa-Louisi; et al. 2008: 1434-1447) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานของ กรดอะมิโนทอรีน อาร์จินีน (arginine) แอสพาราจีน (asparagine) กลูตามีน (glutamine) เซอรีน (serine) แอสปาทิก (aspartic) กลูตามิก (glutamic) ทรีโอนีน (threonine) อะลานีน (alanine) กาบา (GABA) เมทไทโอนีน วาลีน (valine) ทริปโตเฟน (tryptophan) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ลิวซีน (leucine) ไกลซีน (glycine) และโดปามีน (dopamine) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับ OPA/2-ME แล้วทำการตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ และตรวจวัดทางเคมีเชิงไฟฟ้า (electrochemical detector) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกทอรีนออกจากกรดอะมิโนตัวอื่นๆ เป็นดังนี้ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 5 ต่ออะซิโตน ไตรคลีนอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้ระบบเกรเดียนท์ (gradient) และใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยสภาวะดังกล่าวสามารถแยกกรดอะมิโนทั้งหมดได้ภายในเวลา 20 นาที

ในปีค.ศ. 2008 ซาوابิ และคณะ (Sawabe; Tagami; & Katsuhiko. 2008: 661–664) ได้ทำการพัฒนาวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในเครื่องดื่มชูกำลัง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมทอรีนเป็นสารอนุพันธ์ด้วย 4-ฟลูออโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (4-fluoro-7-nitrobenzofurazan; NBD-F) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ออกตะเดซิล ซิเลน (octadecyl silane; ODS) ที่ใช้เตตระบิวทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (tetrabutylammonium bromide) เป็นเคาเตอร์ไอออน (counter ion) ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน โดยที่ไม่จำเป็นต้องใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange column) ที่มีราคาแพง และตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร พบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างเครื่องดื่มชูกำลัง 5 ชนิดได้ ซึ่งตรวจพบมีปริมาณทอรีน 932-3153 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 98.2–99.9 และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD) อยู่ที่ 0.3-0.5

ในปีค.ศ. 2011 แวงและคณะ (Wang; et al. 2011: 537-542) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างทางชีวภาพ เช่น พลาสมา (plasma) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับ 4-ฟลูออโร-7-ไนโตรเบนโซฟลูอราน พบว่าในตัวอย่างพลาสมาของคนและหนูมีปริมาณทอรีน 37.6 และ 263 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปประยุกต์ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนในตัวอย่างทางชีวภาพอื่นๆอีกได้

ในปีค.ศ. 2013 ลูคัส และคณะ (Lukas; et al. 2013: 363-373) ได้ศึกษาการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของทอรีนที่เกิดจากสารอนุพันธ์ของทอรีนกับฟีนอลและโซเดียม ไฮโปคลอไรท์ และสารอนุพันธ์ของทอรีนกับโซเดียม ไฮโปโบรไมท์ แล้วตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของทอรีน-โบรมามีน เกิดเป็นสารสีเหลือง ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 332 นาโนเมตร และสารประกอบเชิงซ้อนของทอรีน-ฟีนอล-ไฮโปคลอไรท์ เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 630 นาโนเมตร ซึ่งเหมาะสมสำหรับในการนำไปตรวจวิเคราะห์ทอรีน

ในปี ค.ศ. 2014 ดราแกนอฟ และคณะ (Draganov; et al. 2014: 123-126) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ในเครื่องดื่มชูกำลังด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยทำอนุพันธ์กับสารนินไฮดริน (ninhydrin) เกิดเป็นสารที่ให้สีฟ้าหรือสีม่วง และตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณทอรีนได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจง มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอยู่ที่ 140 ไมโครกรัม มีค่าของขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณอยู่ที่ 1400 ไมโครกรัม มีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ที่ 98.3-102 และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD) อยู่ที่ 1.44

ตาราง 4 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตัวทำละลายในการสกัด ตัวอย่าง	สารที่ใช้เตรียม อนุพันธ์	วิธีวิเคราะห์	ผู้วิเคราะห์
ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม	น้ำ	2, 4-DNFB	UV-Visible	Soga; & Aono
ปลา	น้ำร้อน	DNP	HPLC	Polanuer; et al.
ปัสสาวะ				
น้ำเหลือง ตับ	-	OPA/2-ME	Ion chromatography	Waterfield.
เนื้อเยื่อ				
อาหารเสริม	น้ำ	-	HPLC/ESI-MS	Chen; et al.
เครื่องดื่มชูกำลัง	น้ำ	NBD-F	HPLC	Sawabe; Tagami; & Katsuhiro.
พลาสติก	อะซิโตนไตรคลอโรเอทิล	NBD-F	HPLC	Wang; et al.

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีน

ในปี ค.ศ. 1998 วาเลเรีย และ คลาเวีย (Valeria; & Claudia.1998: 241–245.) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ฮีสตามีน และฮีสติดีนพร้อมกันในรูปแบบตัวอย่างทูน่ากระป๋อง โดยทำการสกัดตัวอย่างทูน่าด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid; TCA) แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้วิธี 2 วิธี วิธีแรกทำการตรวจวัดด้วยอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลที่มีความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ง่ายและใช้เวลาในการวิเคราะห์รวดเร็ว วิธีที่สองทำการเตรียมฮีสตามีน และฮีสติดีนเป็นสารอนุพันธ์ด้วยออร์โท-ฟทาลอัลดีไฮด์ แล้วทำการตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ พบว่าขั้นตอนการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์จะมีผลต่อช่วงความมีเส้นตรง (linearity) และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในการทำซ้ำ (reproducibility) เนื่องจากอนุพันธ์ของสารออร์โท-ฟทาลอัลดีไฮด์นั้นไม่เสถียร แต่การเตรียมเป็นสารอนุพันธ์มีข้อดีคือ ช่วยทำให้การแยกฮีสตามีน และ ฮีสติดีนได้ดี สารอนุพันธ์ที่ได้จะให้ความไวในการตรวจวัดสูง

ในปี ค.ศ. 2001 ซาคิลลา และ คณะ (Shakila; et al. 2001: 255–259) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา โดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง 2 เทคนิค ดังนี้ เทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) โดยใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์มและ ไตรเอทิลลามีนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งใช้เวลาในการแยกตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่างในเวลา 30-40 นาที และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ด้วยแดนซิลคลอไรด์ แล้วทำการตรวจวัดด้วยยูวี-วิสิเบิลที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งใช้เวลาในการแยก 30 นาที พบว่า เทคนิค TLC สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างหลายชนิดพร้อมกันได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมปลาในการตรวจสอบสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสารพิษฮีสตามีน พิวเทรสซีน (putrescine) และคาร์ดาเวรีน (cadaverine)

ในปี ค.ศ. 2003 ดัวบัลและ คณะ (Douabalé; et al. 2003: 581-590) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาของฮีสตามีนกับออร์โท-พทาเลอดีไฮด์ โดยศึกษาการดูดกลืนแสง และการวาวแสงจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสง พบว่าฮีสตามีนทำปฏิกิริยากับออร์โท-พทาเลอดีไฮด์ ในอัตราส่วน 1:1 จากสเปกตรัมการคายแสง พบว่าการวาวแสงของสารอนุพันธ์จะลดลงในสภาวะกรด และจะเพิ่มมากขึ้นในสภาวะเบสแต่สารอนุพันธ์ที่ได้ไม่มีความเสถียร แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาจลนศาสตร์ของสารอนุพันธ์ฮีสตามีนกับออร์โท-พทาเลอดีไฮด์ในสภาวะเบสกับค่าการวาวแสง พบว่าให้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี

ในปี ค.ศ. 2008 โคโรส และคณะ (Koros; et al. 2007: 46–55) ได้ทำการตรวจวัดกรดอะมิโน และไบโอจีนิกเอมีนในเนยแข็ง ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงระบบเกรเดียนท์ โดยทำการสกัดด้วยสารละลายกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) แล้วทำการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ด้วยสารออร์โท-พทาเลอดีไฮด์ อีเทนไทออล 9-ฟลูออรีนิลเมทิล คลอโรฟอร์มेट (*o*-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate; OPA/ET/FMOC) จากนั้นทำการตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ และยูวี-วิสิเบิล พบว่าสามารถตรวจวัดกรดอะมิโน 21 ชนิด และสารไบโอจีนิกเอมีน 9 ชนิด ได้พร้อมกัน และมีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD) น้อยกว่า 3.49

ในปี ค.ศ. 2011 เซล์ฟ และ คณะ (Self; et al. 2011: 5906–5913) ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีน 8 ชนิด ฮีสตามีน คาร์ดาเวรีน ฟีนีลเอทิลลามีน (phenylethylamine) พิวเทรสซีน ทริปตามีน (tryptamine) ไทรามิน (tyramine) แอ็กมาทีน (agmatine) และ กรดยูโรคานิก (urocanic acid) ในพูนากะป๋อง และปลาพูนากะป๋อง โดยทำการสกัดด้วยวิธี matrix solid-phase dispersion ซึ่งใช้ CN-silica เป็นวัฏภาคของแข็งในการดูดซับ และใช้สารละลายแอมโมเนีย ฟอร์เมต บัฟเฟอร์ และอะซิโตนไนโตรลเป็นตัวชะ แล้วทำการแยกสารด้วยเทคนิค ultrahigh-performance hydrophilic interaction chromatography (UHPLC-HILIC) และทำการตรวจวัดด้วยแมสสเปกโตร

เมตรี พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารไบโอจีนิกเอมีนในตัวอย่างอาหารที่มีสารรบกวนมาก

ในปี ค.ศ. 2011 ทาเมาซี และ คณะ (Tahmouzi; et al. 2011: 756–761) ได้ทำการพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในปลาทูน่า ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการเตรียมฮีสตามีนเป็นสารอนุพันธ์ด้วยอโท-พทาลอัลดีไฮด์แล้วทำการตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนได้อย่างรวดเร็ว มีความไวสูงในการตรวจวัด และมีความจำเพาะเจาะจง โดยมีค่าของขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ มีค่าเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 4.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และมีค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD) เท่ากับ 1.35

ในปี ค.ศ. 2012 ซากราตินี และคณะ (Sagrati; et al. 2012: 537-543) ได้ทำการตรวจวัดสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีนพร้อมกันในปลา โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค liquid chromatography-tandem mass spectrometry พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีข้อดีคือ ไม่ต้องทำการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไบโอจีนิกเอมีน 8 ชนิดได้พร้อมกัน มีความไวสูงในการตรวจวัด มีความจำเพาะเจาะจง มีค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์สูง

ในปี ค.ศ. 2013 เยซูดฮาสัน และ คณะ (Yesudhasan; et al. 2013: 777-783) ได้ทำการตรวจวัดฮีสตามีนในปลาวงศ์ Scombroide และปลาอื่นๆ ประเภทสด และผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ ปลาแช่แข็ง ปลากระป๋อง และปลาแห้ง ในประเทศโอมาน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการเตรียมฮีสตามีนเป็นสารอนุพันธ์ด้วยอโท-พทาลอัลดีไฮด์ แล้วทำการตรวจวัดด้วยฟลูออโรโฟโตมิเตอร์ พบว่าในตัวอย่างปลาสด ปลาแช่แข็ง ปลากระป๋อง และปลาแห้งมีปริมาณฮีสตามีน ดังนี้ 2.6, 5.8, 3.1 และ 104 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งในปลาแห้งมีปริมาณฮีสตามีนมากกว่าที่องค์การ The United States Food and Drug Administration (FDA) และ European Union (EU) ได้กำหนดไว้

ตาราง 5 การวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตัวทำละลายในการสกัด ตัวอย่าง	สารที่ใช้เตรียม อนุพันธ์	วิธีวิเคราะห์	ผู้วิเคราะห์
ท่อนำกระป๋อง	TCA	OPA	HPLC	Valeria; & Claudia
ปลา และปลา แปรรูป	TCA	DSN-CI	TLC/HPLC	Shakila; et al.
เนยแข็ง	HClO ₄	OPA/ET/FMOC	HPLC	Koros; et al.
ท่อนำกระป๋อง และ ปลาท่อนำแช่แข็ง	matrix solid- phase dispersion	-	UHPLC-HILIC	Self; et al.
ปลาท่อนำ ปลาวงศ์	TCA	OPA	HPLC	Tahmouzi; et al.
Scombroid และ ผลิตภัณฑ์จาก ปลา	TCA	OPA	HPLC	Yesudhasan; et al.

เนื่องจากยังไม่พบการรายงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจวัดสารทอรีนที่มีประโยชน์ และฮีสตามีนที่เป็นตัวบ่งบอกความสดในตัวอย่างปลาพร้อมกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้ทำวิจัยจึงมีความสนใจนำเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์มาใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารทอรีน และฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและใช้ตัวตรวจวัดแบบเปล่งแสง
- (Fluorescence รุ่น HP 1100) จากบริษัท Hewlett-Packard
- คอลัมน์ C₁₈ (SphereClone 5 µm ODS, ขนาด 250 x 4.60 mm) จากบริษัท Fortis
- เครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Spectrofluorometer) รุ่น FP-6200 จากบริษัท JASCO
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB104S) จากบริษัท Mettler
- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออนรุ่น LaboStar จากบริษัท Siemens
- เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic) จากบริษัท Mettler electronic
- เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-genie 2 จากบริษัท Scientific Industries
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Zentrifugen EBA 8S จากบริษัท Hettich
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) จากบริษัท Memmert
- เครื่อง pH meter จากบริษัท Mettler Toledo
- ไมโครปิเปตขนาด 10 100 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Socorex
- ไซริงจ์ฟิลเตอร์ (Syringe filters) ชนิด PTFE (Polytetrafluoroethylene)

ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท International Scientific

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- กรดอะมิโนทอรีน (AR Grade) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- กรดอะมิโนซิสเทอีน (AR Grade) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- กรดอะมิโนเมธไทโอนีน (AR Grade) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- กรดอะมิโนไลซีน (AR Grade) จากบริษัท ACROSS
- ฮีสตามีนไฮโดรคลอไรด์ (AR Grade) จากบริษัท Fluka
- อะซิโตนไนไตรล์ (HPLC Grade) จากบริษัท Carlo Erba
- เมทานอล (HPLC Grade) จากบริษัท Merck
- ออร์โท-พทาเลตดีไฮด์ (AR Grade) จากบริษัท ACROS
- 2-เมอร์แคปโตเอทานอล (AR Grade) จากบริษัท Merck

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (AR Grade) จากบริษัท CARLO ERBA
- บอแรก (AR Grade) จากบริษัท APS Finechem
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (potassium di-hydrogen phosphate anhydrous) จากบริษัท Quality Reagent Chemical Product
- ไตรคลอโรแอสिटิก (trichloroacetic acid) จากบริษัท CARLO ERBA
- โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate anhydrous) จากบริษัท Quality Reagent Chemical Product

3. ตัวอย่างปลา

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยแบ่งเป็นตัวอย่างปลาทะเลและปลาน้ำจืดที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด ดังนี้

ตลาดห้วยขวาง

- A1 ปลาโอ (*Katsuwonus pelamis*)
- B1 ปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma*)
- C1 ปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus*)
- D1 ปลาช่อน (*Channa striatus*)

ตลาดปากน้ำ

- A2 ปลาโอ (*Katsuwonus pelamis*)
- B2 ปลาทุ (*Rastrelliger brachysoma*)
- C2 ปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus*)
- D2 ปลาช่อน (*Channa striatus*)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซึ่งสารมาตรฐานทอรีน 0.0100 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บใส่ในขวดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานฮีสตามีนเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซึ่งสารมาตรฐานฮีสตามีน 0.0100 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน เก็บใส่ในขวดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาเลไดอัลดีไฮด์
ซึ่งออร์โท-พทาเลไดอัลดีไฮด์ 0.0500 กรัม ละลายด้วยเมทานอล 2.0 มิลลิลิตร เติมน้ำ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 40 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.04 M (pH 9.5) เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตอนที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ศึกษาความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) ที่เหมาะสมในการตรวจวัดทอรีนและฮีสตามีนโดยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์

- 1.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานทอรีน ฮีสตามีน และสารละลายผสมทอรีน และฮีสตามีนที่มีความเข้มข้นละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
- 1.1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานทอรีน ฮีสตามีน และสารละลายผสมทอรีน และฮีสตามีน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง เติมน้ำปราศจากไอออนออร์โท-พทาเลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้สารละลายเข้ากันด้วยเครื่องเขย่า vortex เป็นเวลา 10 วินาที
- 1.1.3 นำสารอนุพันธ์ที่เตรียมได้สแกนหาความยาวคลื่นของการกระตุ้น และความยาวคลื่นของการเปล่งแสงด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ บันทึกค่าที่ได้
- 1.1.4 เลือกความยาวคลื่นของการกระตุ้น และความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่เหมาะสมในการตรวจวัดทอรีน ฮีสตามีน และสารละลายผสมทอรีน และฮีสตามีน

1.2 ศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.2.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐานออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันด้วยเครื่องเขย่า Vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ทำการศึกษาสภาวะโดยระบบของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Pappa-Louisi และคณะ (Pappa-Louisi; et al. 2008: 1434-1447) มีดังนี้

- คอลัมน์ C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)
- ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ :

อะซิโตนไตริล

- อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาตรต่อหนึ่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ 20 ไมโครลิตร
- ตรวจวัดสัญญาณโดยใช้ฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น λ_{ex}

และ λ_{em} จากข้อ 1.1

1.2.2 ปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ : อะซิโตนไตริลในช่วง 65:35 ถึง 75:25 โดยปริมาตร

1.2.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.3 ศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.3.1 ทำการทดลองซ้ำ โดยใช้สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ได้จากข้อ 1.2

1.3.2 ปรับอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วง 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที จนถึง 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

1.3.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.4 ศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของภูมิภาคเคลื่อนที่

1.4.1 ทำการทดลองซ้ำ โดยใช้สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามข้อ 1.3

1.4.2 เปลี่ยนค่า pH ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้อยู่ในช่วง 4.6-5.8

1.4.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างกราฟมาตรฐาน และวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีน

1.5 ศึกษาผลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฮิสเตอีน เมธไทโอนีน ไลซีน และฮีสติดีน

1.5.1 เตรียมสารละลายผสมทอรีน ฮีสตามีน ฮิสเตอีน เมธไทโอนีน ไลซีน และฮีสติดีน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.5.2 ทำการทดลองซ้ำดังข้อ 1.5.1 แต่ทำการเติมกรดอะมิโนลงในสารสกัดตัวอย่างปลา และบันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลองเพื่อศึกษาผลรบกวนของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องต่อการวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีน

ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปลา

2.1 การศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางเคมี

โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างปลา ด้วยวิธีการเปรียบเทียบค่าร้อยละการคืนกลับ

2.1.1 ศึกษาชนิดตัวทำละลายในการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีน

โดยทำการศึกษาชนิดตัวทำละลาย ได้แก่ กรดไตรคลอโรแอซิดิก กรดเปอร์คลอริก เมทานอล และอะซิโตนไตริล

2.1.1.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 1.0000 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่าง

2.1.1.2 เติมสารละลาย 5% กรดไตรคลอโรแอซิดิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรอง และเก็บส่วนสารละลายใสมาปรับให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต

2.1.1.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง บันทึกโครมาโทแกรมแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ

2.1.1.4 ทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนสารละลายกรดเป็นกรดเปอร์คลอริก เมทานอล และอะซิโตนไตรล์

2.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม

เมื่อได้ตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.1 แล้วทำการศึกษาหาความเข้มข้นของตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% โดยมวลต่อปริมาตร

2.1.2.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม เติมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่าง

2.1.2.2 เติมสารละลาย 5% กรดไตรคลอโรแอซิดิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรอง และเก็บส่วนสารละลายใสมาปรับให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต

2.1.2.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง บันทึกโครมาโทแกรมแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ

2.1.2.4 ทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 10% และ 15% โดยมวลต่อปริมาตร

2.1.3 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสม

เมื่อได้สภาวะของตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.1 และ 2.1.2 แล้วทำการศึกษาหาปริมาตรของตัวทำละลายที่ 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร

2.1.3.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม เติมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่าง

2.1.3.2 เติมสารละลาย 10% กรดไตรคลอโรแอซิดิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรอง และเก็บส่วนสารละลายใสมาปรับให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต

2.1.3.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง บันทึกโครมาโทแกรมแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ

2.1.3.4 ทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนปริมาตรของตัวทำละลายที่ปริมาตร 20 และ 30 มิลลิลิตร

2.2 การศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางกล

ศึกษาวิธีการสกัดด้วยวิธีทางกลโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic extraction) โดยทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด 10, 15, 20 และ 30 นาที

2.2.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม เติมน้ำสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่าง

2.2.2 เติมน้ำสารละลาย 10% กรดไตรคลอโรแอซิดิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรอง และเก็บส่วนสารละลายใสมาปรับให้มีสภาพเป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต

2.2.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับบอริโท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง บันทึกโครมาโทแกรมแล้วคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ

2.2.4 ทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการสกัดเป็น 15, 20 และ 30 นาที

ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

3.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของทอรีน และฮีสตามีน ที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นกรองสารละลายด้วยไซรินจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.2 นำสารละลายที่เตรียมได้ ทำอนุพันธ์กับบอริโท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.1.3 ฉีดสารอนุพันธ์ทอรีน และฮีสตามีนทุกความเข้มข้นเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังตอนที่ 1

3.1.4 บันทึกโครมาโทแกรมและค่าพื้นที่ใต้พีค เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐานทอรีน และฮีสตามีน โดยสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณพื้นที่ใต้พีค (แกน Y) กับค่าความเข้มข้นของทอรีน และฮีสตามีน (แกน X)

3.2 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ)

3.2.1 นำสารละลายมาตรฐานทอรีน และฮีสตามีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรทำอนุพันธ์กับบอริโท-พทาลไดอัลดีไฮด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และฉีดสารอนุพันธ์ทอรีน และฮีสตามีนเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.2.2 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 3.2.1 แต่ลดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทอรีนและอีสเตامين จนกระทั่งสัญญาณที่วัดได้มีความสูงเป็น 3 เท่าและ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของภูมิภาคเคลื่อนที่ โดยจะได้ความเข้มข้นของค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ

3.3 การหาค่าร้อยละการคืนกลับ

3.3.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่าง 1.0000 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และอีสเตامين ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่าง

3.3.2 เติมสารละลาย 10% กรดไตรคลอโรแอซิดิก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองสารสกัด เก็บส่วนสารละลายใสมาปรับให้มีสถานะเป็นกลางด้วยโซเดียมคาร์บอเนต

3.3.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.3.4 บันทึกโครมาโทแกรม และคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับดังสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{((C_{\text{in sample}} + C_{\text{added}}) - C_{\text{in sample}})}{C_{\text{added}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

เมื่อ $C_{\text{in sample}}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์
 C_{added} คือ ความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่าง

3.4 ความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์

3.4.1 ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision)

3.4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีนและอีสเตامينที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.1.2 นำสารละลายมาตรฐานผสมที่แต่ละความเข้มข้น กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ซ้ำ

3.4.1.3 บันทึกโครมาโทแกรม และคำนวณค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation; %RSD) ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีค

3.4.2 ความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision)

3.4.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมทอรีนและอีสเตامينที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4.2.2 นำสารละลายมาตรฐานผสมที่แต่ละความเข้มข้น กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 5 วัน

3.4.2.3 บันทึกโครมาโทแกรม และคำนวณค่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีค

ตอนที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา ได้แก่ ปลาโอ ปลาหู ปลาทับทิม และปลาช่อน ที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างจากตลาดสด ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ และใช้สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามที่ได้จากตอนที่ 1

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

- 4.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม
- 4.2 สกัดตัวอย่างปลาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากตอนที่ 2
- 4.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- 4.4 บันทึกโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีน
- 4.5 ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

ตอนที่ 5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

5.1 ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษา

5.1.1 ผลในการเก็บปลาที่อุณหภูมิห้อง

ทำโดยนำตัวอย่างปลาสดใส่ภาชนะวางตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง แล้วทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณดังนี้

- 5.1.1.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม
- 5.1.1.2 สกัดตัวอย่างปลาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากตอนที่ 2
- 5.1.1.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงจ์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- 5.1.1.4 บันทึกโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีน
- 5.1.1.5 ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

5.1.2 ผลในการเก็บรักษาปลาในที่เย็น

ทำโดยนำตัวอย่างปลาสดแช่เย็นในห้องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน แล้วทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณดังนี้

5.1.2.1 สับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม

5.1.2.2 สกัดตัวอย่างปลาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากตอนที่ 2

5.1.2.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5.1.2.4 บันทึกโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีน

5.1.2.5 ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

5.2 ศึกษาปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหาร

ทำโดยนำตัวอย่างปลาสดมาผ่านปรุงอาหารด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การต้ม นึ่ง และทอด แล้วทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณดังนี้

5.2.1 ทำการต้มปลา และสับตัวอย่างเนื้อปลาให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม

5.2.2 สกัดตัวอย่างปลาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากตอนที่ 2

5.2.3 นำสารสกัดที่เตรียมได้กรองด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์ในลอนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วทำอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5.2.4 บันทึกโครมาโทแกรมและวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีน

5.2.5 ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ

5.2.6 ทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนเป็นการปรุงอาหารด้วยวิธีนึ่ง และทอด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเสนอผลการทดลองดังนี้

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
2. ผลการศึกษาวិธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม
3. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์
4. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา ได้แก่ ปลาทับทิม ปลาช่อน ปลาหู และปลาโอ
5. ผลการศึกษำปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

1.1 ศึกษาความยาวคลื่นของการกระตุ้น (λ_{ex}) และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (λ_{em}) ที่เหมาะสมในการตรวจวัดทอรีนและฮีสตามีนโดยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์

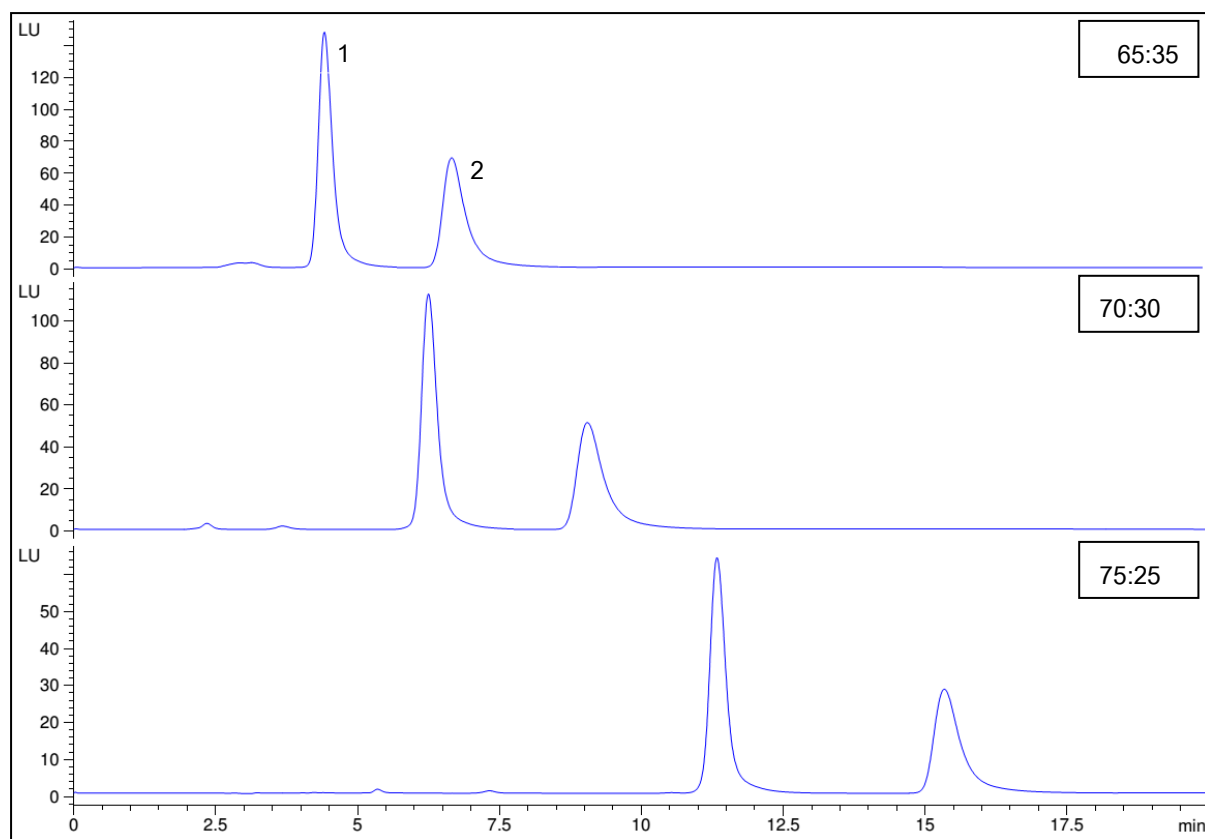
ผลการศึกษาช่วงความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่มีความเข้มแสงสูงสุดและช่วงความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่มีความเข้มแสงสูงสุดของทอรีน ฮีสตามีน และสารละลายผสมทอรีนและฮีสตามีนด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี โดยใช้ออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์เตรียมเป็นสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานของทอรีน ฮีสตามีน สารละลายผสมทอรีน และฮีสตามีน พบว่า ความยาวคลื่นของสารอนุพันธ์ของสารมาตรฐานผสมของทอรีน และฮีสตามีน ให้ความเข้มแสงของการเปล่งแสงสูงสุด โดยมีความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 451 นาโนเมตร ความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 333 นาโนเมตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 451 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 333 นาโนเมตร ในการตรวจวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีน

1.2 ศึกษาหาอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

การวิเคราะห์สารหลายชนิดพร้อมกันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง องค์ประกอบของภูมิภาคเคลื่อนที่ และภูมิภาคคงที่เป็นปัจจัยสำคัญ ซึ่งจะส่งผลต่อลักษณะพีคของสารที่ทำการวิเคราะห์ เช่น รูปร่างของพีค การแยกของพีค และเวลาที่ใช้ในการแยก ดังนั้นการศึกษหา

อัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไตรล์ (Pappa-Louisi; et al. 2008: 1434-1447) ในช่วงร้อยละ 65 ต่อ 35 ถึง 75 ต่อ 25 โดยปริมาตร โดยใช้สารมาตรฐานผสมทอรีนและฮีสตามีนความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมเป็นสารอนุพันธ์กับออร์โท-พทาลอัลดีไฮด์ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของอะซิโตนไตรล์จะส่งผลให้สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว แต่การที่สารแยกออกจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว แสดงว่าสารดังกล่าวเกิดอันตรกิริยากับภูมิภาคคงที่ได้น้อย ทำให้สารเกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามการที่สารเกิดอันตรกิริยากับภูมิภาคคงที่มากเกินไปจะส่งผลให้สัญญาณของพีคต่ำลง และพีคมีลักษณะกว้าง (Band broadening) ดังภาพประกอบ 6 นอกจากนี้การใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์มากเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลดลง จนเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในคอลัมน์และเกิดความเสียหายต่อคอลัมน์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไตรล์ในอัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร ซึ่งสามารถแยกทอรีนและฮีสตามีนออกจากคอลัมน์โดยให้ค่าระยะเวลารีเทนชันเท่ากับ 4.340 และ 6.406 นาที ตามลำดับ

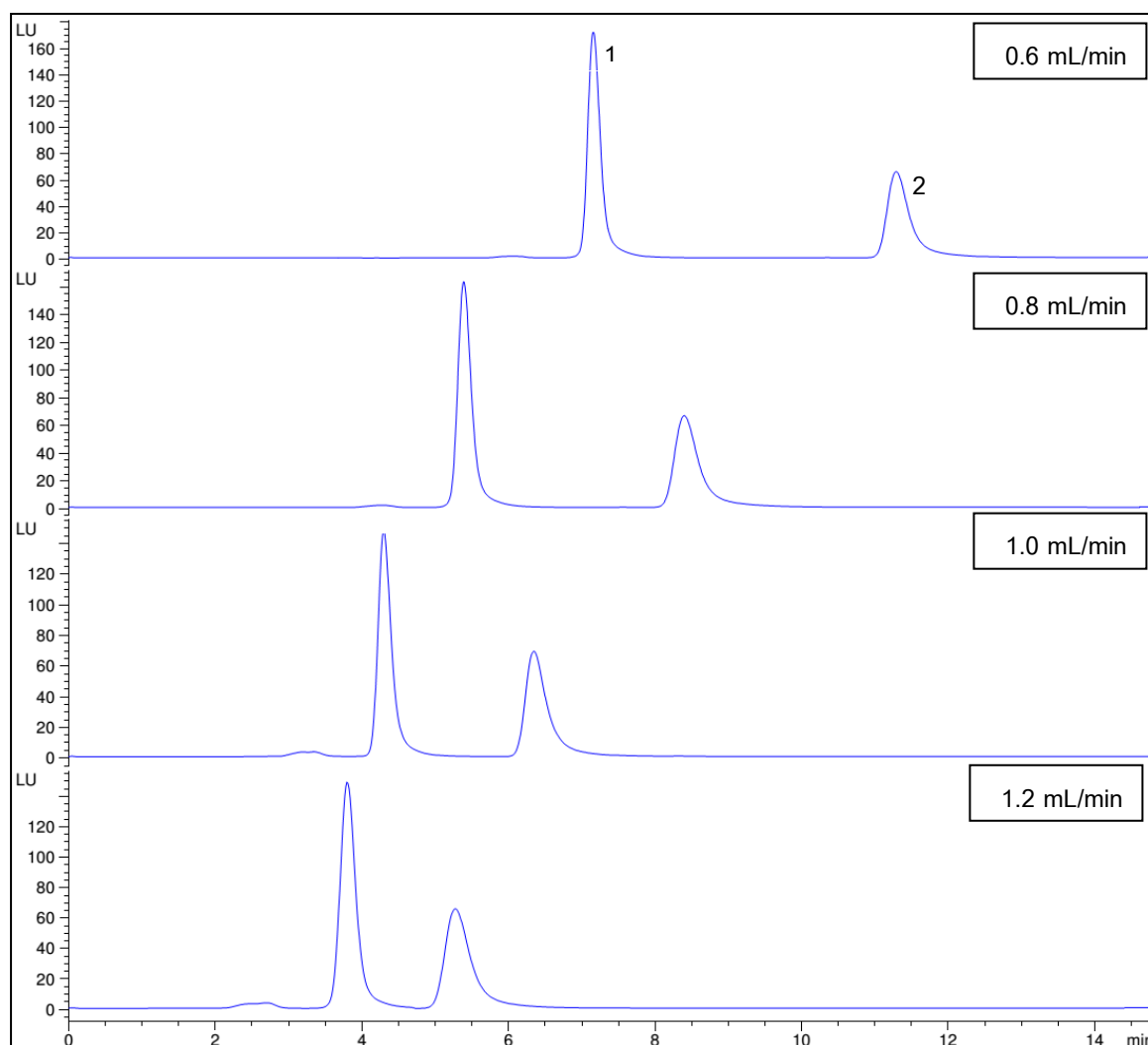


ภาพประกอบ 6 โครมาโทแกรมผลการศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
หมายเหตุ 1 แทน พีค ทอรีน 2 แทน พีค ฮีสตามีน

1.3 ศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ส่งผลต่อการเกิดอันตรกิริยาของสารทั้งทอรีนและฮีสตามีนต่อวัฏภาคคงที่ โดยถ้าใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เร็วเกินไปจะทำให้สารเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อย และเกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ถึงแม้ว่าการควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ช้าเกินไปทำให้สารเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่ได้ดีขึ้น และเกิดการแยกที่สมบูรณ์ แต่จะใช้เวลาในการแยกที่นานมากขึ้น พีคจึงมีลักษณะกว้าง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการแยกสารทอรีนและฮีสตามีน โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไตริล อัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร ในช่วง 0.6 ถึง 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

ผลการศึกษาอัตราการไหลที่เหมาะสม ดังแสดงในภาพประกอบ 7 และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (มิลลิลิตรต่อนาที) กับระยะเวลาการรีเทนชัน (นาที) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (มิลลิลิตรต่อนาที) กับพื้นที่ใต้พีค ดังภาพประกอบ 8

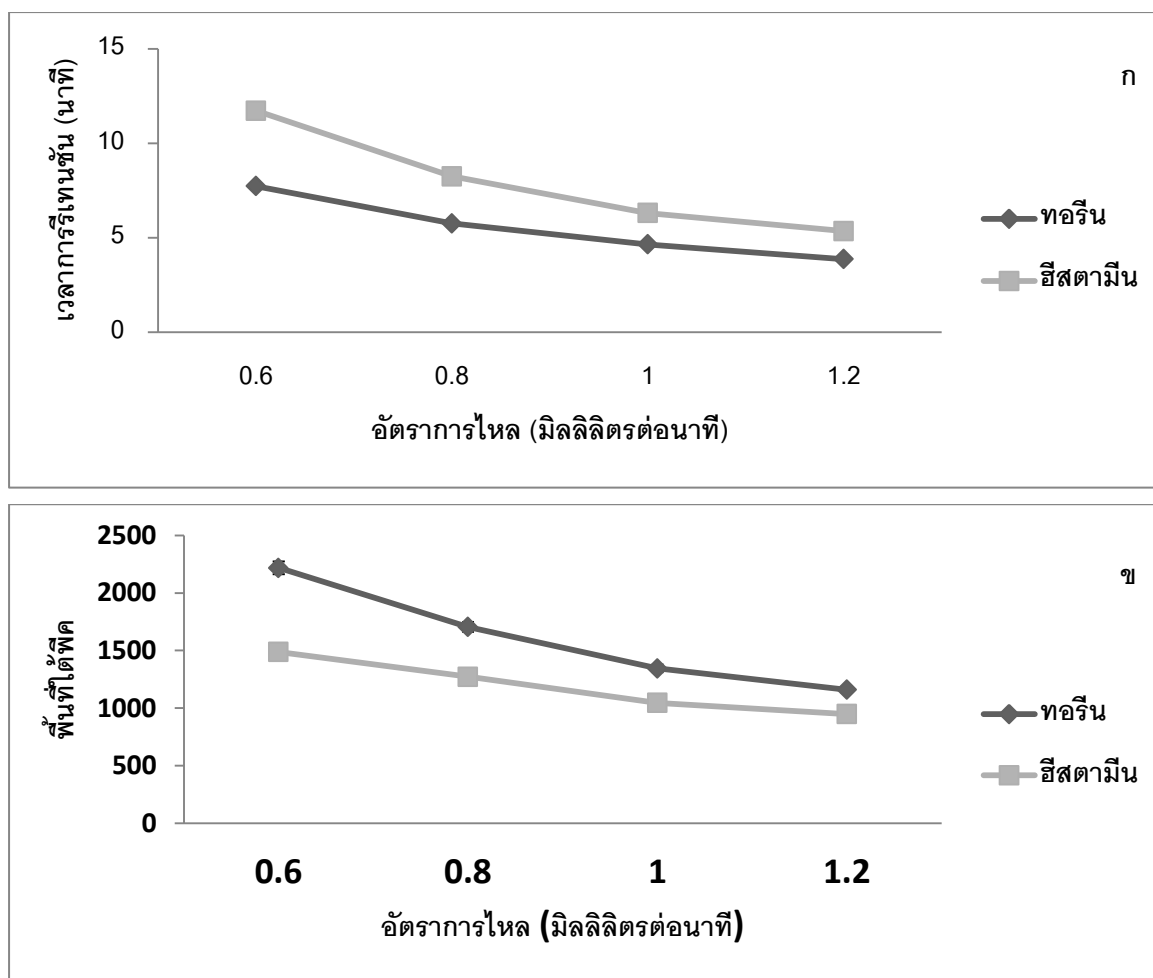


ภาพประกอบ 7 โครมาโทแกรมผลการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ pH 4.8 ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไตรล์อัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35

โดยปริมาตร

หมายเหตุ 1 แทน พีค ทอรีน 2 แทน พีค ฮีสตามีน



ภาพประกอบ 8 ผลของอัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่

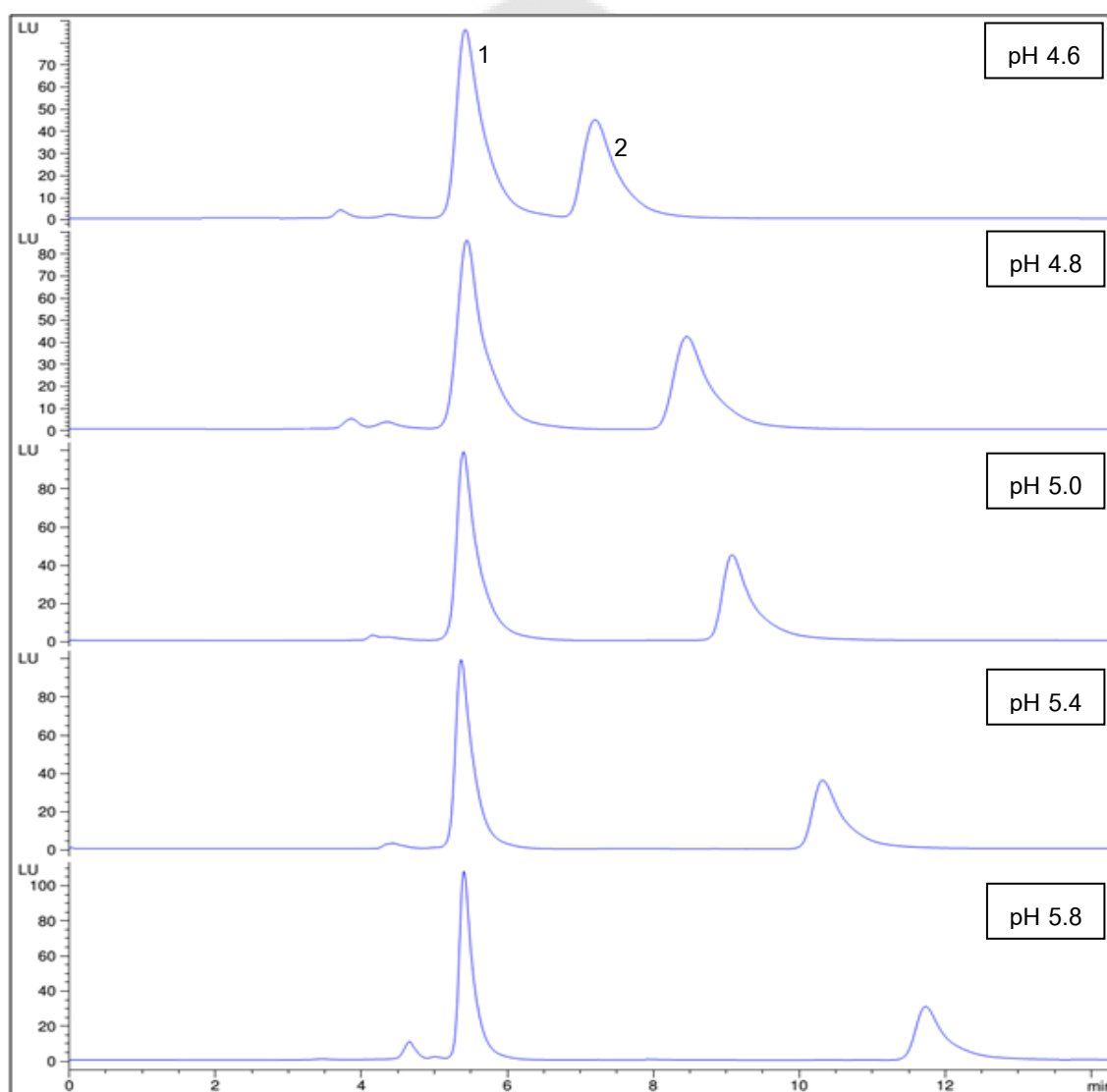
ก กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่กับเวลาการรีเทนชัน

ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่กับพื้นที่ได้พีด

จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้อัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่มากจะส่งผลให้สามารถแยกสารทอริ่นและอีสดามีนได้ในเวลาเร็ว แต่จะทำให้สารเกิดอันตรกิริยากับวัสดุเคลือบที่ได้น้อยเกิดการแยกที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้สัญญาณของพีคมีความไม่สมมาตร และทำให้แรงดันภายในระบบสูงขึ้น ส่งผลต่อคอลัมน์และปั๊ม สำหรับการใช้อัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่น้อยสารจะเกิดอันตรกิริยากับวัสดุเคลือบที่ได้มากขึ้น ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ทำให้สัญญาณของพีคมีลักษณะกว้าง จึงส่งผลให้พื้นที่ใต้พีคของสารอนุพันธ์ทอริ่น และอีสดามีนมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการใช้ของวัสดุเคลือบที่เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาทีก

1.4 ศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

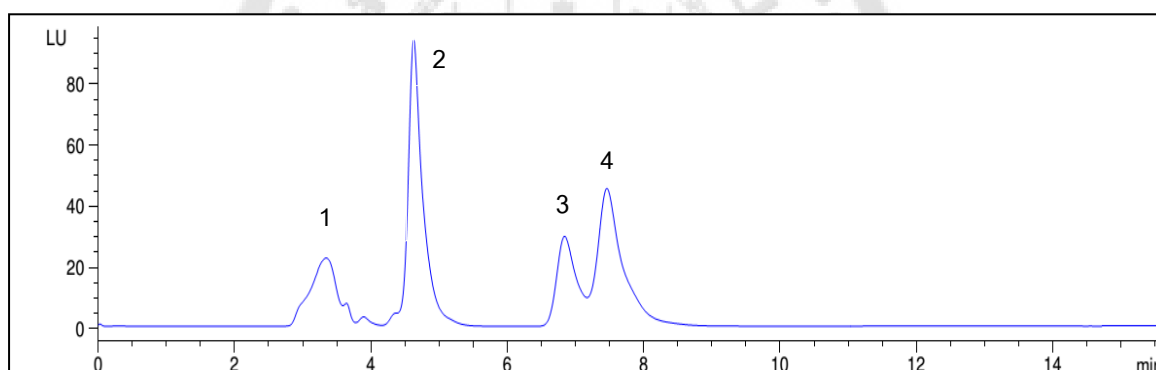
เนื่องจากคุณสมบัติทางโครงสร้างของทอรีนและฮีสตามีนนั้นสามารถแตกตัวได้ในสารละลายเมื่อค่า pH ของสารละลายมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจะส่งผลต่อความเสถียรของอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนกับออร์โท-พทาลัลดีไฮด์ และส่งผลต่อการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนกับวัฏภาคคงที่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาหา pH ที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมความเสถียรของสารอนุพันธ์ทอรีนและฮีสตามีน โดยทำการศึกษาในช่วง pH 4.8 ถึง 5.8 ผลของการศึกษาค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่ แสดงดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 โครมาโทแกรมผลการศึกษา pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่

หมายเหตุ 1 แทน พีคทอรีน 2 แทน พีคฮีสตามีน

จากการทดลอง พบว่าค่า pH ของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อระยะเวลาที่ทนชั้นของสารอนุพันธ์ฮีสตามีน เมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH สูงจะส่งผลให้ระยะเวลาที่ทนชั้นของสารอนุพันธ์ฮีสตามีนใช้เวลานาน ส่งผลให้สัญญาณมีความสูงของพีคต่ำ และกว้างขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ต่ำ จะทำให้สารอนุพันธ์ฮีสตามีนเกิดการรับโปรตอน หรือเกิดการโปรโตเนต (protonate) ที่หมู่เอมีนจึงส่งผลให้สารอนุพันธ์ฮีสตามีนเกิดอันตรกิริยากับวัฏภาคคงที่ได้ลดลง ทำให้สารอนุพันธ์ฮีสตามีนถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น และการปรับให้ค่า pH ต่ำยังส่งผลให้สัญญาณพีคของสารอนุพันธ์ทอรีนมีลักษณะกว้างขึ้น นอกจากนี้การใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 5.0 ส่งผลให้กรดอะมิโนเมไทโอนีนเกิดการรบกวนการวิเคราะห์ต่อฮีสตามีน ดังภาพประกอบ 10 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 สำหรับความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในงานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงเลือกใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ก็สามารถควบคุม pH ของระบบที่วิเคราะห์ได้ นอกจากนี้การใช้ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไปจะส่งผลให้เกิดการตกตะกอนเกลือของบัฟเฟอร์ในคอลัมน์อีกด้วย



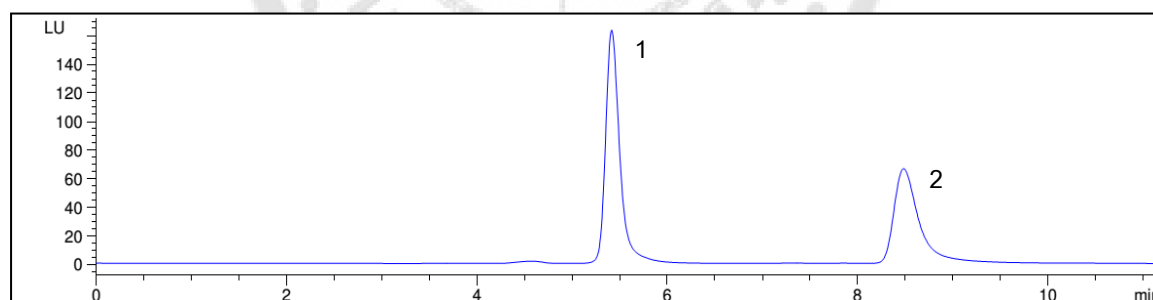
ภาพประกอบ 10 โครมาโทแกรมผลการรบกวนของกรดอะมิโนเมไทโอนีนต่อฮีสตามีนที่ pH 5.0
หมายเหตุ 1 แทน พีคฮีสติดีน 2 แทน พีคทอรีน 3 แทน พีคฮีสตามีน 4 แทน เมไทโอนีน

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แสดงดังตาราง 6

ตาราง 6 ผลสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
ระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่อ อะซิโตนไนโตรล์
อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่	อัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร
อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
ความยาวคลื่นตรวจวัด	ความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 451 นาโนเมตร ความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 333 นาโนเมตร

ซึ่งจะเห็นได้ว่าระบบสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนได้พร้อมกันภายในเวลา 10 นาที โดยให้ค่าระยะเวลาริเทนชันเท่ากับ 5.415 และ 8.483 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพประกอบ 11

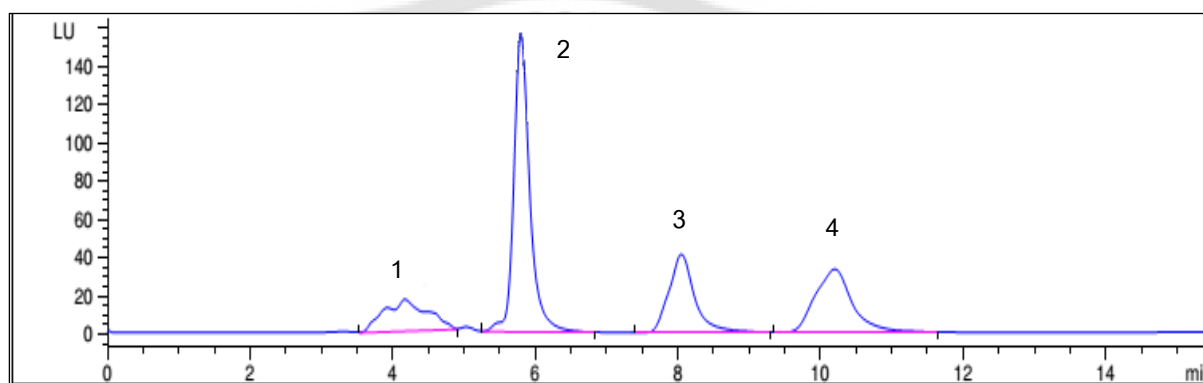


ภาพประกอบ 11 โครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกัน

หมายเหตุ 1 แทน พีคทอรีน 2 แทน พีคฮีสตามีน

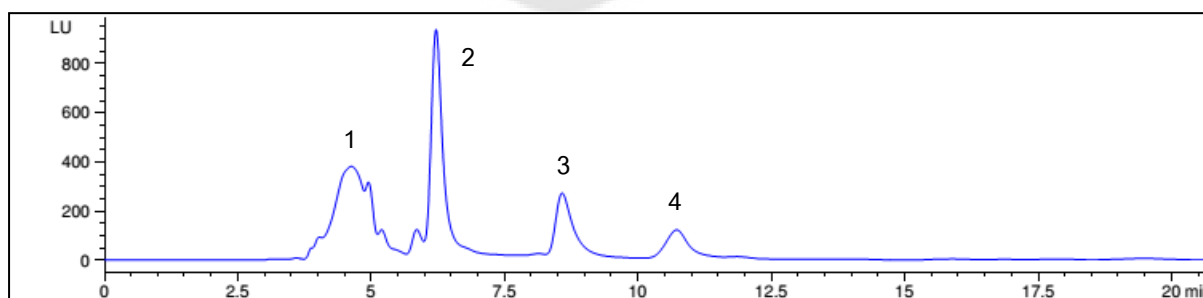
1.5 ศึกษาผลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฮิสเตอีน เมทไทโอนีน ไลซีน และฮีสติดีน

ในรายวิจยนี้ทำการตรวจวิเคราะห์สารทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา ซึ่งปลาเป็นแหล่งของโปรตีนและกรดอะมิโนจำนวนมาก โดยกรดอะมิโนที่พบมากในปลาได้แก่ ฮีสติดีน ไลซีน เมทไทโอนีน และฮิสเตอีน เป็นต้น เนื่องจากกรดอะมิโนเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสำคัญที่จะต้องทำการศึกษาผลการรบกวนของกรดอะมิโนที่อยู่ในปลา โดยทำการเติมสารรบกวนทั้ง 4 ชนิดลงในตัวอย่างแล้วทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อยืนยันผลการรบกวนของกรดอะมิโนดังกล่าว แสดงผลดังภาพประกอบ 12 และ 13



ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมทอรีนและฮีสตามีนที่เติมสารละลายผสมของสารรบกวนทั้ง 4 ชนิด

หมายเหตุ 1 แทน พีคฮีสติดีน 2 แทน พีคทอรีน 3 แทน พีคฮีสตามีน 4 แทน เมทไทโอนีน



ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมของตัวอย่างปลาโอที่เติมสารละลายผสมของทอรีน ฮีสตามีน และสารรบกวนทั้ง 4 ชนิด

หมายเหตุ 1 แทน พีคฮีสติดีน 2 แทน พีคทอรีน 3 แทน พีคฮีสตามีน 4 แทน เมทไทโอนีน

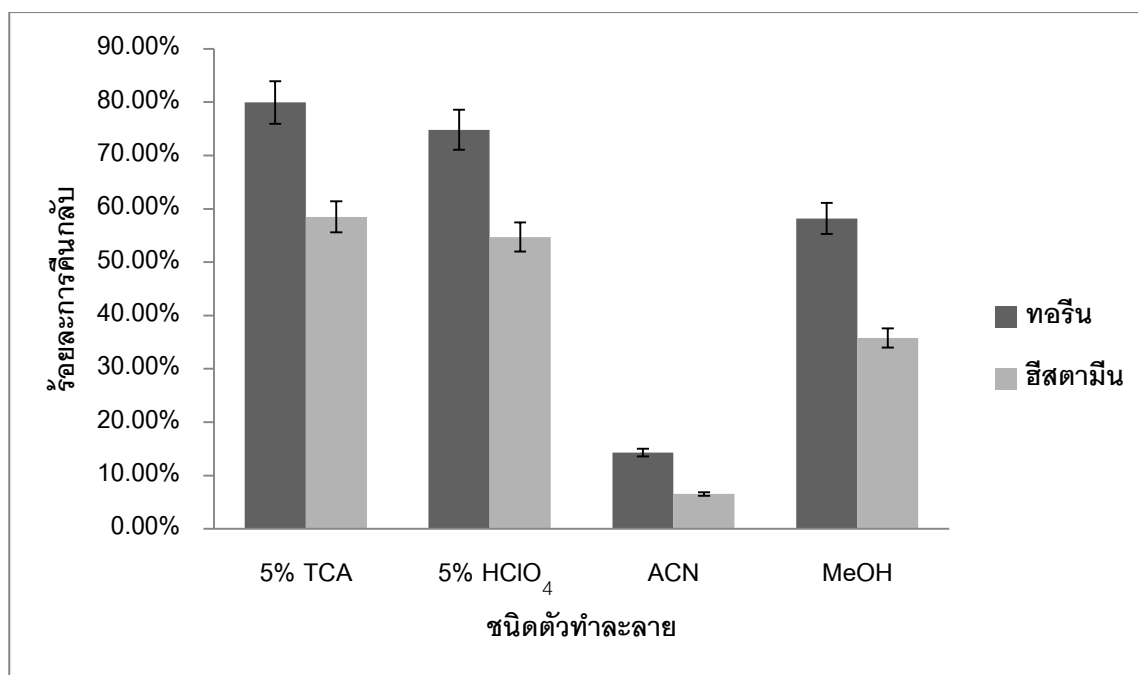
จากผลการทดลองพบว่ากรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา โดยกรดอะมิโนซิสเตอีน และไลซีนไม่ให้สัญญาณบนโครมาโทแกรม ส่วนกรดอะมิโนฮีสติดีน และเมไทโอนีนให้สัญญาณบนโครมาโทแกรมที่ระยะเวลาที่เกินขั้นเท่ากับ 4.629 และ 10.725 นาที ตามลำดับ ซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อผลการแยกของทอรีนและฮีสตามีน ดังนั้นพบว่าสารทั้ง 4 ชนิดไม่ส่งผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีน

ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปลา

2.1 การศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนด้วยวิธีทางเคมี

2.1.1 ศึกษาชนิดตัวทำละลายในการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีน

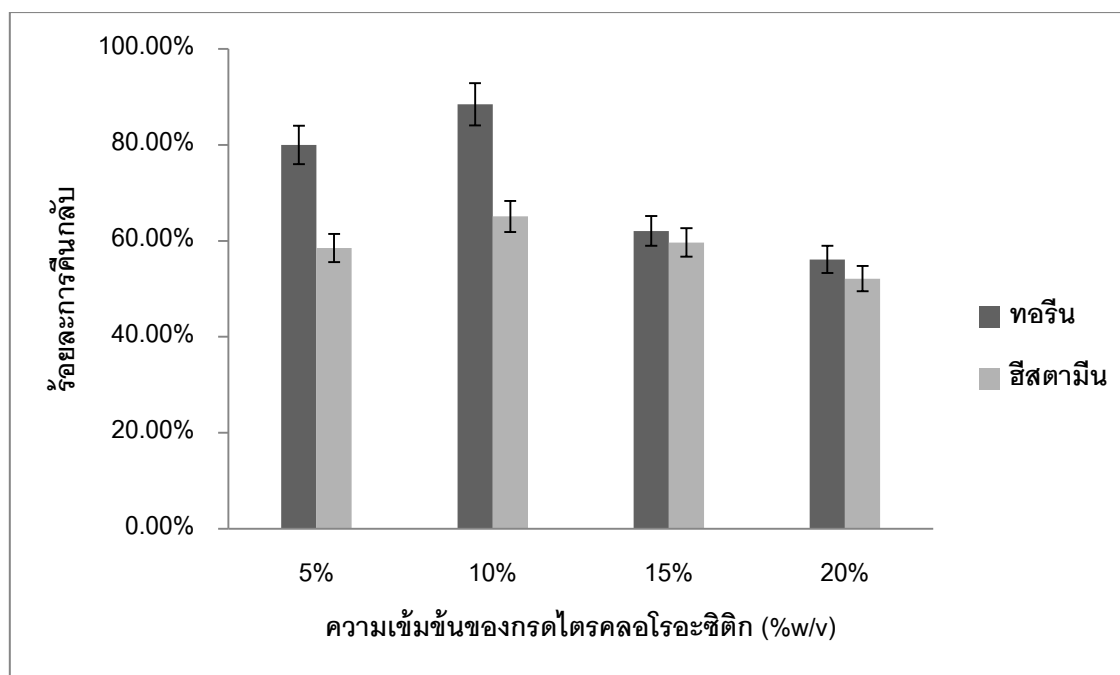
ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารที่เราสนใจวิเคราะห์ในตัวอย่าง เนื่องจากเป็นตัวแปรสำคัญที่จะส่งผลต่อปริมาณสารที่เราสนใจวิเคราะห์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดกรดอะมิโนทอรีนและฮีสตามีนออกจากตัวอย่างปลา โดยเลือกพิจารณาตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพช่วยในการตกตะกอนโปรตีน ได้แก่ กรดไตรคลอโรแอซิดิก กรดเปอร์คลอริก เมทานอล และ อะซิโตนไตริล โดยในสถานะที่เป็นกรด โปรตีนบางชนิดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุบนโครงสร้าง ทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงทำให้เกิดการจับตัวกันของโปรตีนแล้วตกตะกอนในสารละลายกรด (นิธิยา รัตนานนท์. 2557: 254) สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์จะไปลดความสามารถในการทำน้ำที่เป็นตัวทำละลายของน้ำ ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลงจึงเกิดการตกตะกอนของโปรตีน ผลการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา แสดงดังภาพประกอบ 14 พบว่ากรดไตรคลอโรแอซิดิกสามารถสกัดทอรีนและฮีสตามีนได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสารละลายทอรีนและฮีสตามีนเท่ากับร้อยละ 79.94 และ 58.49 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 14 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม

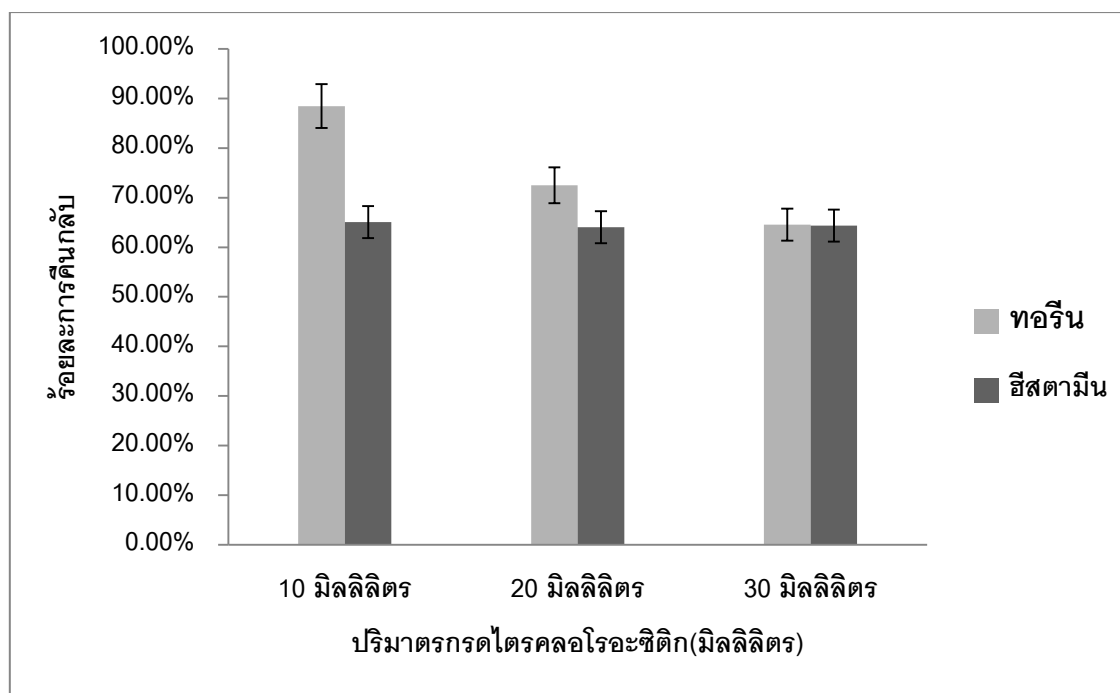
การศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของกรดไตรคลอโรแอซิดิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 โดยมวลต่อปริมาตรตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดไตรคลอโรแอซิดิกจะทำให้สามารถสกัดปริมาณทอริ่นและอีโอสตามีนได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดไตรคลอโรแอซิดิกมากกว่าร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ความเข้มข้นของสารละลายจะถึงจุดอิ่มตัวทำให้ความสามารถในการละลายของทอริ่นและอีโอสตามีนในสารละลายกรดลดลง ดังนั้นความเข้มข้นของกรดไตรคลอโรแอซิดิกที่เหมาะสมคือร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งสามารถสกัดทอริ่นและอีโอสตามีนให้ค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับร้อยละ 88.44 และ 65.07 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 ผลการศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลาย

2.1.3 ศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสม

การศึกษาปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดทอริ่นและอีสตามีน โดยทำการศึกษากรดไตรคลอโรอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ในปริมาตร 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาตรของกรดไตรคลอโรอะซิติกจะส่งผลให้ปริมาณการสกัดทอริ่นลดลง ส่วนอีสตามีนมีปริมาณคงที่ ดังนั้นปริมาตรกรดไตรคลอโรอะซิติกที่เหมาะสม คือ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถสกัดทอริ่นและอีสตามีนให้ค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับร้อยละ 88.44 และ 65.07 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 16

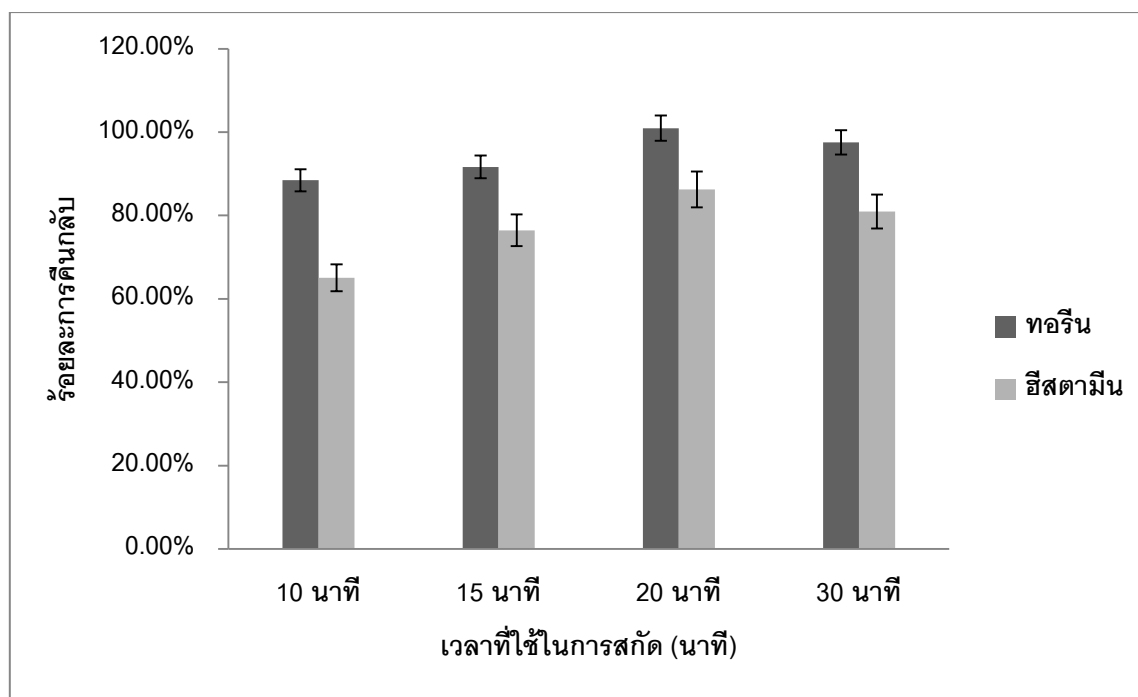


ภาพประกอบ 16 ผลการศึกษาปริมาณของตัวทำละลายที่เหมาะสม

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดสารทอรีนและอีสเตอรินด้วยวิธีทางเคมี พบว่า กรดไตรคลอโรอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีความเหมาะสมที่นำไปใช้ในการสกัดปริมาณทอรีนและอีสเตอรินออกจากตัวอย่างปลา

2.2 การศึกษาหาวิธีการสกัดสารทอรีนและอีสเตอรินด้วยวิธีทางกล

การศึกษาวิธีการสกัดด้วยวิธีทางกลโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic extraction) โดยทำการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัด 10, 15, 20 และ 30 นาที พบว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจะส่งผลให้สามารถสกัดทอรีนและอีสเตอรินออกจากตัวอย่างได้มากขึ้น โดยที่เวลา 20 นาทีสามารถสกัดปริมาณทอรีนและอีสเตอรินได้สูงสุด แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดมากกว่า 20 นาที พบว่าปริมาณทอรีนและอีสเตอรินที่สกัดได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการสกัดทอรีนและอีสเตอรินออกจากตัวอย่างปลาที่ 20 นาที ซึ่งสามารถสกัดทอรีนและอีสเตอรินให้ค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับร้อยละ 100.95 และ 86.22 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ



ภาพประกอบ 17 ผลการศึกษาของเวลาที่ใช้ในการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการสกัดทอริน และฮีสตามีนด้วยวิธีการสกัดทางเคมีร่วมกับวิธีทางกลได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

วิธีการสกัดด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ตัวทำละลายกรดไตรคลอโรแอซิดิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีการสกัดทางกลด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เวลาที่ใช้ในการสกัด 20 นาที

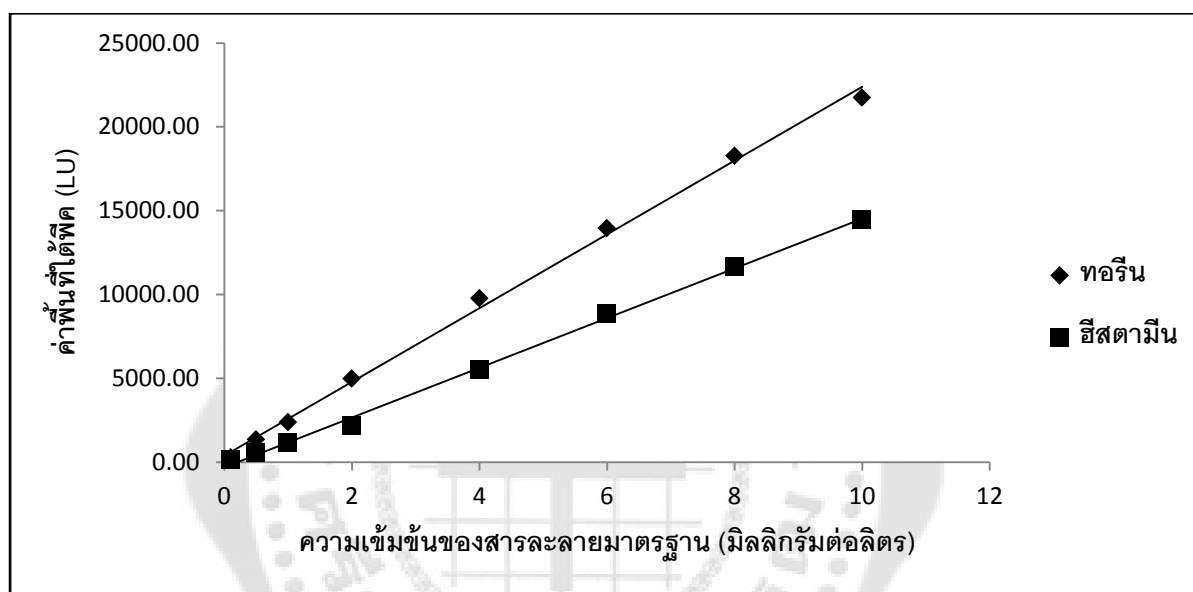
ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์

3.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอริน และฮีสตามีนโดยสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทอริน และฮีสตามีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) กับพื้นที่ใต้พีค (LU) พบว่ากราฟมาตรฐานของทอริน และฮีสตามีนมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.0005 ถึง 10 และ 0.03 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของทอริน และฮีสตามีน เท่ากับ 0.9975 และ 0.9980 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 18 แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ (EURACHEM Guide. 1998)

ตาราง 7 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์

สารละลายมาตรฐาน	ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
ทอรีน	0.0005 - 10	$y = 2199.7x + 388.68$	0.9975
ฮีสตามีน	0.03 - 10	$y = 1482.3x - 299.65$	0.9980



ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานทอรีน และฮีสตามีนกับพื้นที่ใต้พีค

3.2 การหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ โดยเลือกความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทอรีน และฮีสตามีน ที่มีสัดส่วนสัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวนของภูมิภาคเคลื่อนที่ (3 S/N) และ 10 เท่าของสัญญาณรบกวนของภูมิภาคเคลื่อนที่ (10 S/N) ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีค่า LOD และ LOQ ของทอรีน เท่ากับ 0.0001 และ 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับฮีสตามีน มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.3 การหาค่าร้อยละการคืนกลับ

จากการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับของสารทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานผสมของทอรีนและฮีสตามีนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรลงในตัวอย่างปลา แล้วนำมาสกัดด้วยวิธีสกัดที่ได้จากตอนที่ 2 และวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า วิธีวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 80.56-98.45 และ 75.83-83.57 ตามลำดับ ดังตาราง 8 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อยู่ในช่วงร้อยละ 75-120 แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้อง (EURACHEM Guide. 1998)

ตาราง 8 ค่าร้อยละการคืนกลับของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

ตัวอย่างปลา	ค่าร้อยละการคืนกลับ	
	ทอรีน	ฮีสตามีน
ปลา A	98.19	82.98
ปลา B	80.56	75.83
ปลา C	98.45	83.57
ปลา D	93.92	76.00

3.4 ความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์ เพื่อประเมินความเที่ยงของวิธีตรวจวิเคราะห์ โดยทำการศึกษาความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day precision) โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมทอรีน และฮีสตามีนที่ความเข้มข้น 0.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์แสดงดังตาราง 9 พบว่า ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันของทอรีนและฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0.14-1.35 และ 0.16-0.63 ตามลำดับ และ ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวันของทอรีน และฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0.18-0.71 และ 0.20-1.18 ตามลำดับ โดยค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการศึกษามีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงที่ดี (EURACHEM Guide. 1998)

ตาราง 9 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีการตรวจวิเคราะห์

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	%RSD ในวันเดียวกัน ^a		%RSD ระหว่างวัน ^a	
		พื้นที่ใต้พีค		พื้นที่ใต้พีค	
ทอรีน	0.50	1.35		0.71	
	5.00	0.22		0.19	
	10.00	0.14		0.18	
ฮีสตามีน	0.50	0.63		1.18	
	5.00	0.25		0.20	
	10.00	0.16		0.51	

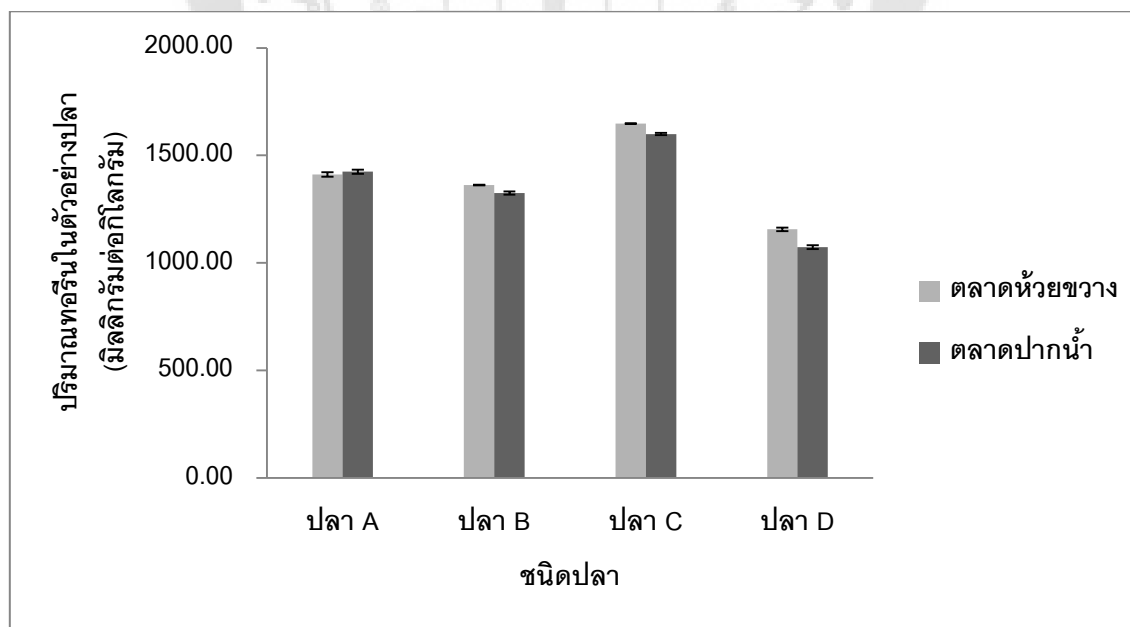
^a ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (n=5)

ตอนที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสด

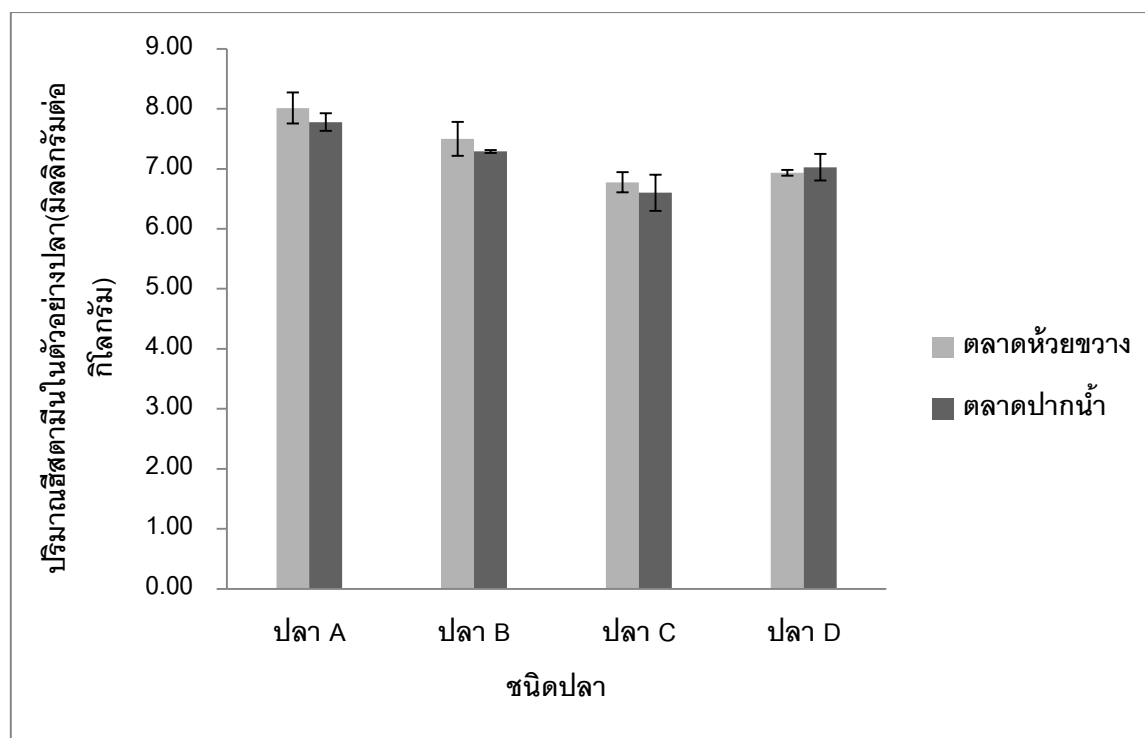
ผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา ได้ทำการสุ่มตัวอย่างปลาจากตลาดสด ได้แก่ ปลาโอ A ปลาทุ B ปลาหีบ C และปลาช่อน D โดยใช้กรดไตรคลอโรแอซิกในการสกัด และทำอนุพันธ์กับออร์โท-ฟทาลไดอัลดีไฮด์ก่อนตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าในตัวอย่างปลามีปริมาณทอรีนอยู่ในช่วง 1074.05 ± 8.91 ถึง 1648.45 ± 1.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณฮีสตามีนในช่วง 6.60 ± 0.30 ถึง 8.01 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตาราง 10 และภาพประกอบ 19 และ 20

ตาราง 10 ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสด

ตัวอย่างปลา	ปริมาณทอรีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม $\pm$ SD)	ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม $\pm$ SD)
ห้วยขวาง		
ปลา A1	1411.17 $\pm$ 9.90	8.01 $\pm$ 0.26
ปลา B1	1362.46 $\pm$ 1.81	7.50 $\pm$ 0.28
ปลา C1	1648.45 $\pm$ 1.33	6.78 $\pm$ 0.17
ปลา D1	1156.32 $\pm$ 8.17	6.93 $\pm$ 0.05
ปากน้ำ		
ปลา A2	1424.55 $\pm$ 9.72	7.78 $\pm$ 0.15
ปลา B2	1324.85 $\pm$ 7.91	7.29 $\pm$ 0.03
ปลา C2	1599.42 $\pm$ 5.50	6.60 $\pm$ 0.30
ปลา D2	1074.05 $\pm$ 8.91	7.03 $\pm$ 0.22



ภาพประกอบ 19 ปริมาณทอรีนที่ตรวจพบในปลาสด



ภาพประกอบ 20 ปริมาณฮีสตามีนที่ตรวจพบในปลาสด

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสดที่นิยมบริโภคในประเทศไทยแต่ละชนิด พบว่าในปลาทั้งหมั้มีปริมาณทอรีนสูงที่สุดอยู่ในช่วง 1599.42 ± 5.50 ถึง 1648.45 ± 1.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ทราบว่านอกจากทอรีนจะสามารถพบได้ในปลาทะเลซึ่งเป็นแหล่งของทอรีนแล้วยังพบว่าในปลาน้ำจืดก็มีทอรีนสูงที่เป็นแหล่งของทอรีนเช่นกัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณทอรีนในปลาสดจากตลาด 2 ตลาด พบว่าปริมาณทอรีนในปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนในปลาน้ำจืดและปลาทะเล พบว่าในปลาโอมีปริมาณฮีสตามีนสูงที่สุดในช่วง 7.78 ± 0.15 ถึง 8.01 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่าในปลาทะเลมีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่าปลาน้ำจืด จากการรายงานของ Silva และคณะ (Silva C.; et al. 1998: 644-647) พบว่าปลาแต่ละชนิดจะมีปริมาณฮีสตามีนที่แตกต่างกัน โดยปลาทะเลในตระกูล scombroid เช่น ปลาโอ (Skipjack) มีปริมาณฮีสตามีนในเนื้อปลาสสูง จึงส่งผลให้เมื่อปลาเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กรดอะมิโนฮีสตามีนในปลาจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฮีสตามีน ดีคาร์บอกซิเลสไปเป็นฮีสตามีน ดังนั้นจึงส่งผลให้ตรวจพบปริมาณฮีสตามีนในปลาทะเลมากกว่าปลาน้ำจืด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฮีสตามีนในปลาทะเลสดจากตลาด 2 ตลาดจะพบว่าปลาทะเลที่ซื้อมาจากตลาดที่อยู่ใกล้ทะเล (ตลาดปากน้ำ) จะมีปริมาณฮีสตามีนน้อยกว่าตลาดที่อยู่ใจกลางเมือง (ตลาดห้วยขวาง) เป็นผลมาจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกระบวนการขนส่งปลาโดยจุลินทรีย์จะสร้าง

เอนไซม์ฮีสติดีนดีคาร์บอกซิเลสย่อยสลายกรดอะมิโนฮีสติดีนในเนื้อปลาไปเป็นฮีสตามีน ส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนในปลาที่ซื้อจากตลาดในเมืองมีมากกว่าตลาดที่ใกล้ทะเล นอกจากนี้ปลาน้ำจืดยังสามารถตรวจพบฮีสตามีนได้ เนื่องจากฮีสติดีนเป็นกรดอะมิโนสารตั้งต้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของฮีสตามีนที่สามารถพบได้ในปลาทุกชนิด

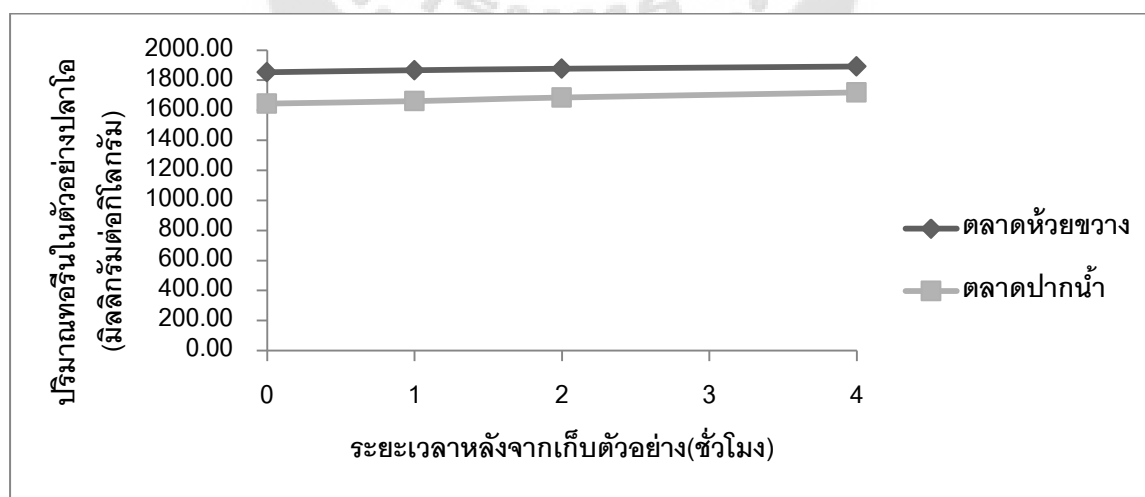
ตอนที่ 5 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

งานวิจัยนี้สนใจทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในปลาที่ซื้อจากตลาดสด เพื่อใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของปลา เนื่องจากปลาเป็นอาหารที่เสื่อมสภาพและเน่าเสียได้ง่าย โดยการเน่าเสียของปลาเกิดจากการสลายตัวของกรดอะมิโนด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา และการย่อยสลายกรดอะมิโนในตัวปลาจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการย่อยสลายกรดอะมิโนในตัวปลาจะขึ้นอยู่กับวิธีและระยะเวลาในการเก็บรักษาหลังจากที่ปลาตาย ในงานวิจัยนี้แบ่งหัวข้อในการศึกษาการเก็บรักษาปลาดังนี้

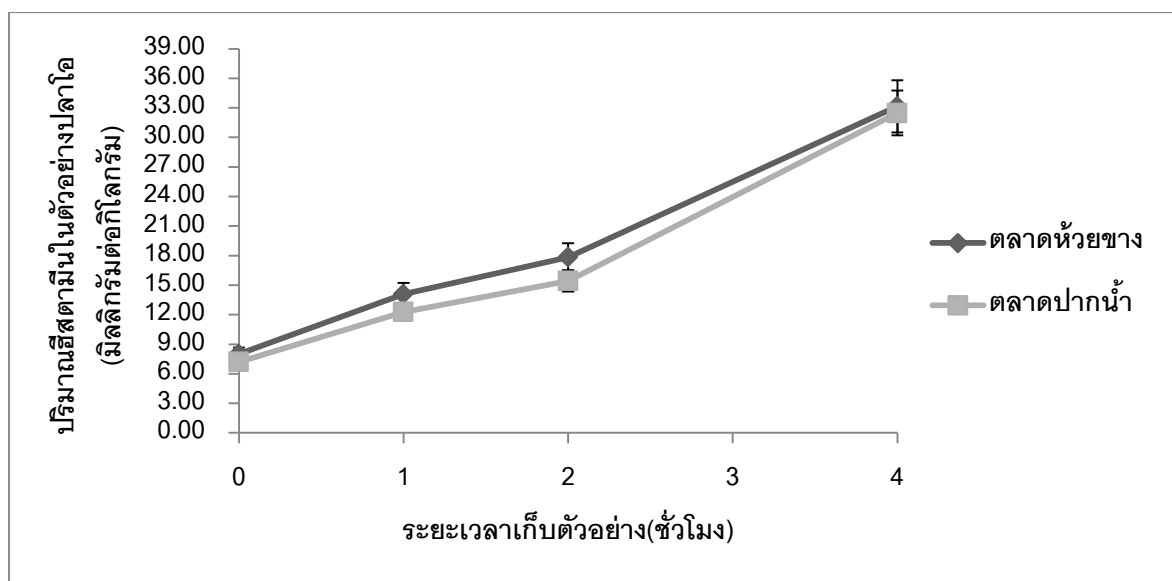
5.1 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาปลา

5.1.1 ผลในการเก็บปลาที่อุณหภูมิห้อง

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยนำปลามาวางตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 33.2 องศาเซลเซียส แล้วทำการศึกษาที่เวลา 0 1 2 และ 4 ชั่วโมง ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน แสดงดังภาพประกอบ 21 และ 22



ภาพประกอบ 21 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนในการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิห้อง

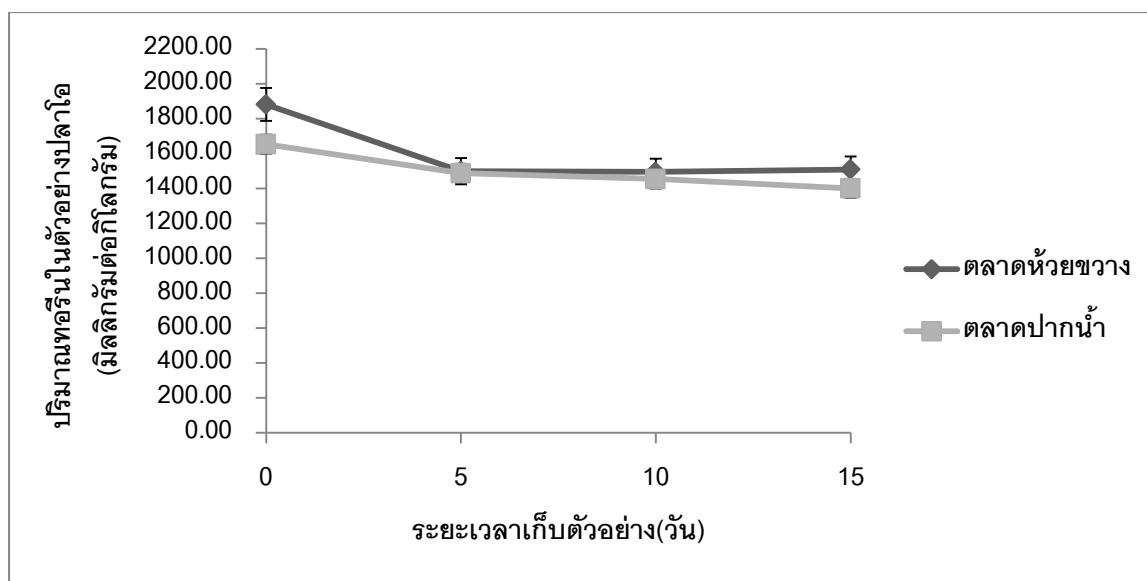


ภาพประกอบ 22 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีสตามีนในการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิห้อง

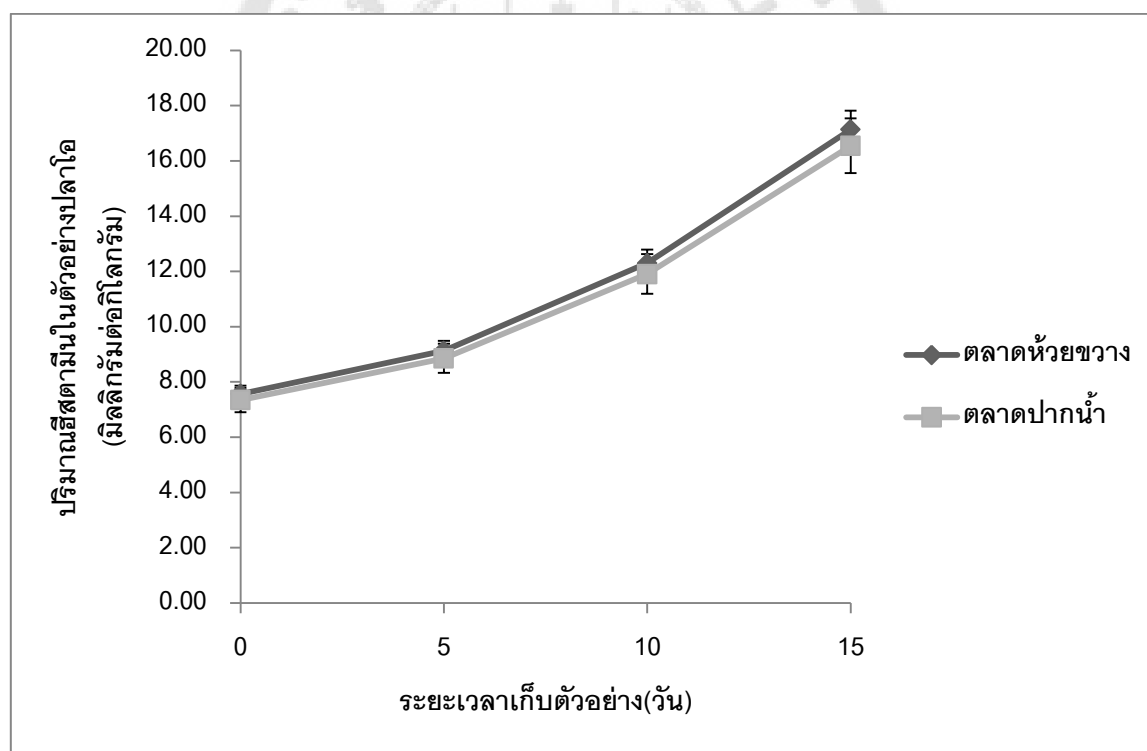
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่า การเก็บปลาไว้ที่อุณหภูมิห้องไม่ส่งผลต่อปริมาณทอรีนในตัวอย่างปลา เนื่องจากทอรีนมีความเสถียรสูงและไม่มีกระบวนการย่อยสลายทอรีนหลังจากปลาตายแล้ว สำหรับฮีสตามีน พบว่าการเก็บปลาไว้ที่อุณหภูมิห้องส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างปลาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากปริมาณฮีสตามีนสัมพันธ์กับปริมาณของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฮีสตีดินดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งส่วนใหญ่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20-30 องศาเซลเซียสจึงส่งผลให้เกิดกระบวนการย่อยสลายฮีสตีดินเป็นฮีสตามีนในตัวอย่างปลาได้อย่างรวดเร็ว

5.1.2 ผลในการเก็บรักษาปลาในที่เย็น

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนเมื่อเก็บไว้ในที่เย็น โดยนำปลามาแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาปลาดังนี้ 0 5 10 และ 15 วัน ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนแสดงดังภาพประกอบ 23 และ 24



ภาพประกอบ 23 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในการเก็บรักษาปลาที่เย็น

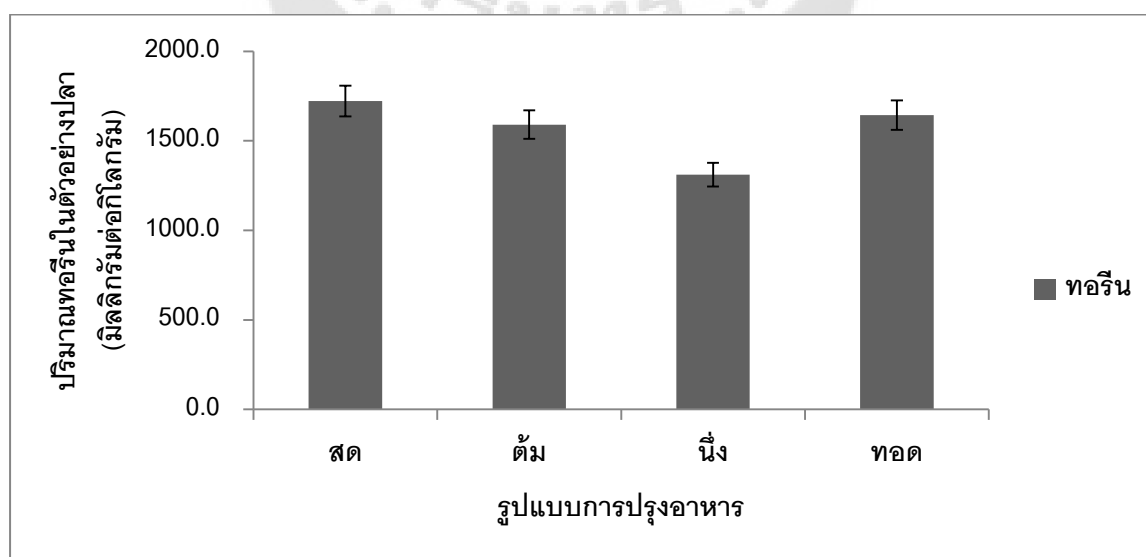


ภาพประกอบ 24 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไขมันในการเก็บรักษาปลาที่เย็น

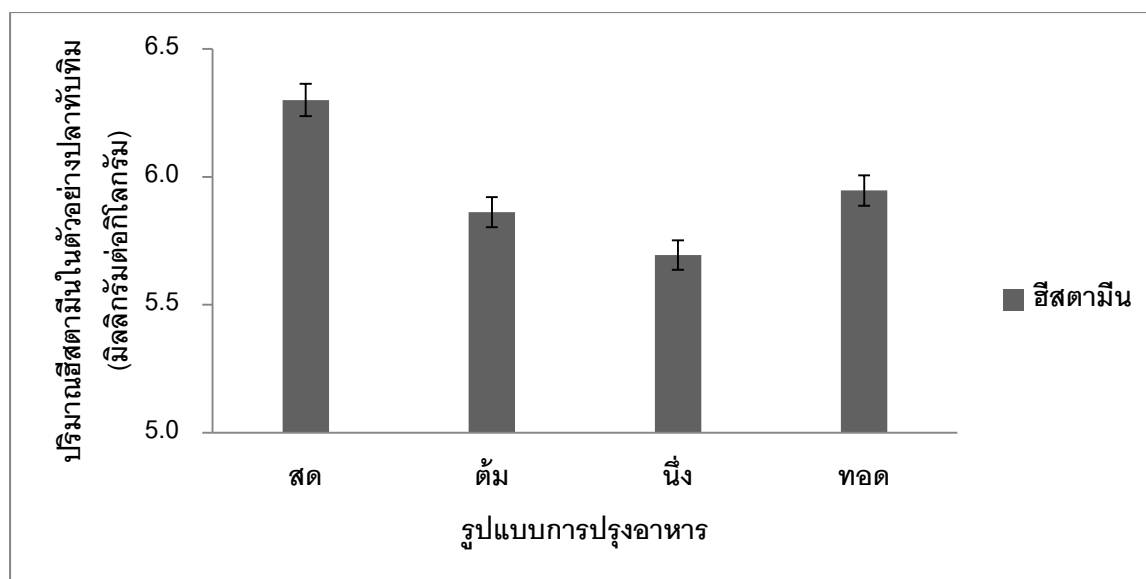
จากผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาที่เก็บรักษาไว้ในที่เย็น แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาปลาในที่เย็นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีน แต่จะเกิดการสูญเสียปริมาณทอรีนในปลา เนื่องจากการละลาย Freeze-thaw คือเมื่อนำปลาไปแช่แข็ง (Freeze) จะส่งผลให้น้ำในตัวปลาจับตัวกันเป็นผลึกน้ำแข็ง หลังจากนั้นเมื่อนำปลาแช่แข็งมาละลาย (thaw) จะส่งผลให้เนื้อสัมผัสของปลานิ่ม และมีน้ำไหลออกมาจากเนื้อปลา (ชัยรัตน์ ตั้งดวงดี. 2555: 33) ซึ่งทอรีนมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ส่งผลให้ทอรีนละลายในน้ำที่ไหลออกมาจากเนื้อปลา จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณทอรีนลดลง สำหรับฮีสตามีนพบว่าการเก็บรักษาปลาไว้ในที่เย็นเป็นเวลานานจะส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพียงไม่กี่ชั่วโมง โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rossano R. และคณะ รายงานว่า การที่เก็บปลาไว้ที่อุณหภูมิต่ำสามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดสารพิษฮีสตามีนได้ เนื่องจากการเก็บรักษาปลาในที่เย็นจะส่งผลให้จุลินทรีย์ในเนื้อปลาชะลอกระบวนการย่อยสลายฮีสตามีนไปเป็นฮีสตามีนได้ ดังนั้นการเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียสเป็นวิธีถนอมปลาที่ดีสำหรับผู้บริโภคที่จำเป็นต้องเก็บปลาไว้เป็นเวลานาน (Rossano R.; et al. 2006: 161-164)

5.2 ศึกษาปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหาร

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนเมื่อนำตัวอย่างปลาสดไปปรุงอาหารด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ ต้ม นึ่ง และทอด ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนแสดงดังภาพประกอบ 25 และ 26



ภาพประกอบ 25 ปริมาณทอรีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร



ภาพประกอบ 26 ปริมาณคอเลสเตอรอลในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเตอรอลและคอเลสเตอรอลในตัวอย่างปลาที่ผ่านกระบวนการปรุงอาหาร แสดงให้เห็นว่าการปรุงอาหารด้วยวิธีการต้ม นึ่ง และทอด ส่งผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอลในเนื้อปลาที่แตกต่างกัน โดยการปรุงอาหารด้วยวิธีการทอดสามารถเก็บรักษาปริมาณคอเลสเตอรอลในเนื้อปลาไว้ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการปรุงอาหารวิธีอื่น เนื่องจากคอเลสเตอรอลสามารถละลายน้ำได้ดีซึ่งการปรุงอาหารด้วยวิธีการต้มและนึ่ง จะใช้น้ำในการปรุงอาหารจึงทำให้คอเลสเตอรอลละลายออกมากับน้ำจากกระบวนการต้มและนึ่ง นอกจากนี้ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารจะทำให้คอเลสเตอรอลเกิดการสลายตัวจึงส่งผลให้เนื้อปลาสูญเสียปริมาณคอเลสเตอรอล ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของพรพิมลและกาญจนา (Muangthai P. และ Klongnganchui K. 2015: 11-19) สำหรับคอเลสเตอรอลพบว่าการปรุงอาหารด้วยวิธีการต้ม นึ่ง และทอด จะส่งผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอลในเนื้อปลาเช่นเดียวกันคอเลสเตอรอล แต่คอเลสเตอรอลเป็นสารที่สามารถทนความร้อนได้ ทำให้ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารไม่ส่งผลให้คอเลสเตอรอลสลายตัว แต่ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารจะฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายคอเลสเตอรอลเป็นคอเลสเตอรอลได้

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการสุ่มตัวอย่างปลาจากตลาดสด ได้แก่ ปลาโอ ปลาหูปลา ทับทิม และปลาช่อน ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกัน วิธีการเตรียมตัวอย่างปลา และการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสอง นอกจากนี้ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาปลา และผลของปัจจัยจากรูปแบบการปรุงอาหารที่มีผลต่อปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลา เพื่อดูผลการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารทั้งสองหลังจากการเก็บรักษาและผ่านกระบวนการปรุงอาหาร

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สรุปผลได้ดังนี้

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

1.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีน ความยาวคลื่นของการเปล่งแสงที่ 451 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการกระตุ้นที่ 333 นาโนเมตร

1.2 ภูมิภาคเคลื่อนที่ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.8 เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ต่ออะซิโตนไตริล ในอัตราส่วนร้อยละ 65 ต่อ 35 โดยปริมาตร

1.3 อัตราการไหลของภูมิภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

1.4 ค่า pH ภูมิภาคเคลื่อนที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เท่ากับ 4.8

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน พบว่าสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ทอรีนและฮีสตามีนได้พร้อมกันภายในเวลา 10 นาที โดยให้ค่าระยะเวลาริเทนชันของทอรีนและฮีสตามีนเท่ากับ 5.415 และ 8.483 นาที ตามลำดับ สำหรับการศึกษา

ผลของกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ฮิสเตอีน เมไทโอนีน ไลซีน และฮีสติดีน พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดไม่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลา

2. ผลการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปลา โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนออกจากตัวอย่างปลาด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับวิธีทางกล ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

2.1 วิธีการสกัดด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ตัวทำละลายกรดไตรคลอโรแอซิดิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในการสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนออกจากปลา

2.2 วิธีการสกัดทางกลโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง โดยใช้เวลา 20 นาทีที่สามารถสกัดปริมาณทอรีนและฮีสตามีนได้สูงสุด

จากสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างปลาดังกล่าวสามารถสกัดสารทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาให้ค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับร้อยละ 100.95 และ 86.22 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดนั้นมีประสิทธิภาพที่ดีและอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ จึงเหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างปลาก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร

3. ผลของการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีน จากการทดลองพบว่ากราฟมาตรฐานของทอรีนและฮีสตามีนมีความเป็นเส้นตรงที่ดีในช่วงความเข้มข้น 0.0005-10 และ 0.03-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของทอรีน และฮีสตามีน เท่ากับ 0.9975 และ 0.9980 ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) ของทอรีนเท่ากับ 0.0001 และ 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับฮีสตามีน มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับวิธีการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงที่ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวันโดยให้ค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันของทอรีน และฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0.14-1.35 และ 0.16-0.63 ตามลำดับ และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวันของทอรีน และฮีสตามีนอยู่ในช่วง 0.18-0.71 และ 0.20-1.18 ตามลำดับ และให้ค่าร้อยละการคืนกลับทอรีนและฮีสตามีนของตัวอย่างปลาอยู่ในช่วงร้อยละ 80.56-98.45 และ 75.83-83.57 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนพร้อมกันในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพที่ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างปลาได้

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีน และฮีสตามีนในตัวอย่างปลาสดที่ได้ทำการสุ่มตัวอย่างปลาจากตลาดสด ได้แก่ ปลาโอ ปลาทูปลาหับทิม และปลาช่อน พบว่ามีปริมาณทอรีนอยู่ในช่วง

1074.05±8.91 ถึง 1648.45±1.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณฮีสตามีนในช่วง 6.60±0.30 ถึง 8.01±0.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างปลาแสดงให้เห็นว่าสามารถพบทอรีนได้ทั้งในปลาทะเลและปลาน้ำจืด สำหรับฮีสตามีนพบว่าปริมาณฮีสตามีนในปลาทะเลมากกว่าปลาน้ำจืด เนื่องจากปลาโอ ปลาหูเป็นปลาทะเลในตระกูล scombroid ซึ่งจะมีปริมาณฮีสติดีนสูงกว่าในกลุ่มปลาน้ำจืดส่งผลให้ในปลาทะเลปริมาณฮีสตามีนมาก จากข้อมูลผลการวิเคราะห์ปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาข้างต้นสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเลือกบริโภคปลาสำหรับผู้แพ้อาหารทะเลได้

5. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีน

จากการศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาปลาพบว่า ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาปลาในที่อุณหภูมิห้อง และในที่เย็นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีน เนื่องจากทอรีนมีความเสถียรภาพสูง สำหรับฮีสตามีนการเก็บปลาไว้ในที่อุณหภูมิห้องส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนในตัวอย่างปลาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่อุณหภูมิประมาณ 20-30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จึงส่งผลให้เกิดกระบวนการย่อยสลายฮีสติดีนไปเป็นฮีสตามีนได้มาก ส่วนการเก็บรักษาปลาไว้ในที่เย็นเป็นเวลานานจะส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาปลาไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากการเก็บปลาไว้ในที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในเนื้อปลาจึงส่งผลให้เกิดกระบวนการย่อยสลายฮีสติดีนไปเป็นฮีสตามีนได้น้อย

จากการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณทอรีนและฮีสตามีนเมื่อนำตัวอย่างปลาไปปรุงอาหารด้วยวิธีต่างๆ พบว่า การปรุงอาหารด้วยวิธีการต้ม นึ่ง และทอด ส่งผลต่อปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในเนื้อปลาเป็นแนวโน้มไปในทางเดียวกัน โดยการปรุงอาหารด้วยวิธีการทอดสามารถเก็บรักษาปริมาณทอรีนและฮีสตามีนในเนื้อปลาไว้ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีปรุงอาหารวิธีอื่น นอกจากนี้ ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารจะทำให้ทอรีนเกิดการสลายตัวจึงส่งผลให้เนื้อปลาสูญเสียปริมาณทอรีนได้ แต่ฮีสตามีนเป็นสารที่ทนความร้อน ทำให้ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารไม่ส่งผลให้ฮีสตามีนสลายตัว แต่ความร้อนจากกระบวนการปรุงอาหารสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายฮีสติดีนเป็นฮีสตามีนในปลาได้ และถึงแม้ว่าจุลินทรีย์จะถูกทำลายด้วยความร้อน แต่สารพิษฮีสตามีนยังคงสภาพอยู่ในเนื้อปลาจึงทำให้ผู้บริโภคที่ทานปลาที่มีสารฮีสตามีนปนเปื้อนเกิดอาการการแพ้ได้

ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ปริมาณทอรินและฮีสตามีนพร้อมกันในตัวอย่างปลาในงานวิจัยนี้ พบว่าจากสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปประยุกต์วิเคราะห์พร้อมกับสารเมทไทโอนีนได้
2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณทอรินและฮีสตามีนพร้อมกันที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณทอรินและฮีสตามีนในตัวอย่างชนิดอื่น และตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2530). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์
คุรุสภาลาดพร้าว. หน้า 88.
- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2530). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์
คุรุสภาลาดพร้าว. หน้า 124.
- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2530). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์
คุรุสภาลาดพร้าว. หน้า 148.
- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2530). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์
คุรุสภาลาดพร้าว. หน้า 164.
- จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล และคณะ. (2546). *ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณฮีสตามีนในกระบวนการผลิต
น้ำปลา*. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ชัยรัตน์ ตั้งดวงดี. (2555). *การแช่เย็นและการแช่แข็งอาหาร*. คู่มืออบรมหลักสูตรมินิ Food
Engineering มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. หน้า 33.
- นิธิยา รัตนพานนท์. (2557). *เคมีอาหาร*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 254.
- ประพันธ์ โนระดี. (2558). *การบริโภคสัตว์น้ำของไทย* สืบค้นเมื่อ 12 ตุลาคม 2558,
จาก <http://www.fisheries.go.th/foreign/images/pdf/a0654.pdf>
- ประสงค์ เทียนบุญ. (2547). ทอริ่ง. *วารสารโภชนาบำบัด*. 15(1): 23-32.
- ยุพิน สังวรินทะ; และคนอื่นๆ. (2537). *เภสัชวิทยา*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล.
- อำพรพรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์. (2556). *การลดปริมาณฮีสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์ปลาโดยจุลินทรีย์.
วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*. 9(1): 1-8.
- Cataldi, T. R.; et al. (2004). Quantitative determination of taurine in real samples by high-
performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed
amperometric detection. *Talanta*. 64: 626-630.
- Chen, Z.; Chen B.; & Yao, S. (2006). High-performance liquid chromatography/electrospray
ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10
water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Analytica Chimica Acta*. 569: 169-
175.

- Douabalé, S. E.; et al. (2003). Contributions to the determination of histamine rate by measuring out the histamine-orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence. *Talanta*. 60: 581-590.
- Draganov, G. B.; Pencheva, I. P.; & Todorova, K. A. (2014). UV-spectrophotometry determination of taurine in energy drink mixtures. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 3: 123-126.
- Gormley, T. R.; et al. (2007). Taurine content of raw and processed fish fillets/portions. *European Food Research and Technology*. 225: 837–842.
- Kataoka, H.; & Ohnishi N. (1986). Occurrence of taurine in plants. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50 (7): 1887-1888.
- Körös, Á.; et al. (2007). Analysis of amino acids and biogenic amines in biological tissues as their o-phthalaldehyde/ethanethiol/fluorenylmethyl chloroformate derivatives by high-performance liquid chromatography a deproteinization study. *Journal of Chromatography A*. 1149: 46–55.
- Laura, M.; & Natalija N. (2007). Histamine and histamine intolerance . *The American Journal of Clinical Nutrition*. 85: 1185-1196.
- Lukas, N.; et al. (2013). Spectrometric and chromatographic study of reactive oxidants hypochlorous and hypobromous acids and their interactions with taurine. *Chromatographia*. 76: 363–373.
- Muangthai P. and Klongnganchui K. (2015). Taurine in fresh seafishes and processed seafishes. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences*. 4: 11-19.
- Pappa-Louisi, A.; Sotiropoulos, S.; & Balkatzopoulou, P. (2008). Mobile phase pH, column temperature, and eluent flow rate effects on separation and fluorescence electrochemical detection of OPA derivatives of amino acids in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 31: 1434-1447.
- Pencheva, I. P.; & Todorova, K. A. (2015). Analytical approaches and methods in quality control procedures of energy food drinks containing caffeine and taurine. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 4: 1-8.

- Polanuer, B.; et al. (1994). Rapid assay of dinitrophenyl derivative of taurine by highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 656: 81-85.
- Redmond, H. P.; et al. (1998). Immunonutrition: the role of taurine. *Journal of Nutrition*. 14: 599-604.
- Rossano R.; et al. (2006). Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A study by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 830: 161-164.
- Sagratini, G.; et al. (2012). Simultaneous determination of eight underivatised biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 132: 537-543.
- Salze, G. A.; & Davis, D. A. (2015). Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture*. 437: 215-229.
- Sawabe, Y.; Tagami, T.; & Katsuhiro. (2008). Determination of taurine in energy drinks by HPLC using a pre-column derivative. *Journal of Health Science*. 54(6): 661-664.
- Self, R. L.; Wu W. H.; & Marks, H. S. (2011). Quantification of eight biogenic amine compounds in tuna by matrix solid-phase dispersion followed by HPLC orbitrap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 5906-5913.
- Shakila, R. J.; Vasundhara, T. S.; & Kumudavally, K. V. (2001). A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry*. 75: 255-259.
- Shifen, M.; Xiaojing D.; & Yongjian L. (2002). Separation method for taurine analysis in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 781: 251-267.
- Silva C.; et al. (1998). Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. *Journal of Food Science*. 63: 644-647.
- Soga, H.; & Aono M. (1957). A spectrophotometric method for the determination of taurine in nutritional supplement drinks. *Food and Agriculture Organization of the united Nations*.
- Stapleton, P. P.; et al. (1997). Taurine and human nutrition. *Clinical Nutrition*. 16: 103-108.

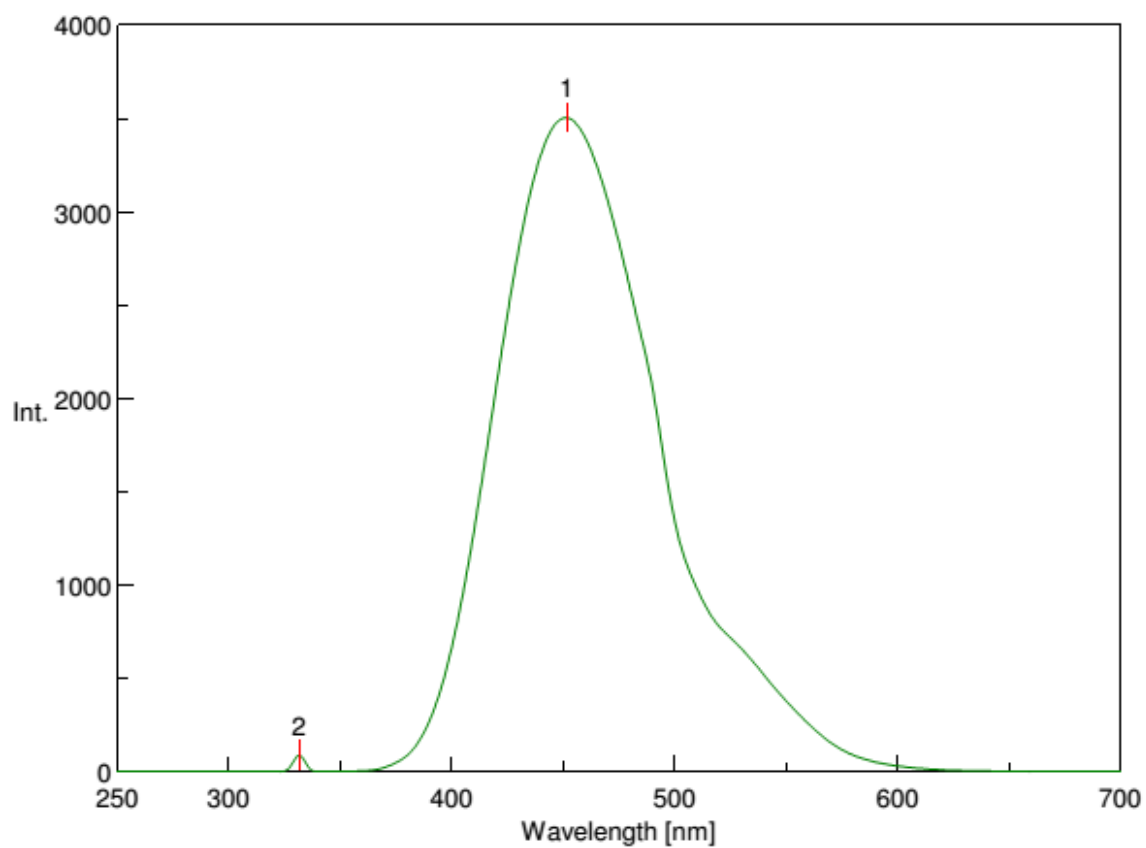
- Stipanuk, M. H.; et al. (2002). Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *Journal of Nutrition*. 132: 3369–3378.
- Tahmouzi, S.; Khaksar, R.; & Ghasemlou, M. (2011). Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry*. 126: 756–761.
- The Fitness for Purpose of Analytical Methods ; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (1998). *EURACHEM Guide*. 1st.
- Valeria, F.; & Claudia, L. (1998). Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography Derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of “free” species. *Journal of Chromatography A*, 809: 241–245.
- Visciano, P.; et al. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*. 3:188.
- Wang, X.; et al. (2011). Determination of taurine in biological samples by high-performance liquid chromatography using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a derivatizing agent. *Biomedical and Environmental Sciences*. 24: 537-542.
- Waterfield, C. J. (1994). Determination of taurine in biological samples and isolated hepatocytes by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B*. 657: 37–45.
- Wójcik, O. P.; et al. (2010). The potential protective effect of taurine on coronary heart disease. *Artherosclerosis*. 208: 19-25.
- Yesudhasan, P.; et al. (2013). Histamine levels in commercially important fresh and processed fish of Oman with reference to international standards. *Food Chemistry*. 140:777–783.



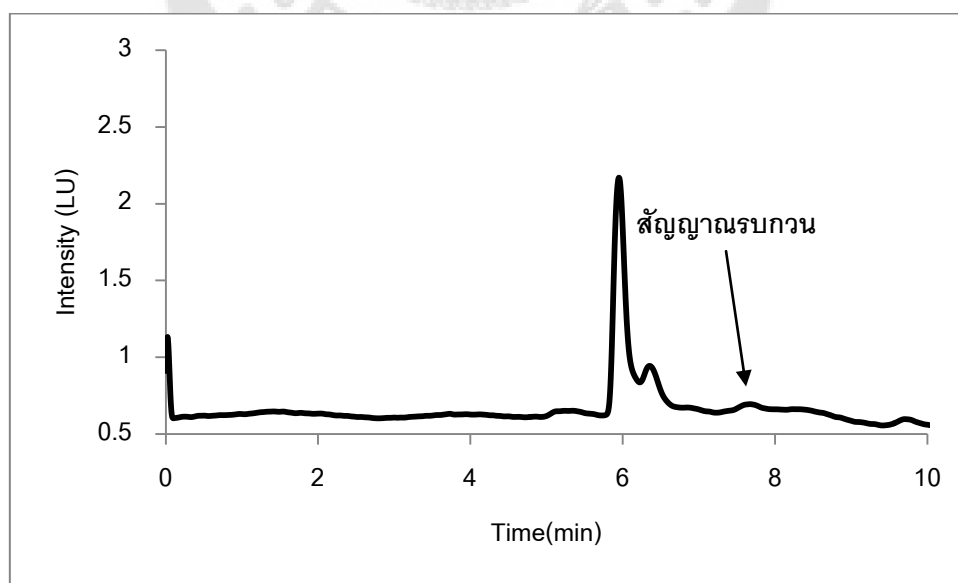


ภาคผนวก ก

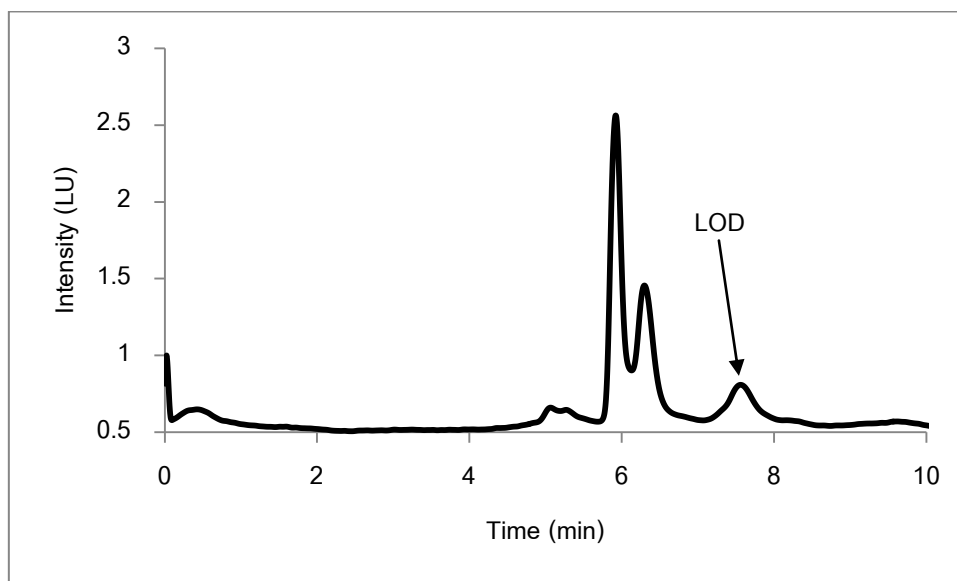
โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง



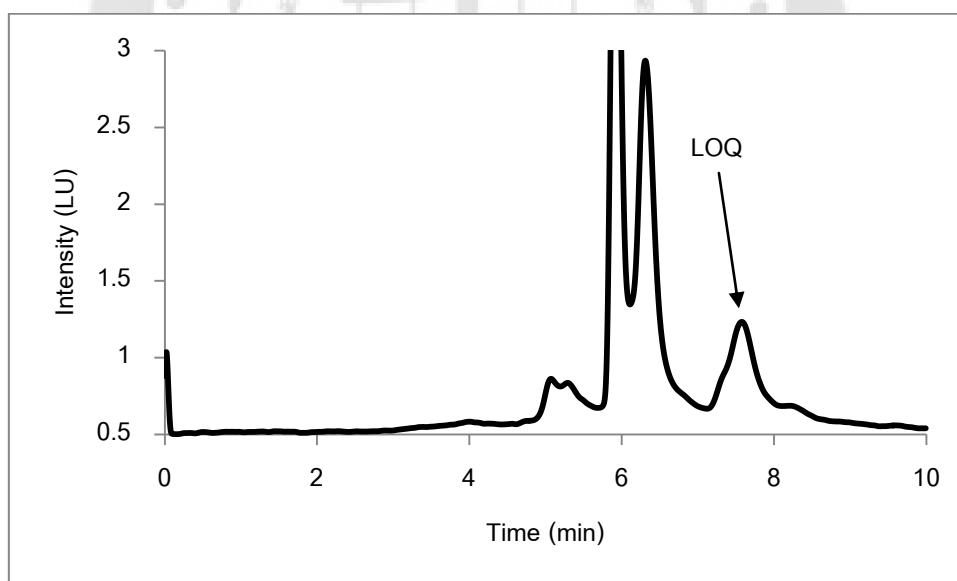
ภาพประกอบ 27 ช่วงความยาวคลื่นการเปล่งแสงของสารอนุพันธ์ฟลิวออโรเรซิน และอีซีตามีน



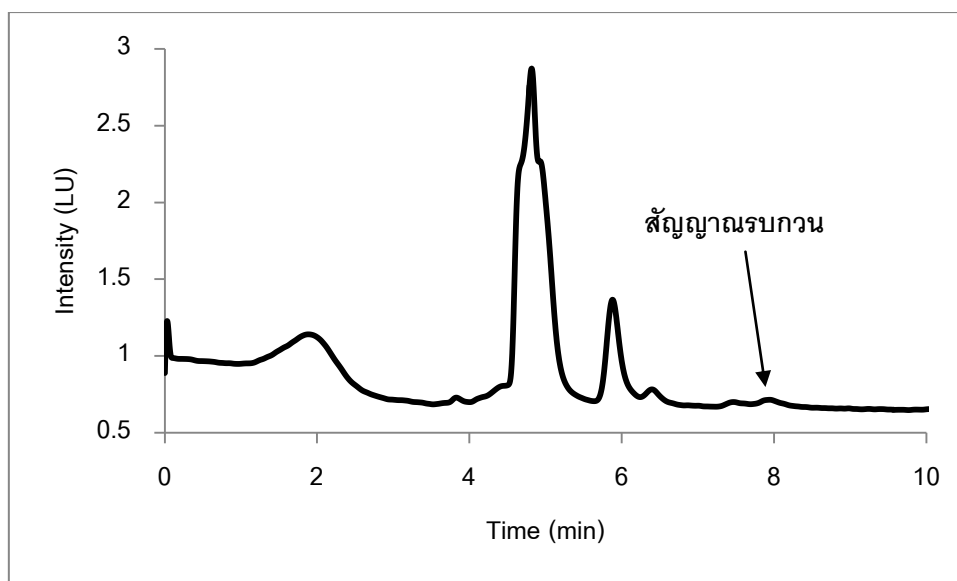
ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมสารละลายรบกวนของฟลูออเรซิน



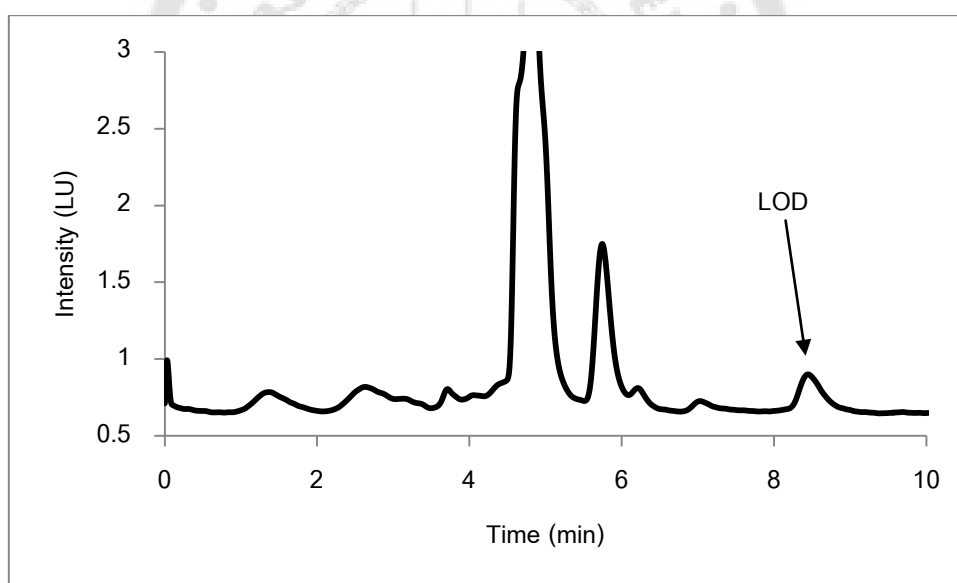
ภาพประกอบ 29 โคโรนาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.0001 มิลลิกรัมต่อลิตร



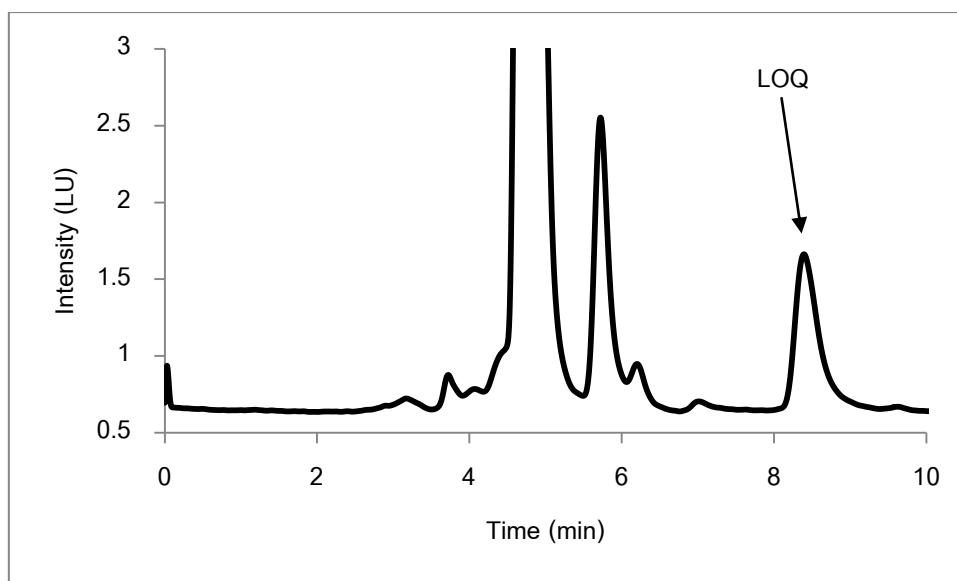
ภาพประกอบ 30 โคโรนาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของทอรีนความเข้มข้น 0.0005 มิลลิกรัมต่อลิตร



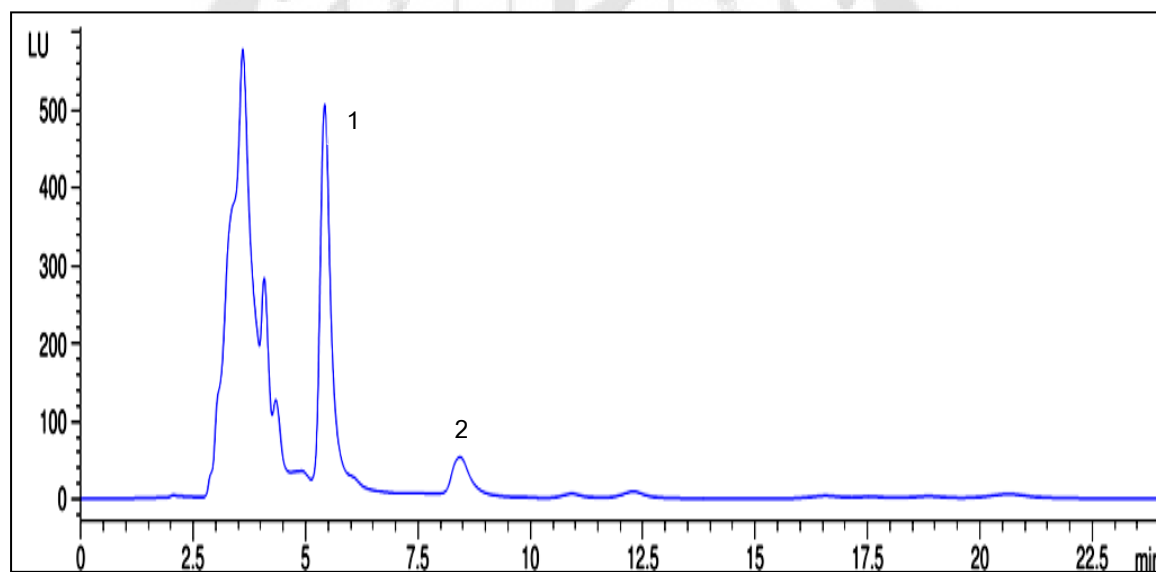
ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมสารละลายรบกวนของฮีสตามีน



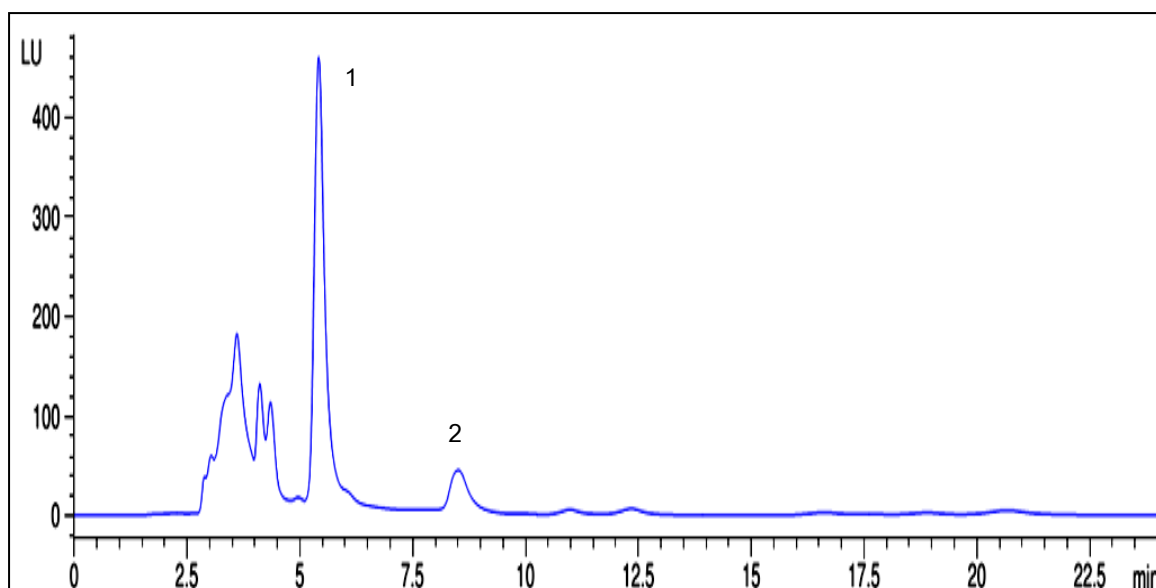
ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของฮีสตามีนความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพประกอบ 33 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานอนุพันธ์ของฮีสตามีนความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

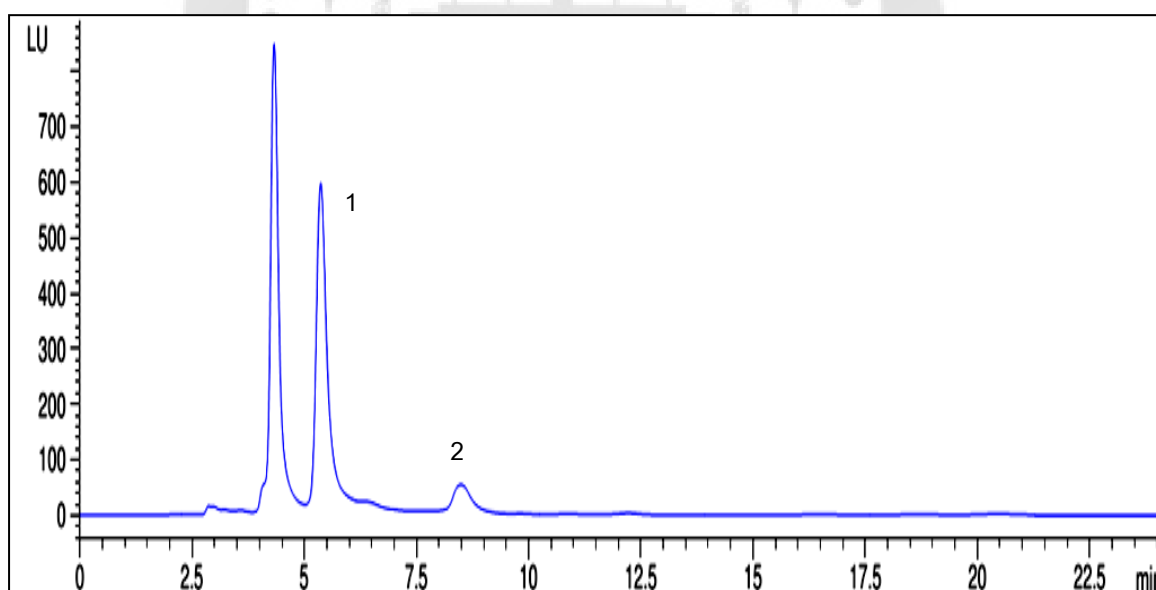


ภาพประกอบ 34 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างโอ
หมายเหตุ 1 แทน พีค ทอรีน 2 แทน พีค ฮีสตามีน



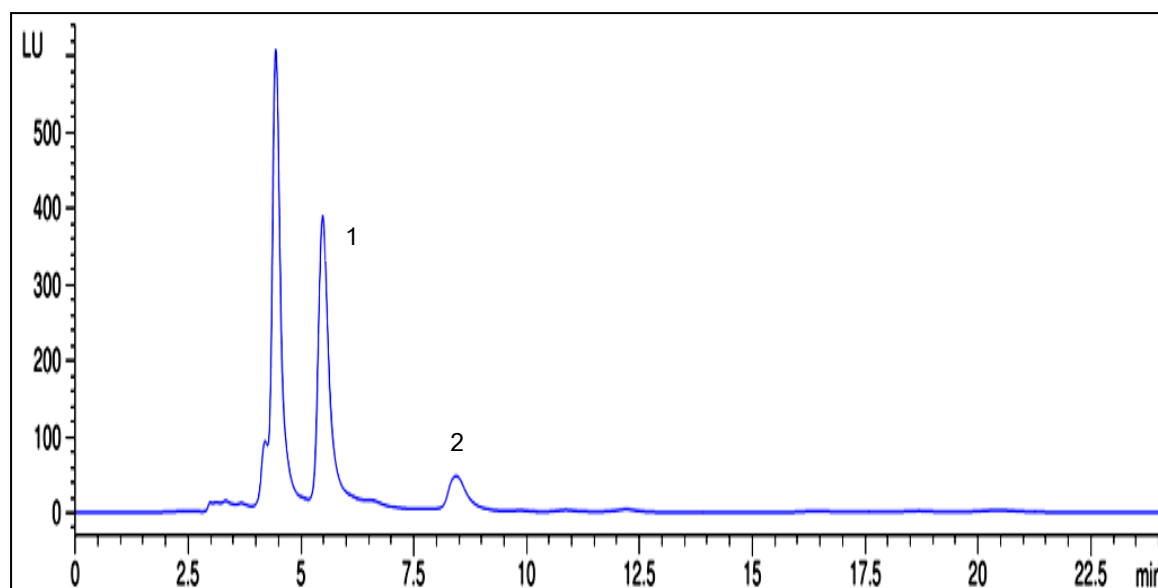
ภาพประกอบ 35 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาทุ

หมายเหตุ 1 แทน พีค ทอรีน 2 แทน พีค ฮีสตามีน



ภาพประกอบ 36 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาหีบต้ม

หมายเหตุ 1 แทน พีค ทอรีน 2 แทน พีค ฮีสตามีน



ภาพประกอบ 37 โครมาโทแกรมสารอนุพันธ์ของทอรีนและฮีสตามีนในตัวอย่างปลาช่อน

หมายเหตุ 1 แทน พีค ทอรีน 2 แทน พีค ฮีสตามีน

ภาคผนวก ข
รูปตัวอย่างปลา และวิธีการเตรียมตัวอย่างปลาด้วยวิธีการสกัดทางเคมี
ร่วมกับวิธีทางกล



ภาพประกอบ 38 ตัวอย่างปลาโสด



ภาพประกอบ 39 ตัวอย่างปลาหูสด



ภาพประกอบ 40 ตัวอย่างปลาทับทิมสด



ภาพประกอบ 41 ตัวอย่างปลาช่อนสด



ภาพประกอบ 42 ตัวอย่างปลาทับทิมต้ม



ภาพประกอบ 43 ตัวอย่างปลาทับทิมนึ่ง



ภาพประกอบ 44 ตัวอย่างปลาทึบทอด



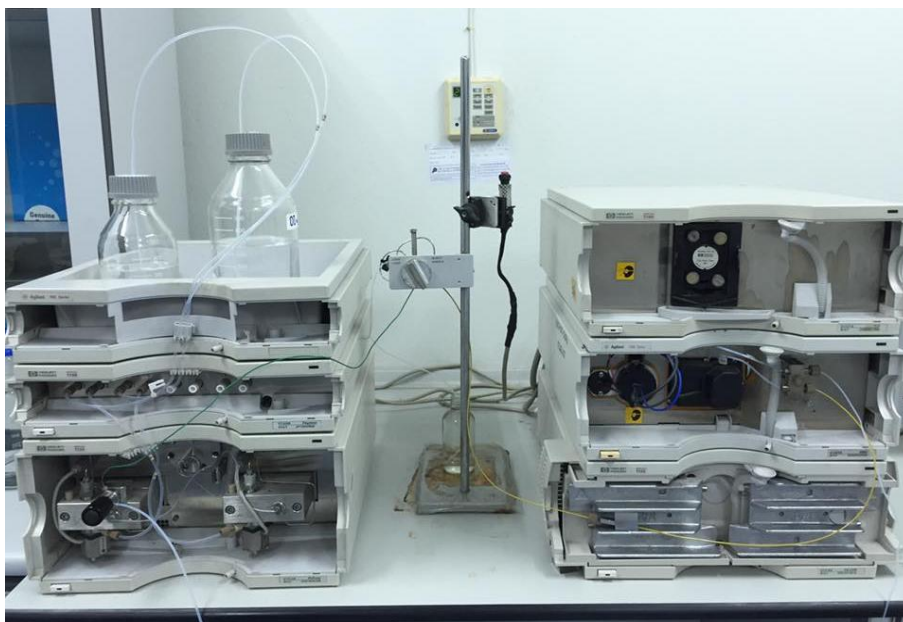
ภาพประกอบ 45 วิธีการสกัดตัวอย่างปลาด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ตัวทำละลายกรดไตรคลอโรแอซิดิก



ภาพประกอบ 46 วิธีการสกัดตัวอย่างปลาด้วยวิธีทางทางกลด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

ภาคผนวก ค
รูปเครื่องมือและอุปกรณ์





ภาพประกอบ 47 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง



ภาพประกอบ 48 เครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Fluorescence spectrometer)



ภาพประกอบ 49 เครื่องกรองน้ำปราศจากไอออน



ภาพประกอบ 50 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง



ภาพประกอบ 51 เครื่องเขย่า Vortex



ภาพประกอบ 52 เครื่องอัลตราโซนิก



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวกาญจนา คล่องงานดูย
วันเดือนปีเกิด	12 เมษายน 2534
สถานที่เกิด	บ้านเลขที่ 79/927 ถนนแสนสุข ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี 20130
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2552	มัธยมศึกษา 4-6 จาก โรงเรียนชลราษฎรอำรุง จังหวัดชลบุรี
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2559	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเคมี จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
นำเสนอผลงาน	
พ.ศ. 2559	ได้รับทุนสนับสนุนการไปเสนอผลงานวิชาการของนิสิต ระดับบัณฑิตศึกษาในงานประชุม 43rd International Academic Conference on Development in Science and Technology ประเทศเกาหลีใต้ จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ