



การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท
จากหลอดลมสัตว์ปีก

**Production of Chondroitin Sulfate and Collagen Hydrolysate
Containing Product from Poultry Trachea**

ทัศนีย์ เจริญวิริยภาพ

Tassanee Jaroenviriyapap

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Food Science and Technology
Prince of Songkla University**

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนไฮโดรไลสัท จากหอยค่อมสัตว์ปีก
ผู้เขียน	นางสาวทัศนีย์ เจริญวิริยาภ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

หอยค่อมไก่ เป็ด และนกกระจอกเทศ เป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีก เพื่อประเมินศักยภาพของหอยค่อมเหล่านี้ในการเป็นแหล่งของคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจน จึงได้ทำการศึกษองค์ประกอบทางเคมี, สัดส่วนกระดูกอ่อน, คอนครอยตินซัลเฟตและไฮดรอกซีโปรตีน ผลการทดลองพบว่าสัดส่วนของกระดูกอ่อนจากวัตถุดิบมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 49.20-73.05 ปริมาณโปรตีนและไฮดรอกซีโปรตีนมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 66.19-84.38 และ 4.04-7.49 (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ รูปแบบเปปไทด์ของคอลลาเจนของทุกตัวอย่างที่สกัดโดยใช้เอนไซม์เปปซินที่ศึกษาด้วยเทคนิค SDS -PAGE ประกอบด้วย คอลลาเจน type I และ type II ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ส่วนปริมาณสารคอนครอยตินซัลเฟตที่วิเคราะห์โดย HPLC มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.574-6.357 (โดยน้ำหนักแห้ง) โดยมีคอนครอยติน-4-ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก และในทุกตัวอย่างจะพบคอนครอยตินไดซัลเฟตในปริมาณน้อยมาก สัดส่วนของคอนครอยติน-4-ซัลเฟตต่อคอนครอยติน-6-ซัลเฟตของทุกตัวอย่างมีค่า 1.7-5.5 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของคอนครอยตินซัลเฟตจากสัตว์ปีก หอยค่อมนกกระจอกเทศมีปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตและไฮดรอกซีโปรตีนสูงที่สุดตามด้วยหอยค่อมและกอลองเสียงเป็ดแต่เนื่องจากหอยค่อมเป็ดมีปริมาณมากและหาได้ง่ายกว่าจึงถูกเลือกใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

เพื่อเตรียมส่วนกระดูกอ่อนหอยค่อมเป็ดจึงได้ทำการศึกษาผลของค่า (0.05-0.1 M NaOH ที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง), เอนไซม์ (0.1-0.5% Alcalase เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง) และความร้อน (ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1-120 นาที) ต่อการกำจัดโปรตีนอื่นๆ การสูญเสียไฮดรอกซีโปรตีนและคอนครอยตินซัลเฟตตลอดจนชนิดของคอนครอยตินซัลเฟตและรูปแบบเปปไทด์ของคอลลาเจนที่เหลืออยู่ ผลการทดลองพบว่าวิธีการต้มในน้ำเดือดสามารถกำจัดโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจน type I ได้สูงที่สุด และสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตเพียงร้อยละ 11 หลังจากต้มเป็นเวลา 120 นาที ขณะที่การแช่ค้างจะสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตมากกว่าร้อยละ หลังการแช่ค้างปริมาณคอนครอยติน-4-ซัลเฟตลดลงมากจนเป็นสาเหตุให้สัดส่วนของคอนครอยติน-4-ซัลเฟตต่อคอนครอยติน-6-ซัลเฟตมีค่าต่ำกว่า 1 (0.75-0.94) นอกจากนี้ผลจาก

เทคนิค SDS –PAGE แสดงว่าคอลลาเจนจากตัวอย่างกระดูกอ่อนที่เตรียมโดยการต้มในน้ำเดือดจะถูกตัดย่อย ขณะที่คอลลาเจน type II ในกระดูกอ่อนที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์ยังคงสภาพเดิม

ในการติดตามปริมาณผลผลิตโปรตีน คอนครอยตินซัลเฟต และไฮดรอกซีโปรลีนจากการสกัดย่อยกระดูกอ่อนหลอดลมเปิดที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์และความร้อนด้วยปาเปน ความเข้มข้นร้อยละ 0.0625-1.0 เป็นเวลา 1-10 ชั่วโมงและพบว่าผลผลิตคอนครอยตินซัลเฟตและไฮดรอกซีโปรลีนจากกระดูกอ่อนที่เตรียมโดยการต้มมีปริมาณมากกว่าผลผลิตคอนครอยตินซัลเฟตและไฮดรอกซีโปรลีนจากกระดูกอ่อนที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์เล็กน้อย การใช้ปาเปน ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 มีประสิทธิภาพสกัดย่อยดีที่สุด โดยสามารถสกัดย่อยคอนครอยตินซัลเฟตได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่เวลา 10 ชั่วโมง ขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตจากหลอดลมเปิดที่ย่อยด้วยปาเปนความเข้มข้นร้อยละ 0.0625-1.0 เป็นเวลา 1- 10 ชั่วโมง อยู่ในช่วงเดียวกับสารคอนครอยตินซัลเฟตมาตรฐานคือ 15-40 กิโลดาลตัน โปรตีนไฮโดรไลเซตจากการย่อยด้วยปาเปนร้อยละ 0.25 ประกอบด้วยเปปไทด์ขนาด 24 กิโลดาลตันเป็นส่วนใหญ่ และมีเปปไทด์ขนาด 14 และ 6.5 กิโลดาลตันในปริมาณเล็กน้อย

จากการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต องค์ประกอบทางเคมี และการละลายของไฮโดรไลเซตผงแห้งย่อยจากกระดูกอ่อนที่เตรียมโดยการต้มพบว่าปริมาณผลผลิตที่ได้จากการย่อยเป็นเวลา 1 และ 10 ชั่วโมงมีค่าร้อยละ 33 และ 46 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ โดยผลผลิตที่ได้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70.2-75.0 โดยน้ำหนักแห้ง) และโปรตีนส่วนมากเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเซตซึ่งบ่งชี้ได้โดยค่าไฮดรอกซีโปรลีน ปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตมีค่าร้อยละ 9.7-10.6 ซึ่งมากกว่า 2 เท่า ของปริมาณในหลอดลมเปิด (ร้อยละ 4.2) การละลายของผลิตภัณฑ์ผงแห้งที่ pH 2-9 มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 66-95 โดยละลายได้ดีที่สุดที่ pH 2 และละลายได้ต่ำสุดที่ pH 4

Thesis Title Production of chondroitin sulfate and Collagen Hydrolysate containing product from poultry trachea

Author Tassanee Jaroenviriyapap

Major Program Food Science and Technology

Academic Year 2010

ABSTRACT

Tracheas of chicken, duck and ostrich are wastes from poultry processing industry. To evaluate potential of these wastes to be used as a source of chondroitin sulfate (CS) and collagen, their proximate composition, cartilage proportion, CS and hydroxyproline (HyP) were analyzed. Percentage of cartilage in studied materials ranged from 49.20 to 73.05. Total proteins and HyP contents were 66.19-84.38% and 4.04-7.49% (dry basis), respectively. The peptide patterns observed by SDS-PAGE indicated that pepsin-solubilized collagen from all samples comprised of type I and type II with different proportion. The CS of all samples content determined by HPLC was found to be 0.574-6.357% (dry basis) with chondroitin-4-sulfate (CS-4) as the majority. All sample had only trace amount of di-sulfated CS. The CS-4/CS-6 ratio of all CS sample was 1.7-5.5 indicating a characteristic of CS from land animal. Ostrich trachea possessed the highest content of CS and collagen followed by duck trachea and larynx. As duck trachea is more available than that of ostrich, it was chosen as a raw material for further study.

To obtain only cartilage part of duck trachea, the effect of alkaline (0.05-0.1 M NaOH at 4°C and RT for 1-6 hours), enzyme (0.1-0.5% Alcalase for 1-6 hours) and heat (boiling for 1-120 min) treatments on protein removal, loss of HyP and CS along with CS type and the peptide structure of the remaining collagen were investigated. The results showed that the protein removal, especially type I collagen, was highest by boiling in water. Alkaline treatment caused up to 50% loss of CS when only 11% loss was observed after 120 min boiling. The CS-4 content of alkali-treated trachea decreased causing its CS-4/CS-6 ratio to be lower to 0.75-0.94 (less than one). SDS-PAGE showed degradation of collagen in heat-treated trachea cartilage while most of collagen type II remained its integrity after enzyme treatment.

The CS extraction from cartilage obtained from enzyme and heat treatment were studied by 0.0625-1.0% papain hydrolysis for 1-10 hours. Extracting yield of protein, CS and HyP were monitored. Slightly higher yield of CS and HyP was obtained from hydrolysis of heat-prepared cartilage than those from enzyme-prepared cartilage. Using 0.25% papain gave the highest hydrolysis efficacy when compared to other studied concentration levels. Up to 80% of CS was extracted by 0.25% papain hydrolysis for 10 hours. The electrophoretic result indicated that molecular size of CS from duck trachea after 0.0625-0.25% papain hydrolysis for 1-10 hours were quite similar (15-40 KDa). Protein hydrolysate from 0.25% papain digestion contained mostly peptide of 24 KDa and small amount of those at 14 and 6.5 KDa.

Yield, major chemical composition and solubility of the freeze-dried hydrolysate digested from heat-prepared cartilage were evaluated. The total of 33% and 46% (dry basis) of freeze-dried products were obtained from 1 and 10 hours hydrolysis, respectively. The major composition of the products was protein (70.2-75.0% dry basis), mostly collagen hydrolysate as indicated by HyP content. The CS content was 9.7-10.6% which is more than twice increased from the raw material (4.2%). The solubility of hydrolysis products was in the range of 66.95% which was highest at pH 2 and lowest at pH 4.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(9)
LIST OF TABLES	(11)
LIST OF FIGURES	(12)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
1. อุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีก	2
2. หลอดลม	4
3. กระดูกอ่อน	5
4. โครงสร้างและชนิดของคอนดรอยตินซัลเฟต (Chondroitin sulfate)	7
5. คอลลาเจน	9
6. คอนดรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนกับการบรรเทาอาการโรคกระดูกข้อ อักเสบ	11
6.1 โรคกระดูกข้ออักเสบ	11
6.2 การรักษาอาการโรคข้ออักเสบ	12
7. แหล่งและปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตในอุตสาหกรรม	14
7.1 ปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตในกระดูกอ่อน	15
7.2 ปริมาณและสมบัติคอนดรอยตินซัลเฟต (CS) ในผลิตภัณฑ์	17
8. การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตหรือคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบ	20
8.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ	20
8.2 ขั้นตอนการสกัดแยกคอลลาเจนและคอนดรอยตินซัลเฟต	21
8.3 ขั้นตอนการบดและ/หรือทำแห้ง	27
วัตถุดิบ	28
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุอุปกรณ์	29

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
วิธีการ	32
1. ตรวจสอบวิเคราะห์องค์ประกอบและสัดส่วนกระดูกอ่อนของวัตถุดิบ	32
1.1 ตรวจสอบปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหลอดลมไก่, เป็ด และ นกกระทาจอกเทศ	32
1.2 ตรวจสอบสัดส่วนกระดูกอ่อนของหลอดลมไก่, เป็ด และ นกกระทาจอกเทศ	32
1.3 วิเคราะห์ชนิดของคอลลาเจน	32
2. ศึกษาวิธีและสภาวะในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตและ คอลลาเจนเป็นองค์ประกอบ	33
2.1 การกำจัดส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่กระดูกอ่อนจากวัตถุดิบหลอดลม สัตว์ปีก	33
2.2 วิธีการย่อยสกัดคอนครอยตินซัลเฟตโดยใช้เอนไซม์ปาเปน	34
3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้	35
3.1 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้	35
3.2 ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์	35
3.3 ขนาดของคอนครอยตินซัลเฟตเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า	35
3.4 ค่าการละลาย	35
4. การวิเคราะห์ทางสถิติ	36
3 ผลและวิจารณ์	37
1. องค์ประกอบของวัตถุดิบ	37
1.1. ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและสัดส่วนกระดูกอ่อนของหลอดลมไก่ เป็ด นกกระทาจอกเทศ และกล้ามเนื้อปีก	37
1.2 ปริมาณและชนิดคอนครอยตินซัลเฟตในหลอดลมไก่, เป็ด, นกกระทาจอกเทศ และกล้ามเนื้อปีก	40
1.3 ชนิดคอลลาเจน	43

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2. ผลของสภาวะในการผลิตที่มีต่อคอนครอยดินซัลเฟตและคอลลาเจนใน ผลิตภัณฑ์	44
2.1 ผลของการกำจัดส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่กระดูกอ่อนจากวัตถุดิบ (หลอดลมเปิด)	44
2.2 ผลการย่อยสกัดครอยดินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนหลอดลมเปิด	59
3. ผลผลิต องค์ประกอบเคมีและสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้	68
3.1 ผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์	68
3.2 ชนิดและขนาดของคอนครอยดินซัลเฟต	70
3.3 ค่าการละลายของผลิตภัณฑ์	71
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	73
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้เขียน	99

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Estimated quantity of trachea cartilage from chicken, duck, and ostrich raised in Thailand (2008)	4
2. Compositional properties of CS disaccharides	8
3. Type and source of collagen	10
4. Cartilage content from shark, ray and crocodile	15
5. Percentage and type of chondroitin sulfate (CS) in cartilage from shark fin, ray and crocodile by sulfate GAGs assay	16
6. Characteristics of CS in SCPs on the basis of CS content (%), $\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$ and source	18
7. Characteristics of CS in finished products on the basis of CS content (%), $\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$ and source	18
8. Proximate composition of shark cartilage powder products (SCP) and finished products (FP)	19
9. List of chemicals used in research experiments	30
10. Instruments used in experiments	31
11. Chemical composition of poultry tracheas	39
12. Proportion of cartilage in poultry tracheas	40
13. Chondroitin sulfate content in poultry tracheas	41
14. Comparison of protein removal, hydroxyproline (Hyp) and chondroitin sulfate (CS) loss from duck trachea cartilage prepared by different methods	55
15. $\Delta\text{Di-0S}$, $\Delta\text{Di-4S}$, $\Delta\text{Di-6S}$ contents and $\Delta\text{Di-4S}/\Delta\text{Di-6S}$ ratio of duck trachea after alkali, enzyme and heat treatments	58
16. Weight yield of hydrolysis products from duck trachea	69
17. Comparison of major composition of duck trachea, cartilage and hydrolysis products	69
18. Major mineral content of products hydrolyzed from duck trachea cartilage	70

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Trend in export quantity of frozen chicken meat during 1999-2008	2
2. Trend in export quantity of cooked chicken meat during 1999-2008	3
3. Cartilage ring of bird trachea	5
4. Schematic representation of the molecular composition of articular cartilage	6
5. The main components of the cartilage	6
6. Basic structure of disaccharide unit of chondroitin sulfate	7
7. Chemical structure of various disaccharide units of chondroitin sulfate	8
8. Structure of tropocollagen	9
9. Tropocollagen molecule in collagen fibril	10
10. Characteristic of Knee cartilage, (a) Healthy knee (b) Osteoarthritic knee	11
11. Agarose gel-electrophoresis: 300 μ l of (a)water-soluble fraction in SCPs; (b) water-soluble fraction in FPs. Lane a, Seikagaku CS (15 kDa); lane b, Seikagaku CS (40 kDa); lane c, SCP A; lane d, SCP B; lane e, SCP C; lane f, SCP D; lane g, SCP E; lane h, SCP F; lane i, SCP G; lane j, SCP H; lane k, FP A; lane l, FP B; lane m, FP C; lane n, FP D; lane o, FP E; lane p, FP F; lane q, FP G; lane r, all samples were loaded onto 1.0% agarose gel	19
12. Extraction and separation process of collagen from Skate cartilage	24
13. Proteolytic cleavage of cartilage aggrecan	26
14. Raw materials (poultry trachea) used in research work	29
15. Chromatogram of disaccharides produced by enzymatic depolymerization of chondroitin sulfate from (b) duck trachea, (c) chicken trachea, (d) ostrich trachea and (e) duck larynx compared to that of (a) standard CS where (i): Δ Di-0S, (ii): Δ Di-6S, and (iii): Δ Di-4S	42

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
16. SDS-PAGE patterns of pepsin-solubilized collagens from poultry trachea; Lane 1: standard type I collagen, lane 2: duck trachea (first extract), lane 3: duck trachea (third extract), lane 4: duck larynx (first extract), lane 5, duck larynx (third extract), lane 6, chicken trachea (first extract), lane 7: chicken trachea (third extract) and lane 8: standard type II collagen	44
17. Total protein removal after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)	45
18. Loss of Hydroxyproline after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)	46
19. Loss of chondroitin sulfate after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)	47
20. The ratio of hydroxyproline/protein remained in trachea samples after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT) ...	48
21. Total protein removal after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% Alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C	49
22. Loss of Hydroxyproline after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% Alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C	50
23. Loss of chondroitin sulfate after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% Alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C	50
24. The ratio of hydroxyproline/protein remained in trachea samples after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C	51
25. Total protein removal after boiling for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C	52
26. Loss of Hydroxyproline after boiling for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 95-100°C..	53
27. Loss of chondroitin sulfate after boil for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C....	54
28. The ratio of hydroxyproline/protein remained in trachea samples after boil for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C	54

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure	Page
29. SDS-PAGE patterns of pepsin-solubilized collagens from heat treated duck trachea (lane 1), enzyme treated duck trachea (lane 2), compared with non-treated duck trachea (lane 3), standard type II collagen (II) and standard type I collagen (I)	56
30. Protein, hydroxyproline (Hyp) and chondroitin sulfate (CS) yields after digestion of enzyme-pretreated duck trachea with 0.0625%-1.0% papain at 65°C for 1-10 h	61
31. Protein, hydroxyproline (Hyp) and chondroitin sulfate (CS) after digestion of heat-pretreated duck trachea with 0.0625%-1.0% papain at 65°C for 1-10 h	62
32. SDS-PAGE patterns of peptides hydrolyzed from enzyme-treated (a) and heat-treated (b) duck tracheas for 1, 5 and 10 h by papain 0.0625% (lane 1-3), 0.25% (lane 4-6) and 1.0% (lane 7-9)	64
33. Molecular size of CS from enzyme-treated duck trachea cartilage hydrolyzed for 1, 3, 5, 7 and 10 h (lane1-5) with 0.0625% papain (a) with 1.0% papain (c) and from heat treated duck trachea cartilage hydrolyzed for 1, 3, 5, 7 and 10 h (lane1-5) with 0.0625% papain (b) with 1.0% (d) compared to standard CS 15-40 kDa (Std) and commercial CS product(C) on 12% polyacrylamide gel using 100 µg CS sample	66
34. Molecular size of CS from enzyme-treated duck trachea cartilage hydrolyzed with 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5% and 1.0% papain (lane1-5) for 1h (a) hydrolyze for 10 h (c) and from heat-treated duck trachea cartilage hydrolyzed for 1 h (lane1-5) with 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5% and 1.0% papain (b) hydrolyze for 10 h (d) compare to standard CS 15-40 kDa (Std) and commercial CS product (C) on 12% polyacrylamide gel using 100 µg CS sample	67

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure		Page
35.	Molecular weight of chondroitin sulfate hydrolyzed from heat treated duck trachea with 0.25% papain for 1 h (lane 1) and for 10 h (lane 2) compared to standard chondroitin sulfate of 15-40 kDa (Std) and commercial chondroitin sulfate product (C)	71
36.	Solubility of dried products at various pH	72

LIST OF APPENDIX FIGURES

Figure		Page
1.	Standard curve of BSA content	85
2.	Standard curve of hydroxyproline content.....	86
3.	Standard curve of Chondroitin-4-sulfate content	94
4.	Standard curve of Chondroitin-0-sulfate content	95
5.	Standard curve of Chondroitin-6-sulfate content	95

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

กระดุกอ่อนมีสารที่ให้คุณค่าทางโภชนาการหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจนและคอนดรอยตินซัลเฟต ซึ่งมีข้อมูลทางการแพทย์ชี้ให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดมีผลในการบรรเทาอาการโรคข้ออักเสบ ปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตทางการค้า ทั้งที่ผลิตจากกระดุกอ่อนของปลาฉลาม โคนและสุกรแพร่หลายในตลาดโลก อย่างไรก็ตามปัญหาในเรื่องโรควัวบ้าทำให้เกิดความกังวลในการบริโภคผลิตภัณฑ์จากโคน การใช้กระดุกอ่อนจากสุกรเป็นข้อจำกัดของผู้นับถือศาสนาอิสลาม ส่วนกระดุกอ่อนปลาฉลามมีต้นทุนสูงเนื่องจากปริมาณที่ลดลงและปัญหาการสูญพันธุ์ของปลาฉลาม เมื่อความต้องการผลิตภัณฑ์คอนดรอยตินซัลเฟตในตลาดอาหารเสริมและขยายตัวสูงขึ้น จึงมีความพยายามศึกษาหาวัสดุจากแหล่งชนิดอื่น ๆ ที่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของคอนดรอยตินซัลเฟตมาเป็นทางเลือกหรือใช้ทดแทน เช่น กระดุกอ่อนปลากระเบน จระเข้ หน้าอกไก่ เกล็ดปลา ตลอดจน แบคทีเรีย (Emergent Technologies, Inc., 2002; Lou และคณะ, 2002; Sumi และคณะ, 2002; Garnjanakoonchorn และคณะ, 2006)

ถึงแม้ว่าอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์ปีกของประเทศไทยจะประสบปัญหาการระบาดของไข้หวัดนกมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 แต่ระบบการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพของภาครัฐ ตลอดจนการปรับการผลิตที่มุ่งเน้นพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรุงสุกของภาคเอกชน ส่งผลให้ประเทศไทยสามารถเพิ่มตลาดการส่งออกอย่างต่อเนื่อง ในขณะเดียวกันการเลี้ยงนกกระทาเทศซึ่งได้รับการส่งเสริมเป็นสัตว์เศรษฐกิจในแผนพัฒนาเศรษฐกิจแห่งชาติฉบับที่ 9 (2545-2549) มีแนวโน้มขยายตัวไปตามภาคต่างๆของประเทศไทยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในภาคกลาง และภาคตะวันออก ดังนั้นวัสดุจากการแปรรูปสัตว์ปีกเหล่านี้จึงมีปริมาณมากขึ้นตามไปด้วย หลอดลมซึ่งมีกระดุกอ่อนเป็นส่วนประกอบเป็นเศษเหลือส่วนที่ยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง การศึกษาแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเสริมทางการค้าที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทเป็นองค์ประกอบ จึงเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์วัตถุดิบจากไก่อย่างครบวงจร อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่ครอบคลุมถึงตลาดอาหารฮาลาลอีกด้วย

บทตรวจเอกสาร

1. อุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีก

สัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่เนื้อ และเป็ดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ และเป็ดถูกส่งออกในรูปแบบปรุงสุกเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาไข้หวัดนกที่เคຍ ระบาดในสัตว์ปีกในปี 2546 จนส่งผลกระทบต่อปริมาณส่งออกสัตว์ปีกแช่แข็งของไทยเพราะผู้นำเข้า หลายประเทศระงับการสั่งซื้อ อย่างไรก็ตามปี พ.ศ.2547 ถึงปัจจุบัน พบว่าผลิตภัณฑ์ไก่เนื้อและเป็ด มีแนวโน้มในการขยายตัวส่งออกสูงขึ้นเรื่อยๆ (Figure 1 และ Figure 2) ส่วนนกกระเจอกเทศจัดเป็น สัตว์เลี้ยงเพื่อการพาณิชย์ชนิดใหม่ที่มีศักยภาพสำหรับการบริโภคและอุปโภค แต่ยังมีปริมาณการ เลี้ยงหรือผลิตระดับอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกน้อยในประเทศไทย

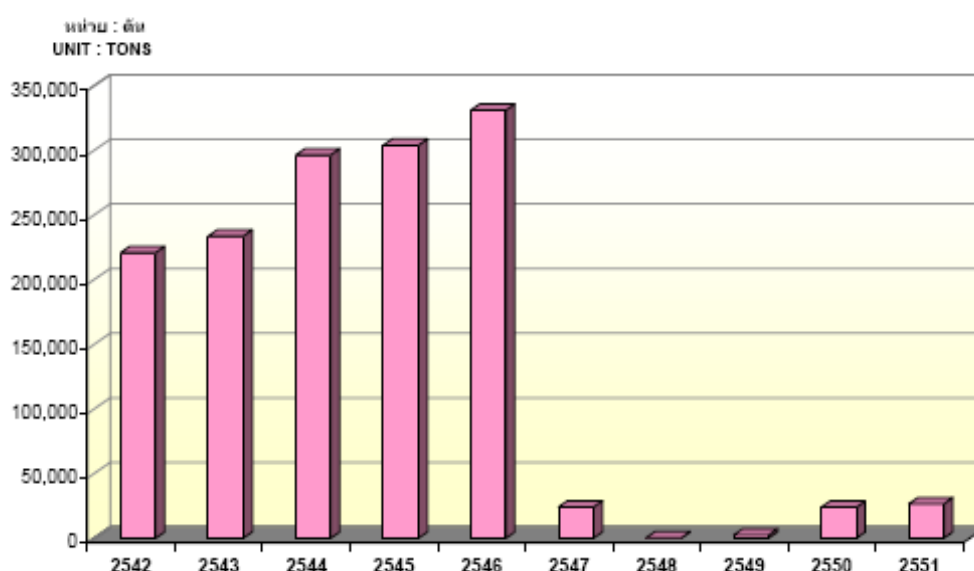


Figure 1. Trend in export quantity of frozen chicken meat during 1999-2008

ที่มา: กรมปศุสัตว์ (2551)

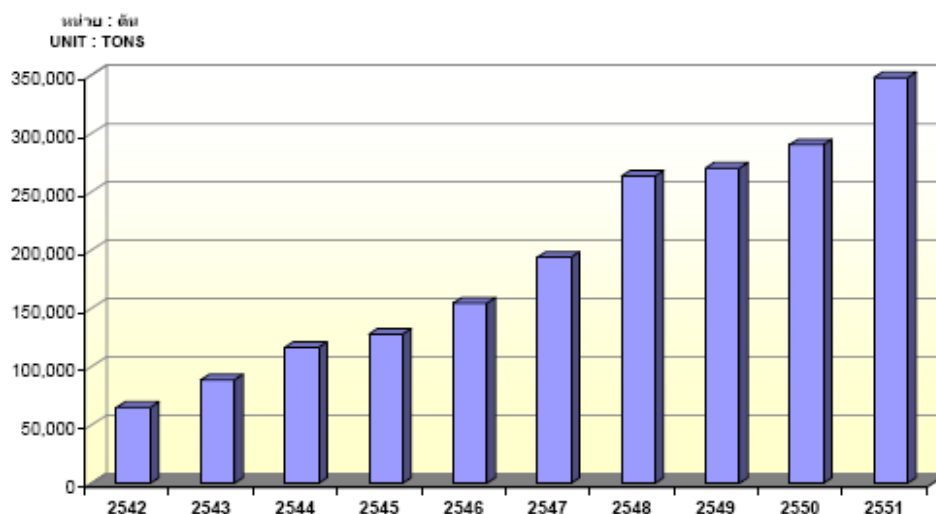


Figure 2. Trend in export quantity of cooked chicken meat during 1999-2008

ที่มา: กรมปศุสัตว์ (2551)

ในกระบวนการแปรรูปสัตว์ปีกผลผลิตและส่วนเหลือที่ได้จากขั้นตอนการชำแหละและการแปรรูปขึ้นกับชนิด, อายุ และน้ำหนักของสัตว์ปีก ตลอดจนวิธีและขั้นตอนการแปรรูป ในส่วนเครื่องในที่เหลือถูกนำไปเป็นอาหารสัตว์เมื่อสุ่มตรวจปริมาณหาลอดลมพบว่า มีปริมาณ 0.12% และ 0.24% ของน้ำหนักไก่และเป็ด ตามลำดับ เมื่อคำนวณปริมาณหาลอดลมของสัตว์ปีกโดยเฉพาะอย่างยิ่งไก่เนื้อและเป็ดซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจจากข้อมูลปริมาณการเลี้ยงในประเทศไทยในปี 2551 พบว่าจะมีปริมาณหาลอดลมไก่ประมาณ 500 ตัน/ปี และหาลอดลมเป็ดประมาณ 164 ตัน/ปี ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งปริมาณหาลอดลมสัตว์ปีกเหล่านี้เพิ่มขึ้นทุกปีตามการขยายตัวของอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง จึงควรมีการศึกษานำไปใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่าเช่นการเป็นวัตถุดิบของการผลิตคอลลาเจนและคอนครอยตินซัลเฟตซึ่งเป็นองค์ประกอบของส่วนกระดูกอ่อนหาลอดลม เป็นต้น

Table 1. Estimated quantity of trachea cartilage from chicken, duck, and ostrich raised in Thailand (2008)

Source	Quantity of poultry (head/ year)	Quantity of trachea ¹ (g/head)	Quantity of trachea ² (kg/ year)	Quantity of trachea cartilage ² (kg/year)
Chicken	235,599,566	2.12	499,469.65	241,286.9
Duck	22,722,647	7.23	164,286.5	119,048.4
Ostrich	17,450.65	141.5	2,471.05	1,387

¹ Data from experiments

² Calculated from production quantity data and information from experiment⁽¹⁾

ที่มา: ข้อมูลจากกรมปศุสัตว์ (2551) และคำนวณจากการทดลอง

2. หลอดลม

หลอดลมเป็นโครงสร้างของระบบทางเดินหายใจที่ต่อจากกล่องเสียง จากนั้นทอดตัวในลำคออยู่ด้านหลังของหลอดอาหารแล้วเข้าสู่ช่วงอก หลอดลมเป็นท่อที่สามารถยืดตัวได้ตามยาวประกอบขึ้นด้วย tracheal rings ที่เชื่อมเป็นวงโดยรอบ จำนวน 100 ถึง 400 วง ในไก่มีจำนวนประมาณ 100-130 วง ความยาวของหลอดลมและจำนวน tracheal cartilage จะแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์ปีก กระดูกอ่อนที่เป็นวงแหวนนี้เป็นกระดูกอ่อนชนิดไฮอะลีน (hyaline cartilage) ในสัตว์ปีกจะเชื่อมต่อเป็นวงอย่างสมบูรณ์ (Figure 3) แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่เชื่อมต่อเป็นวงอย่างสมบูรณ์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม tracheal cartilage rings จะเป็นกระดูกอ่อนอยู่ตลอดชีวิต แต่ในสัตว์ปีกหลายชนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกแข็งเมื่อโตเต็มวัย โดยเฉพาะบริเวณส่วนล่างของหลอดลมพบว่าจะเริ่มมีการเกิดเซลล์กระดูกขึ้นครั้งแรกเมื่ออายุย่างเข้า 15 สัปดาห์ และยังคงต่อไปอีกจนอายุ 104 สัปดาห์ โดย tracheal rings แต่ละอันจะถูกเชื่อมด้วย fibrous connective tissue ที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางเหนียวทางด้านบน สำหรับผนังหลอดลมเป็นกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งกล้ามเนื้อเรียบประกอบไปด้วยเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle fiber) ส่วนในไซโทพลาสซึมเรียกว่า sarcoplasmia ประกอบไปด้วยโปรตีน myofibrils (วิโรจน์ จันทรรัตน์, 2537: พิสมัย ประทุมทาน, 2542)

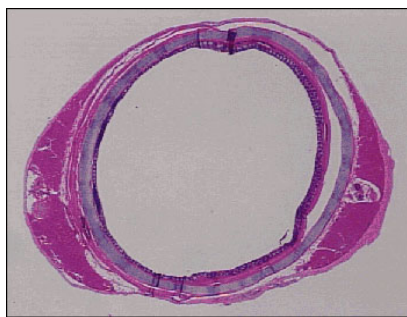


Figure 3. Cartilage ring of bird trachea

ที่มา: Teaching resources center of UC Davis (2002)

3. กระดูกอ่อน

กระดูกอ่อนประกอบด้วยสารพื้นฐานพอลิแซคคาได์ซึ่งก่อตัวเป็นเจลแผ่ออกไปเป็นโครงข่ายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) มีส่วนที่หุ้มเรียกว่า perichondrium ซึ่งเซลล์ด้านในสามารถเปลี่ยนไปเป็น cartilage cell ได้ กระดูกอ่อนแบ่งออกเป็น 4 ชนิดหลักคือ

- (1) Hyaline Cartilage เป็นกระดูกที่ใสคล้ายแก้ว พับงอได้ มีเส้นใยคอลลาเจนหนาแน่น จะพบตามซี่โครง (กระดูกซี่โครง) บริเวณปลายกระดูกแขนขา และจมูก
- (2) Calcified Cartilage เป็นกระดูกอ่อนที่มีเกลือแคลเซียมใน cartilage matrix ทำให้แข็งขึ้น
- (3) Elastic Cartilage เป็นกระดูกอ่อนที่มี elastic fiber ใน matrix พบในบริเวณที่งอได้ เช่น ใบบุ กล่องเสียง epiglottis และ Cartilage cell ที่ยังอ่อนอยู่ (chondroblast)

(4) Fibrocartilage ประกอบด้วย dense connective tissue และ cartilage พบที่บริเวณข้อต่อ และบริเวณที่กล้ามเนื้อและเอ็นต่อกัน (Anonymous, 2522: Bevan, 1995) Aigner และ Stove (2003) รายงานว่ากระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) มีองค์ประกอบหลักคือ น้ำ (70-80%) คอลลาเจน (15%) แอ็กกรีแคนหรือโปรตีโอไกลแคน (9%) เซลล์ (3%) และอื่นๆ (3%) ซึ่งประมาณ 80% ของคอลลาเจนในกระดูกอ่อนผิวข้อนี้เป็นคอลลาเจน type II และมีคอลลาเจนชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบอยู่เพียงเล็กน้อยคือ คอลลาเจน types III, VI, XII, XIV และ XVI (Figure 4) นอกจากนี้เป็นองค์ประกอบหลัก คอลลาเจนยังเป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของข้อและแนวทางการรักษาโรคข้ออักเสบ

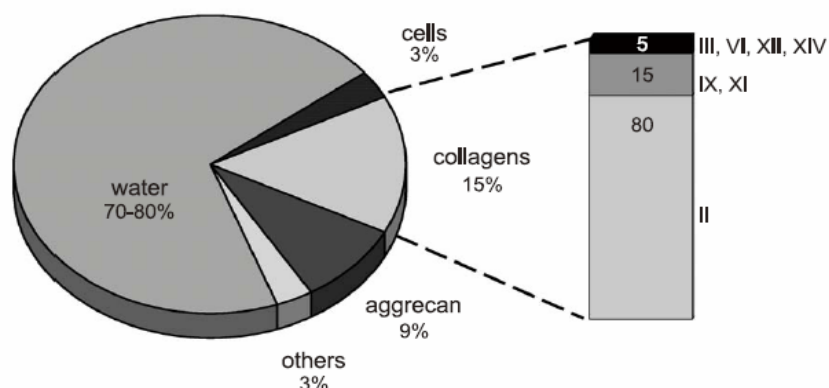


Figure 4. Schematic representation of the molecular composition of articular cartilage
ที่มา: Aigner และ Stove (2003)

องค์ประกอบหลักของ Cartilage matrix คือ คอลลาเจน (collagen Type II), กรดไฮแอลูโรนิก(Hyaluronic acid), และ โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) (Line et al, 1993) โดยสาร โปรตีโอไกลแคนเกิดจากการต่อเชื่อมของกลุ่มสารไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan: GAG) โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอนดรอยตินซัลเฟต (Chondroitin sulfate: CS) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ของหน่วยย่อย serine (Carney และ Muir, 1998) โปรตีโอไกลแคนจึงมีลักษณะเป็น โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ตรึงโครงข่ายเส้นใยของคอลลาเจน (Figure5) ทำหน้าที่ในการควบคุมแรงดันออสโมติกภายในกระดูกอ่อน และช่วยให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรงและยืดหยุ่น

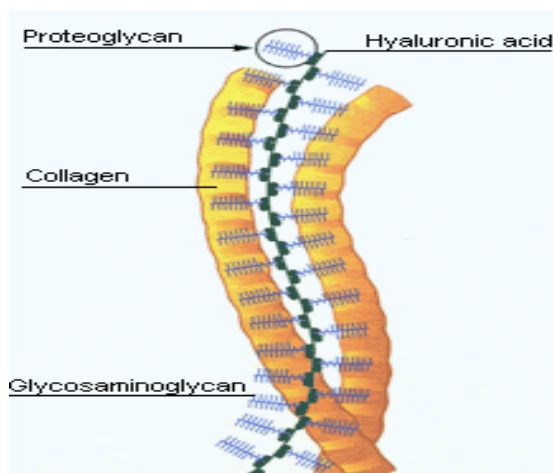


Figure 5. The main components of the cartilage
ที่มา: Pharmaceutical Information Associates, Ltd. (2007)

4. โครงสร้างและชนิดของคอนดรอยตินซัลเฟต (Chondroitin sulfate)

คอนดรอยตินซัลเฟตเป็นสารหลักในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคนนอกเหนือไปจาก เดอร์มาแทน(dermatan) เคอราแทน (keratin) และ เฮปาริน(heparan) ซัลเฟต คอนดรอยตินซัลเฟตมีลักษณะเป็นสายเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่แตกกิ่งก้าน (unbranched) ประกอบด้วย ไคแซ็กคาไรด์ของ N - acetyl - D - galactosamine และ D - glucuronic acid เรียงต่อกันด้วยพันธะ $\beta(1 - 3)$ และ $\beta(1 - 4)$ สลับกัน (Figure 6) เป็นสายยาวที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงกว้าง ขนาดโมเลกุลของมิวโคพอลิแซ็กคาริ์ไรด์หรือไกลโคซามิโนไกลแคนของสัตว์อยู่ในช่วง 30-800 KDa (Lagocka และคณะ, 1996) ในขณะที่ขนาดโมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตของผลิตภัณฑ์ทางการค้าอยู่ในช่วง 5-40 KDa (Petito และPetito, 2002; Bioiberica, 2008) โมเลกุลของคอนดรอยตินซัลเฟตมีความเป็นประจุลบสูงเนื่องจากมีหมู่ซัลเฟตมาก จึงมีสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี

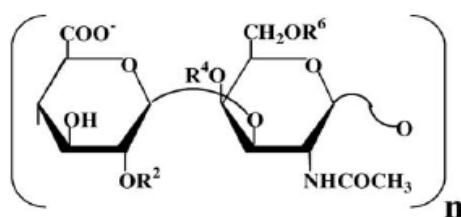


Figure 6. Basic structure of disaccharide unit of chondroitin sulfate

ที่มา: Sim และคณะ (2005)

คอนดรอยตินซัลเฟตมีหลายชนิดแตกต่างกันที่ตำแหน่งของหมู่ซัลเฟต ดังแสดงใน Table 2 คอนดรอยตินซัลเฟตโดยทั่วไปมีหมู่ซัลเฟต 1 หมู่ เช่นคอนดรอยตินซัลเฟต A มีหมู่ซัลเฟตจับกับ R-group ที่ C-4 ของ N-acetyl-D-galactosamine และคอนดรอยตินซัลเฟต C มีหมู่ซัลเฟตจับกับ R-group ที่ C-6 ของ N-acetyl-D-galactosamine สำหรับคอนดรอยตินที่มีหมู่ซัลเฟตมากกว่าหนึ่งมักพบในปริมาณน้อย เช่นคอนดรอยตินซัลเฟต D และ E ประกอบด้วย 2 หมู่ซัลเฟต โดยคอนดรอยตินซัลเฟต D มีหมู่ซัลเฟตจับกับ R-group ที่ C-6 ของ N-acetyl-D-galactosamine และที่ C-2 ของ D-glucuronic acid ในขณะที่คอนดรอยตินซัลเฟต E มีหมู่ซัลเฟตจับกับ R-group ที่ C-4 และ C-6 ของ N-acetyl-D-galactosamine ดังแสดงใน Figure 7 และ Table 2 เป็นต้น (Carney และ Muir, 1998; Sim และคณะ, 2007) ส่วนคอนดรอยตินซัลเฟต B เดิมเป็นชื่อใช้เรียกเดอร์มาแทนซัลเฟตแต่ปัจจุบันยกเลิกไปแล้ว

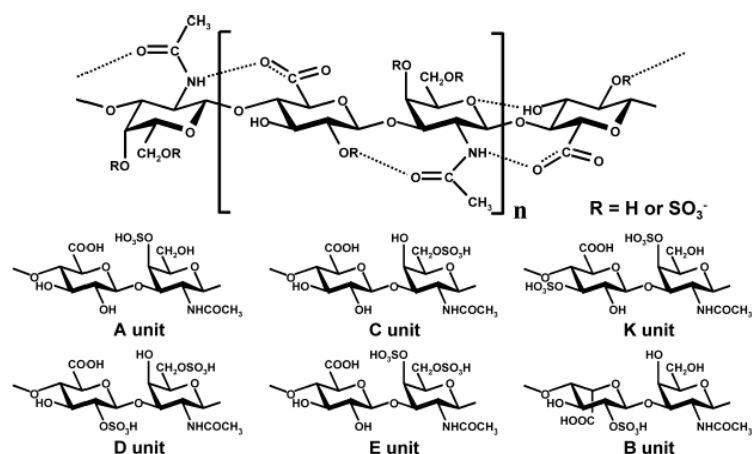


Figure 7. Chemical structure of various disaccharide units of chondroitin sulfate

ที่มา: Sakai และคณะ (2007)

Table 2 Compositional properties of CS disaccharides

Systematic name	R2	R4	R6
Δ Di-0S	H	H	H
Δ Di-4S	H	SO_3^-	H
Δ Di-6S	H	H	SO_3^-
Δ Di-2,6 diS	SO_3^-	H	SO_3^-
Δ Di-4,6 diS	H	SO_3^-	SO_3^-
Δ Di-2,4 diS	SO_3^-	SO_3^-	H
Δ Di-2,4,6 triS	SO_3^-	SO_3^-	SO_3^-

ที่มา: Sim และคณะ (2007)

CS อยู่ในกลุ่มสาร GAG ที่มีความหลากหลาย เนื่องจาก disaccharide ในโมเลกุลมี ปริมาณและจุดเชื่อมของ sulfate บนสาย Polysaccharide ที่แตกต่างกัน สัดส่วนองค์ประกอบของ disaccharides ของ CS แต่ละชนิดแตกต่างกันตามสายพันธุ์และแหล่งเนื้อเยื่อของสัตว์ มีการศึกษา พบว่าโครงสร้างของ CS ที่มาจากสัตว์บก เช่น โค และสุกร มี disaccharide ของ chondroitin-4-sulfate (Δ Di-4S) มากกว่า disaccharide ของ chondroitin-6-sulfate (Δ Di-6S) ในขณะที่โครงสร้าง ของ CS ที่มาจากปลาฉลามมีลักษณะตรงข้าม (Muccia และคณะ, 2000; Volpi, 2004) จากความ แตกต่างที่เป็นลักษณะจำเพาะดังกล่าว Sim และคณะ(2005) ศึกษาและรายงานผลการวิเคราะห์

ปริมาณ CS-disaccharides ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์กระดูกอ่อนฉลามผงเปรียบเทียบกับคอนครอยตินซัลเฟตมาตรฐานจากแหล่งต่างๆว่า CS จากกระดูกอ่อนฉลามประกอบด้วย Δ Di-6S, Δ Di-2,4diS และ Δ Di-2,6diS ในปริมาณสูง มีผลให้สัดส่วน Δ Di-4S ต่อ (Δ Di-6S + Δ Di-2,4diS + Δ Di-2,6diS) ต่ำกว่า CS ในกระดูกอ่อนจากสัตว์บกซึ่งมี disaccharide ของ CS กลุ่มดังกล่าวนี้ โดยค่า Δ Di-4S/(Δ Di-6S + Δ Di-2,4diS + Δ Di-2,6diS) ของ CS มาตรฐานจากหลอดลมโค คีรีบฉลาม และกระดูก เท่ากับ 1.13 0.19 และ 3.07 ตามลำดับ ล่าสุด Sakai และคณะ (2007) เสนอการระบุแหล่งของ CS โดยใช้ค่าสัดส่วน sulfate ion ต่อ galactosamine (GalN) ของคอนครอยตินซัลเฟต ซึ่งจากการศึกษาค่าดังกล่าวของคอนครอยตินซัลเฟตที่สกัดจากแหล่งต่างๆพบว่า คอนครอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนฉลามมีค่า sulfate ion/GalN มากกว่า 1 แต่หากเป็นคอนครอยตินซัลเฟตจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีค่าน้อยกว่า 1

5. คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนึ่งที่มีมากที่สุดในโครงสร้างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคิดเป็นประมาณร้อยละ 10 ของโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยทั่วไปพบมากในกล้ามเนื้อ เส้นเอ็น กระดูกอ่อน กระดูก เหงือก ฟัน ตา ผิวหนัง และหลอดเลือด

โครงสร้างพื้นฐานของคอลลาเจนคือโทรโปคอลลาเจน ซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 3 สาย (α chain) สายโซ่ทั้งสามพันเกลียวในลักษณะที่เรียกว่า triple helix แต่ละโซ่เป็นเกลียวชนิดวนซ้าย แล้วทั้ง 3 โซ่มาพันกันเป็นเกลียวขนาดใหญ่ชนิดวนขวาซึ่งเสถียรด้วยพันธะไฮโดรเจน มีความยาวประมาณ 2800 $^{\circ}$ A และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-15 $^{\circ}$ A (Figure 8) และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300,000 ดาลตัน (Foegeding และคณะ, 1996) การจัดเรียงตัวของโทรโปคอลลาเจนเป็นเส้นใยคอลลาเจนโดยการวางเหลื่อมกับอีกโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงประมาณ 1 ใน 4 ความยาว ดังแสดงใน Figure 9 ทำให้เกิดเป็นลายขวางบนเส้นใยคอลลาเจน เมื่อมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบของโทรโปคอลลาเจนมากขึ้น เส้นใยของคอลลาเจนมีความแข็งแรงมากขึ้น โดยพันธะโควาเลนต์ระหว่างสายเปปไทด์



Figure 8. Structure of tropocollagen

ที่มา: Chai (2005)



Figure 9. Tropocollagen molecule in collagen fibril

ที่มา: Buehler (2006)

เมื่อสัตว์มีอายุมากขึ้นคอลลาเจนจะเกิดการ cross link กันระหว่างโซ่โพลีเพปไทด์ของโทรโปคอลลาเจนมากขึ้น ทำให้ความเหนียวของเนื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามอายุ โดยทั่วไปพบว่าสัตว์ที่อายุน้อยกว่าจะมีคอลลาเจนในกล้ามเนื้อมากกว่าแต่คอลลาเจนของสัตว์ที่แก่กว่าจะมีการ cross link เกิดมากกว่า ซึ่งทำให้ยากต่อการละลาย (Fennema, 1985)

คอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลักที่สำคัญได้แก่ ไกลซีน (Glycine) ประมาณ 33% , โพรลีน (Proline) ประมาณ 12%, ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) ประมาณ 11% และ อะลานีน (Alanine) ประมาณ 11% แต่ไม่พบทริปโตเฟน (Tryptophan) (Pearson and Young, 1989; Xiong, 1997)

คอลลาเจนแบ่งออกได้อย่างน้อย 14 ชนิด ขึ้นกับแหล่งที่มา โดยชนิดที่พบบมากที่สุดคือ Type I Type II Type III และ Type IV คอลลาเจน Type I ประกอบด้วย α^1_2 สาย และ α^2_1 สาย [$\alpha^1(I)$]₂ [$\alpha^2(I)$] มักพบในส่วนของหนัง เอ็น กระดูก และกระดูกตา คอลลาเจน Type II ซึ่งมักพบในกระดูกอ่อนประกอบด้วย α^1_3 สาย [$\alpha^1(II)$]₃ ส่วนคอลลาเจน Type III มักพบในชั้นผิวหนังของตัวอ่อนและระบบหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งประกอบด้วย α^1_3 สาย [$\alpha^1(III)$]₃ และสำหรับ Type IV มักพบในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรนประกอบด้วย α^1_3 สาย [$\alpha^1(IV)$]₃ ดังแสดงใน Table 3

Table 3. Type and source of collagen

Type	peptide	Source
I	$\alpha^1(I)$ 2 chains, $\alpha^2(I)$ 1 chain	Skin, tendon and bone
II	$\alpha^1(II)$ 3 chains	Cartilage
III	$\alpha^1(III)$ 3 chains	Artery walls, skin, intestines and the uterus
IV	$\alpha^1(IV)$ 3 chains	Membrane tissue

ที่มา: Wong (1989)

6. คอนดรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนกับการบรรเทาอาการโรคกระดูกข้ออักเสบ

6.1 โรคกระดูกข้ออักเสบ

คือโรคที่เกิดจากการอักเสบภายในข้อ ซึ่งบางชนิดอาจลุกลามไปสร้างความอักเสบที่เนื้อเยื่อข้างเคียง เช่น กล้ามเนื้อ เอ็น และเอ็นยึดข้อ หรือบางรายเป็นกับผิวหนังและอวัยวะภายในด้วย สาเหตุของข้ออักเสบแต่ละแบบมีความไม่แน่นอน เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ จะมีเหตุปัจจัยมาทางพันธุกรรม ส่วนสาเหตุของข้ออักเสบอื่นๆ ยังอยู่ระหว่างการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง เช่น ปัจจัยสิ่งแวดล้อม อาหารบางประเภท เชื้อโรค เช่น ไวรัส แบคทีเรีย หรือเชื้อรา ความไม่สมดุลของเอนไซม์ในร่างกาย เป็นต้น ข้ออักเสบชนิดที่พบบ่อยมี 3 ชนิดคือ

6.1.1 ข้อเสื่อม (osteoarthritis: OA)

เป็นข้ออักเสบชนิดที่พบบ่อยที่สุด เป็นโรคเรื้อรัง โดยมักจะเริ่มเป็นตั้งแต่ช่วงวัยกลางคน สาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ความผิดปกติของโครงสร้างข้อต่อ หรือประวัติการบาดเจ็บ จะเป็นตัวเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดข้อเสื่อม ผู้ที่ไม่ค่อยออกกำลังกาย น้ำหนักเกิน หรือเป็นโรคทางพันธุกรรมบางอย่างจะเพิ่มความเสี่ยงด้วยเช่นกัน การอักเสบจะเกิดกับข้อไหนก็ได้ แต่ที่พบบ่อยมี 2 กลุ่มคือ ตามข้อเล็กๆ เช่น ข้อนิ้วมือ และข้อใหญ่ที่แบกน้ำหนัก เช่น ข้อกระดูกสันหลัง ข้อสะโพก ข้อเข่า การที่กระดูกปลายข้อมีการเสียดสีกันนานๆ ทำให้กระดูกอ่อนที่หุ้มปลายกระดูกบางลง ขณะเดียวกันก็กลายเป็นผิวขรุขระจากที่เคยเรียบเป็นมัน เมื่อเป็นมากเข้า ปลายกระดูกจึงเสียดสีกันเอง อีกสาเหตุปัจจัยหนึ่งคือ ความไม่สมดุลกันของเอนไซม์ภายในกระดูกอ่อน จนเป็นสาเหตุให้กระดูกอ่อนถูกทำลายในอัตราที่เร็วกว่าสร้างขึ้นใหม่ มีผลต่อการทำให้เกิดการระคายเคืองต่อกระดูกข้างเคียง จนเป็นตะปุ่มตะป่ำตามด้านข้างของท่อนกระดูกใกล้เคียง Figure 10 แสดงตัวอย่างลักษณะข้อเข่าเสื่อมอันเกิดจากการที่กระดูกอ่อนที่หุ้มปลายกระดูกข้อเสียหาย

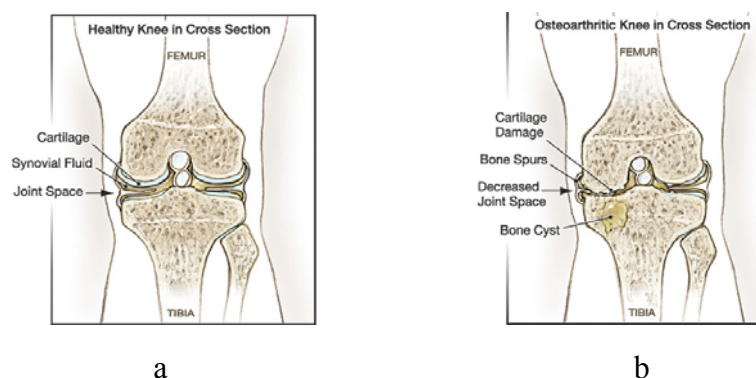


Figure 10 Characteristic of Knee cartilage, (a) Healthy knee (b) Osteoarthritic knee

ที่มา: Parmet (2003)

6.1.2 ข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis: RA)

โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์มักมีความรุนแรงกว่าข้ออักเสบชนิดอื่นๆ ในผู้ใหญ่ อาการที่เริ่มเป็นอาจไม่รุนแรงและไม่เกี่ยวข้องกับการใช้งานข้อนั้นๆ หรือการบาดเจ็บของข้อไม่เกี่ยวข้องกับการที่เริ่มเป็นนั้นๆ โรคนี้อาจเป็นตอนช่วงอายุใดก็ได้ มีสาเหตุจากการที่เยื่อหุ้มข้อ (synovial membrane) ซึ่งห่อหุ้มและหล่อลื่นข้อเกิดการอักเสบ ทำให้ปวดบวม หากการอักเสบยังคงอยู่ต่อไป จะมีสารเคมีหลังเข้ามาในข้อ เริ่มจากกระดูกอ่อน กระดูก เส้นเอ็น และเอ็นยึดข้อ ทำให้ข้อและกล้ามเนื้อโดยรวมอ่อนแอลงจนในที่สุดข้อต่อเสื่อมทั้งหมด

6.1.3 ข้ออักเสบเก๊าท์ (Gouty Arthritis: GA)

เป็นการอักเสบของข้อที่เกิดจากการตกตะกอนเป็นผลึกของกรดยูริกที่ข้อนั้นๆ เนื่องจาก ร่างกายไม่สามารถทำลายกรดยูริกทิ้งได้

นอกจากนี้ยังมีโรคข้ออักเสบแบบอื่นๆ อีกมาก เช่น ข้อติดเชื้อ สเคลอโรเดอมา (Scleroderma), Poly myositis, Ankylosing Spondylitis, Polymyaegei Rhoumatica หรือ Giant cell arteritis เป็นต้น

6.2 การรักษาอาการโรคข้ออักเสบ

สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับสาเหตุและระดับความรุนแรงของโรค เช่น

6.2.1 การนวด แต่ต้องไม่นวดขณะที่มีอาการปวด บวมอยู่

6.2.2 การออกกำลังกายเช่น โยคะ หรือ การเดิน

6.2.3 การใช้ยาบำบัดโรคข้ออักเสบ ยาหลักคือ ยาบรรเทาปวดและลดการอักเสบได้เช่น

- พาราเซตามอล ทรามาดอล

- ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroid anti-inflammatory drug หรือ NSAID) เช่น แอสไพริน ไอบูโพรเฟน ยายับยั้ง COX-2 เป็นยากลุ่มสำคัญเพราะว่าออกฤทธิ์ยับยั้งตอนอักเสบของข้อซึ่งนำไปสู่อาการปวด ปัญหาของยากลุ่มนี้คือยาก่อให้เกิดการระคายเคืองของเยื่อบุกระเพาะอาหารจนเกิดแผลและเสียเลือดได้มากๆ ในประเทศอังกฤษพบว่าร้อยละ 45 ของคนที่ใช้ยานี้จะมีอาการข้างเคียงและเพิ่มเป็น 75% ในผู้ป่วยอายุ 65 ปีขึ้นไปโรคแทรกซ้อนจา

- สเตียรอยด์ (Steroid) โรคแทรกซ้อนจากการใช้สเตียรอยด์นานๆ ก็คือทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนและอื่นๆ อีก

6.2.4 การรับประทานอาหารเสริม โดยผลิตภัณฑ์ที่มักใช้สำหรับคนที่เป็โรคข้ออักเสบมี 2 ชนิดคือคอนดรอยตินซัลเฟต และกลูโคซามีน

- คอนดรอยตินซัลเฟต พบในกระดูกอ่อนของสัตว์ มีฤทธิ์เสริมยา NSAID Leeb และคณะ(2000) รายงานว่าคอนดรอยตินซัลเฟตสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์อีลาสเตสซึ่งย่อยทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ เอนไซม์นี้สร้างขึ้นโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยที่มีอาการของโรคข้ออักเสบ เมื่อผู้ป่วยได้รับยาที่มี คอนดรอยตินซัลเฟตจึงสามารถลดการเสียหายของกระดูกอ่อน โดยพบว่าคอนดรอยตินซัลเฟตช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดแผลที่กระเพาะและลำไส้ ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากผลข้างเคียงของการใช้ยา NSAID อย่างไรก็ตามคอนดรอยตินซัลเฟตออกฤทธิ์ช้ากว่า NSAID (Foot and Mullholland, 2005)

ในยุโรปมีการใช้คอนดรอยตินซัลเฟตบรรเทาอาการข้ออักเสบมานานกว่า 10 ปี แต่ประเทศสหรัฐอเมริกาโดยคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) ยังไม่ผ่านกฎหมายอนุญาตให้ใช้คอนดรอยตินซัลเฟตเป็นยารักษาโรค แต่อนุญาตให้ใช้ร่วมกับกรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารให้ความยืดหยุ่น (viscoelastic agent) ในการผ่าตัดต่อกระดูกได้

Verges (2000) รวบรวมผลการใช้คอนดรอยตินซัลเฟตจากการศึกษาที่ต่างๆ ไว้ดังนี้

1. ทำให้ผู้ป่วยลดปริมาณการใช้ยา NSAID หรือยาแก้ปวดอื่นๆลงได้
2. ให้ผลต่อการลดอาการปวดยาวนานถึง 3 เดือน หลังได้รับยา
3. ทำให้ผู้ป่วยเคลื่อนไหวได้สะดวกขึ้น
4. ลดอาการบวมแดง
5. ลดปริมาณของเหลวในข้อกระดูก
6. ทำให้เดินได้คล่องขึ้น
7. ทำให้พัฒนาการของโรคช้าลง

ส่วนใหญ่ของรายงานการศึกษาใช้ คอนดรอยตินซัลเฟตที่ผลิตจากแหล่งวัตถุดิบ เช่นกระดูกอ่อนหลอดลมวัว กระดูกอ่อนส่วนหูและจมูกหมู กระดูกอ่อนปลาฉลามและปลาวาฬ คอนดรอยตินซัลเฟต ที่รับประทานจะถูกดูดซึมที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (Ronca และ Conte, 1993) พวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะถูกดูดซึมได้ดีกว่าพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ปริมาณที่แนะนำคือ 1200 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งเป็น 3 มื้อ และอาจใช้ร่วมกับ glucosamine ผลของการรักษาอาการจะเห็นได้หลังจากรับประทานเป็นเวลาหลายสัปดาห์ ข้อดีของ คอนดรอยตินซัลเฟตคือยังไม่มีรายงานการเกิดอาการผิดปกติจากรับประทานในปริมาณมากเกินกำหนด

- กลูโคซามีน กลูโคซามีนเกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกอ่อนโดยการเป็นสารตั้งต้นของ disaccharide ใน GAG ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอะกรีแคนและช่วยซ่อมแซมกระดูกอ่อน ช่วยลดอาการอักเสบของข้อ คล้ายยาในกลุ่ม NSAID ที่ไม่กักระเพาะอาหาร สารนี้พบในร่างกายตาม

ธรรมชาติ และเชื่อว่ามิมีบทบาทในการซ่อมแซมกระดูกอ่อน ส่วนในอาหารจะพบได้ในเปลือกกุ้ง ปู และกุ้งก้ามกราม

มีการทดลองใช้กลูโคซามีนร่วมกับการใช้คอนดรอยตินซัลเฟตในหลอดทดลอง พบว่ากลูโคซามีนจะไปเร่งให้ เซลล์ของกระดูกอ่อน(chondrocytes) เพิ่มการผลิตไกลโคซามิโนไกลแคนและโปรตีโอไกลแคน ส่วนคอนดรอยตินซัลเฟตไปยับยั้งเอนไซม์ที่ทำลายกระดูกอ่อน สำหรับการใส่สารทั้งสองร่วมกันจะให้ผลในการรักษาที่ส่งเสริมกัน โดยพบว่าการรับประทานร่วมกันจะเพิ่ม $^{35}\text{SO}_4$ ในไกลโคซามิโนไกลแคนร้อยละ 96.6 ขณะที่การรับประทานกลูโคซามีนหรือคอนดรอยตินอย่างเดียวสามารถเพิ่มได้ร้อยละ 32 (Hungerford และคณะ, 2003)

สำหรับการใช้คอลลาเจนในการบรรเทาอาการ โรคข้ออักเสบทางการแพทย์นั้น เนื่องจาก 30-40% ของโปรตีนในร่างกายมนุษย์เป็นคอลลาเจน ทำหน้าที่ช่วยให้แข็งแรงและมีความยืดหยุ่นดี โดยเฉพาะเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนบริเวณข้อช่วยการรับน้ำหนักและการเคลื่อนไหวหรือขยับไปมาได้อย่างปกติทั่วไป อย่างไรก็ตามระดับปริมาณคอลลาเจนในร่างกายจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น เมื่อระดับคอลลาเจนลดลงจะทำให้ความยืดหยุ่นและสภาพความแข็งแรงของอวัยวะต่างๆของร่างกายลดลงด้วย ช่วงที่ปริมาณคอลลาเจนมีการเปลี่ยนแปลง ร่างกายจะสูญเสียความแข็งแรงของผิวหนัง กระดูก และกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อซึ่งเป็นสาเหตุของปัญหาโรคข้อเสื่อมตามมา มีการศึกษาพบว่ารับประทานคอลลาเจนไฮโดรไลสเสทซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนสัตว์ในปริมาณวันละ 10 กรัมเป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือนขึ้นไป จะช่วยทดแทนเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนและกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์คอลลาเจน type II ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในกระดูกอ่อนในข้อต่อเพิ่มขึ้น มีผลให้อาการปวดข้อและข้อยึดติดน้อยลงเมื่อรับประทานคอลลาเจนติดต่อกันนานตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป (ประวิทย์ ตันติสุวิทกุล, 2549)

6.2.5 การผ่าตัด เป็นทางเลือกสุดท้ายของการรักษา ในกรณีที่โรคข้ออักเสบดำเนินไปนานจนอาจไม่ตอบสนองต่อยาและมาตรการต่างๆข้างต้น(ชุมศักดิ์ พุกษาพงษ์, 2541; ชุมศักดิ์ พุกษาพงษ์, 2547)

7. แหล่งและปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตในอุตสาหกรรม

ปัจจุบันมีการผลิตคอนดรอยตินซัลเฟตทางการค้าโดยใช้กระดูกอ่อนของสัตว์ เช่น ครีบบปลาดูแลม หลอดลมวัว หูและจมูกสุกร เป็นวัตถุดิบ โดยผลิตภัณฑ์อาจอยู่ในรูปกระดูกอ่อนบดละเอียดหรือสารสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต กรณีผลิตภัณฑ์จากครีบบปลาดูแลมมักเป็นการนำกระดูกอ่อนครีบบปลาดูแลมมาบดละเอียดได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่อุดมไปด้วยธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส สารไกลโคซามิโนไกลแคน และสารมิวโคพอลิแซคคาไรด์ (วารสารยา, 2546) ที่ใช้เป็นอาหารเสริม

ทั้งในรูปแบบเซลล์ที่เคลื่อนด้วยเจลาคตินหรืออัดเป็นเม็ดและในลักษณะของเหลว ปัจจุบันการผลิตผลิตภัณฑ์ข้างต้นประสบปัญหาเกี่ยวกับแหล่งวัตถุดิบ กล่าวคือ กระจุกอ่อนจากครีบบปลาคลามนั้นหายากขึ้นจากปัญหาในเรื่องการสูญพันธุ์จึงมีราคาแพง ส่วนกระจุกอ่อนจากสุกรนั้นมีข้อจำกัดทางศาสนา สำหรับกระจุกอ่อนของโคมีปัญหาความกังวลของผู้บริโภคในโรควัวบ้า ดังนั้นจึงได้มีผู้ทำการศึกษาหาวัสดุจากโรงงานอุตสาหกรรมสัตว์ชนิดอื่นๆที่มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของคอนดรอยตินซัลเฟตมาเป็นทางเลือกหรือใช้ทดแทน

วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ และอรุณี อิงคากุล (2548) ได้ศึกษาปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟต ในวัตถุดิบที่เหลือใช้จากการแปรรูปสัตว์น้ำ พบว่าประเทศไทยมีกระจุกอ่อนครีบบปลาคลาม กระจุกอ่อนปลาคลาม และปลากระเบน รวมทั้งกระจุกอ่อนจากซากจระเข้ในปริมาณมาก ซึ่งอาจใช้เป็นแหล่งของสารคอนดรอยตินซัลเฟต การศึกษาปริมาณผลผลิตกระจุกอ่อนจากตัวอย่างปลาคลาม(โรนัน) พบว่ามีกระจุกอ่อนเท่ากับร้อยละ 12.2 ต่อน้ำหนักปลาทั้งตัว ในส่วนครีบบปลาคลามโรนันมีกระจุกอ่อนเท่ากับ 21.6-23 กรัม ต่อครีบบ 100 กรัม สำหรับปลากระเบนหรือปลากระเบนปากแหลมพบว่ามีกระจุกอ่อนเฉลี่ยร้อยละ 10.2 ของน้ำหนักปลาสดทั้งตัว นอกจากนี้ยังพบว่าโครงกระดูกจระเข้ที่มีน้ำหนัก 20-25 กิโลกรัมประกอบด้วยกระจุกอ่อนในบริเวณต่างๆ คือ สันนอก หลอดลม โคนลิ้น และส่วนปลายข้อต่อรวมทั้งส่วนปลายกระดูกเชิงกราน และกระดูกซี่โครง เป็นสัดส่วนร้อยละ 0.6 ของน้ำหนักจระเข้ทั้งตัว โดยแยกเป็นกระจุกอ่อนจากสันนอกและซี่โครงเท่ากับ 0.47 กระจุกอ่อนจากหลอดลมและกระจุกอ่อนโคนลิ้นเท่ากับ 0.13 (Table 4)

Table 4. Cartilage content from shark, ray and crocodile

Type	Weight (g)	% Cartilage(per weight of animal)
Shark	750	12.2
Ray	1,250	10.2
Crocodile	22,500	0.6

ที่มา: วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษและอรุณี อิงคากุล (2548)

7.1 ปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตในกระจุกอ่อน

Garnjanakoonchorn และคณะ (2006) ได้ศึกษาปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตจากกระจุกอ่อนครีบบปลาคลาม กระจุกอ่อนกระเบนและจระเข้ส่วนสันนอก โคนลิ้น หลอดลม และซี่โครงอ่อน ที่สกัดโดยเอนไซม์ปาเปนและตรวจวิเคราะห์ปริมาณโดย sulfated GAG assay ผลการทดลองพบว่าปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตในสารสกัดที่วิเคราะห์โดยใช้ Chondroitin-4-sulfate และ

Chondroitin-6-sulfate เป็นสารมาตรฐาน มีค่าน้อยกว่าน้ำหนักของคอนดรอยตินซัลเฟตที่สกัดได้ ซึ่งอาจเกิดจากยังมีไกลโคสอะมิโนไกลแคนชนิดอื่นๆ หรือคอนดรอยตินชนิดอื่นปนอยู่ด้วย หรือไกลโคสอะมิโนไกลแคนต่างชนิดกันมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับสีย้อม Dimethylmethylene blue ได้ไม่เท่ากัน และไกลโคสอะมิโนไกลแคนชนิดที่ไม่มีหมู่ซัลเฟตหรือกรดไฮยาโลโรนิกที่อาจละลายออกไปกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ไม่หมด ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสีย้อม Dimethylmethylene blue ได้ จึงทำให้ปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตมีปริมาณน้อยกว่าของแข็งในสารสกัด อย่างไรก็ตามปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟตในกระดูกอ่อนที่วิเคราะห์ได้ (Table 5) มีปริมาณ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้คือ กระดูกอ่อนจระเข้ส่วนโคนลิ้น สันอก ครีบน้ำม กระดูกอ่อนจระเข้ส่วนหลอดลมและซี่โครงอ่อน กระดูกอ่อนกระเบนตามลำดับ ผลการทดลองบ่งชี้ว่ากระดูกอ่อนจระเข้ส่วนโคนลิ้นและ สันอกมีศักยภาพการเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารคอนดอยตินซัลเฟตสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ

Table 5. Percentage and type of chondroitin sulfate (CS) in cartilage from shark fin, ray and crocodile by sulfate GAGs assay

Source of cartilage	Yield of CS extract (% dry wt)	Percentage of CS	
		X ^a	Y ^b
Shark fin	13.42±0.19	9.60±1.05	8.76±0.96
Ray	6.69±1.14	5.27±0.91	4.81±0.84
Crocodile			
- Sternum	18.31±0.96	11.55±0.88	10.54±0.80
- Hyoid	24.78±1.53	14.84±0.38	13.54±0.35
- Trachea	13.45±1.78	9.51±1.99	8.68±1.81
- Rib	8.17±0.90	5.56±0.96	5.08±0.87

^a Chondroitin-4-sulfate (CS A) was used as standard

^b Chondroitin-6-sulfate (CS C) was used as standard

ที่มา: ดัดแปลงจากวรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษและอรุณี อิงกากุล (2548) ; Garnjanagoonchorn และคณะ (2006)

7.2 ปริมาณและสมบัติคอนครอยตินซัลเฟต (CS) ในผลิตภัณฑ์

Sim และคณะ(2007) ได้ทำการศึกษาปริมาณและชนิดของ CS ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ(nutraceutical supplements) กระดูกอ่อนฉลามผง(shark cartilage powder products: SCPs) 8 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป(finish products) ที่มีกระดูกอ่อนฉลามผงเป็นองค์ประกอบ 7 ตัวอย่างจากตลาดของประเทศเกาหลีเพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ระบุบนฉลากของผลิตภัณฑ์นั้นๆ พบว่าปริมาณ CS ในผลิตภัณฑ์กระดูกอ่อนฉลามทั้งหมด มีค่าอยู่ในช่วง 0% - 28.92 % (Table 6) โดยมี 2 ตัวอย่าง (AและB) เท่านั้นที่มีปริมาณ CS มากกว่า 20% ตัวอย่างอื่นมีปริมาณ CS ต่ำกว่า 20% (12 -18 % ในตัวอย่าง D และ E ส่วนตัวอย่าง F G และH มีปริมาณ CS น้อยกว่า 5% และตรวจไม่พบ CS ในตัวอย่าง C) นอกจากนั้นปริมาณสัดส่วน $\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$ (0.26-0.56) ของ CS ในตัวอย่าง ยังระบุว่าทุกตัวอย่างมาจากกระดูกอ่อนฉลาม ยกเว้นตัวอย่าง D ซึ่งมีค่าสัดส่วนดังกล่าว เท่ากับ 1.53

สำหรับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป พบว่ามีปริมาณ CS ในช่วง 0.58-21.3% โดยตัวอย่าง D และ F เท่านั้นที่มีปริมาณ CS มากกว่า 5% ส่วนตัวอย่างอื่นมีปริมาณ CS เพียงเล็กน้อย (Table 7) โดยทั้ง 7 ตัวอย่างผลิตจากกระดูกอ่อนฉลาม (สัดส่วน $\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$ ของ CS มีค่า 0.13-0.37) นอกจากนั้นจะเห็นว่าข้อมูลปริมาณ CS ของตัวอย่าง ASC ซึ่งเป็นกระดูกอ่อนฉลามมาตรฐานเท่ากับ 13.37 ± 0.09 แต่ตัวอย่าง F ซึ่งประกอบด้วยกระดูกอ่อนฉลาม 60% มีปริมาณ CS สูงถึง 21.30 ± 0.08 จึงบ่งชี้ว่าอาจมีการเติมสารสกัดคอนครอยตินซัลเฟตในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปดังกล่าว

นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่11) พบว่าโมเลกุลของ CS ใน SCPs และในผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปมีขนาดไม่ต่ำกว่า 15 KDa โดยส่วนใหญ่มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 40 KDa อย่างไรก็ตามปริมาณองค์ประกอบของตัวอย่าง (Table 8) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและเถ้าของตัวอย่างมีความแตกต่างกันสูง และไม่สัมพันธ์กับปริมาณ CS ของตัวอย่าง

Table 6. Characteristics of CS in SCPs on the basis of CS content (%), $\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$ and source

SCPs	Type	CS (%)	$\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$	Source
A	SCWE	28.92±0.03	0.49	Shark cartilage
B	SCWE	26.36±0.12	0.54	Shark cartilage
C	RM	0	-	Shark cartilage
D	SCWE	12.85±0.02	1.53	Bovine trachea
E	SCWE	18.36±0.13	0.56	Shark cartilage
F	RM	0.86±0.03	0.26	Shark cartilage
G	RM	2.33±0.01	0.32	Shark cartilage
H	RM	2.74±0.02	0.41	Shark cartilage

SCWE: shark cartilage water extract

RM: raw material of SCP containing non-soluble component

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sim และคณะ (2007)

Table 7. Characteristics of CS in finished products on the basis of CS content (%), $\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$ and source

Products	% SC Composition	% Final CS	$\Delta\text{Di-4S}/(\Delta\text{Di-6S} + \Delta\text{Di-diSs})$	Source
A	100	0.62±0.01	0.14	Shark cartilage
B	64.83	3.67±0.04 ^a	0.15	Shark cartilage
C	100	0.58±0.01	0.14	Shark cartilage
D	100	5.98±0.05	0.34	Shark cartilage
E	100	2.17±0.02	0.22	Shark cartilage
F	60	21.30±0.08 ^b	0.37	Shark cartilage
G	100	1.23±0.04	0.13	Shark cartilage
ASC ^a	100	13.37±0.09	0.46	Shark cartilage

ASC: Authentic shark cartilage

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sim และคณะ(2007)

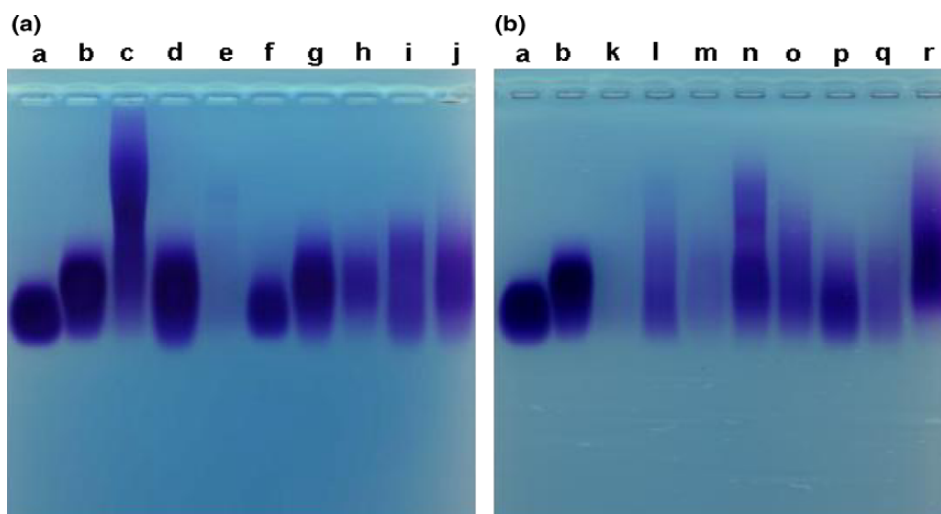


Figure 11. Agarose gel-electrophoresis: 300 μ l of (a) water-soluble fraction in SCPs; (b) water-soluble fraction in FPs. Lane a, Seikagaku CS (15 kDa); lane b, Seikagaku CS (40 kDa); lane c, SCP A; lane d, SCP B; lane e, SCP C; lane f, SCP D; lane g, SCP E; lane h, SCP F; lane i, SCP G; lane j, SCP H; lane k, FP A; lane l, FP B; lane m, FP C; lane n, FP D; lane o, FP E; lane p, FP F; lane q, FP G; lane r, all samples were loaded onto 1.0% agarose gel

ที่มา: Sim และคณะ (2007)

Table 8. Proximate composition of shark cartilage powder products (SCP) and finished products (FP)

Samples	Content (%)				
	Moisture	Protein	Fat	Ash	Carbohydrate
SCP B	4.49 \pm 0.08	18.29 \pm 0.12	4.49 \pm 0.62	3.16 \pm 0.06	69.57 \pm 0.72
SCP C	6.08 \pm 0.09	52.37 \pm 0.26	0.91 \pm 0.05	10.57 \pm 0.46	30.07 \pm 0.68
SCP D	6.77 \pm 0.16	63.92 \pm 0.16	1.27 \pm 0.08	8.51 \pm 0.07	19.53 \pm 0.15
FP B	9.77 \pm 0.10	32.50 \pm 1.78	4.43 \pm 0.17	48.05 \pm 0.28	5.25 \pm 1.77
FP F	4.95 \pm 0.18	60.88 \pm 0.18	1.07 \pm 0.11	11.70 \pm 0.11	21.40 \pm 0.15
FP G	2.59 \pm 0.22	59.89 \pm 0.30	0.76 \pm 0.01	17.93 \pm 0.06	18.83 \pm 0.45
ASC	3.82 \pm 0.22	25.03 \pm 1.31	0.50 \pm 0.06	41.31 \pm 0.11	29.34 \pm 1.37

ASC: authentic shark cartilage from *Squatina oculata*.

ที่มา: Sim และคณะ (2007)

8. การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตหรือคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบ

โดยทั่วไปในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตหรือคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักนั้นประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

8.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบจากแหล่งต่างๆที่ใช้เป็นมีโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจน ไชมัน และแร่ธาตุต่างๆโดยเฉพาะอย่างยิ่ง แคลเซียมเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีคอลลาเจนหรือคอนครอยตินซัลเฟตเป็นส่วนประกอบหลัก จึงจำเป็นต้องกำจัดองค์ประกอบอื่นที่ไม่ต้องการออกจากวัตถุดิบให้มากที่สุด

8.1.1 การกำจัดโปรตีนอื่นๆและไขมันออกจากวัตถุดิบ

Boles และคณะ (1999) ศึกษาถึงการสกัดโปรตีนจากกระดูกวัวโดยใช้สารละลาย 4 ชนิดได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 4 ร่วมกับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (STP) ร้อยละ 0.3 เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (TTP) ร้อยละ 0.3 หรือ 0.05 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่อุณหภูมิ 4°C เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการใช้ NaCl ร่วมกับฟอสเฟตหรือ NaOH มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนมากกว่าการ NaCl อย่างเดียว โดยฟอสเฟตจะทำให้เกิดการฟองตัวของโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนละลายดีในสารละลายเกลือ

Herbage และคณะ (1977) ศึกษาถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพของคอลลาเจน Type II จากกระดูกอ่อนบริเวณข้อเข่าของวัวที่สกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้มีการทดลองกำจัดโปรตีนโอไกลแคนออกจากกระดูกอ่อนโดยใช้สารละลาย 4 ชนิดคือ 4 M guanidinium chloride (ใน 0.05M-sodium acetate pH5.8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4°C), 1.5M CaCl₂ pH 5.5 (เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 20°C), 0.2M NaOH (เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 4°C) และ Trypsin ร่วมกับ EDTA พบว่าการใช้สารละลาย NaOH สามารถสกัดโปรตีนโอไกลแคนออกจากกระดูกอ่อนข้อเข่าของวัวได้มากที่สุด

Bonifer และ Froning (1996) ศึกษาเปรียบเทียบผลการล้างหนังไก่ด้วย 0.1 M NaCl พีเอช 7 กับการใช้ 0.5 M NaHCO₃ พีเอช 8.4 โดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายเท่ากับ 1:3 กวนที่ความเร็วรอบ 800g เวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 5°C เพื่อกำจัดไขมันและโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ พบว่าหนังไก่ ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายดังกล่าวมีปริมาณไขมันลดลงประมาณร้อยละ 59 แต่มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยการล้างด้วย NaHCO₃ จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันสูงกว่า การใช้ 0.1 M NaCl ถึงร้อยละ 10.66

8.1.2 การกำจัดแคลเซียม

โดยทั่วไปการใช้กรดแก่ จะสามารถกำจัดแคลเซียมออกจากกระดูกได้มาก แต่การใช้กรดมักเป็นสาเหตุให้รูปแบบของคอลลาเจนเสียไป การใช้ EDTA (ethylene-diamine tetraacetic acid) ซึ่งเป็นสารพวก tetradentate chelating agent มีคุณสมบัติในการกำจัดแคลเซียมจากกระดูก ในรูปของ calcium disodium edentate โดยแคลเซียมจะไปจับกับส่วนที่เป็น anionic ในสภาวะที่ pH เป็นกลาง อย่างไรก็ตาม EDTA สามารถกำจัดแคลเซียมออกจากกระดูกได้ช้า Kiviranta และคณะ (1980) ศึกษาการสกัดแคลเซียมออกจากกระดูกต้นขา หน้าแข้ง และกระดูกต้นแขนของกระต่ายอายุ 2-3 เดือน ด้วย EDTA เปรียบเทียบกับ acidic buffer (2.39 M K formate/formic acid, pH 3.15 และ 2.40 M Na lactate/lactic acid, pH 3.70) และ New Decale โดยได้ทดลองนำกระดูกกระต่ายความหนา 300 μm -2 mm มาแช่ในสารละลาย EDTA (4.8 และ 15%) ปริมาตรต่างๆ (5, 15, 50 และ 100 ml) ที่อุณหภูมิ 4, 20, 37 และ 60°C พีเอช 5.0, 7.4, 8.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง, 3, 5 และ 7 วัน พบว่าสารละลาย EDTA เข้มข้น 15% มีอัตราการสกัดแคลเซียมเร็วกว่าความเข้มข้นที่ 4 และ 8% ที่อุณหภูมิ 37°C และ 60°C สามารถกำจัดแคลเซียมได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 4°C และ 20°C และที่พีเอช 7.4 นั้นจะมีอัตราการกำจัดแคลเซียมต่ำกว่าที่พีเอช 5.0 และ 8.5 แต่การกวนและปริมาตรของสารละลาย EDTA ไม่มีผลต่ออัตราการกำจัดแคลเซียม นอกจากนี้พบว่าการใช้ acidic buffer และ New Decale มีอัตราการกำจัดแคลเซียมได้สูงกว่า EDTA

Kittiphattanabawon (2004) ศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังและกระดูกปลาตาหวาน โดยมีขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุออกจากกระดูกปลาตาหวานโดยการใช้ citric acid และ HCl ในระดับความเข้มข้น 0.6 และ 1.2 M เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง และตรวจวัดปริมาณเถ้าหลังจากกำจัดแร่ธาตุออกจากกระดูก พบว่าการใช้สารละลาย HCl เข้มข้น 1.2 M สามารถกำจัดแร่ธาตุออกได้มากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แต่การใช้สารละลาย HCl เข้มข้น 1.2 M จะทำให้รูปแบบเปปไทด์ของเจลาตินที่สกัดได้เสียไป ดังนั้น HCl เข้มข้น 0.6 M เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ citric acid เข้มข้น 1.2 M เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดแร่ธาตุมากที่สุด

8.2 ขั้นตอนการสกัดแยกคอลลาเจนและคอนดรอยตินซัลเฟต

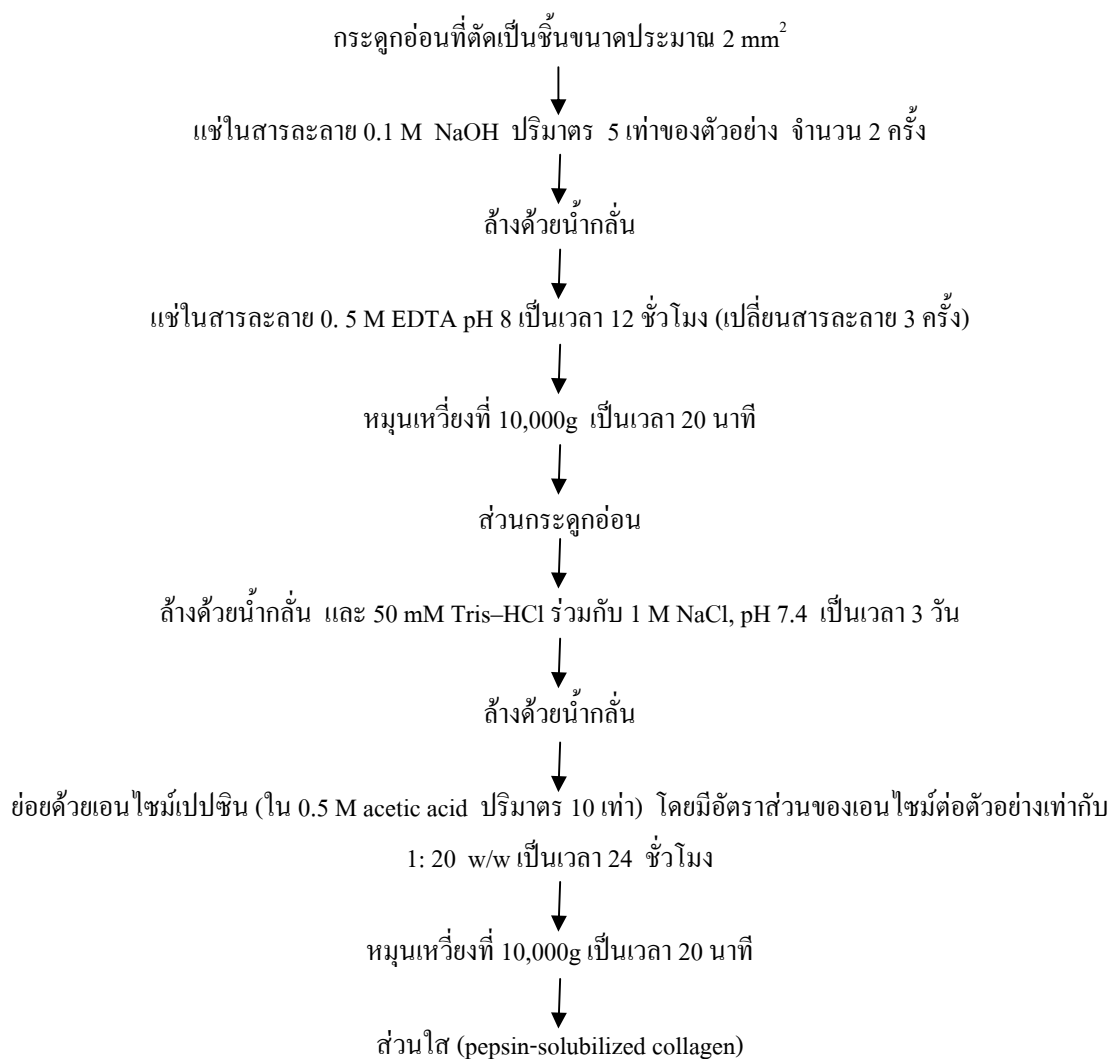
การย่อยคอลลาเจนและคอนดรอยตินซัลเฟตจากโครงสร้างกระดูกอ่อนเพื่อให้ขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนและคอนดรอยตินซัลเฟตอยู่ในรูปอิสระสามารถถูกดูดซึมที่กระเพาะอาหารได้ง่าย ซึ่งมีการศึกษาขั้นตอนและสภาวะในการสกัดคอลลาเจนและคอนดรอยตินซัลเฟต ดังต่อไปนี้

Herbage และคณะ (1977) ศึกษาถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพของคอลลาเจน Type II ที่สกัดด้วยเอนไซม์เปปซิน จากกระดูกอ่อนข้อเข่าของวัว โดยทดลอง

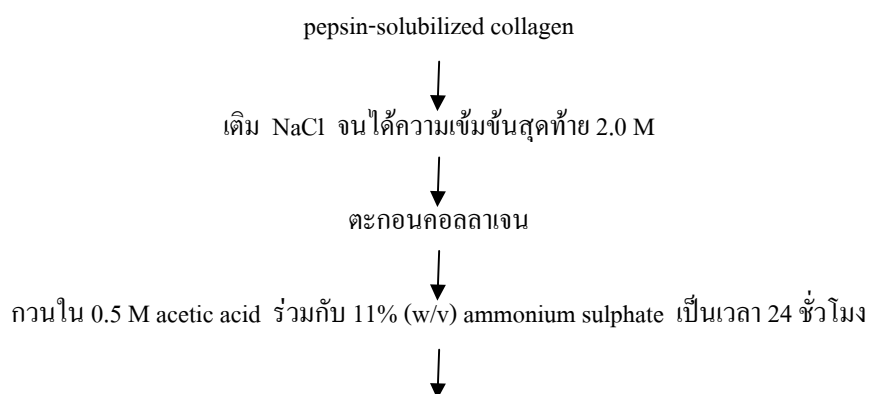
เปรียบเทียบวิธีที่มีการกำจัด (ด้วย 0.2M NaOH) และไม่กำจัดโปรตีนโกลบูลินออกจากกระดูกอ่อนก่อนการสกัดคอลลาเจนโดยใช้สารละลายเปปซิน(ใน 0.5 M acetic acid) โดยมีอัตราส่วนของคอลลาเจนต่อเอนไซม์เปปซิน 10:1 (w/w) กวนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20°C พบว่ากระดูกที่ไม่ผ่านการสกัดโปรตีนโกลบูลินออกก่อนนำมาสกัดคอลลาเจนจะไม่สามารถสกัดคอลลาเจนจากกระดูกได้ ในขณะที่การใช้ 0.2 M NaOH สามารถสกัดโปรตีนโกลบูลินออกได้ มีผลให้สามารถสกัดคอลลาเจนได้สูงสุด(80-95%)

Mizuta และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาชนิดของคอลลาเจนจากกระดูกอ่อนของครีป Skate (*Raja kenoei*) โดยทำการสกัดด้วยเอนไซม์เปปซินและแยกคอลลาเจน แต่ละชนิดออก โดยการตกตะกอนที่ความเข้มข้นเกลือต่างๆ ดังแสดงขั้นตอนใน Figure 12 ก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วย phosphocellulose column chromatography จากนั้นศึกษาชนิดของคอลลาเจนที่แยกได้ พบว่ากระดูกอ่อนของครีปปลา skate มีคอลลาเจนประมาณ 1.7 และ 31.1% ของตัวอย่างสดและแห้งตามลำดับ โดยคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักคือคอลลาเจน type I, type II และมีคอลลาเจน type XI ในปริมาณเล็กน้อย

ขั้นตอนการเตรียมกระดูกอ่อนและสกัดคอลลาเจนด้วยเอนไซม์เปปซิน



ขั้นตอนแยกคอลลาเจนแต่ละชนิด



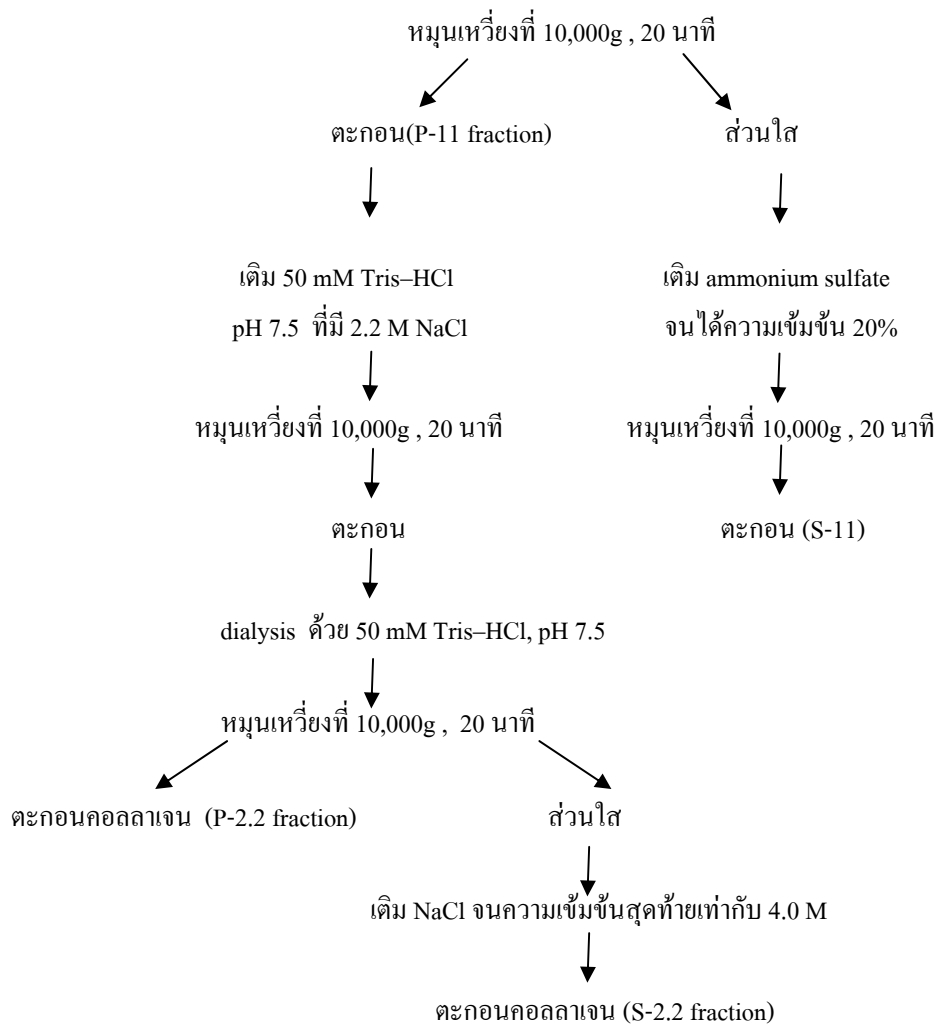


Figure 12. Extraction and separation process of collagen from Skate cartilage
ที่มา: ดัดแปลงจาก Mizuta และคณะ (2003)

โดย พบว่า P-2.2 fraction และ S-2.2 fraction เป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจนในกระดูกอ่อนครีป Skate โดยประกอบด้วยคอลลาเจน type I และ II ตามลำดับ ส่วน S-11 fraction เป็นองค์ประกอบส่วนน้อยที่ประกอบด้วยคอลลาเจน type XI

วิธีการผลิตคอนรอยตินซัลเฟต ซึ่งยื่นจดลิขสิทธิ์ U.S. Pat. No. 4,302,577 โดย Rucker ในปี 1981 ระบุการสกัดวัตถุดิบดัดผ่านการกำจัดไขมันแล้วด้วยเอ็นไซม์ปาเปน จากนั้นตกตะกอนสารคอนรอยตินซัลเฟต (CS) ด้วยสารประกอบกลุ่ม quaternary ammonium เช่น cetylpyridinium chloride ซึ่งมีความจำเพาะต่อ CSA และ CSC ที่สูงกว่า มีประสิทธิภาพและสะดวกกว่าการตกตะกอนโดยใช้ acetone จากนั้นจึงแยก CSA และ CSC โดยการใช้ anion exchange resin

Lagocka และคณะ (1997) ศึกษาวิธีการแยกมิวโคพอลิแซคคาไรด์จากกระดูกอ่อนหลอดลมวัว เริ่มโดยการกำจัดโปรตีนจากส่วนหลอดลมวัวบดด้วยการย่อยในสารละลาย 1.5% เอนไซม์ปาเปน(3:1 v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 60°C แล้วจึงตกตะกอนแยกส่วนโปรตีนออกด้วย 10% TCA แล้วใช้เอทานอลตกตะกอนมิวโคพอลิแซคคาไรด์ทั้งหมดจากสารละลายส่วนที่เหลือ จากนั้นแยกส่วนคอนครอยตินซัลเฟตโดยการละลายกลับตะกอนมิวโคพอลิแซคคาไรด์ใน 5% calcium acetate 0.5 M acetic acid แล้วตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 20, 30, 40 และ 66 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าที่ความเข้มข้น 20% เอทานอลสามารถตกตะกอนคอนครอยตินซัลเฟตได้มากที่สุด

Lou และคณะ (2002) เปรียบเทียบการสกัดคอนครอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนหน้าอกไก่ โดยใช้ 3 M $MgCl_2$ และ 3 M guanidine HCL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและ 4°C โดยขั้นตอนแรกสกัดโปรตีนโกลโคสโดยใช้ 3 M $MgCl_2$ และ 3 M guanidine HCL เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและ 4°C จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มา dialysis ด้วย diH_2O โดยใช้ dialysis tubing ขนาด MWCO 3,500 แล้ว freeze dry ก่อนนำมากำจัดโปรตีนออกด้วยเอนไซม์ปาเปน หมุนเหวี่ยง(10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที) เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนโกลโคสอะมิโนโกลแคนด้วยเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกตะกอนโกลโคสอะมิโนโกลแคน พบว่าที่ 4°C การสกัดโดยใช้ $MgCl_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ได้คอนครอยตินซัลเฟต $76.6 \pm 3.4\%$ และ $73.2 \pm 4.4\%$ เมื่อเทียบกับปริมาณเริ่มต้น ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการสกัดด้วย guanidine HCL ส่วนการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่พบความแตกต่างระหว่างผลการสกัดด้วยสารละลายทั้ง 2 ชนิด แต่ การสกัดด้วย $MgCl_2$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้คอนครอยตินซัลเฟต ($88.4 \pm 2.6\%$) มากกว่าการสกัดด้วย guanidine HCL ($82.1 \pm 1.5\%$) ผลการศึกษาชี้ว่าการสกัดด้วย $MgCl_2$ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และมีความปลอดภัยต่อการผลิตเพื่อบริโภคกว่าการใช้ guanidine

Garnjanagoonchorn และคณะ(2006) สกัดคอนครอยตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนครีปปลาฉลาม กระเบนและจระเข้ส่วนสันอก โคนลิ้น หลอดลม และซี่โครงอ่อน โดยใช้เอนไซม์ปาเปนย่อยโปรตีนในกระดูกอ่อนที่ 65°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกโปรตีนออกด้วยการตกตะกอนด้วย TCA และแยกโกลโคสอะมิโนโกลแคนด้วย Cetylpyridinium chloride 1.5 กรัมต่อกระดูกอ่อน 10 กรัม กำจัด hyaluronic acid และสารประกอบ non sulfate ที่ปนอยู่โดยใช้สารละลาย 0.04 M NaCl ละลายตะกอนด้วย 2.1 M NaCl จากนั้นจึงใช้ 1 M Potassium thiocyanate เพื่อตกตะกอน Cetylpyridinium triocyanate

Hardingham (2007) รายงานว่าสารคอนครอยตินซัลเฟตซึ่งเชื่อมต่อกับโปรตีนเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินจะได้ชิ้นส่วนที่มีกลุ่มสายโมเลกุลคอนครอยตินซัลเฟตเชื่อมต่ออยู่ประมาณ 2-10 สาย ขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนจะได้สายของคอนครอยตินเดี่ยวดัง Figure 13 ส่วนการใช้ต่างเจือจางจะไปตัดย่อยโดยทำปฏิกิริยา β -elimination ตรงพันธะระหว่าง xylose-serine ปลดปล่อยคอนครอยตินซัลเฟตเป็นอิสระ

Gu และคณะ (1999) ได้ศึกษาวิธีสกัดแยกมิวโคพอลิแซคคาร์ไรด์ซัลเฟตจากเพรียงหัวหอมชนิดนี้ (*ciona intestinalis*) 4 วิธีคือ โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30-180 นาที การสกัดภายใต้ความดัน 1.5 กก./ซม.² ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 30-180 นาที โดยการต้มในสารละลายกรดและด่าง (0.1M NaOH หรือ 0.1 M HCL) ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 30- 180 นาที และการสกัดโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน(25°ซ pH 7.6) ปาเปน (25°ซ pH 6.2) ไคโมทริปซิน (25°ซ pH 7.8) โนวัวไซม์ (50°ซ pH 5) คอมเพล็กซ์เอนไซม์(50°ซ pH 6) นิวเทรส (50°ซ pH 6) และอัลคาเลส (50°ซ pH 9) กรองตัวอย่างหลังจากสกัดด้วยกระดาษกรอง นำส่วนสารละลายมาไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เฉพาะจากการย่อยด้วยกรด ด่าง และเอนไซม์) และระเหยแบบสูญญากาศ แล้วทำแห้งที่ 50 °ซ บดเป็นผงให้ละเอียด(200 mesh) ผลจากการทดลองพบว่า การสกัดภายใต้ความดัน 1.5 กก./ซม.² ที่อุณหภูมิ 121 °ซ สามารถสกัดมิวโคพอลิแซคคาร์ไรด์ซัลเฟตได้สูงที่สุดคือ 8.6 -10.3% รองลงมาคือการสกัดโดยต้มในน้ำเดือด (4.3-5.9%) ส่วนการสกัดโดยใช้กรดหรือด่าง และเอนไซม์จะมีปริมาณมิวโคพอลิแซคคาร์ไรด์ซัลเฟตต่ำกว่า ขณะที่การใช้เอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรสจะสามารถสกัดได้มากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ คือ 5.4 % และ 3.7 % ตามลำดับ

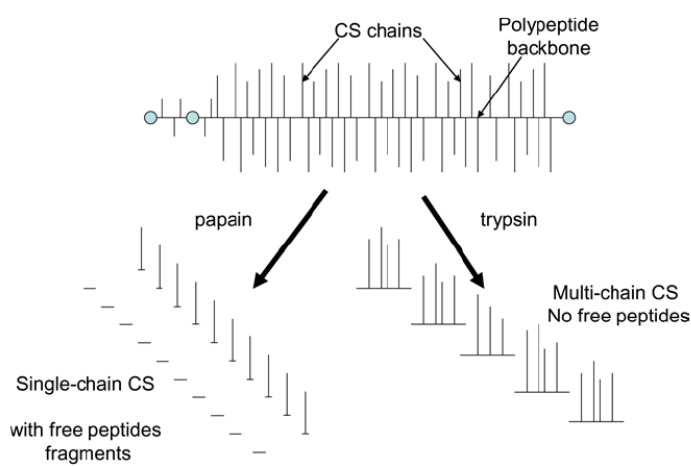


Figure 13. Proteolytic cleavage of cartilage aggrecan

ที่มา: Hardingham (2007)

8.3 ขั้นตอนการบดและ/หรือทำแห้ง

ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากกระดูกอ่อนบดหรือสารสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า นั้น โดยมากจะผลิตอยู่ในรูปผงแห้งหรือแคปซูลที่บรรจุผงกระดูกอ่อนหรือผงของสารสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต ทั้งนี้เนื่องจากการลดความชื้นสามารถชะลอหรือระงับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และยังเป็นการลดปริมาณและน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ในการขนส่งและการเก็บรักษา ตลอดจนสะดวกต่อการบริโภค วิธีการทำแห้งสำหรับสารสกัดคอนดรอยตินซัลเฟต ได้แก่ การทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง(หรือระเหิด) การเลือกวิธีการทำแห้งต้องพิจารณาจากหลายปัจจัย อันได้แก่ ลักษณะและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ตลอดจนต้นทุนการผลิต

การบดและร่อนเป็นขั้นตอนสำหรับผลิตภัณฑ์กระดูกอ่อนผงเพื่อให้มีขนาดอนุภาคเล็กและมีความสม่ำเสมอ ขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์มีผลต่อความสามารถในการละลายและอัตราการดูดซึมที่กระเพาะอาหาร โดยหากผลิตภัณฑ์มีอนุภาคใหญ่ ถูกดูดซึมช้ามีผลให้ถูกย่อยสลายเป็นโมเลกุลเล็กมากกว่า ในขณะที่อนุภาคขนาดเล็กจะถูกดูดซึมเร็วจึงยังคงขนาดของโมเลกุลเดิมไว้ โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ทางการค้าจะมีขนาดของอนุภาคแตกต่างกันซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพและมีผลต่อการกำหนดราคาของผลิตภัณฑ์ มีขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์กระดูกอ่อนบดในตลาดปัจจุบันซึ่งผลิตจาก สุกกร หรือฉลาม อยู่ในช่วง 325-60 mesh หรือประมาณ 44 -250 ไมครอน (Aroma (NZ) Ltd., 1961; Jedwards International, Inc., 2005; Universal Power, 2007

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาองค์ประกอบเคมีรวมถึงปริมาณสารคอนครอยดินซัลเฟตและคอลลาเจนของหลอดลมไก่ เป็ด และนกกระจอกเทศ เพื่อเป็นข้อมูลคัดเลือกวัตถุดิบ
2. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของสารคอนครอยดินซัลเฟต และคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจากหลอดลมสัตว์ปีกที่คัดเลือก
3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุดิบ

- หลอดลมไก่ ไก่เนื้ออายุประมาณ 7 สัปดาห์ จากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีก บรรจุถุงพอลิเอทิลีน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C
- หลอดลมเป็ด เป็ดเนื้ออายุประมาณ 7 สัปดาห์ จากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีกบรรจุถุงพอลิเอทิลีน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C
- หลอดลมนกกระจอกเทศ นกกระจอกเทศพันธุ์คอดำ อายุประมาณ 10-14 เดือน จาก ออคิตส์ฟาร์ม จังหวัดพังงา บรรจุถุงพอลิเอทิลีน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C
- ผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ทำจากครีบน้ำมและกระดูกอ่อนสุกร (shark and porcine cartilage powder)



Ostrich trachea



Chicken trachea



Duck larynx



Duck trachea

Figure 14. Raw materials (poultry trachea) used in research work

2. สารเคมี ดังแสดงใน Table 9

Table 9. List of chemicals used in research experiments

Chemical	Company
1. Enzyme	
PepsinA (EC 3.4.2.3.1)(806.3U/mg protein)	Sigma-Aldrich chemie GmbH, Spain
Chondrotinase ABC (0.36 U/ mg solid)	
Papain (EC 3.4.22.2) (3.11 U/mg)	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Spain
Alcalase (2.4L FG)	The East Asiatic (Thailand) PC Ltd.
2. Chemical for analysis	
Copper sulfate	Ajax Finecchem, Adivision of Nuplex
Dibasic sodium phosphate	Industries (Aust) Pty Ltd, New Zealand
Monobasic sodium phosphate	
Potassium sulfate	
Potassium thiocyanate	
Sodium hydroxide	LAB-SCAN
Sodium azide	LAB-CHEM
Hydrochloric acid	Merk KGaA, Germany
Chloramine T	Merk KGaA, Germany
4- Dimethylaminobenzaldehyde	APS
Perchloric acid	Panreac Quimaca
n-Propanal	LAB-SCAN
Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA)	BDH, VWR international Ltd., England
Cysteine hydrochloride	Merk KGaA, Germany
Cetylpyridinium chloride	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Spain
Trichloroacetic acid (TCA)	Merk KGaA, Germany
	Ajax Finecchem, Adivision of Nuplex
	Industries (Aust) Pty Ltd, New Zealand
Tris [hydroxymethyl] aminomethane	BDH, VWR international Ltd., England
Sodium chloride (NaCl)	BDH, VWR international Ltd., England

3. อุปกรณ์ ดังแสดงใน Table 10

Table 10. Instruments used in experiments

Instrument	Model	Company/Country
Balance	BJ 1001	Pricisa, Switzerland
Blender	EM -11	Shap, Japan
Homogenizer	T25 basic	IKA-Ultra Turrax, Germany
pH meter	12DVC	Satorius, germany
Refrigerated Centrifuge	Avanti J-E	Bekman, USA
Freeze dryer	Dura-top TM μ P	FTS System, USA
HPLC	1100	Agilent, USA
Spectrophotometer	20 Genesye	Thermo Spectronic, England
Water bath	W760	Memment, Germany
Soxhlet	Art915	FALC
Rotary Evaporator	N1000	Tokyo Rikakikai, Japan

วิธีการ

1. ตรวจสอบวิเคราะห์องค์ประกอบและสัดส่วนกระดูกอ่อนของวัตถุดิบ

1.1 ตรวจสอบปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหลอดลมไก่, เป็ด และนกกระจอกเทศ ดังนี้

- ความชื้น โดยวิธี gravimetric method (AOAC, 1999)
- เถ้า (AOAC, 1999)
- โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999)
- ไขมัน โดยวิธี soxhlet fat analysis (AOAC, 1999)
- คาร์โบไฮเดรต โดยการหักลบปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน จาก 100
- แคลเซียม และฟอสฟอรัสโดยวิธี Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)
- คอลลาเจน โดยวิเคราะห์ปริมาณ hydroxyproline (Hyp) ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Kolar (1990) (ภาคผนวก 3)
- คอนครอยตินซัลเฟตซัลเฟต (CS) โดยการเตรียมตัวอย่างและสกัดคอนครอยตินซัลเฟตซัลเฟตตามวิธีการของ Garnjanagoonchorn และคณะ (2006) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของคอนครอยตินซัลเฟต โดยใช้ Strong Anion-exchange High Performance Liquid Chromatography (SAX-HPLC) ตามขั้นตอนของ Sim และคณะ (2007) (ภาคผนวก 7)

1.2 ตรวจสอบสัดส่วนกระดูกอ่อนของหลอดลมไก่, เป็ด และนกกระจอกเทศ ดังนี้

นำหลอดลมไก่ เป็ด และนกกระจอกเทศ มาต้มในน้ำเดือด 90-95°ซ เป็นเวลา 2 นาที ใช้มือลอกเนื้อเยื่อด้านนอก และชั่งน้ำหนักกระดูกอ่อน คำนวณหาร้อยละสัดส่วนกระดูกอ่อนเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้น

1.3 วิเคราะห์ชนิดของคอลลาเจน

1.3.1 เตรียมตัวอย่างโดยตัดหลอดลมสัตว์ปีกเป็นชิ้นขนาด 1 ซม. แล้วด้วยการแช่ในคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (2: 1) ที่อุณหภูมิ 20°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อกำจัดไขมัน หลังจากนั้นสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมด้วยเอนไซม์เปปซิน (0.5 M ในกรด อะซิติก) ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปกรองแยกส่วนกากและหมุนเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำส่วนสารละลายไปตกตะกอนด้วยเกลือความเข้มข้น 2.5 M หมุนเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายตะกอนคอลลาเจนที่ได้ด้วย 0.5 M กรด อะซิติก จากนั้นทำการ

ไดอะไลซิสในสารละลาย 0.1 M กรดอะซิติก ตามด้วยน้ำกลั่น และนำไปทำแห้งโดยการ freeze dry นำส่วนกากหลังจากที่สกัดเปปซินครั้งที่ 1 มาแช่สารละลายต่าง 0.1 M เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างให้หมดค้างก่อนสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยเปปซินโดยใช้วิธีการเดียวกับการสกัดครั้งที่ 1

1.3.2 ตรวจสอบรูปแบบเปปไทด์ของคอลลาเจน โดย SDS PAGEตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้ 5% resolving gel โดย load ตัวอย่างคอลลาเจนที่สกัดได้ และมาตรฐานคอลลาเจน type I and type II ลงบนเจล และทำงานด้วยกระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมแปร์ ย้อมสีเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R250 solution (0.25%) และล้างสีย้อมด้วยกรดอะซิติก: เมทานอล: น้ำกลั่น (10: 40: 50) เป็นเวลา 10-15 นาที

2. ศึกษาวิธีและสภาวะในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนทรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบ

2.1 การกำจัดส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่กระดูกอ่อนจากวัตถุดิบหลอดลมสัตว์ปีก

นำตัวอย่างหลอดลมที่คัดเลือกจากข้อ 1 ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °ซ มาละลายที่อุณหภูมิ 4 °ซ ตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปแยกส่วนประกอบอื่นๆ โดย

- (1) ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.05 และ 0.10 M NaOH) อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายเท่ากับ 1:15 (w/v) กวนเป็นเวลา 1 3 และ 6 ชั่วโมง ที่ 4-6 °ซ
- (2) ใช้สารละลายเอ็นไซม์อัลคาเลส 0.1, 0.3 และ 0.5 % (ของโปรตีนในตัวอย่าง) pH 8 กวนเป็นเวลา 1 2 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 °ซ

จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกสารละลายออก ล้างส่วนกระดูกอ่อนหลอดลมที่ได้ด้วยน้ำเย็นและชั่งน้ำหนัก

(3) การต้มในน้ำ (90-95 °ซ) เป็นเวลา 2 10 30 60 และ 120 นาที หลังจากนั้นลอกเนื้อเยื่อส่วนนอกออกด้วยมือแล้วชั่งน้ำหนักส่วนกระดูกอ่อนที่ได้

นำส่วนหลอดลมที่ผ่านการแช่สารละลายต่าง เอนไซม์ และการต้มมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

- ปริมาณคอลลาเจน โดยวัดปริมาณ hydroxyproline ตามวิธีที่ใช้ในข้อ 1.1
- ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl
- ปริมาณคอนทรอยตินซัลเฟต ตามวิธีที่ใช้ในข้อ 1.1
- กำหนดประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีน

$$= \frac{(\text{โปรตีนในตัวอย่างเริ่มต้น} - \text{โปรตีนในตัวอย่างหลังล้าง})}{\text{โปรตีนในตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

- จำนวนร้อยละการสูญเสีย hydroxyproline (Hyp)

$$= \frac{(\text{Hyp ในตัวอย่างเริ่มต้น} - \text{Hyp ในตัวอย่างหลังล้าง})}{\text{Hyp ในตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

- นำตัวอย่างหลอดลมจากการแช่สารละลายเอนไซม์และการต้มมาหาชนิดของคอลลาเจนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการที่ใช้ในข้อ 1.3.2

เลือกขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนสูงสุด ในขณะที่สูญเสีย hydroxyproline และคอนครอยตินซัลเฟตต่ำสุด เพื่อใช้เตรียมวัตถุดิบสำหรับการทดลองในข้อต่อไป

2.2 วิธีการย่อยสกัดคอนครอยตินซัลเฟตโดยใช้เอนไซม์ปาเปน

บดส่วนกระดูกอ่อนที่เตรียมโดยสภาวะที่เลือกจากข้อ 2.1 ให้ละเอียด เติมสารละลายเอนไซม์ปาเปน โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0% ของน้ำหนักกระดูกอ่อน จากนั้นกวนเป็นเวลา 1, 3, 5, 7 และ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65 °C หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ปาเปนโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที และแยกส่วนใสและตะกอน วัดปริมาตร/ชั่งน้ำหนัก แยกสารละลายส่วนใสสำหรับวิเคราะห์โปรตีนและไฮดรอกซีโปรตีน ส่วนใสที่เหลือตะกอนด้วย TCA เพื่อแยกโปรตีนออกแล้วไดอะไลซิสด้วยน้ำกลั่นก่อน freeze dry จากนั้นนำไปวิเคราะห์ CS

2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใสโดยวิธีไบยูเรท (Copeland, 1994) (ภาคผนวก 2)

2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรตีนตามวิธีในข้อ 1.1 และ จำนวนผลผลิตคอลลาเจน (%)

2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตตามวิธีในข้อ 1.1 และ จำนวนผลผลิตคอนครอยตินซัลเฟต (%)

2.2.4 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินโดยใช้ SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 1.3.2

2.2.5 ขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟต โดยเทคนิค PAGE ด้วยวิธีคัดแปลงจาก Cowman และคณะ (1984) (ภาคผนวก 7)

เลือกสภาวะการย่อยที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ผลผลิตไฮดรอกซีโปรตีน (คอลลาเจน) และคอนครอยตินซัลเฟต เพื่อเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในการทดลองข้อต่อไป

3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้

เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์โดยการย่อยตัวอย่างกระดูกอ่อนหลอดลมเป็ดที่ผ่านการต้มและลอกเนื้อเยื่อค้ำนอกออก ด้วยปฏิกิริยาความเข้มข้นและเวลาที่เลือกจากการทดลองข้อ 2 เหยียงแยกส่วนที่ได้จากการย่อยเป็นส่วนสารละลาย (soluble part) และส่วนกาก (insoluble part) จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยการ freeze dry และตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

3.1 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ โดยชั่งน้ำหนักผลิตภัณฑ์ผงแห้งที่ได้และนำไปคำนวณ

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิต}}{\text{น้ำหนักหลอดลมก่อนย่อย}} \times 100$$

3.2 ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์

- ความชื้น โดยวิธี gravimetric method (AOAC, 1999)
- เถ้า (AOAC, 1999)
- โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999)
- ไขมัน โดยวิธี soxhlet fat analysis (AOAC, 1999)
- แคลเซียม ฟอสฟอรัส โซเดียม และ แมกนีเซียม โดยวิธี ICP – OES
- ไฮดรอกซีโปรตีน ตามวิธีที่ใช้ในข้อ 1.1
- คอนครอยตินซัลเฟต ตามวิธีที่ใช้ในข้อ 1.1

3.3 ขนาดของคอนครอยตินซัลเฟตเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

- โดยการวิเคราะห์ด้วย PAGE ตามวิธีที่ใช้ในข้อ 2.2.6

3.4 ค่าการละลาย คัดแปลงจากรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และอรุณี อิงกากุล (2548)

ประเมินค่าการละลายของตัวอย่างที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh ที่ pH 2.0-9.0 โดยละลายตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ใน 100 มิลลิลิตร ของสารละลาย pH ต่างๆ (ปรับ pH โดยใช้ 0.1 M HCl และ 0.1 NaOH) เขย่าตลอดเวลา ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ซึ่งอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว นำตะกอนพร้อม

กระดาษกรองอบที่ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ เก็บในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักหาปริมาณตะกอน กำหนด % การละลาย ดังนี้

$$\% \text{ การละลาย} = \frac{100 \times (\text{นน. ผลิตภัณฑ์แห้ง} - \text{นน. ตะกอนบนกระดาษกรอง})}{\text{นน. ผลิตภัณฑ์แห้ง}}$$

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และจัดชุดการทดลองแบบแฟคทอเรียล (ในข้อ 2.1 และ 2.2) แต่ละสิ่งทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window Version 6.0

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. องค์ประกอบของวัตถุคืบ

1.1. ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและสัดส่วนกระดูกอ่อนของหลอดลมไก่ เป็ด นกกระจอกเทศ และกล่องเสียงเป็ด

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหลอดลมไก่ เป็ด นกกระจอกเทศ และกล่องเสียงเป็ดดังแสดงผลใน Table 11 พบว่าโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของหลอดลมสัตว์ปีกที่ศึกษา โดยหลอดลม นกกระจอกเทศมีปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุดคือร้อยละ 84.38 ± 1.59 และหลอดลมเป็ดมีน้อยที่สุดคือร้อยละ 79.19 ± 3.96 โดยน้ำหนักแห้ง หลอดลมและกล่องเสียงเป็ดมีปริมาณเถ้าสูงที่สุดคือร้อยละ 11.48 ± 0.03 และ 7.65 ± 0.68 สอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสซึ่งมีปริมาณมากที่สุดในกล่องเสียงและหลอดลมเป็ดตามลำดับ แคลเซียมและฟอสฟอรัสเป็นแร่ธาตุที่มีมากที่สุดในร่างกายสัตว์และแปรผันตามปริมาณเถ้า ปริมาณแคลเซียมในกระดูกอ่อนขึ้นกับอายุและชนิดของสัตว์ เมื่อพิจารณาค่าไฮดรอกซีโปรลีนในหลอดลมสัตว์ปีกแต่ละชนิดพบว่าหลอดลม นกกระจอกเทศ มีปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนมากที่สุด (ร้อยละ 7.49 ± 0.37) ในขณะที่กล่องเสียงเป็ดมีน้อยที่สุด (ร้อยละ 4.04 ± 0.10) โดยทั่วไปแล้วปริมาณของไฮดรอกซีโปรลีนสัมพันธ์กับปริมาณของคอลลาเจนแต่ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเป็นคอลลาเจนชนิดใด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบลักษณะตัวอย่างหลอดลมและกล่องเสียงของเป็ดดังแสดงใน Figure 14 จะเห็นว่ากล่องเสียงมีส่วนของเอ็น, กล้ามเนื้อและพังผืด น้อยกว่าหลอดลมมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลอดลม นกกระจอกเทศ ดังนั้นปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนที่มีมากกว่าในหลอดลมจึงน่าจะเป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อต่างๆ ที่กล่าวมา

สารคอนดรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจน type II เป็นองค์ประกอบที่พบในกระดูกอ่อน ดังนั้นสัดส่วนกระดูกอ่อนในหลอดลมสัตว์ปีกจึงเป็นตัวบ่งชี้อย่างคล่าวๆถึงปริมาณของคอนดรอยตินซัลเฟตและคอลลาเจน type II ในตัวอย่างได้ จากผลการทดลองใน Table 12 พบว่าหลอดลมสัตว์ปีกที่ศึกษามีกระดูกอ่อนร้อยละ 50 ขึ้นไป โดยหลอดลมเป็ดมีกระดูกอ่อนมากที่สุดคือร้อยละ 73.05 ± 3.31 เมื่อคำนวณปริมาณร้อยละของกระดูกอ่อนหลอดลมต่อตัวของสัตว์ปีกพบว่าเป็ดมีกระดูกอ่อนของหลอดลมและกล่องเสียงมากที่สุดคือร้อยละ 0.18 ส่วนนกกระจอกเทศและไก่มีสัดส่วนกระดูกอ่อนจากหลอดลมต่อน้ำหนักตัวร้อยละ 0.07 และ 0.05 ของน้ำหนักตัวตามลำดับ วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษกร และอรุณี อิงกากุล (2548) ได้ศึกษาปริมาณคอนดรอยติน

ซัลเฟต ในวัตถุคิบที่เหลือใช้จากการแปรรูปสัตัวน้ำ พบว่าปลาจลลาม (โรนัน) มีกระดูกอ่อนร้อยละ 12.2 ต่อน้ำหนักปลาทั้งตัว โดยเป็นกระดูกอ่อนจากส่วนครีบเท่ากับ 21.6-23 กรัม ต่อครีบ 100 กรัม สำหรับปลากระบางหรือปลากระเบนปากแหลมพบว่ามีกระดูกอ่อนเฉลี่ยร้อยละ 10.2 ของน้ำหนักปลาสดทั้งตัว นอกจากนี้ยังพบว่าจะเข้ประกอบด้วยกระดูกอ่อนในบริเวณต่างๆ คือ สันอก หลอดลม โคนลิ้น และส่วนปลายข้อต่อรวมทั้งส่วนปลายกระดูกเชิงกราน และกระดูกซี่โครง เป็นสัดส่วนร้อยละ 0.6 ของน้ำหนักจะเข้ทั้งตัว โดยแยกเป็นกระดูกอ่อนจากสันอกและซี่โครงเท่ากับ 0.47 กระดูกอ่อนจากหลอดลมและกระดูกอ่อนโคนลิ้นเท่ากับ 0.13 ถึงแม้กระดูกอ่อนหลอดลมเปิดและไก่อมีสัดส่วนต่อน้ำหนักตัวต่ำ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณการผลิตหรือแปรรูปสัตัวปีกของประเทศไทย (ตั้งแต่ปี 2542-2551) จะเห็นว่ามึปริมาณสูงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (กรมปศุสัตว์, 2551) ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณกระดูกอ่อนจากหลอดลมสัตัวปีกเหล่านี้เพิ่มขึ้นและมีปริมาณที่สูงพอสำหรับการเป็นวัตถุคิบในระดับอุตสาหกรรม

Table 11. Chemical composition of poultry tracheas

Source	Composition (% dry basis)*						
	Protein***	Lipid	Ash	Carbohydrate**	Phosphorus	Calcium	Hydroxyproline
Duck trachea	66.19±0.96 ^d	9.27±0.05 ^a	11.48±0.03 ^a	13.06 ^c	0.87±0.03	4.26±0.05	4.11±0.07 ^c
Chicken trachea	79.19±3.96 ^b	3.03±0.71 ^c	2.70±0.06 ^d	15.08 ^b	0.250±0.02	0.07±0.00	4.95±0.0 ^b
Ostrich trachea	84.38±1.59 ^a	3.99±0.1 ^b	3.54±0.15 ^c	8.09 ^d	0.24±0.03	0.41±0.03	7.49±0.37 ^a
Duck larynx	74.65±0.62 ^c	0.80±0.1 ^d	7.65±0.68 ^b	16.90 ^a	1.62±0.11	1.48±0.39	4.04±0.1 ^d

* Values are expressed as means ± S.D. ($n = 3$).

^{a,b,c,d} Different superscripts in each column denote significant difference ($p < 0.05$).

**Calculated by $100 - (\text{protein} + \text{lipid} + \text{ash})$

*** N Factor = 6.25

Table 12. Proportion of cartilage in poultry tracheas

Source	% Cartilage (wet basis)
Duck trachea	73.05± 3.31 ^a
Chicken trachea	49.20 ± 2.06 ^d
Ostrich trachea	60.43 ± 3.12 ^b
Duck larynx	57.01 ± 1.71 ^c

Values are expressed as means ± S.D. ($n = 3$)

^{a,b,c,d} Different superscripts in column denote significant difference ($p < 0.05$)

1.2 ปริมาณและชนิดคอนครอยตินซัลเฟตในหลอดลม ไก่, เป็ด, นกกระจอกเทศ และกล่องเสียงเป็ด

1.2.1 ปริมาณคอนครอยตินซัลเฟต

จากการวิเคราะห์ปริมาณของคอนครอยตินซัลเฟต(CS) ด้วยเทคนิค Strong Anion Exchange-HPLC พบว่าหลอดลมสัตว์ปีกที่ศึกษามีปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตในช่วงร้อยละ 0.572±0.027 - 6.357±0.545 โดยน้ำหนักแห้ง หรือหากคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักกระดูกอ่อนหลอดลมพบว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 1.17-10.52 โดยที่หลอดลมนกกระจอกเทศมีปริมาณคอนครอยตินซัลเฟต สูงสุด และต่ำสุดในหลอดลมไก่ดังแสดงใน Table 13. Ganjanagoonchorn และคณะ (2006) ได้ศึกษาปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตในกระดูกอ่อนจากแหล่งต่างๆ โดยวิธี Dimethylmethylene blue (DMMB) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 nm พบว่ากระดูกอ่อนของหน้าอกจระเข้, หลอดลมของจระเข้, ครีบบปลาฉลาม, ซี่โครงจระเข้ และปลากระเบนมีปริมาณร้อยละ (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนี้คือ 11.55, 9.51, 9.60, 5.56 และ 5.27 นอกจากนี้ Lou และคณะ, 2002 รายงานปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตในกระดูกอ่อนหน้าอกไก่ที่ร้อยละ 16.8 และกระดูกอ่อนหลอดลมวัว 8.8% (Lagocka, และคณะ., 1996) ทั้งนี้ปริมาณที่แตกต่างกันของคอนครอยตินซัลเฟตขึ้นอยู่กับชนิด และแหล่งเนื้อเยื่อของสัตว์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้วิธีการในการวิเคราะห์ที่ต่างกันก็มีผลต่อปริมาณของคอนครอยตินซัลเฟตด้วย

1.2.2 ชนิดของคอนครอยตินซัลเฟต

จากผลการวิเคราะห์ชนิดของคอนครอยตินซัลเฟตดังแสดงโดยโครมาโทแกรมของคอนครอยตินซัลเฟตที่สกัดจากหลอดลมไก่ เป็ด นกกระจอกเทศและกล่องเสียงเป็ดใน Figure 15b-e เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคอนครอยติน-0-ซัลเฟต(Δ Di-0S), คอนครอยติน-4-ซัลเฟต(Δ Di-4S) และคอนครอยติน-6-ซัลเฟต(Δ Di-6S) ใน Figure. 15a พบว่าหลอดลมจากสัตว์ปีกที่

ศึกษาและกล่องเสียงเป็ดมี $\Delta\text{Di-4S}$ มากกว่า $\Delta\text{Di-6S}$ และ $\Delta\text{Di-0S}$ ตามลำดับ $\Delta\text{Di-4S}$ และ $\Delta\text{Di-6S}$ เป็นมิวโคพอลิแซ็กคารไนด์ที่พบมากที่สุดในร่างกายสัตว์ทั้งในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยรูปแบบของหมู่ซัลเฟต (ตำแหน่งและจำนวน)ที่อยู่ในโครงสร้างของคอนดรอยตินซัลเฟตนั้นขึ้นอยู่กับอายุ แหล่งของเนื้อเยื่อ และลักษณะของพื้นผิวข้อต่อ Sim และคณะ (2007) รายงานว่าคอนดรอยตินจากสัตว์ปีกจะมีสัดส่วน $\Delta\text{Di-4S}/\Delta\text{Di-6S}+\Delta\text{Di-diSs}$ มากกว่า 1 ขณะที่คอนดรอยตินจากกระดูกอ่อนปลาฉลามซึ่งเป็นแหล่งจากสัตว์น้ำนั้นมีสัดส่วนของ $\Delta\text{Di-4S}/\Delta\text{Di-6S}+\Delta\text{Di-diSs}$ น้อยกว่า 1 ดังนั้นจึงเสนอว่าอาจใช้สัดส่วนของ $\Delta\text{Di-4S}/\Delta\text{Di-6S}+\Delta\text{Di-diSs}$ เป็นค่าจำแนกหรือระบุแหล่งของคอนดรอยตินซัลเฟตว่ามาจากแหล่งสัตว์ปีกหรือสัตว์น้ำ ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าหลอดลมสัตว์ปีกมีคอนดรอยตินไคซัลเฟตในปริมาณที่น้อยมาก (ไม่ปรากฏบนโครมาโทแกรม) เมื่อคำนวณสัดส่วนของ $\Delta\text{Di-4S}/\Delta\text{Di-6S}$ ในหลอดลมไก่ เป็ด นกกระจอกเทศ และกล่องเสียงเป็ด พบว่ามีค่าในช่วงร้อยละ 1.719-5.478 (Table 13) ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่า 1 เช่นเดียวกับค่าที่มีรายงานจากการศึกษาในแหล่งสัตว์ปีกอื่น ๆ คือ โคน, ไก่, จระเข้ และสุกร (กาญจนกฤษธรและคณะ, 2548; Sim, *et. al*, 2005; Volpi และ Maccari, 2008)

Table 13. Chondroitin sulfate content in poultry tracheas

Sample	Content (% dry basis)*				$\Delta\text{Di-4S}/$
	$\Delta\text{Di-0S}$	$\Delta\text{Di-6S}$	$\Delta\text{Di-4S}$	Total CS	$\Delta\text{Di-6S}$
Duck trachea	0.040±0.007 ^c	1.016±0.048 ^b	2.408±0.112 ^b	3.464±0.154 ^b	2.370±0.024
Duck larynx	0.190±0.117 ^b	0.889±0.063 ^b	1.726±0.120 ^c	2.805±0.189 ^c	1.943±0.003
Chicken trachea	0.023±0.009 ^c	0.086±0.004 ^c	0.472±0.022 ^d	0.572±0.027 ^d	5.478±0.057
Ostrich trachea	0.437±0.107 ^a	2.177±0.115 ^a	3.742±0.230 ^a	6.357±0.545 ^a	1.719±0.024

* Values expressed as means ± S.D. ($n = 3$).

^{a,b,c,d} Different superscripts in each column denote significant difference ($p < 0.05$)

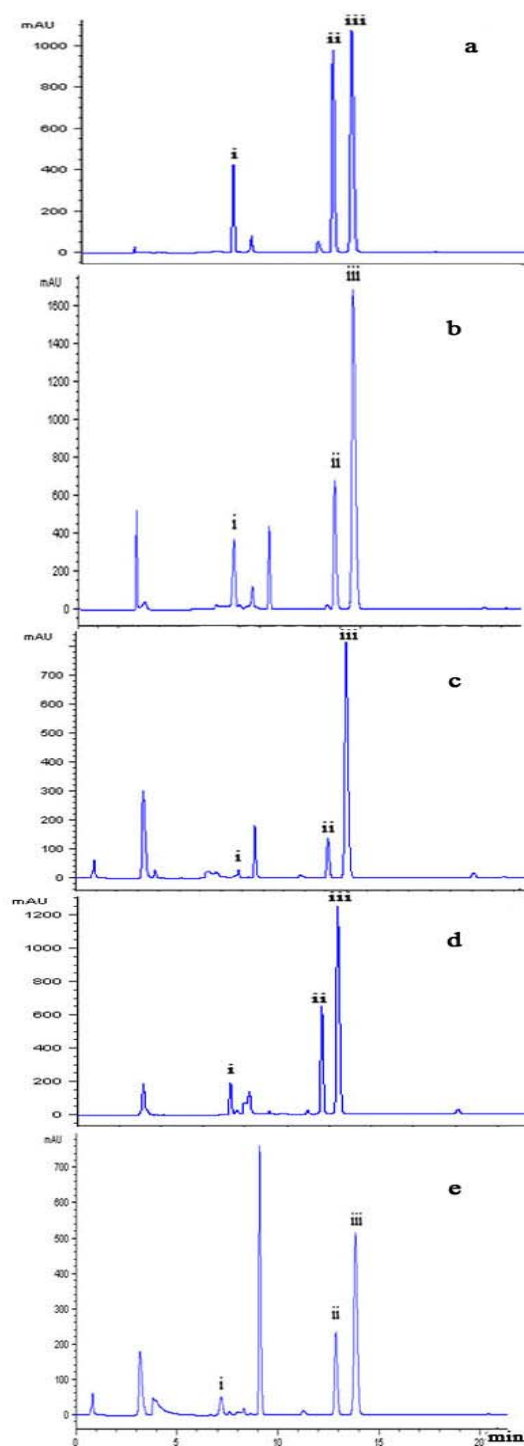


Figure 15. Chromatogram of disaccharides produced by enzymatic depolymerization of chondroitin sulfate from (b) duck trachea, (c) chicken trachea, (d) ostrich trachea and (e) duck larynx compared to that of (a) standard CS where (i): $\Delta\text{Di-0S}$, (ii): $\Delta\text{Di-6S}$, and (iii): $\Delta\text{Di-4S}$

1.3 ชนิดคอลลาเจน

เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณของไฮดรอกซีโปรลีนในหลอดลมและกล่องเสียง สัตว์ปีกไม่สามารถระบุชนิดของคอลลาเจนได้ ดังนั้นจึงได้ใช้เทคนิค SDS-PAGE ศึกษารูปแบบเปปไทด์ของคอลลาเจนที่สกัดจากตัวอย่างหลอดลมสัตว์ปีกโดยเอนไซม์เปปซิน ซึ่งในการทดลองเบื้องต้นของการสกัดตัวอย่างหลอดลมเปิดและไถ่ซ้ำ 3 ครั้ง ได้รูปแบบเปปไทด์ของคอลลาเจน type I ทั้ง 3 ครั้ง จึงได้นำตัวอย่างเช่นในสารละลายต่างก่อนการสกัดซ้ำครั้งที่สองเพื่อสกัดโปรตีโอไกลแคนออกมาก่อนทำให้เปปซินย่อยคอลลาเจน Type II ออกมาได้ง่ายขึ้น ดังแสดงใน Figure 16 พบว่าเปปไทด์ของคอลลาเจนจากหลอดลมเปิดและไถ่ ครั้งที่ 1 (lane 2 และ lane 6) ปรากฏแถบ α_1 [I] และ α_2 [I] เหมือนกับคอลลาเจน type I มาตรฐาน ในขณะที่คอลลาเจนจากการสกัดครั้งที่ 3 (lane 3 และ lane 7) จะปรากฏเปปไทด์หลักคือ α_1 [II] ของคอลลาเจน type II สำหรับคอลลาเจนกล่องเสียงเปิดจากการสกัดด้วยเปปซินครั้งที่ 1 และ 3 (lane 4 และ 5) ปรากฏเปปไทด์ของ α_1 (II) ซึ่งตรงกับคอลลาเจน type II มาตรฐาน นอกจากนี้พบว่าช่องที่มีคอลลาเจน type II ของทุกตัวอย่าง (lane 3, 4, 5 และ 7) ปรากฏเปปไทด์ขนาดเล็ก 2 แถบระหว่าง β -component และ α_1 (II) คล้ายกับรูปแบบเปปไทด์ของคอลลาเจน type XI ซึ่งรายงานโดย Mizuta และคณะ(2002) ที่ศึกษาพบว่าครีบบริเวณหน้าอกของปลากระเบน(skate) มีคอลลาเจน type I และ II เป็นองค์ประกอบหลัก และมีคอลลาเจน type XI ในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ Mendler และคณะ(1989) รายงานว่าคอลลาเจน type XI เป็นองค์ประกอบของโครงข่ายกระดูกอ่อนหน้าอกไก่เช่นเดียวกับคอลลาเจน type II และ IX ผลการทดลองส่วนนี้จึงบ่งชี้ว่ากล่องเสียงเปิดประกอบด้วยคอลลาเจน type II เป็นชนิดหลัก ส่วนหลอดลมเปิดและไถ่จะมีทั้งคอลลาเจน type I, type II และ type XI ในปริมาณเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบธรรมชาติของหลอดลมสัตว์ปีกประกอบด้วย วงแหวนกระดูกอ่อนชนิดไฮอะลีน 100-130 วง ที่เชื่อมต่อกันด้วย fibrous connective tissue ส่วนผนังหลอดลมเป็นกล้ามเนื้อเรียบ ประกอบไปด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ(muscle fiber)อันมีโปรตีน myofibrils เป็นหลัก (วิโรจน์ จันทรรัตน์, 2537: พิสมัย ประทุมทาน, 2542) ในขณะที่กล่องเสียงเปิดซึ่งมีกระดูกอ่อน(อีลาสติก)เป็นโครงสร้างหลักมีเพียงส่วนเชื่อมหุ้มบางๆ ไม่มีส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอื่นๆ เหมือนหลอดลม

การวิเคราะห์ปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนจากการทดลองข้างต้น พบว่าในหลอดลมนกกระจอกเทศเป็นแหล่งที่มีสารทั้งสองชนิดมากที่สุด แต่เนื่องจากแหล่งและปริมาณหลอดลมนกกระจอกเทศของประเทศไทยยังมีจำกัด ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับนำมาเป็นวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรม ในขณะที่หลอดลมและกล่องเสียงเปิด ซึ่งมีปริมาณคอนครอย

ตินซัลเฟตรองลงมาจากนกกระจอกเทศนั้นมีปริมาณการผลิตจากอุตสาหกรรมมาก หลอดลมและกล่องเสียงเป็ดจึงน่าจะเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

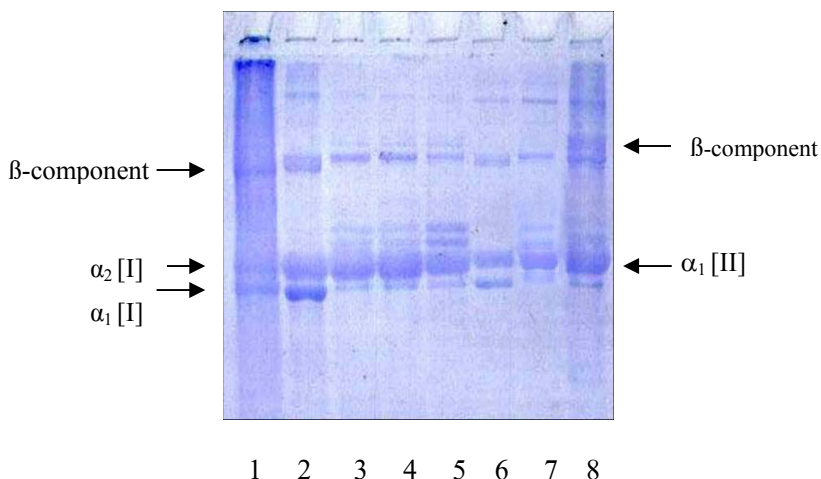


Figure 16. SDS-PAGE patterns of pepsin-solubilized collagens from poultry trachea; Lane 1: standard type I collagen, lane 2: duck trachea (first extract), lane 3: duck trachea (third extract), lane 4: duck larynx (first extract), lane 5, duck larynx (third extract), lane 6, chicken trachea (first extract), lane 7: chicken trachea (third extract) and lane 8: standard type II collagen.

2. ผลของสภาวะในการผลิตที่มีต่อคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์

2.1 ผลของการกำจัดส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่กระดูกอ่อนจากวัตถุดิบ (หลอดลมเป็ด)

เนื่องจากวัตถุดิบหลอดลมเป็ดประกอบด้วยส่วนที่เป็นกระดูกอ่อนและเนื้อเยื่อส่วนนอกซึ่งมีโปรตีนอื่นๆ ตลอดจนคอลลาเจน type I ดังนั้นการศึกษาแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนจึงมีขั้นตอนในการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆจากกระดูกอ่อนเพื่อให้ได้คอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนมากที่สุดด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เอนไซม์อัลคาเลส และความร้อนโดยการต้มแล้วลอกส่วนเนื้อออกจากกระดูกอ่อน แล้วนำไปวิเคราะห์และคำนวณค่าร้อยละการกำจัดโปรตีน ร้อยละการสูญเสียไฮดรอกซีโปรตีน และร้อยละการสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟต เพื่อใช้เป็นค่าชี้วัดในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมคือสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกจากกระดูกอ่อนให้มากที่สุดและสูญเสียคอลลาเจน และคอนครอยตินซัลเฟตน้อยที่สุด เพื่อนำไปทดลองในขั้นต่อไป

2.1.1 ผลของการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

การกวนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 และ 0.1 โมลาร์ ที่ อุณหภูมิห้อง และ 4°C เป็นเวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ให้ผลดังแสดงใน Figure 17 ซึ่งจะเห็นว่าเวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของด่างที่เพิ่มขึ้นมีผลให้สามารถกำจัดโปรตีนได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีร้อยละการกำจัดโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 6.5-44.0 Zhang (2009) รายงานว่าการ เพิ่มอุณหภูมิของสารละลายจะเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนเนื่องจากว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจะช่วย ให้การแพร่ของโมเลกุลเร็วขึ้นและการถ่ายเทมวลระหว่างของแข็งและของเหลวได้ดีขึ้นจึงช่วยเพิ่ม ความสามารถในการละลายของโปรตีนและลดความหนืดของสารละลายต่าง

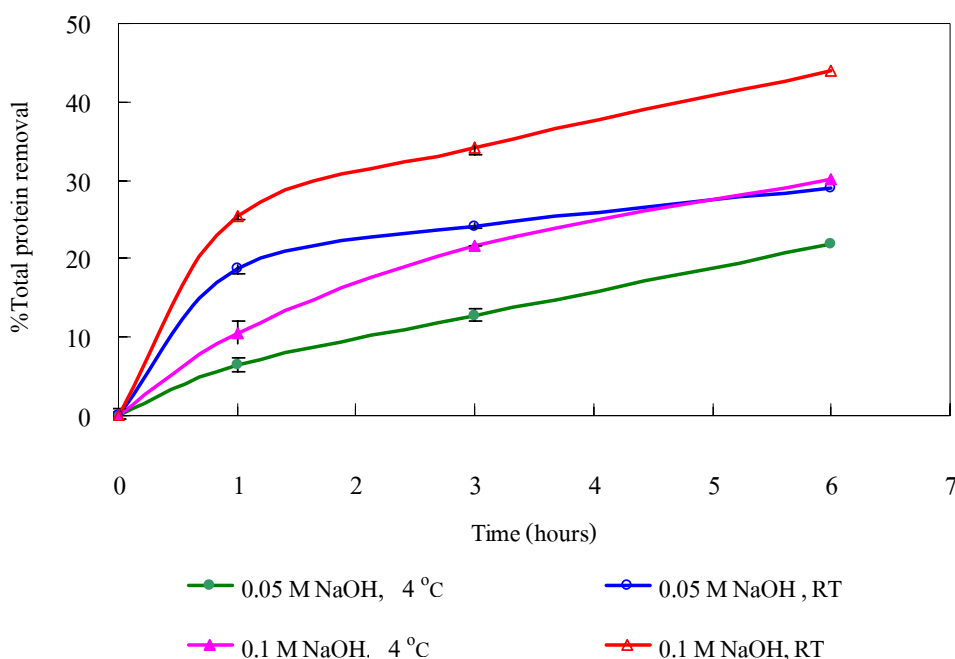


Figure 17. Total protein removal after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)

เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลาเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการสูญเสียไฮดรอกซีโพรลีนและคอนครอยตินซัลเฟตมากขึ้นในลักษณะเดียวกับการกำจัดโพรตีนอื่นๆ (Figure 18 และ 19) โดยมีร้อยละการสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตและไฮดรอกซีโพรลีนอยู่ในช่วงร้อยละ 11.3 - 54.5 และ 4.5 - 24.3 ตามลำดับ Suwan (2004) อธิบายว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์จะไปทำปฏิกิริยา β -elimination ที่พันธะระหว่าง xylose และ กรดอะมิโน serine หรือ asparagines ซึ่งเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างสารไกลโคซามิโนไกลแคนกับโพรตีน Herbage และคณะ (1977) ศึกษาผลการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 M สกัดโพรตีโอไกลแคนจากกระดูกอ่อนข้อต่อของวัว (อายุ 2-4 ปีและลูกวัวอายุ 2 เดือน) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำไปสกัดคอลลาเจน type II พบว่าสามารถกำจัดโพรตีโอไกลแคนได้ถึงร้อยละ 96 และ 90 ตามลำดับ ถึงแม้ในการทดลองนี้ได้ลดความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 0.2 M เป็น 0.05 M และลดเวลาจาก 24 เป็น 1 ชั่วโมง แต่พบว่ายังคงมีผลสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตค่อนข้างสูงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีลักษณะตัวอย่างที่แตกต่างกัน

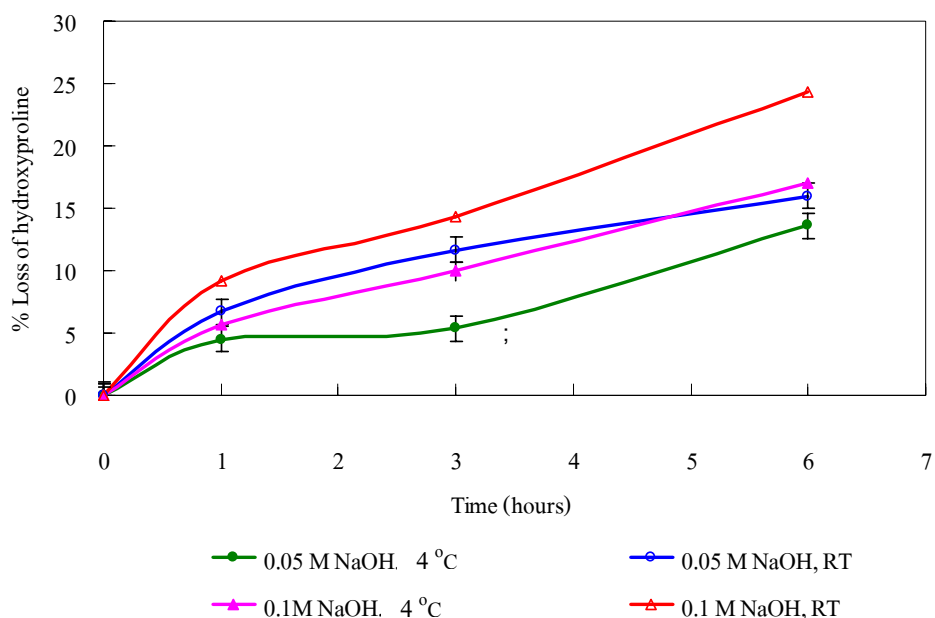


Figure 18. Loss of Hydroxyproline after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)

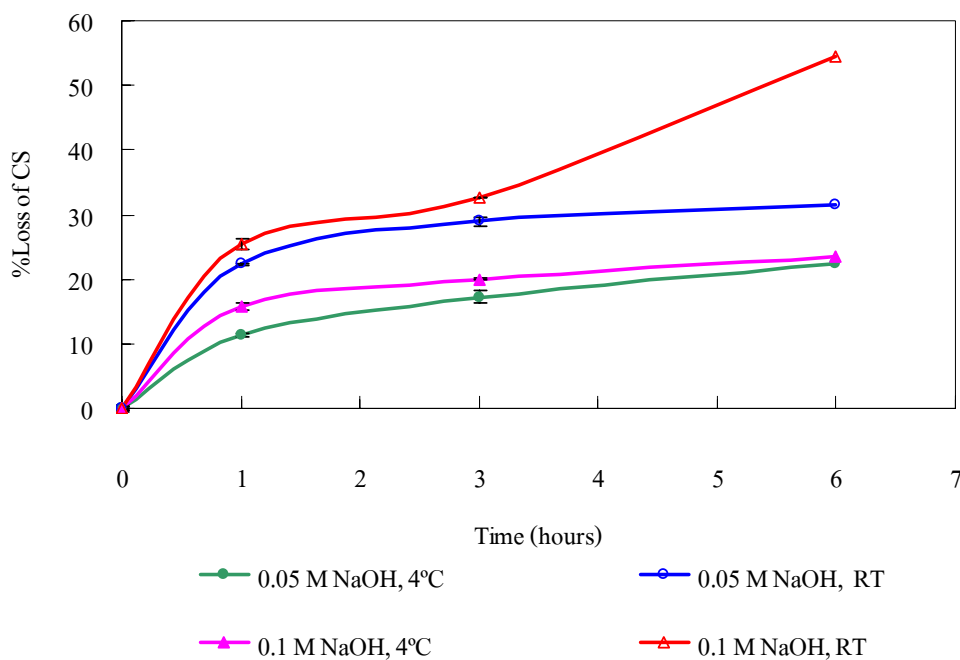


Figure 19. Loss of chondroitin sulfate after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)

เมื่อพิจารณาเลือกสภาวะการใช้ต่างในการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ จากค่าการสูญเสียคอนดรอยตินซัลเฟตค่าและสัดส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรตีนในตัวอย่างที่ได้สูง (ค่าสูงบ่งบอกว่าสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ได้มากกว่าการสูญเสียคอลลาเจน) พบว่าค่าสัดส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรตีนที่เหลือในตัวอย่างหลังการใช้สารละลายต่าง 0.1 M NaOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง มีค่าค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 0.089 - 0.093 (Figure 20) แต่สภาวะดังกล่าวมีผลให้การสูญเสียคอนดรอยตินซัลเฟตสูงมาก (ร้อยละ 32.70-54.52) จึงทำการศึกษาวิธีการแยกส่วนประกอบอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์และความร้อนแทนการใช้ต่างในขั้นตอนต่อไป

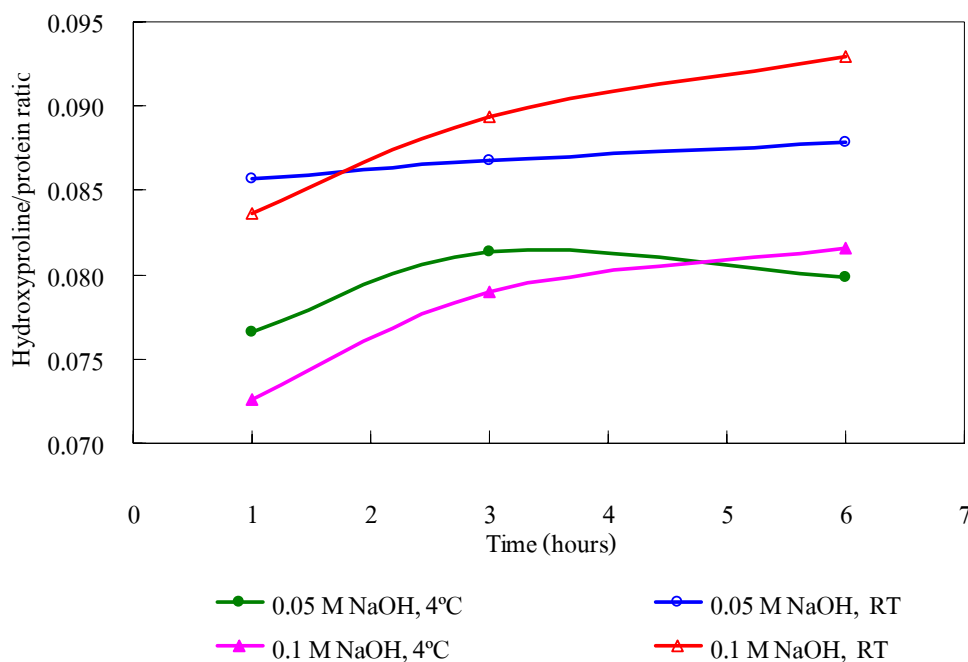


Figure 20. The ratio of hydroxyproline/protein remained in trachea samples after soaking in 0.05 M and 0.1 M NaOH for 1, 3, 6 hours at 4°C and room temperature (RT)

2.1.2 ผลของการใช้สารละลายเอนไซม์อัลคาเลส

การกำจัดโปรตีนเนื้อเยื่อส่วนที่หุ้มกระดูกอ่อนหลอดลมโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสเข้มข้น 0.1%, 0.3% และ 0.5% ของปริมาณโปรตีนในหลอดลมเป็ด ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นสามารถกำจัดโปรตีนทั้งหมดได้มากขึ้นโดยมีร้อยละการกำจัดโปรตีนอยู่ในช่วง 10.7- 33.1 (เทียบกับโปรตีนเริ่มต้นในตัวอย่าง) อัตราการกำจัดโปรตีนเพิ่มอย่างรวดเร็วในชั่วโมงแรก จากนั้นค่อยๆ ลดลงดังแสดงใน Figure 21 และเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เวลาการย่อย 3 ชั่วโมงขึ้นไปพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.3 เป็น 0.5 การกำจัดโปรตีนเพิ่มขึ้นมากกว่าการเพิ่มความเข้มข้นจากร้อยละ 0.1-0.3 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

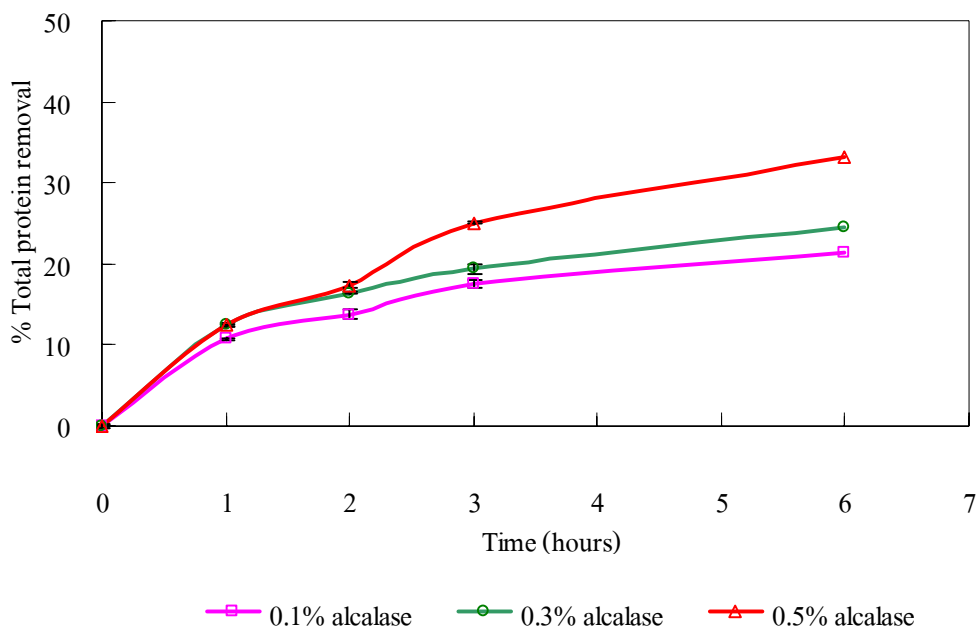


Figure 21. Total protein removal after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% Alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C

เมื่อพิจารณาการสูญเสียไฮดรอกซีโปรตีน (คอลลาเจน) ในระหว่างการทรีตด้วยเอนไซม์ (Figure 22) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากันเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจะมีการสูญเสียไฮดรอกซีโปรตีนมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ที่เวลาการย่อยในช่วง 3 ชั่วโมงแรกการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นเอนไซม์ไม่มีผลต่อการสูญเสียไฮดรอกซีโปรตีน

เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นมีการสูญเสียคอนดรอยตินซัลเฟตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีร้อยละการสูญเสียอยู่ในช่วง 8.65-40.89 ดังแสดงใน Figure 23 Shin และคณะ (2006) ศึกษาการสกัดแยกมิวโคพอลิแซคคารีไรด์จากกระดูกอ่อนหน้าอกไก่บดแห้งโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 55° ซ พีเอช 8 เป็นเวลา 30 -120 นาที พบว่าได้ผลผลิตมิวโคพอลิแซคคารีไรด์ซัลเฟต 72.53 - 75.78 % ที่มีคอนดรอยตินซัลเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่ 22.66-26.61% หรือคิดเป็นคอนดรอยตินซัลเฟต 16.73-20.16 %

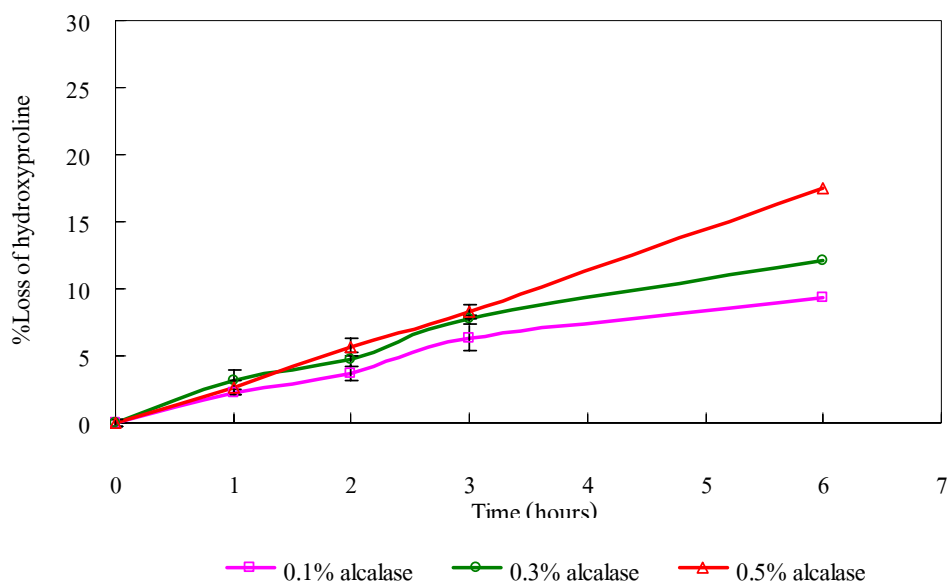


Figure 22. Loss of Hydroxyproline after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% Alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C

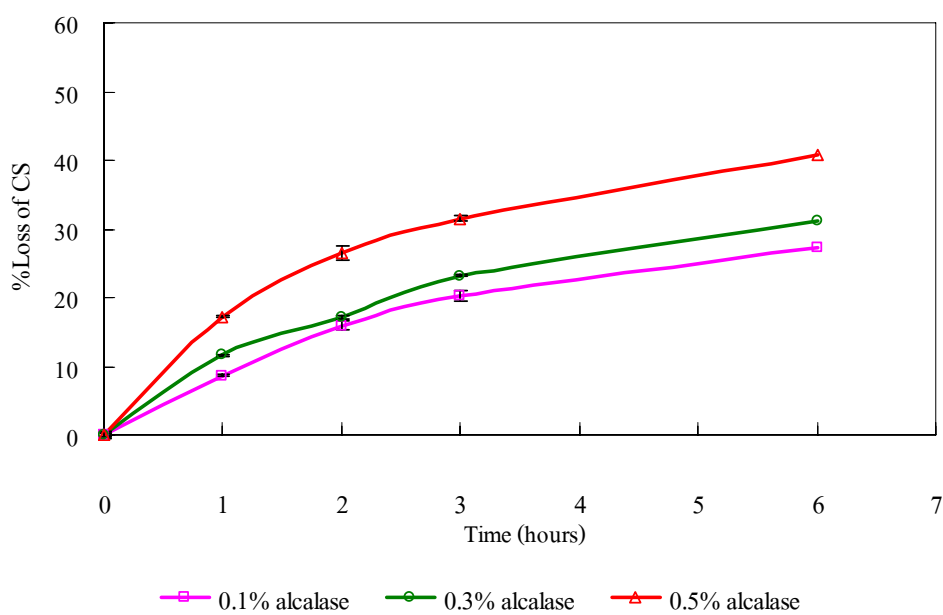


Figure 23. Loss of chondroitin sulfate after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% Alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C

จากการทดลองนี้พบว่าลักษณะการสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตจะสัมพันธ์กับลักษณะกราฟการกำจัดโปรตีนมากกว่ากราฟการสูญเสียไฮดรอกซีโปรลีนกล่าวคือ มีอัตราการสูญเสียโปรตีนและคอนครอยตินซัลเฟตสูงในช่วง 2 ชั่วโมงแรกแล้วชะลอช้าลงในขณะที่การสูญเสียไฮดรอกซีโปรลีนยังคงมีอัตราการเพิ่มขึ้นค่อนข้างคงที่บ่งชี้ว่าคอลลาเจนที่สูญเสียส่วนใหญ่อาจเป็นคอลลาเจนในผังผืดหรือเนื้อเยื่อที่หุ้มกระดูกอ่อนด้านนอก

จาก Figure 24 พบว่าสัดส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรตีนในตัวอย่างหลอดลมที่ใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 0.1-0.5% เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง มีค่าอยู่ในช่วง 0.075-0.090 โดยที่ใช้เอนไซม์อัลคาเลส 0.1% เป็นเวลา 2 ชั่วโมงให้ค่าสัดส่วนของไฮดรอกซีโปรลีนต่อโปรตีนเท่ากับ 0.088 และมีการสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 15.9 ± 0.1 จึงเลือกสภาวะดังกล่าวสำหรับเตรียมตัวอย่างในการศึกษาการสกัดย่อยคอนครอยตินซัลเฟตในขั้นตอนต่อไป

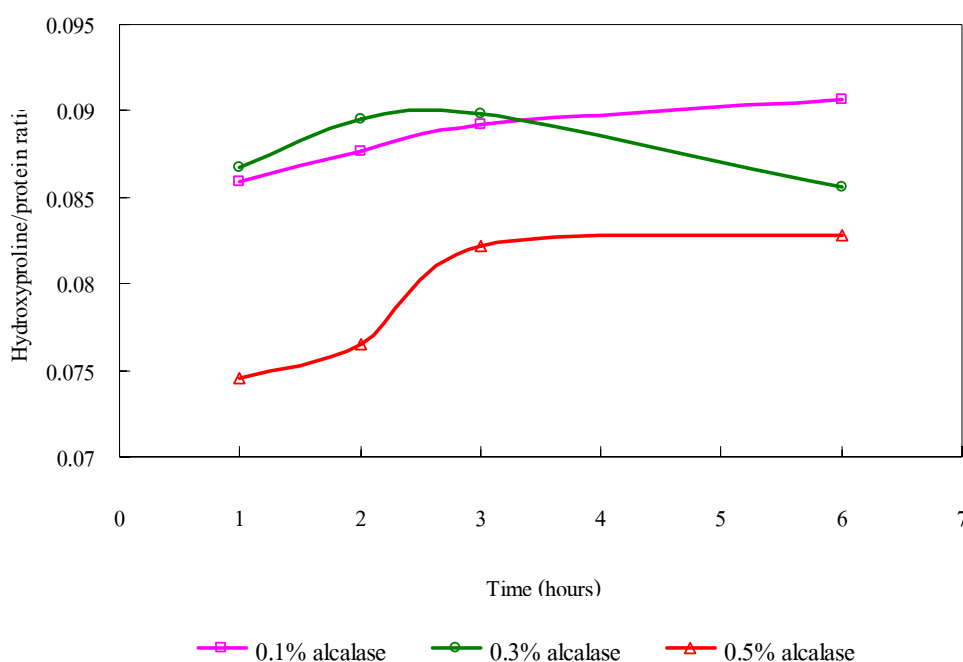


Figure 24. The ratio of hydroxyproline/protein remained in trachea samples after treatment with 0.1%, 0.3% and 0.5% alcalase for 1, 2, 3, 6 hours at 55°C

2.1.3 ผลของการใช้ความร้อน

การกำจัดส่วนประกอบอื่นๆ ออกจากกระดูกอ่อนโดยการต้มในน้ำเดือด(90-95° ซ) เป็นเวลา 2, 10, 30, 60 และ 120 นาที และลอกส่วนเนื้อเยื่อด้านนอก พบว่าหลังการต้มนาน 60 นาที สามารถลอกเนื้อเยื่อด้านนอกออกได้ง่าย แต่หากต้มนานกว่า 60 นาทีจะทำให้หลุดลวมเปื่อยยุ่ย อย่างไรก็ตามร้อยละการกำจัดโปรตีนจากตัวอย่างหลังการต้มที่เวลาต่างๆกันไม่แตกต่างกันมากคืออยู่ในช่วงร้อยละ 42.7-48.1 (Figure 25) เนื่องจากผู้ทดลองพยายามลอกส่วนประกอบอื่นๆ ออกมากที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับความพยายามในการลอกของผู้ทดลองมากกว่าระยะเวลาในการต้ม

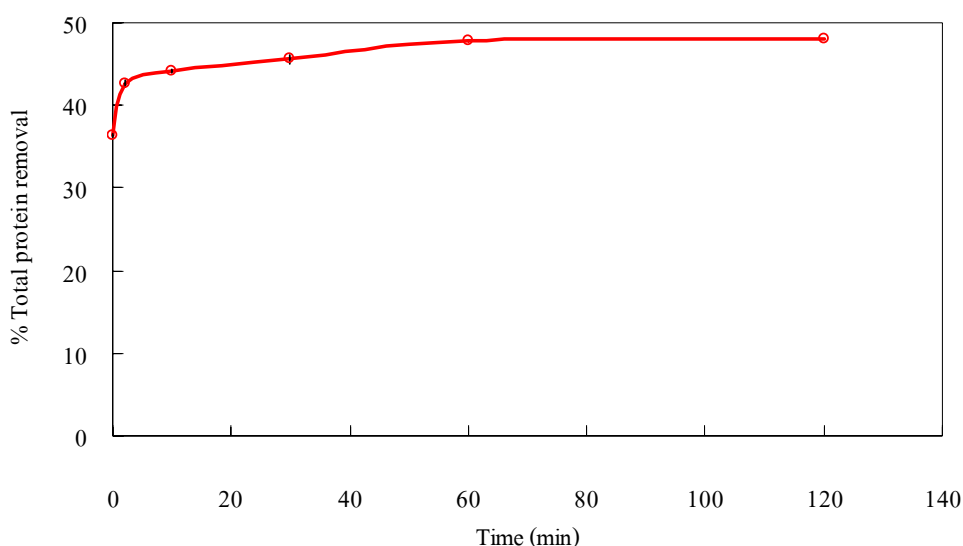


Figure 25. Total protein removal after boiling for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C

การต้มหลุดลวมเปิดที่ระยะเวลาต่างๆ มีผลให้สูญเสียไฮดรอกซีโปรตีนในลักษณะและปริมาณที่สอดคล้องกับการกำจัดโปรตีน (Figure 26) โดยคอลลาเจนที่สูญเสียส่วนใหญ่ น่าจะเป็น type I ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อด้านนอก อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงลักษณะคอลลาเจนที่เหลือโดยเทคนิค SDS-PAGE ในการทดลองต่อไปจะช่วยระบุผลของความร้อนต่อคอลลาเจน type II ในกระดูกอ่อนหลุดลวมได้

การใช้วิธีการต้มและลวกมีผลให้สูญเสียคอนทรอยตินซัลเฟตในปริมาณร้อยละ 0.7-0.8 ดังแสดงใน Figure 27 ซึ่งน้อยกว่าการสูญเสียเมื่อใช้ค้างและเอนไซม์ ผลของความร้อนต่อการสูญเสียหรือต่อการสกัดสารในกลุ่มมิวโคพอลิแซคคาไรด์ซัลเฟตขึ้นกับชนิดวัตถุดิบ อุณหภูมิ และเวลาในการให้ความร้อน จากการศึกษาของ Gu และคณะ (1999) เกี่ยวกับการสกัดแยกมิวโคพอลิแซคคาไรด์ซัลเฟตจากเพรียงหัวหอมชนิดนี้ (*Ciona intestinalis*) โดยใช้วิธีการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30-180 นาทีพบว่าสามารถสกัดมิวโคพอลิแซคคาไรด์ซัลเฟตได้ 4.3-5.9% Shin และคณะ (2006) ได้ศึกษาการสกัดแยกมิวโคพอลิแซคคาไรด์จากกระดูกอ่อนหน้าอกไก่บดแห้ง โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 -120 นาที พบว่าได้ผลผลิตมิวโคพอลิแซคคาไรด์ 34.74 - 40.09% ที่มีคอนทรอยตินซัลเฟตเป็นองค์ประกอบอยู่ 25.83 - 28.46% ซึ่งคำนวณเป็นปริมาณคอนทรอยตินซัลเฟตได้ปริมาณ 9.50 -11.41 %

สัดส่วนของไฮดรอกซีโพรลีนต่อโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการต้ม มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.085 - 0.091 (Figure 28) โดยตัวอย่างที่ต้มเป็นเวลา 30 นาที มีค่าสัดส่วนของไฮดรอกซีโพรลีนต่อโปรตีนสูงที่สุดคือ 0.091 และมีการสูญเสียคอนทรอยตินซัลเฟตค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 6.94 แต่การลวกหลอดลมเปิดที่ต้มเป็นเวลา 30 นาที ยากกว่าการต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ประกอบกับตัวอย่างที่ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าสัดส่วนของไฮดรอกซีโพรลีนต่อโปรตีนและค่าร้อยละการสูญเสียคอนทรอยตินซัลเฟตใกล้เคียงกับการต้มเป็นเวลา 30 นาที คือ 0.089 และ 8.41 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเวลาในการต้มหลอดลมเปิด 1 ชั่วโมง ในการกำจัดส่วนประกอบอื่นๆ จากหลอดลมเพื่อนำกระดูกอ่อนที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

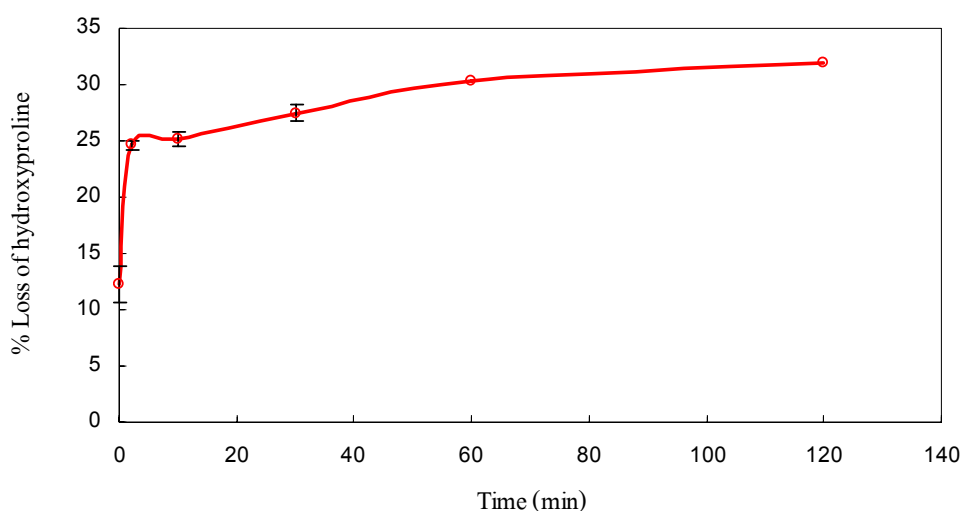


Figure 26. Loss of Hydroxyproline after boiling for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C

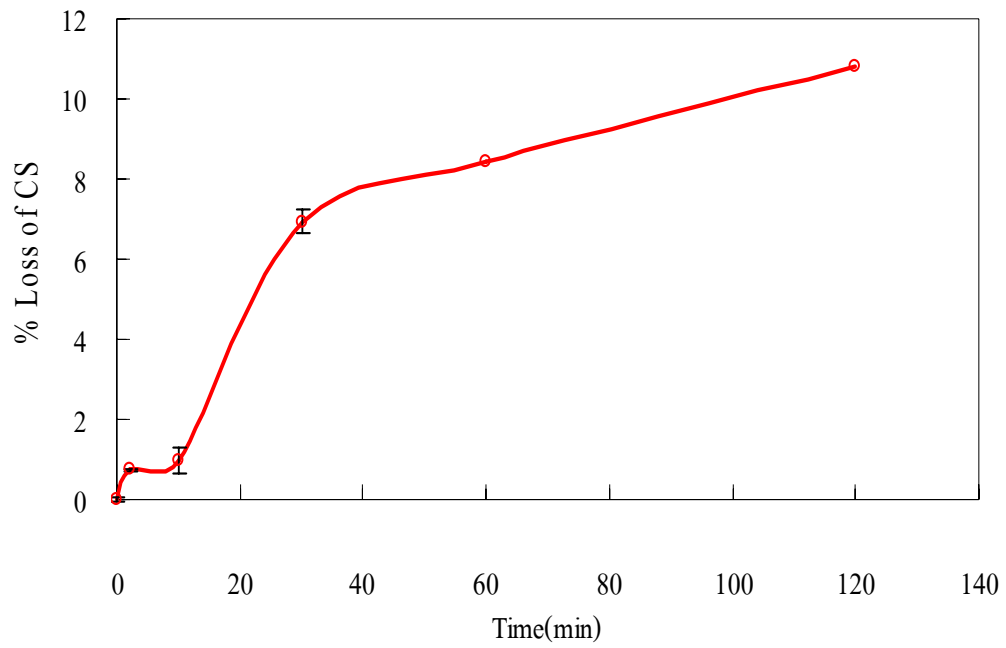


Figure 27. Loss of chondroitin sulfate after boil for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C

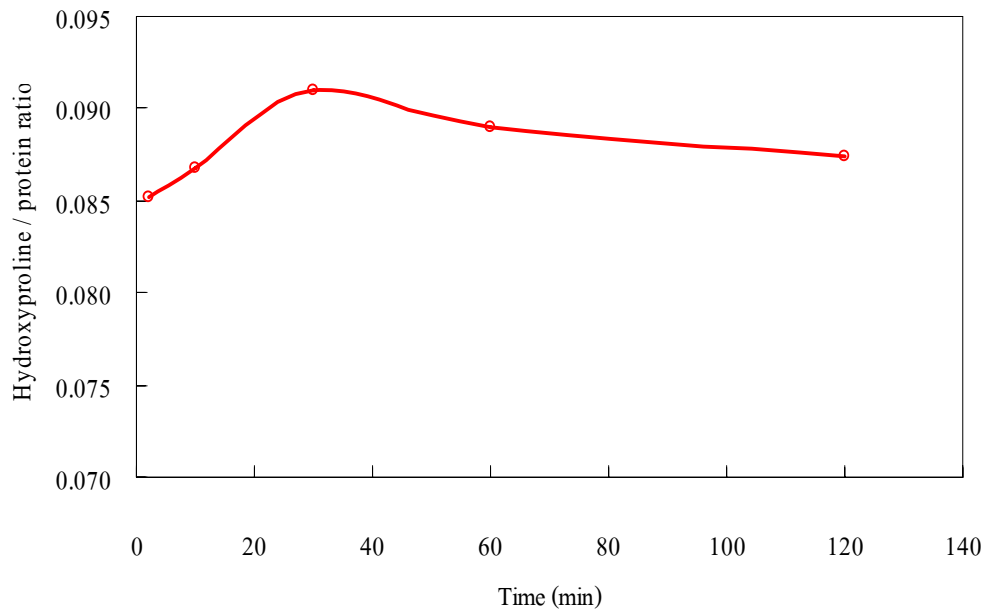


Figure 28. The ratio of hydroxyproline/protein remained in trachea samples after boil for 2, 10, 30, 60 and 120 min at 90-95°C

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการทดลองกำจัดโปรตีนอื่นๆ โดยการใช้วิธีที่แตกต่างกัน

3 วิธีคือการใช้ด่าง การใช้เอนไซม์อัลคาเลส และการต้มในน้ำเดือด (90-95^oซ) ร่วมกับลอกใน Table 14 พบว่าวิธีการใช้ด่างจะทำให้สูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตค่อนข้างสูงกว่าวิธีการใช้เอนไซม์ และการต้มจึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม ขณะที่วิธีการใช้เอนไซม์อัลคาเลสสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตต่ำกว่าแต่สามารถกำจัดโปรตีนได้ใกล้เคียงกับการใช้ด่าง ส่วนวิธีการต้มในน้ำเดือดและลอกนั้น พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนได้มากคืออยู่ในช่วงร้อยละ 42.7-48.0 และสูญเสียคอลลาเจนไปค่อนข้างสูง แต่สูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำมาก ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์และความร้อน โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟต และคอลลาเจนน้อย แต่กำจัดโปรตีนได้มากคือการใช้ 0.1% alcalase เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และการต้มในน้ำเดือด (90-95^oซ) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงร่วมกับการลอก

Table 14. Comparison of protein removal, hydroxyproline (Hyp) and chondroitin sulfate (CS) loss from duck trachea cartilage prepared by different methods

Pretreatment	Protein removal (%)	Hyp loss (%)	CS loss (%)
Alkaline	6.5-44.0	4.5-24.3	11.3-54.5
Enzyme	10.7-33.1	2.3-17.5	8.7-38.0
Heat	42.7-48	24.6-34.9	0.7-10.8

2.1.4 ผลของวิธีการเตรียมต่อชนิดและรูปแบบคอลลาเจนในกระดูกอ่อนหลอดลมเปิด

เนื่องจากไฮดรอกซีโปรลีนเป็นตัวบ่งชี้สำหรับปริมาณคอลลาเจนทุกชนิด ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรลีนที่สูญเสียไปนั้นจึงไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นคอลลาเจนชนิดใด นอกจากนั้นเพื่อให้ทราบถึงผลของ pretreatment ต่อคอลลาเจนที่เหลือในกระดูกอ่อน จึงได้ทำการศึกษารูปแบบของคอลลาเจนในกระดูกอ่อนหลังการกำจัดส่วนประกอบอื่นจากหลอดลมเปิดด้วยวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 2.1.2-2.1.3 คือการใช้เอนไซม์อัลคาเลส 0.1% เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและวิธีการต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงร่วมกับการลอก โดยเทคนิค SDS- PAGE ดังแสดงใน Figure 29 พบว่าเปปไทด์ของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหลอดลมที่ผ่านการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส (lane2) นั้นปรากฏแถบของเปปไทด์ $\alpha_1(I)$ ใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับคอลลาเจนจากหลอดลมเปิดเริ่มต้น (lane3) และมีขนาดเท่ากับ α_1 ของคอลลาเจน type II (lane4) บ่งชี้ว่าคอลลาเจนที่ถูกกำจัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน type I ซึ่งเป็นคอลลาเจนที่อยู่ในส่วนเนื้อเยื่อด้านนอก ส่วนคอลลาเจน type II ในกระดูกอ่อนยังคงเหลืออยู่ในสภาพปกติ ขณะที่การต้มและลอกเพื่อกำจัดองค์ประกอบอื่น พบว่ากระดูกอ่อนที่ได้เมื่อนำมาสกัดคอลลาเจนด้วยวิธี

เดียวกัน คอลลาเจนที่ได้มีเปปไทด์ α_1 , α_2 และ β น้อยมาก (lane 1) และมีเปปไทด์ขนาดเล็กที่บริเวณ dye front ซึ่งบ่งชี้ว่าคอลลาเจนส่วนใหญ่ภายในกระดูกอ่อนนั้นถูกตัดย่อยเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กเมื่อผ่านการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังนั้นปริมาณคอลลาเจนที่สูญเสียไปจากการต้มในผลการทดลองข้อ 2.1.3 จึงอาจรวมถึง คอลลาเจน type II ในกระดูกอ่อนด้วย

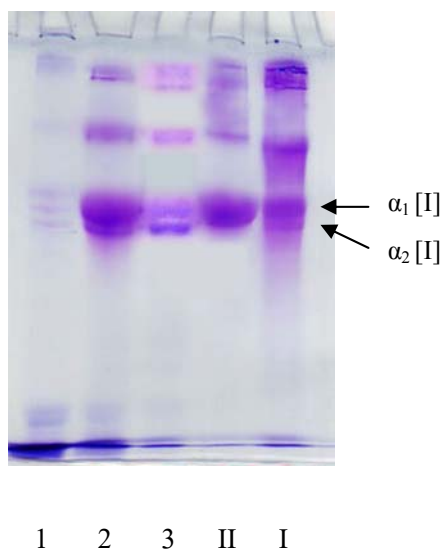


Figure 29. SDS-PAGE patterns of pepsin-solubilized collagens from heat treated duck trachea (lane 1), enzyme treated duck trachea (lane 2), compared with non-treated duck trachea (lane 3), standard type II collagen (II) and standard type I collagen (I).

2.1.5 ผลของวิธีการเตรียมต่อชนิดและสัดส่วน Δ Di-4S/ Δ Di-6S ของคอนครอยดินในกระดุกอ่อนหลอดลมเปิด

การกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ จากกระดุกอ่อนโดยการใช้ดังนั้นนอกจากจะมีผลให้เกิดการสูญเสียคอนครอยดินซัลเฟตในปริมาณสูงกว่าวิธีการใช้เอนไซม์และความร้อนแล้ว ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัดส่วนคอนครอยดินซัลเฟตแต่ละชนิดที่เหลือในตัวอย่างหลอดลมด้วย โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ ความเข้มข้นของด่าง และเวลาที่ใช้ในการแช่มีผลทำให้ปริมาณของ Δ Di-4S ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 15 อันมีผลทำให้สัดส่วน Δ Di-4S/ Δ Di-6S ลดลงเหลือน้อยกว่า 1 ซึ่งตรงข้ามกับวัตถุประสงค์เริ่มต้นที่มีค่าสัดส่วน Δ Di-4S/ Δ Di-6S มากกว่า 1 ขณะที่การกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสและความร้อนนั้นยังคงมีสัดส่วนของ Δ Di-4S/ Δ Di-6S มากกว่า 1 เช่นเดิม การลดลงของ Δ Di-4S อาจมีผลมาจากสถานะต่างมีผลตัดย่อยสารโพลีแซคคาร์ไรด์ออกเป็นกลุ่มซัลเฟต และโมโนแซคคาร์ไรด์ดังรายงานของ Gu และคณะ (1999) ซึ่งทำการสกัดสารมิวโคโพลีแซคคาร์ไรด์จากเพรียงหัวหอมชนิดอ่อน (*Ciona intestinalis*) และพบว่าการใช้ความร้อนร่วมกับกรดหรือด่าง (0.1 M HCl หรือ 0.1 M NaOH) มีผลทำให้ปริมาณมิวโคโพลีแซคคาร์ไรด์ในสารสกัดลดลงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ตรวจวัดหมู่ซัลเฟต ซึ่งพวกเขาอธิบายว่าการใช้กรดหรือด่างอาจมีผลตัดย่อยสารมิวโคโพลีแซคคาร์ไรด์ซัลเฟตเป็น โมโนแซคคาไรด์และซัลเฟต กลุ่มซัลเฟตที่ถูกตัดออกสูญเสียไประหว่างไดอะไลซิสเกลือ ทำให้เหลือหมู่ซัลเฟต ของคอนครอยดินซัลเฟตที่วิเคราะห์ได้น้อยลง ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงบ่งบอกว่าการใช้ค่าสัดส่วน Δ Di-4S/ Δ Di-6S เป็นตัวบ่งชี้แหล่งที่มา (แหล่งสัตว์บกหรือสัตว์น้ำ) ของคอนครอยดินซัลเฟตในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ต่างในการผลิตนั้นอาจไม่เหมาะสมหรืออาจผิดพลาดได้

Table 15. Δ Di-0S, Δ Di-4S, Δ Di-6S contents and Δ Di-4S/ Δ Di-6S ratio of duck trachea after alkali, enzyme and heat treatments

Treatment	Time (Hour)	% Contents			Δ Di-4S / Δ Di-6S
		CS0	CS6	CS4	
Raw material	-	0.101±0.007 ^c	0.152±0.008 ^{de}	0.365±0.019 ^a	2.410 ^{ab}
0.05 M NaOH, 4°C	1	0.093±0.001 ^{de}	0.132±0.003 ^{ef}	0.262±0.006 ^b	2.554 ^a
	3	0.099±0.000 ^c	0.136±0.012 ^e	0.314±0.026 ^{ab}	2.298 ^b
	6	0.107±0.004 ^b	0.194±0.007 ^c	0.145±0.028 ^e	0.754 ^d
0.05 M NaOH, RT	1	0.110±0.007 ^{ab}	0.182±0.011 ^{cd}	0.172±0.010 ^d	0.944 ^c
	3	0.114±0.006 ^a	0.183±0.010 ^{cd}	0.168±0.007 ^d	0.918 ^c
	6	0.110±0.007 ^{ab}	0.180±0.012 ^d	0.162±0.010 ^{de}	0.905 ^c
0.1 M NaOH, 4°C	1	0.114±0.000 ^a	0.235±0.001 ^a	0.179±0.001 ^{cd}	0.759 ^d
	3	0.108±0.001 ^b	0.232±0.015 ^a	0.195±0.001 ^c	0.801 ^d
	6	0.100±0.001 ^c	0.212±0.000 ^b	0.168±0.001 ^d	0.793 ^d
0.1 M NaOH, RT	1	0.097±0.000 ^{cd}	0.207±0.001 ^b	0.164±0.001 ^{de}	0.790 ^d
	3	0.090±0.001 ^e	0.184±0.002 ^{cd}	0.148±0.002 ^e	0.808 ^d
	6	0.061±0.000 ^f	0.124±0.000 ^f	0.100±0.000 ^f	0.808 ^d
Raw material	-	0.154±0.003 ^a	0.337±0.011 ^a	0.555±0.002 ^a	1.648 ^d
	1	0.072±0.031 ^{abcd}	0.214±0.037 ^b	0.450±0.008 ^{ab}	2.152 ^{bcd}
0.1% Alcalase	2	0.085±0.007 ^{abc}	0.202±0.040 ^{bc}	0.391±0.034 ^{bc}	2.024 ^{bcd}
	3	0.079±0.002 ^{abcd}	0.164±0.006 ^d	0.399±0.002 ^b	2.440 ^b
	6	0.069±0.000 ^{abcd}	0.190±0.005 ^{bcd}	0.327±0.001 ^d	1.725 ^d
0.3% Alcalase	1	0.087±0.000 ^{ab}	0.233±0.001 ^{ab}	0.393±0.002 ^{bc}	1.687 ^d
	2	0.095±0.004 ^{ab}	0.204±0.003 ^b	0.368±0.001 ^{bc}	1.799 ^{cd}
	3	0.064±0.000 ^{bcd}	0.197±0.000 ^{bc}	0.356±0.000 ^{cd}	1.802 ^{cd}
	6	0.091±0.046 ^{ab}	0.176±0.026 ^{cd}	0.288±0.073 ^e	1.718 ^d
0.5% Alcalase	1	0.015±0.003 ^e	0.072±0.002 ^f	0.392±0.012 ^{bc}	5.477 ^a
	2	0.058±0.004 ^{cd}	0.114±0.002 ^e	0.263±0.003 ^e	2.302 ^b
	3	0.080±0.017 ^{abcd}	0.106±0.002 ^e	0.220±0.012 ^f	2.075 ^{bcd}
	6	0.054±0.010 ^d	0.091±0.003 ^{ef}	0.205±0.010 ^f	2.251 ^{bc}

Table 15. Δ Di-0S, Δ Di-4S, Δ Di-6S contents and Δ Di-4S/ Δ Di-6S ratio of duck trachea after alkali, enzyme and heat treatments (continued)

Treatment	Time (Hour)	% Contents			Δ Di-4S / Δ Di-6S
		CS0	CS6	CS4	
Raw material	-	0.086±0.001 ^a	0.218±0.010 ^a	0.625±0.000 ^a	2.871 ^a
	2	0.055±0.001 ^b	0.164±0.002 ^b	0.466±0.001 ^b	2.839 ^a
Heat	10	0.046±0.002 ^c	0.168±0.000 ^b	0.469±0.002 ^b	2.784 ^a
	30	0.0043±0.001 ^c	0.148±0.000 ^b	0.381±0.002 ^c	2.593 ^b
	60	0.042±0.003 ^d	0.155±0.006 ^c	0.428±0.001 ^c	2.765 ^a
	120	0.041±0.002 ^d	0.151±0.002 ^c	0.423±0.002 ^d	2.807 ^a

*Based on dry weight of raw material. Values expressed as means \pm S.D. ($n = 4$).

^{a,b,c,d} Different superscripts in each column denote significant difference ($p < 0.05$)

2.2 ผลการย่อยสกัดรอยตีนซัลเฟตจากกระดูกอ่อนหลอดลมเป็ด

การทดลองส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะการย่อยคอนครอยตีนซัลเฟตให้เป็นอิสระเพื่อส่งเสริมการละลายและการดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากโมเลกุลของคอนครอยตีนซัลเฟตเชื่อมต่อกับโปรตีนที่เรียกว่า core protein (แกนโปรตีน) ด้วยพันธะไกลโคซิดิกของหน่วยย่อน้ำตาลและหมู่ไฮดรอกซิลของอะมิโน serine และตั้งอยู่ในโครงข่ายของคอลลาเจน type II โดยการเตรียมกระดูกอ่อนหลอดลมเป็ดด้วยวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 2.1.2 และ 2.1.3 คือใช้เอนไซม์อัลคาเลส 0.1% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือการต้ม 1 ชั่วโมงร่วมกับการลอก จากนั้นนำไปย่อยโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเข้มข้น 0.0625-1.0% เป็นเวลา 1-10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65^oC และติดตามปริมาณและขนาดของโปรตีน คอนครอยตีนซัลเฟต และคอลลาเจนที่ถูกย่อยเพื่อคัดเลือกสถานะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการขึ้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไป

2.2.1 ผลผลิตโปรตีน คอลลาเจนไฮโดรไลเสทและคอนครอยตีนซัลเฟตจากการย่อย

กระดูกอ่อนหลอดลมเป็ดที่เตรียมโดยทั้ง 2 วิธี เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆพบว่าโปรตีน, ไฮดรอกซีโปรตีน และคอนครอยตีนซัลเฟตส่วนใหญ่ (>80% ของปริมาณที่ย่อยใน 10 ชั่วโมง) ถูกย่อยในชั่วโมงแรก เมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.0625%- 0.25% ปริมาณโปรตีน คอลลาเจน และคอนครอยตีนซัลเฟตที่ถูกย่อยจากกระดูกอ่อนหลอดลมเป็ดมากขึ้น แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มจาก 0.25%-1.0% ปริมาณการย่อยกลับลดลงดังแสดงใน Figure 30 และ 31 ผลผลิตหรือประสิทธิภาพการย่อย

กระดุกอ่อนที่ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จาก 0.25% เป็น 0.5% และ 1.0% นั้นมีสาเหตุจากลักษณะการย่อยของเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปกล่าวคือในชั่วโมงแรกปาเปนตัดย่อยแบบสุ่มทั้งโครงสร้างของกระดุกอ่อน เมื่อได้ผลผลิตเปปไทด์ขนาดใหญ่ซึ่งมีกลุ่มของคอนครอยตินซัลเฟตในปริมาณหนึ่ง เอนไซม์ที่มีปริมาณสูง (> 0.25%) จะเข้าย่อยเปปไทด์เหล่านี้มากกว่าการย่อยสลายกระดุกอ่อนซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานาขนาดคอนครอยตินซัลเฟตที่ได้ในข้อ 2.2.2 ที่พบว่าการใช้เอนไซม์มากกว่า 0.25% มีผลให้ได้ผลผลิตคอนครอยตินซัลเฟตที่มีขนาดเล็กลง Hardingham (2007) สรุปเปรียบเทียบผลการย่อยโปรตีนโกลแดนด้วยเอนไซม์ทริปซิน, ปาเปน และด่างเจือจางว่าสารคอนครอยตินซัลเฟตซึ่งเชื่อมต่อกับโปรตีน เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินจะได้ชิ้นส่วนที่มีกลุ่มสายโมเลกุลคอนครอยตินซัลเฟตเชื่อมต่อยู่ประมาณ 2-10 สาย ขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนจะได้สายของคอนครอยตินซัลเฟตเดี่ยว ส่วนการใช้ด่างเจือจางจะไปตัดย่อยโดยทำปฏิกิริยา β -elimination ตรงพันธะระหว่าง xylose-serine ปลดปล่อยคอนครอยตินซัลเฟตเป็นอิสระจากโปรตีน

จะเห็นได้ว่าร้อยละผลผลิตโปรตีน, ไฮดรอกซีโปรตีน และคอนครอยตินซัลเฟตจากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกันเนื่องจากปาเปนเป็นเอนไซม์โปรตีนเอสที่สามารถย่อยสายเปปไทด์แบบไม่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นจึงไปย่อยสายเปปไทด์คอลลาเจนและโปรตีนที่เชื่อมต่อกับสารไกลโคซามิโนไกลแคน ทำให้สารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคนซึ่งรวมถึงคอนครอยตินซัลเฟตถูกปลดปล่อยออกมา (Suwan, 2004) ดังนั้นการตรวจวัดผลผลิตโปรตีนอาจเป็นวิธีการติดตามการย่อยคอนครอยตินซัลเฟตอย่างคร่าวๆได้ เมื่อพิจารณาถึงผลของ pretreatment ต่อปริมาณการย่อยหรือผลผลิตโปรตีน คอลลาเจนไฮโดรไลเซส และคอนครอยตินซัลเฟตพบว่าผลผลิตไฮดรอกซีโปรตีน(คอลลาเจนไฮโดรไลเซส) จากการย่อยตัวอย่างหลอดลมเป็ดที่ผ่านการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆ โดยการต้มคือร้อยละ 95.22 ± 0.49 มีค่าสูงกว่าผลการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดโปรตีนอื่นด้วยเอนไซม์คือ 81.19 ± 1.43 เป็นเพราะว่าความร้อนในการต้มทำให้คอลลาเจนที่ตรึงอยู่ในกระดุกอ่อนบางส่วนถูกไฮโดรไลซ์ (Figure 29) มีผลให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ปาเปนได้ง่ายขึ้น สำหรับปริมาณการย่อยโปรตีนจากตัวอย่างหลอดลมเป็ดที่ผ่านการใช้เอนไซม์ (89.17 ± 0.96) มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการต้ม (78.11 ± 0.19) เนื่องจากโปรตีนเหล่านั้นเป็นโปรตีนอื่นๆ ในส่วนที่หุ้มกระดุกอ่อนที่ยังหลงเหลือจึงอาจถูกย่อยได้มากกว่าแต่ไม่มีผลหรือไม่สอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณการย่อยคอนครอยตินซัลเฟตจากกระดุกอ่อน

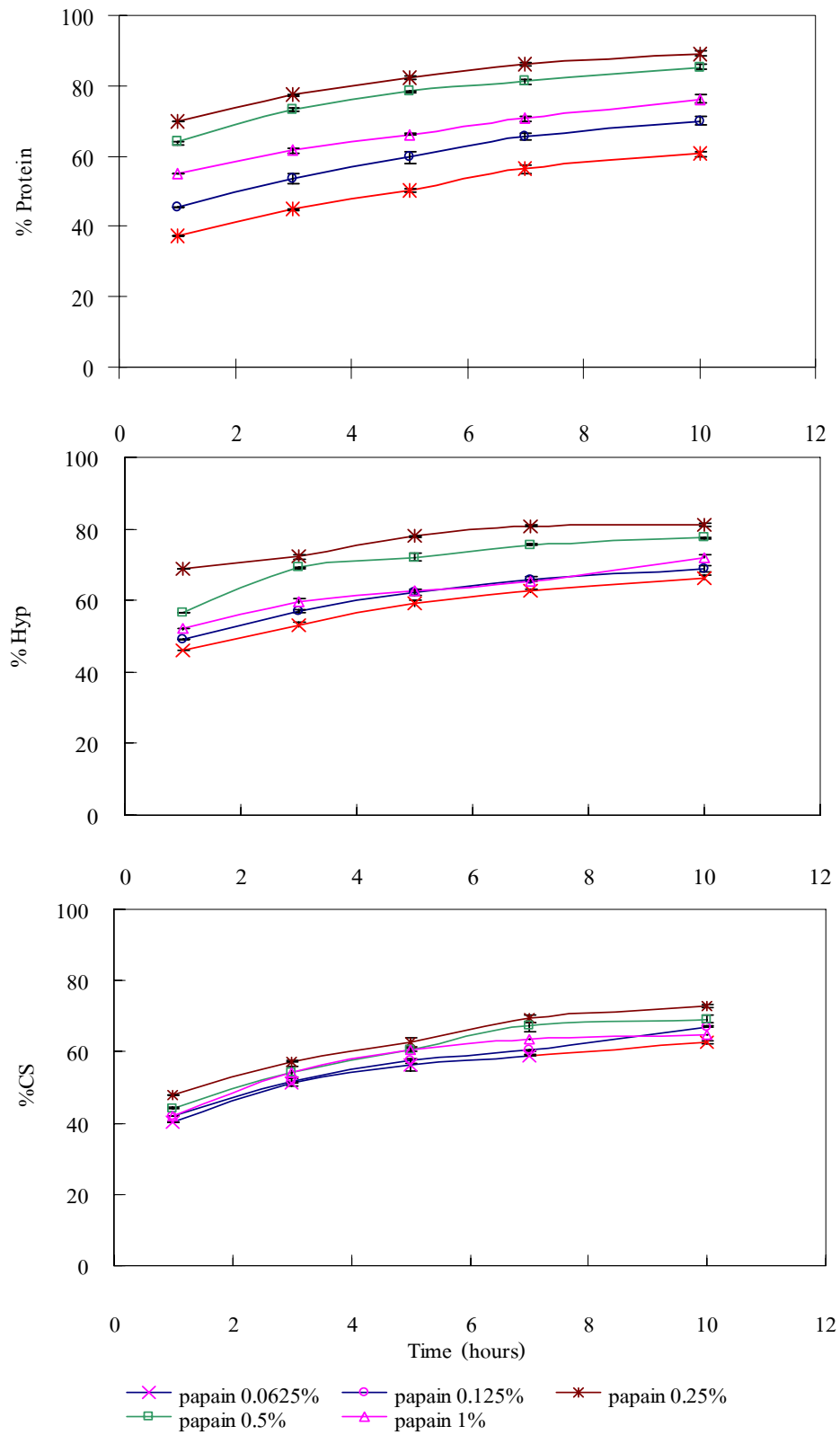


Figure 30. Protein, hydroxyproline (Hyp) and chondroitin sulfate (CS) yields after digestion of enzyme-pretreated duck trachea with 0.0625% - 1.0% papain at 65°C for 1- 10 h.

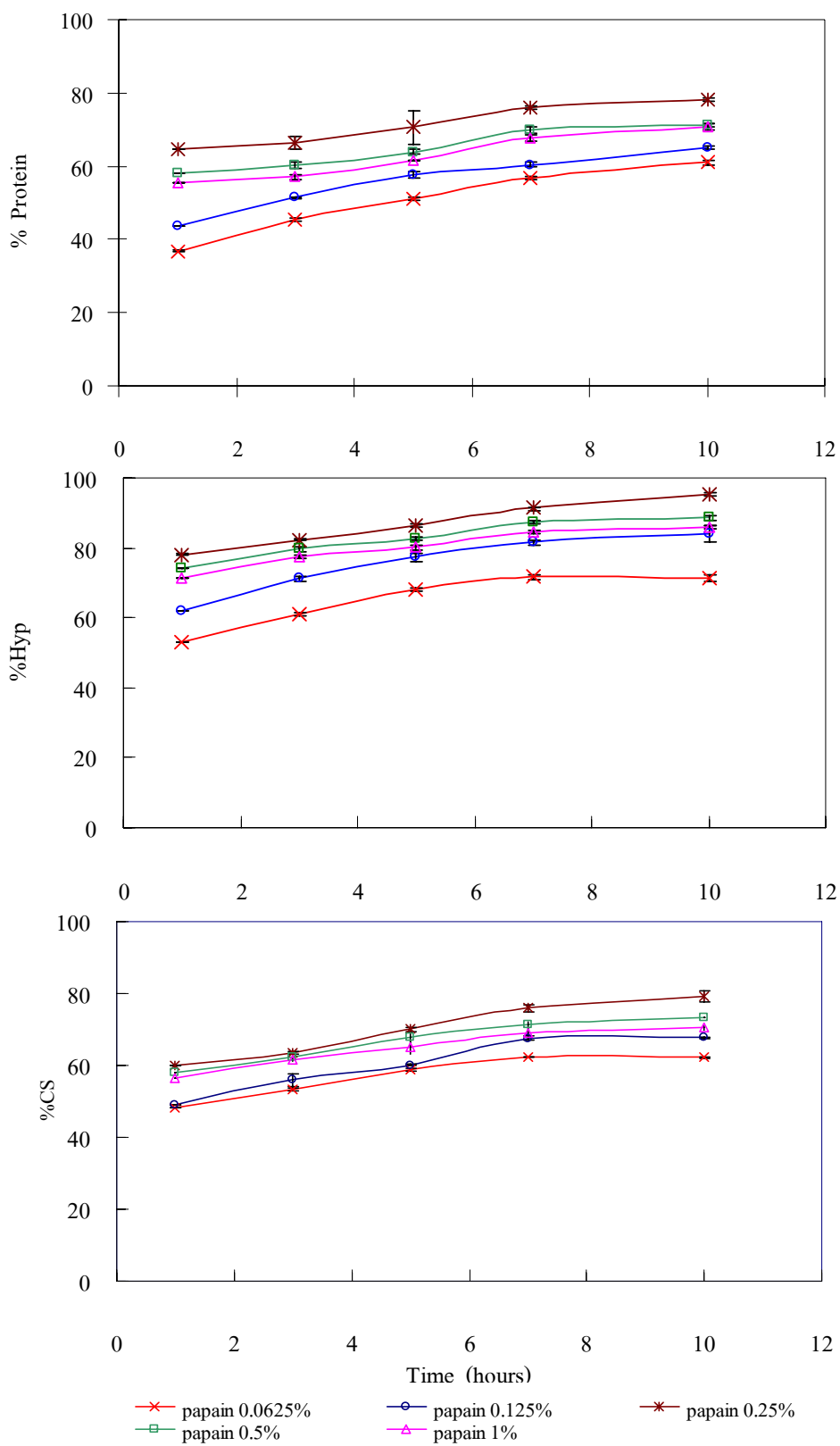


Figure 31. Protein, hydroxyproline (Hyp) and chondroitin sulfate (CS) after digestion of heat-pretreated duck trachea with 0.0625%-1.0% papain at 65°C for 1-10 h.

2.2.2 ขนาดเปปไทด์และคอนครอยตินซัลเฟตจากการย่อยสกัด

เมื่อนำสารละลายจากการย่อยกระดูกอ่อนหลอดลมเปิด (เตรียมโดยการใช้ เอนไซม์อัลคาเลสและการต้ม) ด้วยปาเปน 0.0625, 0.25 และ 1.0% ที่เวลา 1, 5 และ 10 ชั่วโมง มาตกตะกอนด้วย TCA แล้วนำไปศึกษาขนาดเปปไทด์ของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS PAGE พบว่าวิธีการเตรียมกระดูกอ่อนไม่มีผลลักษณะเปปไทด์ที่ย่อยได้ (Figure 32 a,b) โดยเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลที่ประมาณ 24,000 Da และพบเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล ประมาณ 14,200 Da และ 6,500 Da เล็กน้อย เปปไทด์ส่วนใหญ่ที่พบน่าจะเป็นคอลลาเจน ไฮโดรไลเซต เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ของส่วนที่ได้จากการย่อยกระดูกอ่อนคือคอลลาเจน (รายละเอียดในผลการทดลอง 3.1) สำหรับแกนโปรตีนของ aggrecan เป็นโปรตีนส่วนน้อยและเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก Roughley (2006) ระบุว่าแกนโปรตีนในสาย aggrecan อยู่ระหว่างสาม โดเมนที่เป็นกลอบบูลาโปรตีนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เรียกว่า G1-3 มีคอนครอยตินซัลเฟตเกาะติดเป็นกิ่งก้านออกไปที่ช่วงบริเวณ CS1 และ CS2 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีกรดอมิโน 19 หน่วยเรียงต่อกัน 13-33 หน่วย บริเวณดังกล่าวจะถูกตัดโดยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อปลดปล่อยคอนครอยตินซัลเฟต เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นเอนไซม์พบว่าโปรตีนที่ได้จากการใช้ปาเปน 0.0625% (lane 1-3) มีปริมาณเปปไทด์ขนาดต่างๆ น้อยกว่าโปรตีนจากการย่อยด้วยปาเปน 0.25% (lane 4-6) และ 1.0% (lane 7-9) ตามลำดับ แต่มีกลุ่มโปรตีน (aggregate) ขนาดใหญ่ ซึ่งอาจเป็นกลุ่มที่ยังเชื่อมต่อกับ aggrecan ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตหลายๆ โมเลกุลยังคงค้างใน well ผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ว่าความเข้มข้นเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้สกัดย่อยโปรตีนได้มากขึ้น ส่วนเวลาการย่อยที่เพิ่มขึ้นจาก 1 ถึง 10 ชั่วโมง มีผลต่อขนาดเปปไทด์เพียงเล็กน้อย

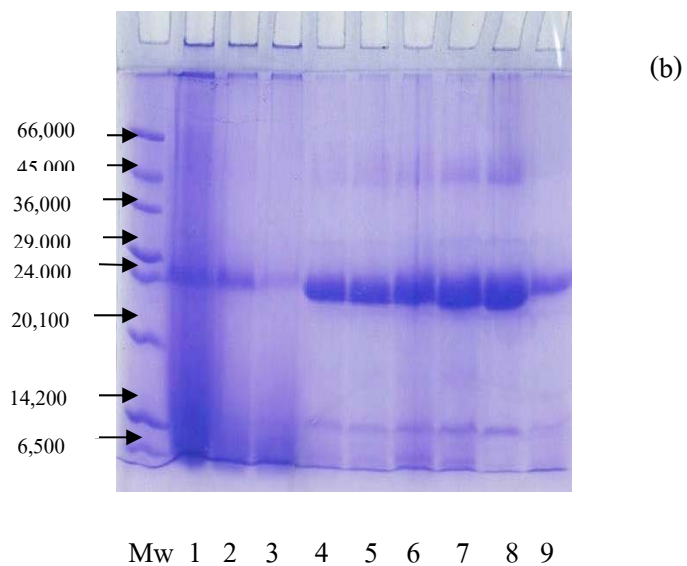
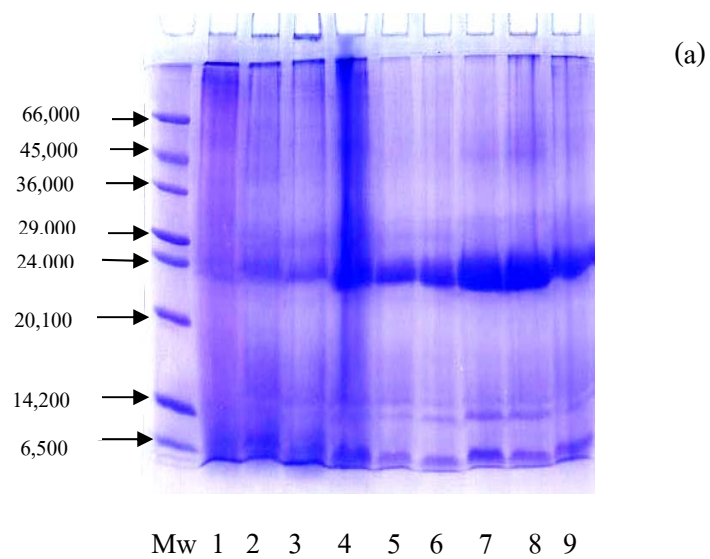


Figure 32. SDS-PAGE patterns of peptides hydrolyzed from enzyme-treated (a) and heat-treated (b) duck tracheas for 1, 5 and 10 h by papain 0.0625% (lane 1-3), 0.25% (lane 4-6) and 1.0% (lane 7-9)

ไม่มีความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตที่ย่อยสกัดได้จากกระดูกอ่อนหลอดลมที่เตรียมด้วยการใช้เอนไซม์ (Figure 33 a,c และ 34 a,c) หรือการต้ม (Figure 33 b,d และ 34 b,d) โดยคอนครอยตินที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน 0.0625 -1.0% เป็นเวลา 1-10 ชั่วโมงมีขนาดอยู่ในช่วงเดียวกับสารมาตรฐานคอนครอยตินซัลเฟตคือ 15,000-40,000 Da แต่มีช่วงขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์คอนครอยตินซัลเฟตทางการค้า Buzzega และคณะ (2010) ศึกษาเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตจากหลอดลมไก่โดยวิธีการ HPSEC (High performance size-exclusion liquid chromatography) และ FACE (Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis) มีขนาดโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 20,540 และ 23,630 ตามลำดับ และมีขนาดโมเลกุลต่ำสุดประมาณ 19,860 และ 21,760 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นปาเปนเท่ากันคือ 0.0625% หรือ 1.0% (Figure 33 a, c หรือ 33 b, d) เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นไม่พบความแตกต่างของช่วงขนาดของโมเลกุลคอนครอยตินซัลเฟต ในขณะที่เวลาการย่อยเท่ากันคือ 1 หรือ 10 ชั่วโมง (Figure 34 a, c หรือ 34 b, d) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์สูงถึง 0.25% ช่วงโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตเริ่มเล็กลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป (>0.25%) จากการย่อยโปรตีนโกลแลนจากกระดูกอ่อน จะไปช่วยย่อยแกนโปรตีนที่เชื่อมต่อกับคอนครอยตินซัลเฟตในกลุ่ม aggrecan ที่ได้ ดังนั้นทำให้โอกาสที่สายคอนครอยตินซัลเฟตจะเป็นสายโมเลกุลเดี่ยวๆ มีมากขึ้นช่วงขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตที่ได้จึงเล็กลง ผลจากการย่อยสารโปรตีนโกลแลนด้วยเอนไซม์ (proteolytic products) ขึ้นกับตำแหน่งการตัดย่อยซึ่งควบคุมโดยชนิดของเอนไซม์ Hardingham (2007) รายงานว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนโกลแลนปลดปล่อยสายโซ่ของคอนครอยตินซัลเฟตออกมา ขณะที่การใช้เอนไซม์ทริปซินนั้นจะตัดย่อยได้กลุ่มของคอนครอยตินซัลเฟตประมาณ 2-10 สายที่ยังเชื่อมต่ออยู่กับแกนโปรตีน

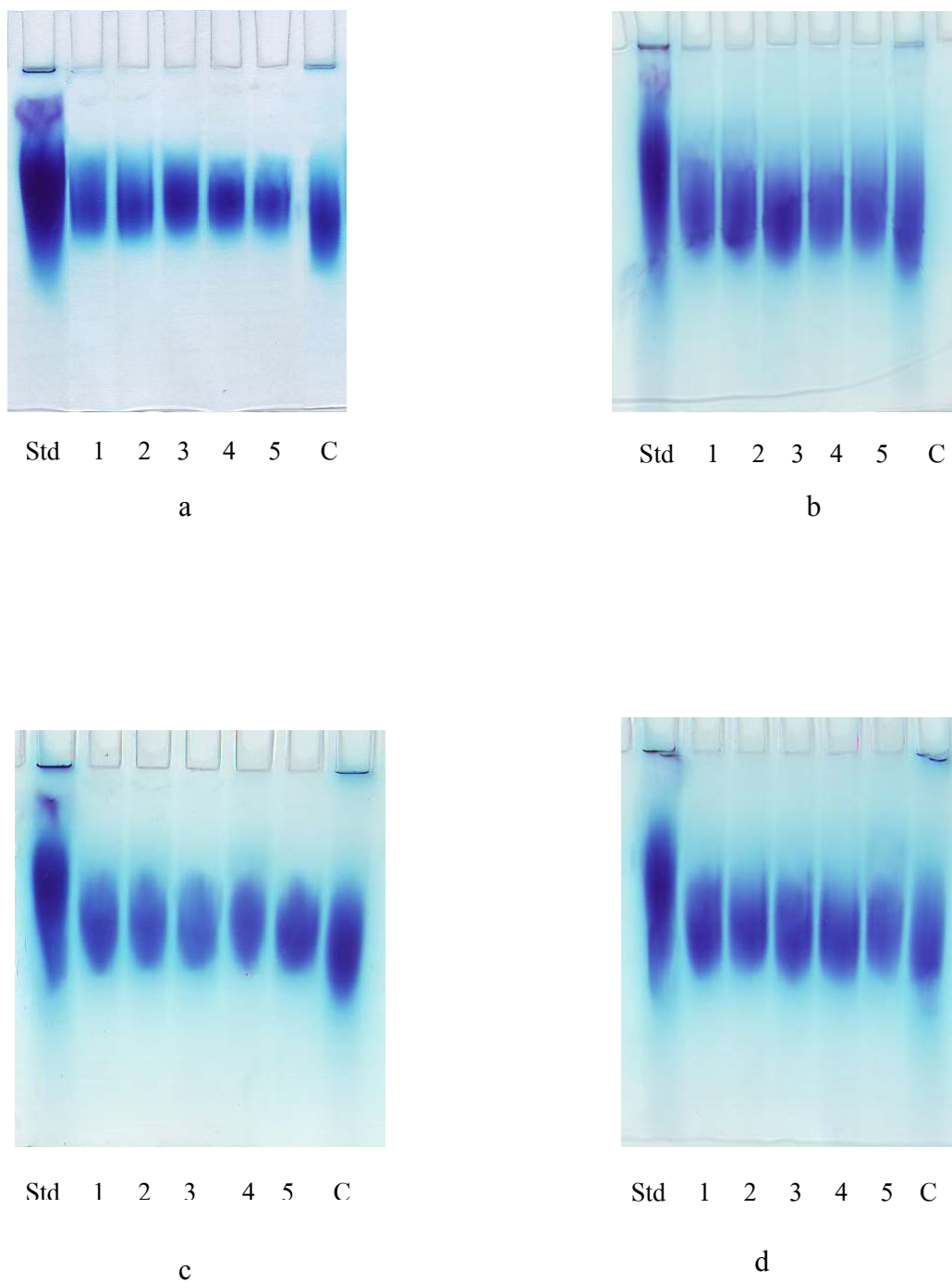


Figure 33. Molecular size of CS from enzyme-treated duck trachea cartilage hydrolyzed for 1, 3, 5, 7 and 10 h (lane1-5) with 0.0625% papain (a) with 1.0% papain (c) and from heat treated duck trachea cartilage hydrolyzed for 1, 3, 5, 7 and 10 h (lane1-5) with 0.0625% papain (b) with 1.0% (d) compared to standard CS 15-40 kDa (Std) and commercial CS product(C) on 12% polyacrylamide gel using 100 μ g CS sample

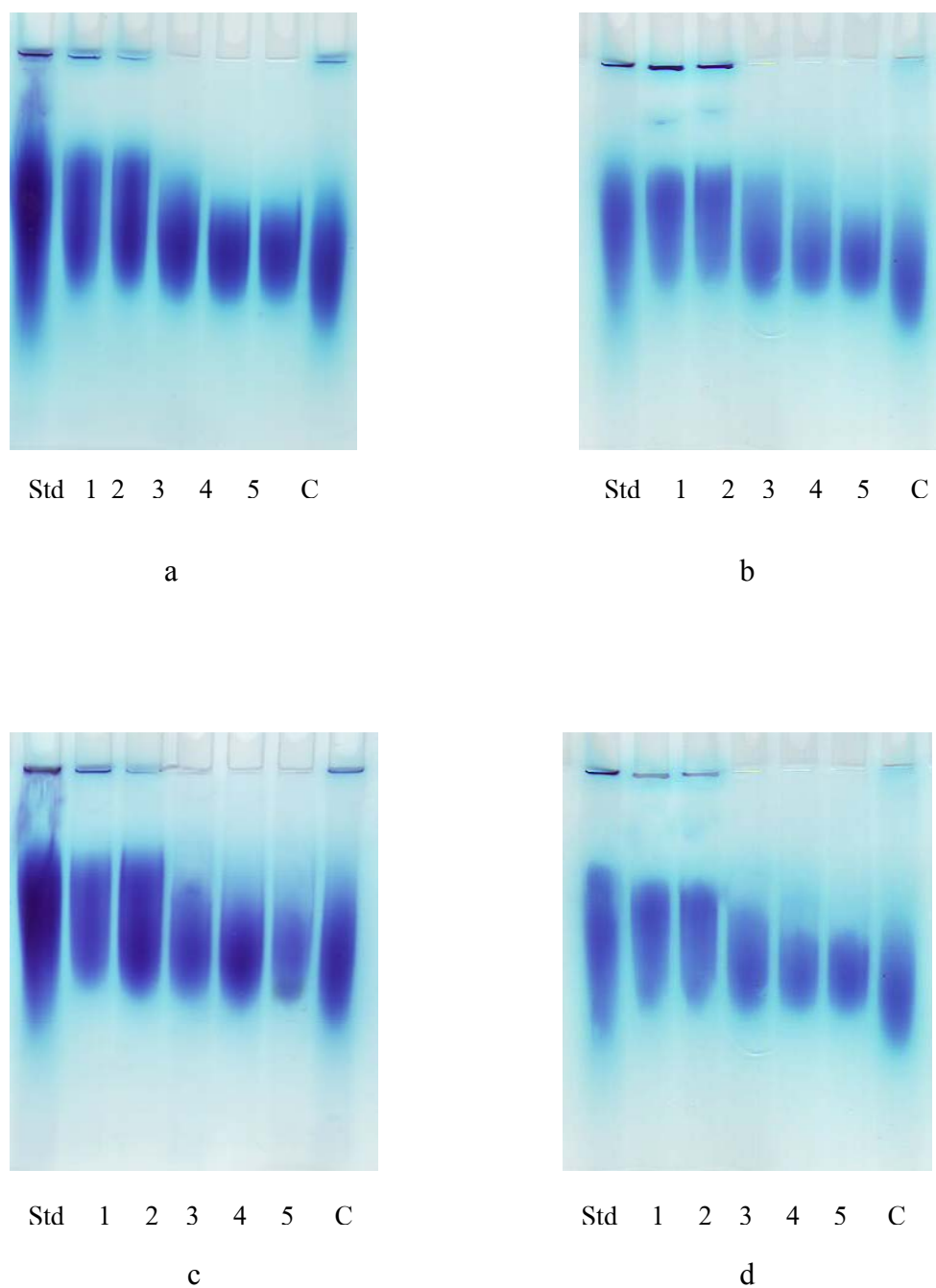


Figure 34. Molecular size of CS from enzyme-treated duck trachea cartilage hydrolyzed with 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5% and 1.0% papain (lane1-5) for 1h (a) hydrolyze for 10 h (c) and from heat-treated duck trachea cartilage hydrolyzed for 1 h (lane1-5) with 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5% and 1.0% papain (b) hydrolyze for 10 h (d) compare to standard CS 15-40 kDa (Std) and commercial CS product (C) on 12% polyacrylamide gel using 100 μ g CS sample

3. ผลผลิต องค์ประกอบเคมีและสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้

จากการทดลองในช่วงต้น ได้คัดเลือกขั้นตอนการเตรียมกระดูกอ่อนโดยกำจัดองค์ประกอบอื่นด้วยวิธีการต้ม 1 ชั่วโมงและลอกเนื้อเยื่ออื่นๆที่ไม่ใช่กระดูกอ่อนออก จากนั้นนำส่วนที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน 0.25% เป็นเวลา 1 หรือ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65° ซ เหวียงแยกส่วนที่ได้จากการย่อยเป็นส่วนสารละลายและส่วนกาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนเป็นเวลา 10 ชั่วโมงมีกาน้อยจึงใช้เฉพาะส่วนสารละลาย ทุกตัวอย่างถูกทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งก่อนใช้ในการวิเคราะห์สมบัติต่างๆ

3.1 ผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์

ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ผลิตด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้น (เทียบกับน้ำหนักหลอดลมเป็ดเริ่มต้น) มีค่าดังแสดงใน Table 16 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยด้วยปาเปน 10 ชั่วโมงมีผลผลิตส่วนที่เป็นสารละลาย (ร้อยละ 46.23) มากกว่าที่ได้จากการย่อย 1 ชั่วโมง (ร้อยละ 33.10)

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้พบว่า ผลิตภัณฑ์ทุกตัวอย่างมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก (52.32 ± 2.43 - 75.00 ± 1.92) ดังแสดงใน Table 17 โดยในผลิตภัณฑ์ที่มาจากส่วนละลาย (soluble part) มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าส่วนกากซึ่งมีค่าสูงคือร้อยละ 27.84 ± 0.85 ซึ่งปริมาณนี้สัมพันธ์กับปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสดังแสดงใน Table 18 สำหรับแร่ธาตุโซเดียมมีมากขึ้นในผลิตภัณฑ์จากการย่อยนาน 10 ชั่วโมง อาจเป็นส่วนที่มาจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ปรับพีเอชระหว่างการย่อย เมื่อพิจารณาปริมาณคอลลาเจนซึ่งคำนวณจากไฮดรอกซีโพรลีนโดยใช้แฟคเตอร์ 8.2 (Bergman และ Loxley, 1963) พบว่ามีค่าน้อยกว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ไนโตรเจนแฟคเตอร์ 6.25) ไม่มากนัก Caperna และคณะ (1994) เสนอแนะว่าในการคำนวณโปรตีนจากไนโตรเจนในตัวอย่างที่มีคอลลาเจนสูงควรใช้แฟคเตอร์ที่ต่ำกว่า 6.25 เนื่องจากสัดส่วนของไนโตรเจนในคอลลาเจนสูงกว่าโปรตีนกล้ามเนื้อทั่วไป ซึ่งในการทดลองนี้หากใช้ไนโตรเจนแฟคเตอร์ที่ต่ำกว่า 6.25 ก็จะทำให้ปริมาณโปรตีนและคอลลาเจนมีค่าใกล้เคียงกันมากขึ้น บ่งชี้ว่าโปรตีนส่วนใหญ่ในผลิตภัณฑ์คือคอลลาเจนไฮโดรไลเสทนั่นเอง

ในผลิตภัณฑ์ที่ย่อยด้วยปาเปนเป็นเวลา 1 หรือ 10 ชั่วโมงมีปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตร้อยละ 9.71 และ 10.63 ซึ่งมากกว่าในกระดูกอ่อนหลอดลม 1.2- 1.3 เท่า และมากกว่าตัวอย่างหลอดลมเป็ดเริ่มต้นประมาณ 2.3 - 2.5 เท่า (Table 17) เมื่อละลายกลับผลิตภัณฑ์และแยกโปรตีนออกโดยการตกตะกอนด้วย TCA พบว่าสามารถเพิ่มคอนครอยตินซัลเฟตเป็นร้อยละ 35-39.06 หรือประมาณ 8-9 เท่าของคอนครอยตินซัลเฟตในหลอดลมเป็ดเริ่มต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปใช้

ทั้งในรูปแบบการบรรจุแคปซูล หรือเป็นส่วนผสมรวมกับกลูโคซามีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า สำหรับเสริมความแข็งแรงและลดข้ออักเสบทั่วไป โดยปริมาณที่แนะนำของสารคอนดรอยติน ซัลเฟตเพื่อให้เกิดผลในการบรรเทาอาการของโรคข้ออักเสบคือวันละ 1,200 มิลลิกรัม วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และอรุณี อิงคากุล (2548) ศึกษาการผลิตผงกระดูกอ่อนอบแห้งจากกระเบน, โรนัน และครีบลามพบว่าผงกระดูกอ่อนจากครีบลามมีคอนดรอยตินซัลเฟตสูงสุดคือ 8.16% (dry basis) รองลงมาคือครีบลาม (7.64%) และโรนัน (5.33%) ตามลำดับ

Table 16. Weight yield of hydrolysis products from duck trachea

Treatments	Yield (% dry basis)
1 h Hydrolysate (soluble part)	33.10
1 h Hydrolysate (insoluble part)	22.82
10 h Hydrolysate (soluble part)	46.23
10 h Hydrolysate (insoluble part)	9.41

Table 17. Comparison of major composition of duck trachea, cartilage and hydrolysis products

Sample	Composition* (% dry basis)				
	Protein ¹	Lipid	Ash	Collagen ²	CS
Tracheas	73.12±0.99	5.87±0.45	11.36±0.69	44.42±0.74	4.28±0.09
Cartilage	62.01±0.74	1.16±0.22	12.94±0.21	43.19±1.11	7.93±0.11
1 h Hydrolysate (soluble part)	75.00±1.92	1.74±0.05	4.79±0.17	61.85±0.97	9.71±0.17
1 h Hydrolysate (insoluble part)	52.32±2.43	0.09±0.01	27.84±0.85	42.30±0.75	6.65±0.08
10 h Hydrolysate (soluble part)	70.22±1.12	0.55±0.02	5.58±0.31	60.67±0.53	10.63±0.10

* Values are expressed as means ± SD. (n = 3)

¹ N Factor = 6.25

² Hydroxyproline x 8.2

Table 18. Major mineral content of products hydrolyzed from duck trachea cartilage

Products	Mineral (% w/w dry basis)			
	Ca	P	Mg	Na
Raw material	6.43±1.24	1.37±0.22	0.15±0.05	0.48±0.09
1 h Hydrolysate (soluble part)	0.44±0.03	0.05±0.02	0.08±0.002	0.39±0.01
1 h Hydrolysate (insoluble part)	15.10±1.59	3.42±0.40	0.12±0.03	0.48±0.06
10 h Hydrolysate (soluble part)	0.23±0.01	0.02±0.01	0.05±0.00	0.72±0.02

* Values are expressed as means ± SD. ($n = 3$)

3.2 ชนิดและขนาดของคอนครอยตินซัลเฟต

คอนครอยตินซัลเฟตในผลิตภัณฑ์จากการย่อย 10 ชั่วโมง (lane 2) มีขนาดเล็กกว่าคอนครอยตินซัลเฟตในผลิตภัณฑ์จากการย่อย 1 ชั่วโมง (lane 1) ดังแสดงใน Figure 35 โดยขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ทั้ง 2 อยู่ในช่วงเล็กกว่า 40,000 Da แต่ไม่ต่ำกว่า 15,000 Da และมีขนาดใหญ่กว่าคอนครอยตินซัลเฟตทางการค้า โดยทั่วไปคอนครอยตินซัลเฟตในผลิตภัณฑ์ทางการค้าจะมีขนาดประมาณ 16,900 Da (NTP, 2002) Sim และคณะ (2007) ได้ศึกษาขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตในกระดูกอ่อนฉลามมง (shark cartilage powder : SCP) 8 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (Finished products: FP) โดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis พบว่าโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตใน SCP และใน FP มีขนาดไม่ต่ำกว่า 15,000 Da โดยส่วนใหญ่มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 40,000 Da นอกจากนี้ Sim และคณะ (2006) ได้ศึกษาขนาดโมเลกุลของคอนครอยตินซัลเฟตในสารสกัดที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ โดยใช้เทคนิค HPSEC พบว่า 12 ตัวอย่างมีขนาดอยู่ในช่วง 9,300 to 28,700 Da และ 7 ตัวอย่างมีขนาดในช่วง 14,000-19,000 Da ขณะที่ 4 ตัวอย่างมีขนาดใหญ่กว่า 20,000 Da และเพียง 1 ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่า 10,000 Da ขนาดของคอนครอยตินมีความสำคัญในแง่การดูดซึมโดยระบบในร่างกาย Adebawale และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองการซึมผ่านของวัสดุคอปคอนครอยตินซัลเฟตทางการค้าโดยใช้ Caco-2-cell monolayer ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นตัวแทนระบบการดูดซึมในลำไส้เล็กได้ดี พบว่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านมีค่าสูงขึ้นเมื่อขนาดโมเลกุลคอนครอยตินซัลเฟตของตัวอย่างเล็กลง โดยขนาดของตัวอย่างคอนครอยตินซัลเฟตที่มีการนำไปศึกษาในสหรัฐอเมริกาและยุโรปแล้วพบว่าสามารถถูกนำไปใช้ในร่างกายได้และให้ผลเชิงรักษา คือ 16,900 Da

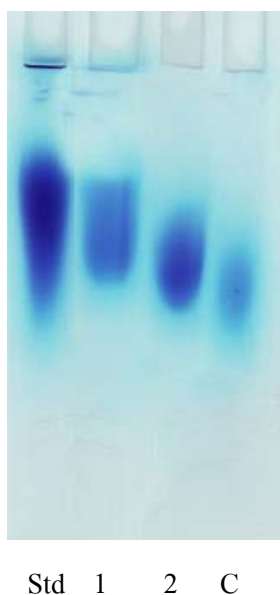


Figure 35. Molecular weight of chondroitin sulfate hydrolyzed from heat treated duck trachea with 0.25% papain for 1 h (lane 1) and for 10 h (lane 2) compared to standard chondroitin sulfate of 15-40 kDa (Std) and commercial chondroitin sulfate product(C)

3.3 ค่าการละลายของผลิตภัณฑ์

ค่าการละลายของผลิตภัณฑ์ที่พีเอชต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C ในช่วงพีเอช 2-9 อาจเป็นตัวบ่งชี้ที่คร่าวๆ ถึงความยากง่ายในการดูดซึมอาหารในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยปกติพีเอชในกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรด pH 2-3 (ชูศักดิ์ เวชแพทย์, 2540) ส่วนในลำไส้เล็กที่ pH 7-8 (มณี อัสวารานนท์, 2525) ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีโปรตีนและคอนดรอยตินซัลเฟตซึ่งมีการดูดซึมที่ลำไส้เล็กเป็นหลัก จากการศึกษาการละลายของผลิตภัณฑ์ที่พีเอชตั้งแต่ 2-9 (Figure 36) พบว่ากระดูกอ่อนหลอดลมที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (ตัวอย่างควบคุม) มีการละลายต่ำที่สุดคือร้อยละ 10.26-19.15 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยปาเปนเป็นเวลา 1 หรือ 10 ชั่วโมง (ส่วนสารละลาย) มีค่าการละลายไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ยกเว้นที่พีเอช 4 โดยมีค่าการละลายสูงที่สุดที่พีเอช 2 คือร้อยละ 94.95 - 95.56 ผลิตภัณฑ์ทุกตัวอย่างมีการละลายต่ำสุดที่พีเอช 4 อาจเนื่องจากเป็นจุดไอโซอิเล็กตริก (pI) ของโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผลิตภัณฑ์ สำหรับส่วนกากหรือส่วนที่ไม่ละลายจากการย่อยมีค่าการละลายต่ำกว่าส่วนละลายแต่สูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการทดลองแสดงว่าการย่อยกระดูกอ่อนโดยใช้เอนไซม์ปาเปนก่อนการทำแห้งมีผลเพิ่มการละลายของผลิตภัณฑ์ทั้งในส่วนที่ยังเป็นกากและส่วนสารละลาย โดยมีการละลายได้ดีขึ้นทั้งสภาวะที่เป็นกรดและด่างซึ่งบ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์สามารถดูดซึม

ได้ง่ายขึ้นหรือเร็วขึ้นทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษร และอรุณี อิงคากุล (2548) ได้ศึกษาค่าการละลายของกระดูกอ่อนปนแห้งของฉลามและกระเบนที่ผ่านการลวกกระดูกสดและแยกเนื้อออก และนำไปอบแห้งที่ 60 °ซ นาน 6 ชั่วโมง พบว่ากระดูกปนแห้งละลายได้ดีที่สุดที่พีเอช 2 เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นถึง 8 การละลายจะลดลงตามลำดับ โดยกระดูกอ่อนปลากระเบนมีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 23.31-60.58 และครีบน้ำมามีค่าการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 21.38 – 36.89

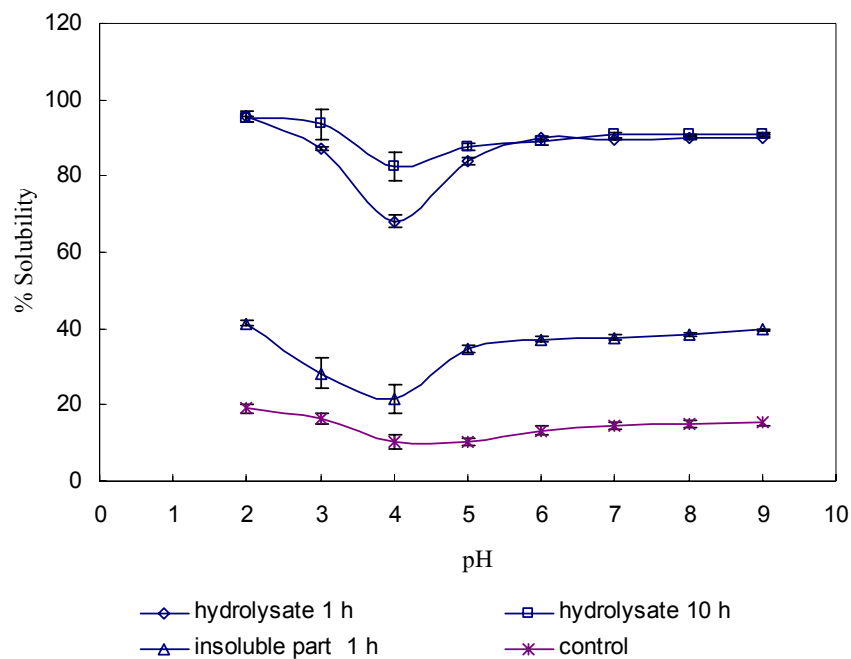


Figure 36. Solubility of dried products at various pH

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

1. หลอดลมนกกระจอกเทศ มีปริมาณไฮดรอกซีโปรตีนและคอนครอยตินซัลเฟตมากที่สุด แต่มีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณวัตถุดิบ หลอดลมเป็ดซึ่งมีปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตมาจากรองมาจากหลอดลมนกกระจอกเทศจึงมีความเหมาะสมเป็นวัตถุดิบในการผลิต

2. หลอดลมของสัตว์ปีกที่ศึกษา มีคอนครอยติน-4-ซัลเฟตมากกว่าคอนครอยติน-6-ซัลเฟตและคอนครอยติน-0-ซัลเฟตตามลำดับ มีค่าสัดส่วนของคอนครอยติน-4-ซัลเฟตต่อคอนครอยติน-6-ซัลเฟตมากกว่า 1 ซึ่งเป็นคอนครอยตินซัลเฟตจากสัตว์ปีก และประกอบด้วยคอลลาเจน type I และ type II ขณะที่กล่องเสียงเป็ดประกอบด้วยคอลลาเจน type II เป็นองค์ประกอบหลัก

3. การเตรียมกระดูกอ่อนจากหลอดลมเป็ดการต้มในน้ำเดือด (90-95°C) ร่วมกับลอกสามารถกำจัดโปรตีนได้มากที่สุด (ร้อยละ 42.7-48) และสูญเสียคอนครอยตินซัลเฟตน้อยที่สุด แต่คอลลาเจนที่ได้จากการต้มถูกย่อยบางส่วน

4. สภาวะที่ใช้ในการย่อยกระดูกอ่อนที่ดีที่สุดคือการใช้เอนไซม์ปาเปนเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยสามารถสกัดย่อยคอนครอยตินซัลเฟตได้ถึงร้อยละ 80

5. ผลผลิตจากการย่อยด้วยปาเปนเป็นเวลา 1 และ 10 ชั่วโมงมีปริมาณมากที่สุดคือ ร้อยละ 46.23 (โดยน้ำหนักแห้งหลอดลม) ผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยโปรตีน และคอนครอยตินซัลเฟตเป็นหลัก โดยปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจากหลอดลมเป็ดเริ่มต้นประมาณ 2.3-2.5 เท่า และมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 15,000-40,000 Da

6. ผลิตภัณฑ์ผงแห้งจากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน 1 และ 10 ชั่วโมงสามารถละลายได้ดีที่สุดที่พีเอช 2 และละลายได้ต่ำสุดที่พีเอช 4 โดยมีการละลายในช่วง pH 2-9 เท่ากับร้อยละ 68.12 - 94.95

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับใช้กลองเสียงเป็ดในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคอนครอยตินซัลเฟตและคอลลาเจนไฮโดรไลเสท เนื่องจากกลองเสียงเป็ดมีเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้มกระดูกอ่อนที่สามารถกำจัดโดยการลอกได้ง่าย และมีปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตที่ใกล้เคียงกับหลอดลมเป็ด นอกจากนี้ยังมี collagen type II เป็นองค์ประกอบหลัก กลองเสียงเป็ดจึงเป็นอีกแหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจ
2. ศึกษาการใช้เอนไซม์โปรตีนเอนอื่นๆเช่นอัลคาเลส หรือความร้อนร่วมกับเอนไซม์ หรือ ดำเนินขั้นตอนการตัดย่อยคอนครอยตินซัลเฟตให้เป็นอิสระจากแกนโปรตีนเพื่อเพิ่มผลผลิตและ/หรือลดระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์อย่างเดียว
3. ศึกษาวิธีการผลิตคอนครอยตินซัลเฟตที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและการนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้นำไปบรรจุแคปซูลหรืออัดเม็ด ตลอดจนการศึกษาค่าของผลิตภัณฑ์ต่อการรักษาโรคข้อกระดูกอักเสบเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่มีคอนครอยตินจากแหล่งอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

- ชุมศักดิ์ พุกษาพงศ์. 2541. ความหวังใหม่ของคนเป็นโรคข้ออักเสบ. ใกล้เคียง. 22: 38-42.
- ชุมศักดิ์ พุกษาพงศ์. 2547. ความหลากหลายของโรคข้ออักเสบ. ใกล้เคียง. 28: 18-25.
- ชูศักดิ์ เวชแพทย์. 2540. ระบบทางเดินอาหาร. *ใน* สรีรวิทยาของมนุษย์. หน้า 348.
กรุงเทพฯ : สวัสดิการพิมพ์.
- บริษัทหมอมวลชน 2000 จำกัด. 2546. กระดูกอ่อนปลาฉลาม. ว. ยา 22: 50-52.
- ประวิทย์ ดันดีสุวิฑูล. 2549. คอลลาเจนมิใช่มีประโยชน์เพียงแต่ความสวยเท่านั้น. ว. ยา. 24: 42-43.
- Anon. 2522. Supporting Tissue: The Skeleton. *ใน* Comparative Anatomy of Vertebrate. หน้า 1-2.
สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- มณี อัสวานนท์. 2525. ระบบทางเดินอาหาร. *ใน* สรีรวิทยา. หน้า 223. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- วรรณวิบูลย์ กาญจนคุณุชรและอรุณี อิงคากุล. 2548. การใช้ประโยชน์จากกระดูกอ่อนซึ่งเป็นเศษเหลือจากอุตสาหกรรม: สกัดและการวิเคราะห์ chondroitin sulfate ในกระดูกอ่อน.
กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 78 หน้า
- วิโรจน์ จันทรรัตน์. 2537. ระบบหายใจ. *ใน* กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก. หน้า 546-634.
เชียงใหม่: ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- พิสมัย ประทุมทาน. 2539. หลอดลม. *ใน* กายวิภาค-สรีรวิทยาของการหายใจ. หน้า 40-45
กรุงเทพฯ: มิตรนภาการพิมพ์.
- Adebowale A. O. Cox, D. S., Liang, Z. and Eddington, N. D. 2000. Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. JANA 3(1): 37-44.

- Aigner, T. and Stove, J. 2003. Collagen-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv. Rev.* 55: 1569-1593.
- AOAC. 1999. Official method of analysis 16th ed. Association of Official Analysis Chemists, Washington, DC, USA.
- Aroma (NZ) Ltd. 2008. Shark Cartilage Chondroitin Extract (water soluble grade) (online). Available: http://www.aromanz.com/shark_chond.htm [2008, January 20].
- Belitz, H.D. 1999. Collagen. *In Food Chemistry*. p 540-545. Springer-verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Bergman I., Loxley R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35:1961–1965.
- Bevan, J. 1995. Cartilage. *In Apictorial Handbook of Anatomy and Physiology*. p. 12. Barnes and Noble, New York.
- Bioiberica. Chondroitin Sulfate (online). Available: http://www.bioiberica.com/art_joint_prod1.asp#digestive [2008, February 1].
- Boles, J. A., Rathgeber, B. M. and Shand, P.J. 2000. Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. *Meat Sci.* 55: 223-231.
- Bonifer, L.B. and Froning, G.W. 1996. Chicken skin composition as affected by aqueous washing. *J Food Sci.* 61: 895–898.
- Buehler, M. 2006. Math Model Could Aid Study Of Collagen Ailments(online). Available: <http://www.sciencedaily.com/releases/2006/11/061114190020.htm>. [2008, March 17]
- Buzzega, D., Maccari, F. and Volpi, N. 2010. Determination of molecular mass values of chondroitin sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *J Pharm Biomed Anal.* 51: 969-972.

- Capera, T.J., Gavelek, D. and Vossoughi, J. 1994. Somatotropin alters collagen metabolism in growing pigs. *J. Nurt.* 124: 770-778.
- Carney, S. L. and Muir, H. 1988. The structure and function of cartilage proteoglycan. *Physiol. Rev.* 68: 858-900.
- Chai, H. M. 2005. Collagen fiber (online). Available:
<http://www.pt.ntu.edu.tw/hmchai/Biomechanics/BMmaterial/Collagen.htm>
[2008, March 1].
- Cowman, M.K., Slahetka, M.F., Hittner, D.M. and Kim, J. 1984. Polyacrylamide-gel electrophoresis and Alcian Blue staining of sulphated glycosaminoglycan oligosaccharides. *Biochem. J.* 221: 707-716.
- Emergent Technologies, Inc. (ETC). Emergent Technologies, Inc. Licenses Chondroitin Technology from the University of Oklahoma. Press Release (online). Available:
http://findarticles.com/p/articles/mi_m0EIN/is_2002_Oct_28/ai_93425446 [2002, October 28].
- Foegeding, E. A., Lanier, T.C. and Hultin, H.O. 1996. Collagen. *In Food Chemistry* 3rd edition. (Fennema, O. R., ed). p. 902-906. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Garnjanagoonchorn, W., Wongekalak, A. and Engkagul, A. 2006. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. *Chem Eng Process.* 46: 465-471.
- Grand Planet Enterprise Co., Ltd. 2007. *Trachea (online)*. Available:
www.matayom108.net [2007, October 20].
- Gu, Y. S., Lee, S. H., Park, D. C., Park, J. H., Kim, I. S., Ji, C. I. and Kim, S. B. 1999. Liquefaction methods for production of sulfate mucopolysaccharide from *Ciaona Intestinalis*. *Food sci.* 8: 338-340.

- Hardingham, T. E. 2007. The birth of proteoglycans: the nature of the link between protein and carbohydrate of a chondroitin sulfate complex from hyaline cartilage. *Biochem J.* (Classic) doi:10.1042/BJ2007c002.
- Herbage, D., Bouillet, J. and Bernenco, J. K. 1977. Biochemical and physicochemical characterization of pepsin-solubilized type-II collagen from bovine articular cartilage. *Biochem J.* 161: 303-312.
- Hungerford, D. S. and Jones, L. C. 2003. Glucosamine and Chondroitin sulfate are effective in the management of osteoarthritis. *J. Arthroplasty.* 18 (3 suppl1): 5-9.
- Jedwards International, Inc.. 2005. Shark cartilage powder (online). Available: <http://bulknaturaloils.com/marineoil/sharkcartilage.html> [2007, October 20]
- Kittiphattanabawon, P. 2004. Extraction and characterization of collagen and gelatin from Bigeye Snapper (*priacanthus tayenus*) skin and bone. M.Sc. Thesis, Prince of Songkla University.
- Kiviranta, I., Tammi, M., Lappalainen, R., Kuusela, T. and Helminen, H.J. 1980. The rate of calcium extraction during EDTA decalcification from thin bone slices as assessed with atomic absorption spectrophotometry. *Histochem.* 68: 119-127.
- Laemimli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Leeb, B. F., Schweitzer, H., Montag, K. and Smolen, J. S. 2000. A metaanalysis of chondroitin sulfate in treatment of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 27: 205-211
- Lagocka, J., Sadowska, M. and Synowiecki, J. 1996. Separation and characteristics of different mucopolysaccharides from bovine trachea cartilage. *Food Chem.* 60: 533-536.
- Lou, X. M., Fosmire, G. J., and Leach, R.M. 2002. Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. *Poult. Sci.* 81: 1086-1089.

- Mizuta, S., Hwang, J. H. and Yoshinaka, R. 2003. Molecular species of collagen in pectoral fin cartilage of skate (*Raja kenoei*). Food Chem. 80: 1–7.
- Mendler, M., Eich-Bender S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H. and Bruckner, P. (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. J Cell Biol. 108: 191-197.
- Muccia, A., Schenettia, L. and Volpi, N. 2000. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin. Carbohydr. Polym. 41: 37–45.
- National toxicology program (NTP) department of health and human service. 2002. Chondroitin sulfate: Summary of data for chemical selection (online). Available: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/chondroitin.pdf
- Parmet, S. 2003. Osteoarthritis of the Knee (online). Available: www.medem.com/medlb/article_detailb.cfm?article_ID=ZZZSZS0SKCD&sub_cat=359 [2008, March 13]
- Pearson, A. M. and Young, R. B. 1989. Muscle and Meat Biochemistry. Academic Press Inc. San Diego.
- Petito, G. D. and Petite, A. M. 2002. Oral and injectable nutritional composition. US Patent No. 6476005.
- Pharmaceutical Information Associates, Ltd. 2007. Chondroitin sulfates (online). Available: www.bioiberica.com/jointcare/palbio.htm [2007, January 11]
- Ronca, F. and Palmieri, L. 1998. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. Osteoarthr Cartilage 6:14–21.
- Roughley, P.J. 2006. The structure and function of cartilage proteoglycans. Eur. Cells Mater.12: 92-101.
- Rucker, Perry G. Process for preparing CSA or CSC. 1981. US Patent No. 4302577.

- Sakai, S., Otake, E., Toida, T. and Goda, Y. 2007. Identification of the origin of chondroitin sulfate in health foods. *Chem Pharm Bull.* 55(2) 299-303.
- Sim, J-S., Im, A. R., Cho, S.M., Jang, H. J., Jo, J. H. and Kim, Y. S. 2007. Evaluation of chondroitin sulfate in shark cartilage powder as a dietary supplement: Raw materials and finished product. *Food Chem.* 101: 532-539.
- Shin, S. C., You, S. J., An, B. K. and Kang, C. W. 2006. Study on Extraction of Mucopolysaccharide-protein containing chondroitin sulfate from chicken keel cartilage. *Asian- australasian journal of animal sciences.* 19(4): 601-604.
- Sumi, T., Ohba, H., Ikegami, T., Shibata, M., Sakaki, T., Sallay, I. and Park. S. S. 2002. Method for the preparation of chondroitin sulfate compounds. US Patent No. 6342367.
- Suwan, k. 2004. Study of chondroitin sulfate pattern in cancer pasien serum by capillary electrophoresis. M. Sc. Thesis, Chiang Mai University.
- Teaching Resources Center, UC Davis. 2002. The respiratory system (online). Available: http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/Respiratory/_index.html [2007, December 2].
- Universal Power. 2007. Chondroitin sukfate (online). Available: http://www.myworldcup.com.cn/page_1195110799578.html [2007, November 20].
- Verges. 2000. Chondroitin sulfate. Available source http://www.fda.gov.ohrms/dockets/ac/04/slides/2004-4035S1_08_verges.ppt [2006, Nov. 5].
- Volpi, N. 2004. Disaccharide mapping of chondroitin sulfate of different origins by high-performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography *Carbohydr. Polym.* 55: 273–281.
- Volpi, N. and Maccari, F. 2007. Quantitative and Qualitative Evaluation of Chondroitin Sulfate in Dietary Supplements. *Food Anal.* 1:195–204.

Wong, Y. L. 1997. Structure-Function Relationship of Muscle Protein. *In* Food Proteins and Their Applications. (Damodaran, S. and Paraf, A., eds.). p. 341-392. Marcel Dekker, Inc. New York.

Zhang, Buning., Yingde Cui, Guoqiang Yin, Xinming Li, Xiaoxia Zhou. 2009. Alkaline Extraction Method of Cottonseed Protein Isolate. *Modern Applied Science*. 3: 77-82.

ภาคผนวก

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี micro- Kjeldahl (ดัดแปลงจาก AOAC, 1999)

วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาย่อย และเครื่องดักจับไอกรด
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปตแบบกระเปาะ ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตต์ ขนาด 25 มิลลิลิตร
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
2. กรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4
3. กรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.5 N
4. อินดิเคเตอร์เป็นสารผสมระหว่างเมทิลินบลู และ โบรโมครีซอลกรีน

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างหาคอลมให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 3 กรัมใส่ในหลอดย่อยและทำแบลงค์
2. ใส่สารผสมคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาณ 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยโปรตีนในเตาย่อย แล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ค้างและเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย
5. เปิดสวิทช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส
6. ปลดยทิ้งให้เย็นประมาณ 30-45 นาที
7. นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

ขั้นตอนการกลั่นและไทเทรต

1. จัดอุปกรณ์กลั่นแล้วเปิดสวิทช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

2. นำขบวนการผสมฟูขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 40 มิลลิลิตรและเติมอินดิเคเตอร์เรียวรี่แล้วไปกรองรับขวดที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควมแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้
3. คูดสารละลายตัวอย่างด้วยปิเปตแบบกระเปาะขนาดความจุ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร
4. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควมนานด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ
5. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(A-B) \times N \times 1.4007 \times F}{W}$$

W

เมื่อ A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มัล)

F = แฟกเตอร์ของโปรตีนเท่ากับ 6.25

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

2. การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ไบยูเรท (Copeland, 1994)

วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. vortex mixer
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายไบยูเรท(ซึ่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.5 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรท 6 กรัม เติมน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตรในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร)
2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA

ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100, 200, 300, 400, 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

วิธีการทดลอง

1. ดูดสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน BSA

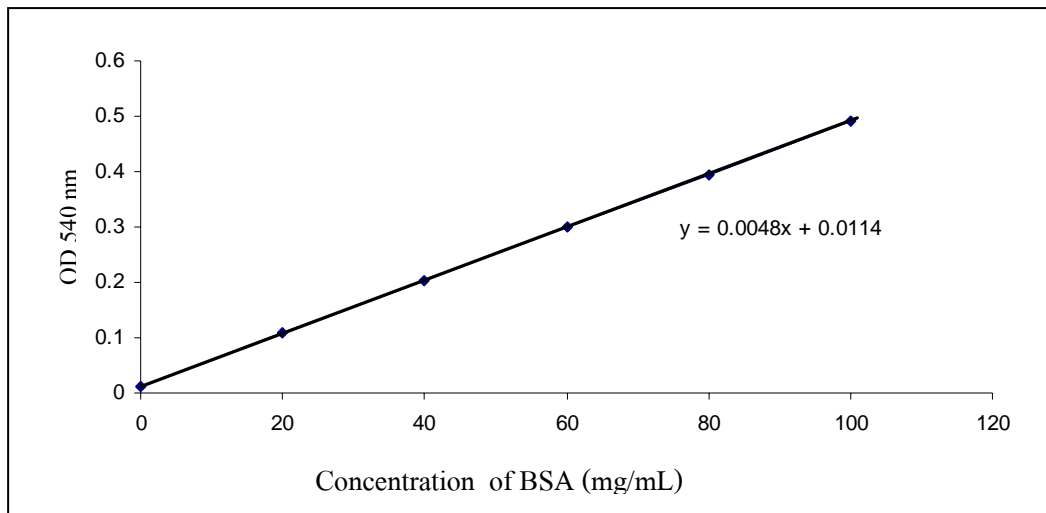


Figure 1 Standard curve of BSA content

3. การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโปรตีน (ดัดแปลงจากวิธีของ Kolar, 1990)

วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
3. หลอดทดลอง
4. vortex mixer
5. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
6. Oil bath

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 N
2. สารละลาย acetate buffer: ชั่ง Sodium acetate trihydrate มา 60 กรัม, citric acid 23 กรัม, sodium hydroxide 17 กรัม และดูดกรด acetic acid มา 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6 ด้วย NaOH หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชาแล้วเก็บในตู้เย็น
3. สารละลาย Ehrlich' s Reagent : ชั่ง 4-dimethylaminobenzaldehyde 2.5 กรัม ปิเปต perchloric acid มา 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปต n-propanal มา 16 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

4. สารละลาย Chloramine T: ชั่ง Chloramine T มา 1.410 กรัม แล้วปิเปต n-propanal และ น้ำกลั่นมาอย่างละ 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม acetate buffer จนได้ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างหลอดลมประมาณ 3 กรัม
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 นอร์มัล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
3. นำตัวอย่างไปย่อยที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำมาปรับ pH เป็น 6.5 และปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร และกรองใช้เฉพาะส่วนใส

ขั้นตอนการวัดหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร
2. ปิเปต chloramine T ลงไป 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer หลังจากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที
3. ปิเปต Ehrlich's Reagent ลงไปและผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer หลังจากนั้นนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
4. นำไปวัด OD ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร
5. คำนวณหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

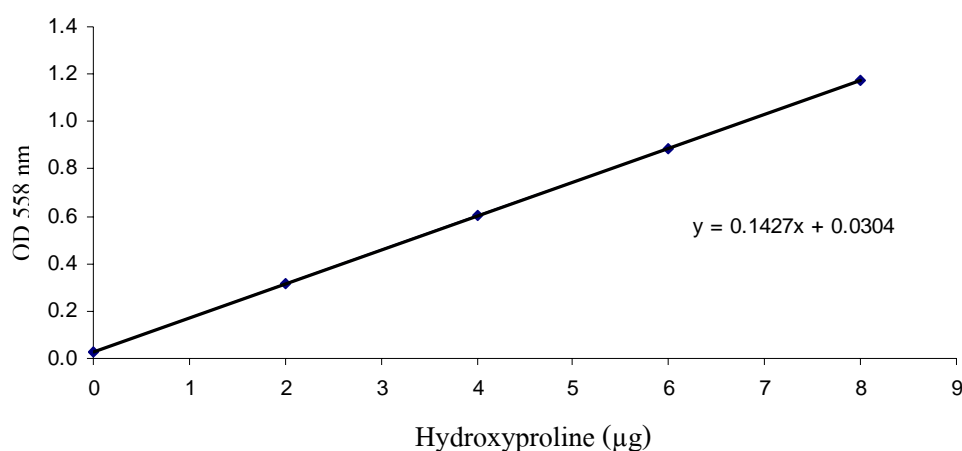


Figure 2. Standard curve of hydroxyproline content

6. คำนวณไฮดรอกซีโปรตีนในตัวอย่างโดยสูตร

$$\% \text{ไฮดรอกซีโปรตีน} = \frac{25A}{MV}$$

เมื่อ A= ปริมาณไฮดรอกซีโปรตีนจากข้อ 5

M= น้ำหนักตัวอย่าง

V= ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ในข้อ 1 (ไมโครลิตร)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC., 1990)

วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมันประกอบด้วยขวดกลม ซอกลेट อุปกรณ์ควมแน่นและเตาให้ความร้อน
2. หลอดใส่ตัวอย่าง
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการวิเคราะห์

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ประมาณ 4 กรัม แล้วใส่ลงในขวดสำหรับใส่ตัวอย่าง กลุ่มด้วยสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดใส่ตัวอย่างใส่ลงในซอกลेट
4. เติมสารตัวทำละลายปีโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 250 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควมแน่นและเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
6. ใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้สารตัวทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควมแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
7. เมื่อครบ 14 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอกลेट ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลออกจากซอกลेटลงในขวดกลมจนหมด
8. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ
9. นำขวดหาไขมันอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียสจนแห้ง ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

10. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนัก 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
11. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตรต่อไปนี้
ปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก = $\frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$

5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เตาเผา
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการวิเคราะห์

1. เเผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อนแล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เเผาซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในเครื่องกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเตาเผาไว้ที่ 550 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2
4. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร
ปริมาณเถ้าคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก = $\frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$

6. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการวิเคราะห์

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ซ้ำมกิ้น นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียด ประมาณ 3 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ซ้ำมกิ้น
5. นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 2 ชั่วโมงและกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ร้อยละปริมาณความชื้น โดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

7. การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของคอนครอยตินซัลเฟต (CS)

7.1 การเตรียมและสกัดคอนครอยตินซัลเฟต (CS)

เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

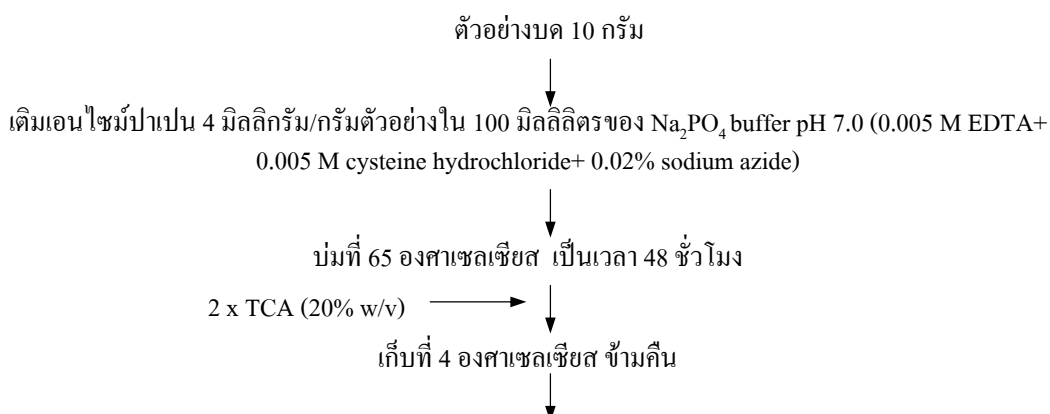
1. เครื่องหมุนเหวี่ยง
2. เครื่อง stirer
3. ถังไดอะไลซิสขนาด MWCO 3500
4. water bath
5. เครื่อง freeze dry

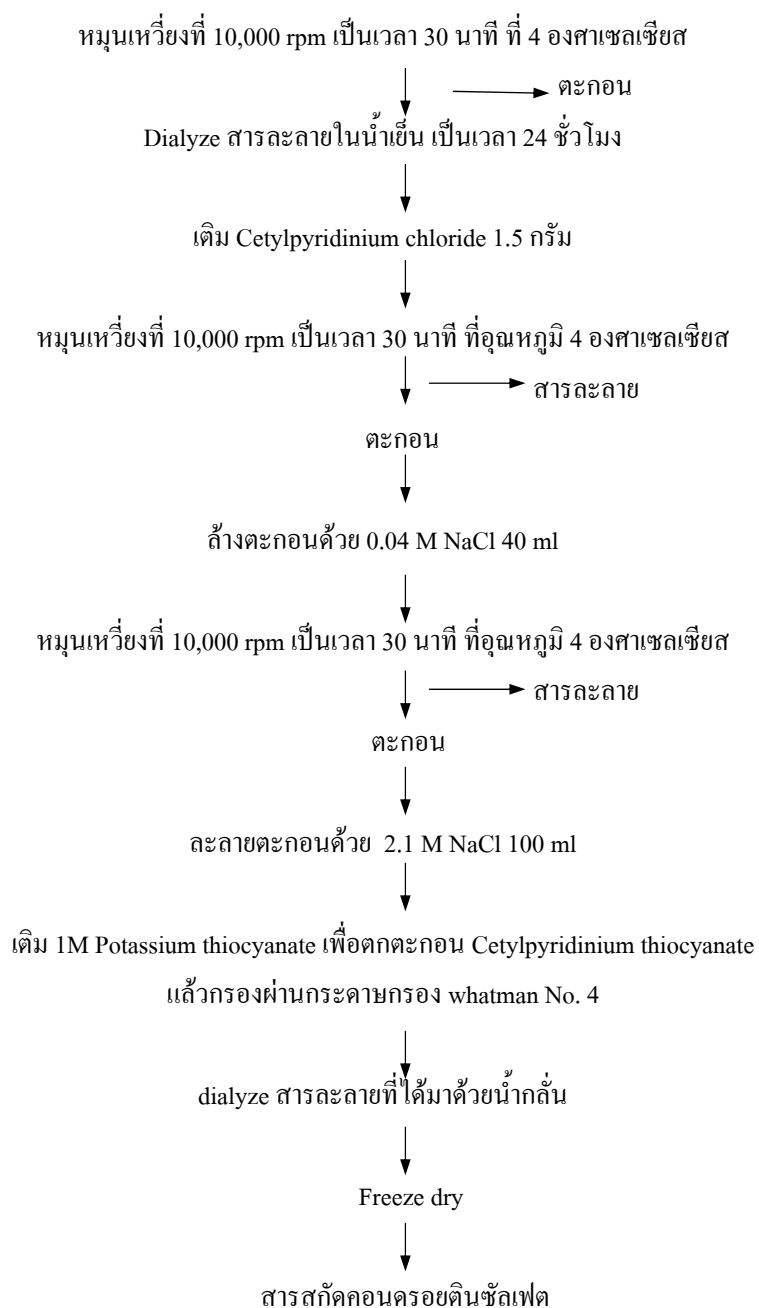
สารเคมี

1. เอนไซม์ปาเปน
2. EDTA
3. cysteine hydrochloride
4. sodium azide
5. Na_2PO_4
6. TCA
7. Cetylpyridinium chloride
8. Potassium thiocyanate

วิธีการ

เตรียมตัวอย่างโดยการนำหลอดลมเป็ดต้มเป็นเวลา 2 นาที ขูดส่วนที่ไม่ใช่กระดูกอ่อนออกไป และสกัดคอนครอยตินซัลเฟต ด้วยวิธีการของ Garnjanagoonchorn และคณะ (2006) ตามขั้นตอนต่อไปนี้





7.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณคอนดรอยตินซัลเฟต (CS)

เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2. กระดาษกรอง 0.4
3. กระบอกฉีดยาแบบใช้แล้วทิ้ง
4. vial

สารเคมี

1. Chondroitinase ABC
2. Trizma base
3. Sodium acetate
4. Bovine serum albumin

วิธีการ

ใช้ Strong Anion-exchange High Performance Liquid Chromatography (SAX-HPLC) วิเคราะห์ disaccharides ที่ย่อยจาก CS ตามขั้นตอนของ Sim และคณะ, 2007 ดังต่อไปนี้

การเตรียมสารมาตรฐานคอนดรอยตินซัลเฟต

เตรียมสารมาตรฐานคอนดรอยติน โดยชั่งสารมาตรฐานคอนดรอยติน-0-ซัลเฟต, คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต และคอนดรอยติน-6-ซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 500, 700 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 50 mM Trizma base กับ 60 mM sodium acetate, pH 8.0

การเตรียมเอนไซม์คอนดรอยติเนส เอบีซี

เตรียมเอนไซม์ให้มีความเข้มข้น 1 mU/ μ l โดยชั่งเอนไซม์ละลายใน diH₂O ที่มี BSA เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ 50 mM Trizma base กับ 60 mM sodium acetate, pH 8.0 ที่มี BSA เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตจากหลอดลมความเข้มข้นประมาณ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายสารสกัดคอนดรอยตินซัลเฟตใน diH₂O

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และปิเปตบัฟเฟอร์ 50 mM Trizma base กับ 60 mM sodium acetate, pH 8.0 ปริมาตร 850 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. ปิเปตสารละลายเอนไซม์ chondroitinase ABC เข้มข้น 1 mU/ μ l ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน
4. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มด้วยน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุน 0.4 ไมครอน
6. นำสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
7. หาปริมาณของสารคอนดรอยตินซัลเฟตโดยอ่านค่าจากพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมและนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานคอนดรอยติน-0-ซัลเฟต, คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต และคอนดรอยติน-6-ซัลเฟต

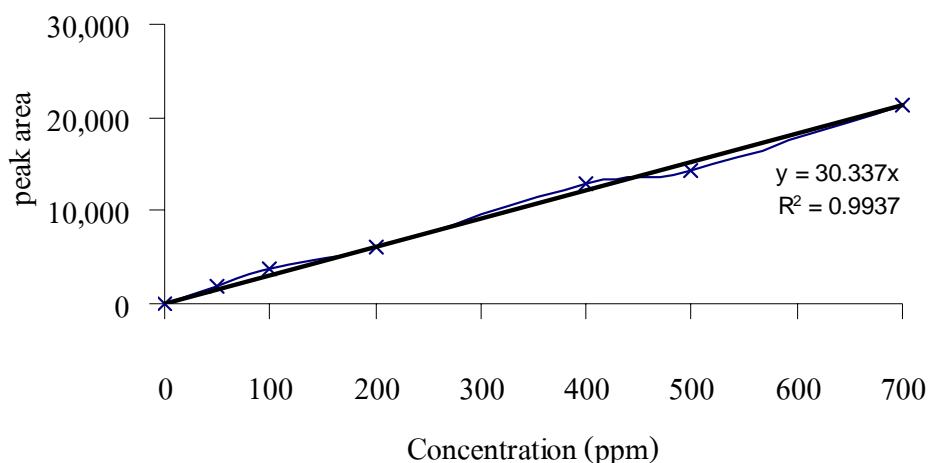


Figure 3 Standard curve of Chondroitin-4-sulfate content

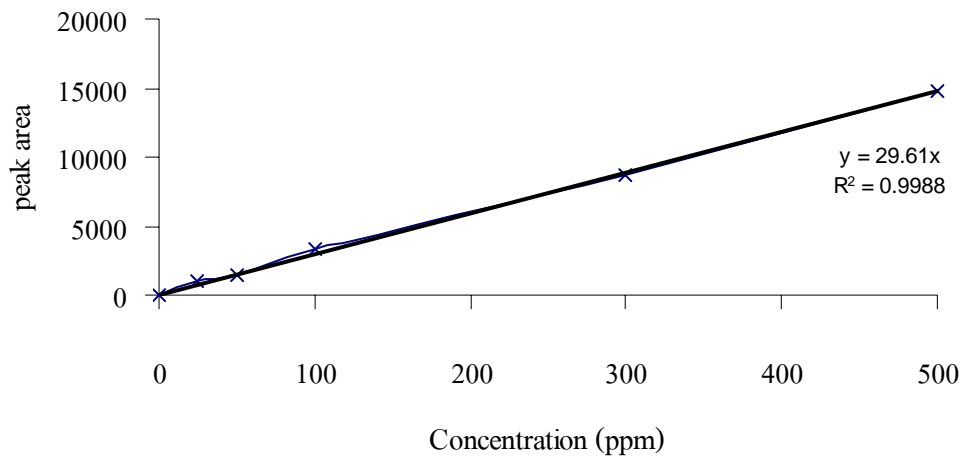


Figure 4 Standard curve of Chondroitin-0-sulfate content

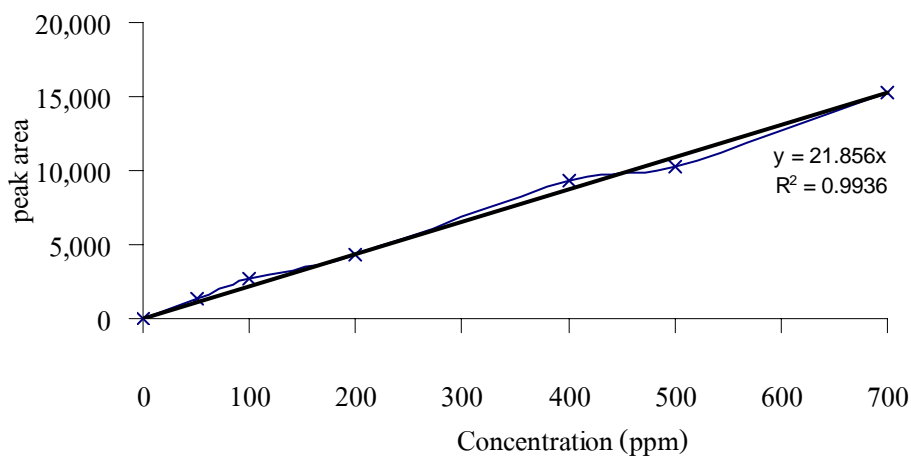


Figure 5 Standard curve of Chondroitin-6-sulfate content

8. กำหนดหาปริมาณร้อยละคอนครอยตินซัลเฟตโดยสูตร

$$\text{ร้อยละคอนครอยตินซัลเฟต} = \frac{V_x A_x}{1000000} B$$

B

A= ปริมาณคอนครอยตินซัลเฟตเทียบกับกราฟมาตรฐาน

B= น้ำหนักตัวอย่าง

V= ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์

8. การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลคอนครอยตินซัลเฟตโดย PAGE ดัดแปลงวิธีจาก Cowman และคณะ (1984) Sim และคณะ(2007)

สารเคมี

1. Azure A
2. เมทานอล
3. กรดอะซิติก
4. EDTA
5. Tris base
6. Boric acid

การเตรียมสีย้อม Azure A

1. เตรียมสารละลายกรดอะซิติกให้ได้ความเข้มข้น 1.0% โดยตวงกรดอะซิติกมา 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร
2. ชั่งสาร azure A มา 5 กรัม และละลายใน 1.0% สารละลายกรดอะซิติก

Sample buffer

1. เตรียมสารละลายซูโครส 2 M โดยละลายใน TBE buffer
2. ชั่งสาร โบรโมฟินอลบลู 0.002 g ละลายในสารละลายซูโครส 2 M ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การเตรียม 10 x TBE Buffer

1. ชั่ง Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมสารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
2. ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.3 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

การเตรียมเจล

1. ปิเปต Acrylamide gel (30%) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เติม 10 X TBE buffer 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 6.434 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ปิเปต 10% ammonium persulfate 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม TMED ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

วิธีการ

- 1 เตรียมตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดคอนครอยติน ซัลเฟตมาผสมกับ sample buffer
- 2 โหลดตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงบน 12% Acrylamide gel ประมาณ 10 ไมโครลิตร และทำงานด้วยกระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์ ภายใต้ TBE buffer
- 3 หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาย้อมสีด้วย Azur A เป็นเวลา 30 นาที
- 4 ล้างสีย้อมออกจากแผ่นเจลโดยสารละลายผสมของ น้ำ : เมทานอล:กรดอะซิติก ใน อัตราส่วน 60:30:10 เป็นเวลาประมาณ 90 นาที

