

การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทูน่าและปลานิล

Extraction of hyaluronic acid from tuna and tilapia eyeballs

บทคัดย่อ

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูงที่สามารถแยกได้จากน้ำเลี้ยงลูกตาปลา จากการที่ประเทศไทยมีการส่งออกปลาแช่แข็งและปลากระป๋องจำนวนมาก จึงเห็นควรสร้างมูลค่าเพิ่มจากเศษเหลือจากการแปรรูป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากน้ำเลี้ยงลูกตาปลา 2 ชนิดคือ ปลานิล (ขนาด 1 กิโลกรัมต่อตัว) และปลาทูน่าห้องเย็น (ขนาด 3 กิโลกรัมต่อตัว) การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกใช้เอนไซม์ปาเปน (EC 3.4.22.2) ในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลสเพื่อปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิก และวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีคาร์บาโซล พบว่าลูกตาปลานิลและปลาทูน่า มีกรดไฮยาลูโรนิก 20.49 ± 3.50 และ 25.49 ± 7.66 ไมโครกรัมกรดยูโรนิก ต่อลูกตา 1 ลูก ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอสีเทตเทียบกับสารมาตรฐาน ยืนยันเอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก นอกจากนั้นฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีของสารสกัดมีรูปแบบสเปกตรัมที่ใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานโดยแสดงหมู่ฟังก์ชันสำคัญคือ CONH- (carboxyl amide I) และ C-O-C (O-bridge) ที่ เลขคลื่น (wave number) 1651 cm^{-1} และ 1149 cm^{-1} ตามลำดับในสารสกัดจากปลานิลและที่ เลขคลื่น 1654 และ 1153 cm^{-1} ในสารสกัดจากตาปลาทูน่าห้องเย็นตามลำดับ ผลการแช่แข็งลูกตาปลานิลพบวาระยะเวลาการแช่แข็ง (0, 2 และ 4 เดือน) มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยตาปลาที่เก็บแช่แข็ง 2 เดือนมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุด (30.21 ± 3.38 ไมโครกรัม กรดยูโรนิกต่อลูกตา 1 ลูก) และตาปลาที่เก็บแช่แข็ง 4 เดือนมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกต่ำที่สุด (18.40 ± 1.28 ไมโครกรัม กรดยูโรนิกต่อลูกตา 1 ลูก) โดยสารที่สกัดได้จากการเก็บแช่แข็ง 0, 2 และ 4 เดือน มีความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันบางหมู่ คือ สารสกัดจากตาปลานิลแช่แข็ง 4 เดือนจะไม่ปรากฏหมู่ฟังก์ชัน C-O-C (O-bridge) ที่ เลขคลื่น 1149 cm^{-1} และ C-OH group ที่ 1041 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่าการเก็บแช่แข็งส่งผลบางประการต่อโครงสร้างในโมเลกุลกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ และทำให้ปริมาณลดลงเมื่อเก็บแช่แข็งเป็นเวลานาน

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) a valuable bioactive compound was isolated from vitreous humor of fish eyeballs. Since Thailand exported large quantity of frozen fish and canned fish it is interesting to add more value to fish by-products. Thus, in this study two types of fish, tilapia (size 1 kilogram/fish) and skipjack tuna (size 3 kilograms/fish) were used to extract HA from fish eyeballs. During extraction papain (commercial enzyme, EC 3.4.22.2) was applied to digest proteoglycans and release HA. The amount of HA determined by carbazole reaction method were 20.49 ± 3.50 and 25.49 ± 7.66 μg uronic acid per fish eyeball in tilapia and skipjack tuna, respectively. Cellulose acetate electrophoresis and FT-IR spectroscopy analysis of standard HA and extracted HA indicated similar identity of which HA functional groups existing as follows: peak of CONH- carboxyl amide I and C-O-C (O-bridge) at 1651 and 1149 cm^{-1} in tilapia eyeball extract and 1654 and 1153 cm^{-1} in skipjack tuna eyeball extract. Effect of frozen storage ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) at 0, 2, 4 months on HA extraction was studied in tilapia eyeballs. Storage time showed significant ($p < 0.05$) effect on HA content in eyeballs, indicating the highest in 2 months frozen sample (30.21 ± 3.38 μg uronic acid/fish eyeball) and the lowest in 4 months frozen fish eyeball (18.40 ± 1.28 μg uronic acid/fish eyeball). Cellulose acetate electrophoresis and FT-IR spectra of hyaluronic acid from 0, 2 and 4 months frozen fish eyeballs were verified. FI-IR analysis of hyaluronic acid in 4 months frozen fish eyeballs showed missing peaks of C-O-C (O-bridge) at 1149 cm^{-1} and C-OH at 1041 cm^{-1} . These differences indicated that frozen storage may cause some changes in molecular structure of extracted HA. Meanwhile increasing of storage time to longer than 3 months decreased HA content in eyeballs.