วัสดุและวิธีการทดลอง

การวิเคราะห์สาร tyramine ในอาหาร ซึ่งเน้นหนักในอาหารที่มีขบวนการหมัก (ferment ation) เนื่องจาก decarboxylase enzymes ที่จะเปลี่ยนกรดอะมิโน tyrosine ให้เป็น tyramine นั้นพบว่ามีในแบคทีเรีย เช่น "Streptococcus faecalis" ไวน์ทำการวิเคราะห์โดยตรง พวกอาหารอื่น ๆ ต้องมีการเตรียมดังต่อไปนี้

(๑) บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน 0.05 M HCl ในปริมาตร ๑๐ เท่า ด้วย Thomas Tissue Grinders

(๒) สะกัดเอาส่วนของลิปิดออกด้วยการใส่ petroleum ether ในปริมาตร ๒ เท่า เขย่า และ centrifuge

(๓) แยกเอาส่วนที่เป็น acid extract (คือ 0.05 M HCl) ออกมา เพื่อหาค่า tyramine หรือ tyrosine โดยวิธีการวิเคราะห์ทาง fluorometry โดยใช้เครื่อง spectrofluorometer "Hitachi 204"

ในการ assay ทาง fluorometry ใช้วิธีของ spector et al (๘) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

ใส่ ๑ มล. ของ 1-nitroso-2 naphthol reagent และ ๑ มล. ของ nitric acid reagent ลงใน ๒ มล. ของ acid extract ผสมกัน อุ่นที่ ๕๕ °ซ เป็นเวลา ๓๐ นาที ปล่อยให้ส่วนผสมเย็นลงเป็นเวลา ๑๐ นาที แล้วเขย่าด้วย ๕ มล. ของ ethylene dichloride เพื่อแยกเอา reagent ที่เหลืออออก แยกเอา ๒ มล. ของ aqueous phase ไปอ่านหาค่าโดยปรับค่า fluorescence ที่ ๕๖๕ mu และ excitation ที่ ๔๖๕ mu

การเตรียม blank ทำโดย อุ่น acid extract กับ nitric acid reagent ที่ ๕๕ °ซ เป็นเวลา ๓๐ นาทีก่อน ปล่อยให้เย็นแล้วจึงเติม 1-nitroso-2-naphthol reagent แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปอุ่นที่ ๕๕ °ซ เป็นเวลา ๓๐ นาที แล้วเขย่ากับ ethylene dichloride ดังที่กล่าวมาแล้วข้างบน

เนื่องจากวิธีการนี้จะเกิดขึ้นทั้งสาร tyramine และ กรดอะมิโน tyrosine จึงต้องมีการพิสูจน์ว่าเป็น tyramine หรือ tyrosine โดยใช้ paper chromatography ใน n-butanol-acetic acid water (๑๒ : ๓ : ๕) แล้วสเปรย์ด้วย nitrosonapthol reagent ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ คือ ๐.๑ กรัมของ nitroso-B-nathol ละลายใน ๘๐ มล. ของ ๙๕% ethanol ผสมกับ ๑๐ มล. กรด HNO_3 อย่างเข้มข้น ทันทีก่อนที่จะใช้สเปรย์ ปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิของห้อง ๒ – ๓ นาที แล้วเอาไปอบที่ ๑๐๕ °ซ เป็นเวลา ๒ – ๓ นาที จะเกิดสีให้เห็นเป็นสีแดง การอบมากเกินไปจะทำลายสีที่เกิดขึ้น ค่า Rf ของ tyramine และ ของ tyrosine ที่หาโดยระบบนี้ คือ ประมาณ ๐.๗๓ และ ๐.๖๕ ตามลำดับ ในการทำทุกครั้งจะต้องมีการทำคู่กับ tyrosine และ tyramine บริสุทธิ์ (ของ SIGMA) เพื่อเป็นการยืนยัน

ในกรณีที่การทำ paper chromatography แล้วพบว่าอาหารนั้น ๆ มีทั้ง tyramine และ tyrosine ปนอยู่ จะทำการสะกัดโดยวิธีของ Spector ๑๙๖๓(8) ซึ่งวิธีนี้ tyrosine จะไม่ถูกสะกัดออกมาใน acid extract มีรายละเอียดดังนี้ บดอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกัน 0.01 M HCl ในปริมาตร ๓ เท่า เอาส่วนผสมที่มีเนื้ออาหาร ๐.๕ กรัม มาผ่านขบวนการดังต่อไปนี้ เติม ๑ กรัม NaOH แล้วปรับ pH ให้เป็น ๑๐.๕ ด้วยผง NaOH และ 1 N NaOH ๒ – ๓ หยด เติม ๔ มล. ๐.๕ M borate buffer pH 10.5 ที่อิ่มตัวด้วย NaOH เติม ๓๐ มล. ether เขย่าเป็นเวลา ๑๐ นาที แยกเอาส่วนที่เป็น ether ออกมา ๒๕ มล. เติม ether อีก ๑๕ มล. ลงในส่วนที่เหลือ เขย่าอีก ๑๐ นาที แล้วแยกเอาส่วนที่เป็น ether ออกมาอีก ๑๐ มล. รวมกับ ether ๒๕ มล. ที่แยกไว้แล้วครั้งแรก เติม ๓ มล. ether equilibrated 0.01 N HCl

ลงใน ether ๓๕ มล ที่แยกไว้ครั้งแรก เขย่าเป็นเวลา ๕ นาที แล้ว centrifuge แยกเอาส่วนของ acid extract ออกมา นำไปหา tyramine โดยวิธีตรวจสอบทาง fluorometry ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น และมีการยืนยันด้วยการทำ paper chromahography อีกครั้ง