

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัยประจำปี 2555

โครงการวิจัยประเภท: โครงการวิจัยประยุกต์ (โครงการวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

ชื่อโครงการวิจัย: การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทูน่าและปลานิล

Extraction of hyaluronic acid from tuna and tilapia eyeballs

งบประมาณที่ได้รับจัดสรร: 130,000.00 บาท

รหัสโครงการวิจัย: พ-ท(ค) 120.55

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ วรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร

เลขที่อ้างอิง: 5510251000/2555

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.

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	34
สรุป	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	56
ภาคผนวก	64
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	64
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีคาร์บาโซล	70
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดของไกลโคซามิโนไกลแคน	12
2 เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟรีซิสและสภาวะในการวิเคราะห์ของพอลิแซ็กคาไรด์ และอนุพันธ์ของพอลิแซ็กคาไรด์	20
3 น้ำหนักลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาเทโพทองแถบ	35
4 องค์ประกอบทางเคมีลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาเทโพทองแถบ	37
5 เปรียบเทียบปริมาณและพีเอชของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากแหล่งต่าง ๆ	42
6 หมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาลูโรนิกจากตาปลานิลและปลาเทโพทองแถบ	47
7 น้ำหนักเฉลี่ยลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 0, 2 และ 4 เดือน	48
8 หมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 0, 2 และ 4 เดือน เทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน	54

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ปลานิล (tilapia)	3
2 ปลาทูน่าท้องแถบ (skipjack tuna)	5
3 ส่วนประกอบของลูกตาปลา	7
4 โครงสร้างของโปรติโอไกลแคนเมื่อจับกับกรดไฮยาลูโรนิก	8
5 การเชื่อมกันระหว่างสายไกลโคซามิโนไกลแคนกับโปรตีนในโมเลกุลของโปรติโอไกลแคน	9
6 ลักษณะการเชื่อมกันระหว่างไกลโคซามิโนไกลแคนกับแกนโปรตีนและไฮยาลูโรแนน	11
7 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก	15
8 แผนภาพกระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลา	31
9 ลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาก่อนการสกัด (ก) ปลานิล, (ข) ปลาทูน่าท้องแถบ, น้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและ (ง) น้ำเลี้ยงลูกตาปลาทูน่าท้องแถบ	36
10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายของดี-กลูคิวโรโนแลกโตนกับการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรและสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 0.034x$ มีค่า $R^2 = 0.9989$	40
11 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลและปลาทูน่าท้องแถบ (ไมโครกรัม กรดยูโรนิก)	41
12 การเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกบนแผ่นเซลลูโลสเอซีเทต, 1 = กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน, 2 = กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลและ 3 = กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทูน่าท้องแถบ	44
13 สเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก, (ก) กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน, (ข) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลและ (ค) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทูน่าท้องแถบ	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลที่เก็บแช่แข็งเป็น เวลา 0, 2 และ 4 เดือน (ไมโครกรัม กรดยูโรนิก)	50
15 การเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกบนแผ่นเซลลูโลสเอซีเทต, 1 = กรดไฮยาลูโรนิก มาตรฐาน, 2 = กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลสด, 3 = กรดไฮยาลูโรนิกจาก ลูกตาปลานิลแช่แข็ง 2 เดือนและ 4 = กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิล แช่แข็ง 4 เดือน	51
16 สเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก, (ก) กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน, (ข) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลสด, (ค) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตา ปลานิลแช่แข็ง 2 เดือนและ (ง) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 4 เดือน	53

การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทูน่าและปลานิล

Extraction of Hyaluronic Acid from Tuna and Tilapia Eyeballs

บทนำ

ประเทศไทยเป็นผู้แปรรูปปลาทูน่าที่สำคัญในตลาดโลก โดยมีการส่งออกในรูปผลิตภัณฑ์แช่แข็งและเนื้อปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง มีการนำเข้าวัตถุดิบปลาทูน่าในลักษณะของปลาแช่แข็งทั้งตัว เพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แบบต่าง ๆ มีวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการถึงร้อยละ 64 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว เศษเหลือจากกระบวนการ ได้แก่ เครื่องใน เศษเนื้อดำและหนัง หัวและก้างปลาจำนวนมาก (Prasertsan *et al.*, 1988) ในปัจจุบันใช้ทำปลาป่นเพื่อเป็นอาหารสัตว์และบางส่วนนำไปแปรรูปทำเป็นอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์เลี้ยง เช่น แมว เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการนำวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่า ซึ่งการนำวัสดุเศษเหลือจากปลาป่นนั้นได้รับความสนใจมานานกว่า 10 ปีแล้ว โดยการนำเอาวัสดุเศษเหลือมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) และสารสกัดจากปลา (fish extract) (Kim *et al.*, 1997) จากภาวะการแข่งขันของอุตสาหกรรมอาหาร จึงต้องค้นหาแนวทางนำทรัพยากรหรือวัสดุเศษเหลือเหล่านี้มาใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าเพิ่มให้มากขึ้น จากการศึกษาพบว่าผู้บริโภคบางกลุ่มมีความนิยมนำลูกตาสัตว์หลายชนิดมาทำเป็นอาหารบริโภค เช่น แกะ ปลาทูน่า ปลานิล เป็นต้น และมีรายงานจากนักวิจัยระบุว่า กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและมีมูลค่าสูงสามารถแยกได้จากลูกตาปลาทูน่าพันธุ์ครีบลีโง (Mizuno *et al.*, 1990) และปลาทูน่าพันธุ์ตาโต (Amagai *et al.*, 2009) ซึ่งข้อมูลในเรื่องนี้ยังมีจำกัด สมควรที่จะศึกษาเพิ่มเติมสำหรับวัตถุดิบจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลที่มีในประเทศไทย เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มจากวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปปลาทูน่าต่อไป

นอกจากปลาทูน่าแล้วยังมีการแปรรูปปลาอื่น ๆ อีกมาก เช่น ปลาซาร์ดีน ปลาแมคเคอเรล ปลานิล ปลาแซลมอน ซึ่งมีลูกตาปลาเป็นวัสดุเศษเหลือเช่นเดียวกับการแปรรูปปลาทูน่า การเก็บรักษาวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรมนิยมวิธีการแช่แข็ง ดังนั้นจึงศึกษาผลกระทบของระยะเวลาใน

การเก็บแซ่แข็งต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดไฮยาลูโรนิกในลูกตาปลานิลเพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ลูกตาปลาอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาองค์ประกอบต่าง ๆ จากลูกตาและน้ำเลี้ยงของปลาทูน่าทองแถบ (skipjack tuna) และปลานิล (tilapia)
2. แยกกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทูน่าและปลานิล และศึกษาสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก
3. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บแซ่แข็งลูกตาปลานิลต่อปริมาณและสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

การตรวจเอกสาร

1. ปลานิล

ปลานิล (อังกฤษ: Nile Tilapia, Mango fish, Nilotica) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งในวงศ์ปลาหมอสี (Cichlidae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* เป็นปลาเศรษฐกิจ แพร่ขยายพันธุ์ง่าย และมีรสชาติดี



ภาพที่ 1 ปลานิล

ที่มา: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพัทลุง (2012)

ปลานิลสามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำจืดและน้ำกร่อย มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศ 수단 ยูกันดาและทะเลสาบแทนกันยิกา ปลานิลเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะ เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่นซึ่งทรงจัดส่งเข้ามาทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว ครั้งนั้นได้โปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงปลานิลในบ่อภายในสวนจิตรลดา เป็นหนึ่งโครงการในโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา

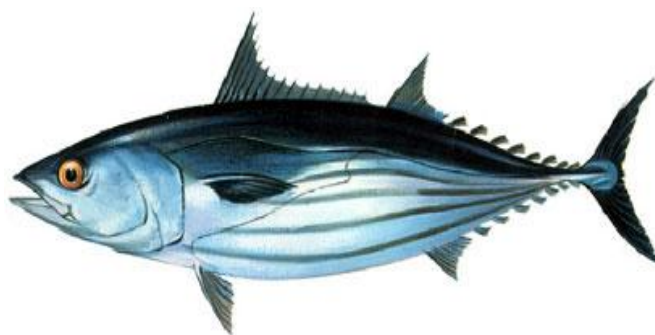
ผลการทดลองปรากฏว่าปลานิลที่ทรงโปรดเกล้าให้ทดลองเลี้ยงได้เจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี ต่อมาจึงได้พระราชทานชื่อว่า ปลานิล (โดยมีที่มาจากชื่อแม่น้ำไนล์ (Nile) ที่เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยดั้งเดิม หรือชื่อวิทยาศาสตร์ *Tilapia nilotica*) และพระราชทานพันธุ์ปลาดังกล่าวให้กับกรมประมงจำนวนหนึ่ง เมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2509 เพื่อนำไปขยายพันธุ์และแจกจ่ายแก่พสกนิกร และปล่อยลงไว้ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ตามที่เห็นว่าเหมาะสม เนื่องจากปลานิลมีคุณลักษณะพิเศษหลายอย่าง เช่น กินอาหารได้ทุกชนิด เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลงและสัตว์น้ำเล็ก ๆ มีขนาดลำตัวใหญ่ ความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร แพร่ขยายพันธุ์ง่าย และมีรสชาติดี (อุเทน, 2547)

1.1 ลักษณะของปลานิล

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับปลาหมอเทศ ลำตัวสั้น แบนข้าง แต่ลักษณะพิเศษของปลานิลคือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ซึ่งปลาชนิดอื่น ๆ มักมีริมฝีปากบนสั้นกว่าริมฝีปากล่าง บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว สีของลำตัวจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัย คือตั้งแต่สีดำอ่อนจนถึงสีเขียวดำ ที่บริเวณลำตัวมีลายพาดขวางประมาณ 9-10 แถบตั้งแต่หัวจรดโคนหาง แม้แต่ลูกปลาก็จะมีลายพาดขวางนี้เห็นได้ชัดเจนไม่น้อยกว่า 7 แถบทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่เพศเมียสีจะจางกว่าเพศผู้มาก ครีบหลัง ครีบกัน และครีบกหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวาง มีเกล็ด 3 แถวที่บริเวณแก้ม และอีก 1 แถวที่บริเวณเหนือเส้นข้างลำตัวเล็กน้อย ครีบหลังมีอันเดียว ยาวจรดถึงคอดหาง ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อันและครีบอกอ่อน 12-14 อัน ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 อันและก้านครีบอกอ่อน 9-10 อัน ครีบกหางตัดตรง บนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด ทางข้างมีเกล็ดตามแนวเฉียงจากตอนต้นของครีบหลังลงมาถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม บริเวณปลายอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบกหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวางดูคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป ที่กระดุกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด ลักษณะฟันบริเวณขากรรไกรและหอยคอกจะมีหลายขนาด ตั้งแต่ค่อนข้างหยาบจนถึงละเอียด เหงือกมีซี่กรองประมาณ 15-17 อัน (อุเทน, 2547)

2. ปลาทูน่าทองแถบ

ปลาทูน่าทองแถบ ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ Skipjack tuna มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus, 1758) อยู่ในวงศ์ Scombridae, subfamily: Scombrinae



ภาพที่ 2 ปลาทูน่าทองแถบ (Skipjack tuna)

ที่มา: กรมประมง (2555)

ปลาทูน่าทองแถบเป็นปลาทูน่าขนาดเล็กอาศัยอยู่ในมหาสมุทรในเขตร้อน ระหว่างละติจูด 58 องศาเหนือถึง 47 องศาใต้ลองจิจูด 180 องศาตะวันตกถึง 180 องศาตะวันออกอุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส ที่ระดับความลึก 0-260 เมตร พบแพร่กระจายอยู่ในมหาสมุทรเขตร้อนแต่ไม่พบทางด้านตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและทะเลดำ เป็นปลาที่อพยพย้ายถิ่น อาศัยอยู่ห่างจากฝั่งอุณหภูมิของตัวอ่อนอยู่ที่ 15-30 องศาเซลเซียส มักรวมฝูงกระโดดอยู่บริเวณผิวน้ำร่วมกับพวกนก ขยะลอยน้ำ ฉลามและปลาวาฬ อาหารจะเป็นพวกปลา กุ้ง หมึก หอย สามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปีในเขตร้อนไข่และตัวอ่อนมักจะกลายเป็นอาหารของปลาผิวน้ำขนาดใหญ่

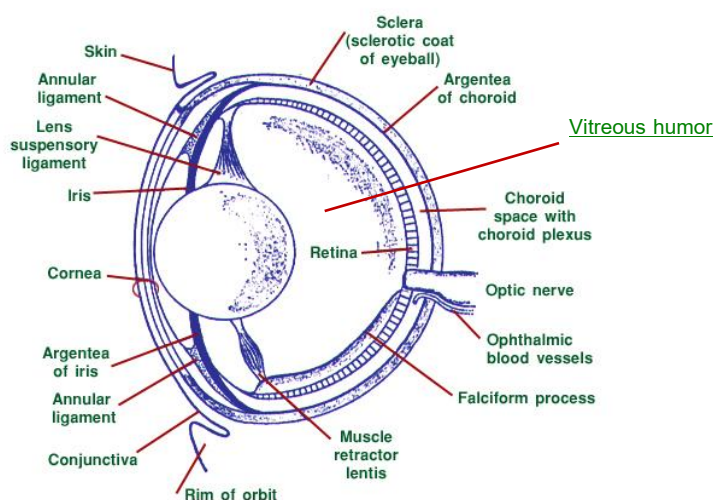
ลักษณะเห็นได้ชัดคือ ลำตัวเป็นรูปทรงเรียวยาวแบบกระสวย ไม่มีกระเพาะลม ด้านข้างลำตัวมีแถบสีค้ำทอดตามยาวกับลำตัว 4-5 แถบ ขนาดที่พบที่ใหญ่ที่สุดคือ 108 เซนติเมตรและมีน้ำหนักระหว่าง 32.5-34.5 กิโลกรัม มีรายงานว่าเคยพบปลาทุ่น้ำทองแถบมีความยาวถึง 110 เซนติเมตร น้ำหนักสูงสุดที่เคยพบคือ 34.5 กิโลกรัม อายุสูงสุดที่มีรายงานคือ 12 ปี

ปลาทุ่น้ำทองแถบเป็นปลาที่นิยมรับประทานสด ร่มควัน แห้งแข็งและเป็นวัตถุดิบในการทำปลาทุ่น้ำบรรจุกระป๋อง ในปัจจุบันปลาทุ่น้ำทองแถบเป็นปลาทุ่น้ำที่มีอัตราการจับสูงสุดแทนปลาทุ่น้ำครีบเหลือง

ปลาทุ่น้ำทองแถบอาศัยบริเวณผิวน้ำ เกือบทั้งหมดจับได้จากเครื่องมือประมงอวนล้อม เบ็ด ตักปลาทุ่น้ำ แต่สามารถจับได้บ้างด้วยเครื่องมือเบ็ดราว เบ็ดลากและอวนลอย โดยทั่วไปมักจะสร้างเครื่องล่อปลาให้รวมฝูงหรือซั้ง เพื่อล่อปลาโอแถบให้อยู่รวมกันแล้วจึงทำประมง

3. ลูกตาปลา

ลูกตามีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำเลี้ยงลูกตา มีลักษณะคล้ายเจลที่ประกอบไปด้วยน้ำ กรดไฮยาลูโรนิก เส้นใยคอลลาเจน เกลือแคลเซียมและโปรตีนพลาสมา น้ำเลี้ยงลูกตามีประมาณร้อยละ 75 ของปริมาตรลูกตา (Baino, 2010) ของเหลวนี้อาจจะอยู่กับเรตินาบริเวณส่วนหน้าของลูกตา จะประกอบด้วยโครงสร้างที่คล้ายแท่งของคอลลาเจนและมีกรดไฮยาลูโรนิกอยู่ระหว่างเส้นใยคอลลาเจน (Swindle and Ravi, 2007) น้ำเลี้ยงลูกตาจะทำหน้าที่ช่วยให้เกิดการเคลื่อนไหวและคงรูปของลูกตาและยังทำหน้าที่ในการขนส่งอาหารเข้าสู่ตา ศัลยแพทย์จะฉีดกรดไฮยาลูโรนิกเข้าไปโดยตรงเพื่อช่วยรักษารูปทรงของตาในระหว่างการผ่าตัด เมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้นตาของมนุษย์จะหยุดการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกจะส่งผลให้เกิดปัญหาทางสายตาต่าง ๆ เช่น การมองเห็น ตาแห้ง เป็นต้น (Hyalogic, 2011)

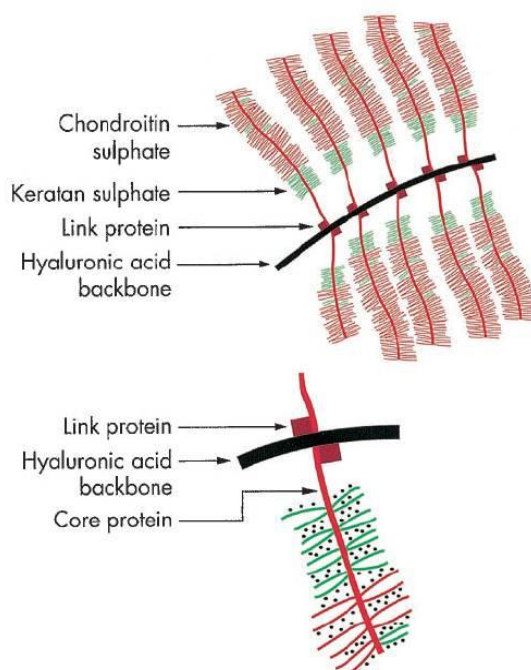


ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของลูกตาของปลา

ที่มา: ดัดแปลงจากประสิทธิ์ (2011)

4. โปรติโอไกลแคน (Proteoglycans: PGs)

โปรติโอไกลแคนหรือมิวคอปอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีแขนงข้างเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาว ที่เรียกว่าไกลโคซามิโนไกลแคนจะจับอยู่กับส่วนที่เป็นแกนโปรตีน (protein core) (Kiernan, 1999) ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น กราวนด์ซับสแตนซ์ของกระดูกอ่อน โปรติโอไกลแคนเหล่านี้จะไป จับกับกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นสายตรงยาวโดยใช้โปรตีนเชื่อมต่อ (link protein) 2 ตัว ซึ่งการจับกันดังกล่าวเป็นพันธะแบบนอน-โควาเลนต์ (non-covalently bound) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครงสร้างของโปรติโอไกลแคนแสดงการจับกับกรดไฮยาลูโรนิก

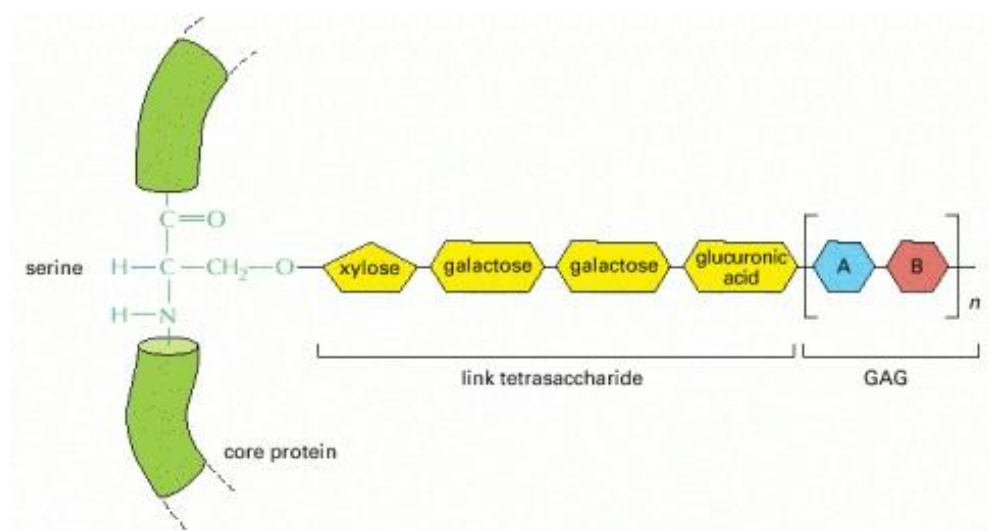
ที่มา: Jeffrey and Watt (2003)

ในกระดูกอ่อน โปรติโอไกลแคนจะรวมตัวกันแบบ supramolecular aggregates หรือ proteoglycan aggregates ซึ่งใน 1 proteoglycan aggregate อาจมีความยาวได้ถึง 4 มิลลิเมตร มีการเชื่อมต่อด้าน N-terminus ของแกนโปรตีนกับกรดไฮยาลูโรนิก และมีลิงค์โปรตีน (link protein) จับทั้งส่วนแกนโปรตีนและกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของการเชื่อมต่อ การรวมตัวกันของโปรติโอไกลแคนจะทำให้ตัวมันถูกกีดขวางการเคลื่อนที่ภายในโครงสร้างของคอลลาเจนและในขณะเดียวกันก็จะทำให้เนื้อเยื่อเกิดความยืดหยุ่น (Bailey and Light, 1989; Lodish, 2001)

4.1 องค์ประกอบของโปรติโอไกลแคน

โปรติโอไกลแคนมีโครงสร้างที่สำคัญ 2 ส่วน คือ

4.1.1 แกนโปรตีน โครงสร้างของแกนโปรตีนยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์ ทราบแต่เพียงว่าเป็นสายพอลิเปปไทด์ และแกนโปรตีนนี้จะเชื่อมต่อกับสายของไกลโคซามิโนไกลแคนผ่านทางแขนงข้างของกรดอะมิโนเซรีน (amino serine) เชื่อมกันด้วยเทตระแซคคาไรด์ (link tetrasaccharide) ดังภาพที่ 5 (Loewy, 1991; Albert, 2002)



ภาพที่ 5 การเชื่อมกันระหว่างสายไกลโคซามิโนไกลแคนกับแกนโปรตีนในโมเลกุลของ

โปรติโอไกลแคน

ที่มา: Albert (2002)

4.1.2 พอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของโปรติโอ-ไกลแคนหรือเรียกว่าไกลโคซามิโนไกลแคนนั้นเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ มีหน่วยของมอนอแซ็กคาไรด์ต่อกันเป็นสายยาว มีน้ำตาล 2 ชนิดหรือมากกว่า ซึ่งหน่วยของมอนอแซ็กคาไรด์ที่มาต่อกันนั้นส่วนใหญ่เป็น แอซิด ซูการ์ (acid sugar) เช่น กรดยูโรนิก ชนิด ดี-กลูคิวโรนิก แอซิด (D-glucuronic acid) และ แอล-ไอดูโรนิก แอซิด (L-iduronic acid) และน้ำตาลที่มีไนโตรเจน

(N-containing sugar) เช่น เอ็น-แอซีทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) หรือ เอ็น-แอซีทิลกาแล็กโทซามีน (N-acetylgalactosamine) โดยน้ำตาลทั้งสองชนิดอาจจะมีหมู่ซัลเฟตอยู่ 1 ถึง 2 หมู่ (Kiernan, 1999; Lodish, 2001)

5. ไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans: GAGs)

5.1 องค์ประกอบของไกลโคซามิโนไกลแคน

ไกลโคซามิโนไกลแคน ส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์โดยการสกัดและการทำบริสุทธิ์ แต่ในปัจจุบันสารเหล่านี้สามารถสกัดจากกระบวนการตัดแปรรูปทางเคมีหรือจากการสังเคราะห์ (Volpi and Maccari, 2006) ไกลโคซามิโนไกลแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวที่มีขนาดใหญ่ มีโครงสร้างเป็นสายตรง ไม่มีกิ่งซึ่งเกิดจากหน่วยซ้ำของไคแซ็กคาไรด์ (Gartner and Hiatt, 2001) คือ

5.1.1 น้ำตาลเอมิโน (amino sugar) ได้แก่ เอ็น-แอซีทิล กลูโคซามีน และ เอ็น-แอซีทิล กาแล็กโทซามีน

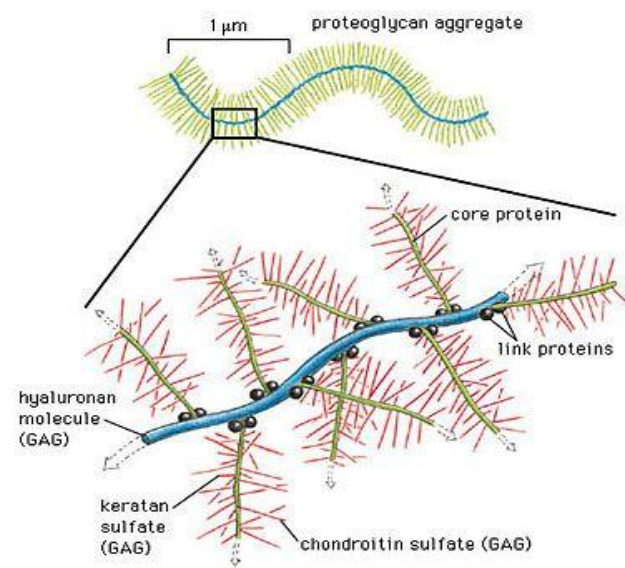
5.1.2 กรดยูโรนิก (uronic acid) ได้แก่ กรดไอดูโรนิก (iduronic acid) และกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid)

ไกลโคซามิโนไกลแคนส่วนใหญ่เป็นกรดที่มีประจุลบอยู่บนโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) และหมู่ซัลเฟต (sulfate group) บนโมเลกุลของไคแซ็กคาไรด์

5.2 การแบ่งกลุ่มของไกลโคซามิโนไกลแคน (ตารางที่ 1)

5.2.1 กลุ่มที่ไม่มีซัลเฟต (non-sulfated group) ได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิก ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของไคแซคคาไรด์มากกว่า 25,000 หน่วย จับกันด้วยพันธะนอน-โควาเลนต์ ไม่ได้เชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์กับแกนโปรตีนเหมือนไกลโคซามิโนไกลแคนตัวอื่น โดยสายของกรดไฮยาลูโรนิกจับกับโมเลกุลโปรตีนด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ ดังภาพที่ 6

5.2.2 กลุ่มที่มีซัลเฟต (sulfated group) ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของไคแซคคาไรด์น้อยกว่า 300 หน่วย ได้แก่ เคราแทน ซัลเฟต (keratan sulfate) เฮปาริน ซัลเฟต (heparan sulfate) เฮปาริน (heparin) คอนดรอยติน 4-ซัลเฟต (chondroitin 4-sulfate) คอนดรอยติน 6-ซัลเฟต (chondroitin 6-sulfate) และ เดอร์มาแทน ซัลเฟต (dermatan sulfate) โดยไกลโคซามิโนไกลแคนในกลุ่มนี้จะจับกับโมเลกุลโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์ในโครงสร้างโปรติโอไกลแคน ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ลักษณะการเชื่อมกันระหว่างไกลโคซามิโนไกลแคนกับแกนโปรตีนและไฮยาลูโรแนน

ที่มา: Albert (2002)

ตารางที่ 1 ชนิดของไกลโคซามิโนไกลแคน

GAGs	Molecular mass (Da)	Repeating disaccharides	Sulfated amino sugar	Covalent linkage to protein	Location in body
Hyaluronic Acid	10^7 - 10^8	Glucuronate and <i>N</i> -acetylglucosamine	None	No	Most connective tissue, synovial fluid, cartilage, dermis
Keratan sulfate	10,000-30,000	Galactose and <i>N</i> -acetylglucosamine	<i>N</i> -Acetylglucosamine	Yes	Cartilage, cornea, intervertebral disk
Heparan sulfate	15,000-20,000	Glucuronate (or iduronate) and <i>N</i> -acetylgalactosamine	<i>N</i> -Acetylgalactosamine	Yes	Blood vessels, lung, basal lamina
Heparin	15,000-20,000	Glucuronate (or iduronate) and <i>N</i> -acetylglucosamine	<i>N</i> -Acetylglucosamine	No	Mast cell granule, liver, lung, skin

ตารางที่ 1 (ต่อ)

GAGs	Molecular mass (Da)	Repeating disaccharides	Sulfated amino sugar	Covalent linkage to protein	Location in body
Chondroitin 4-sulfate	10,000-30,000	Glucuronate and <i>N</i> -acetylglactosamine	<i>N</i> -Acetylglactosamine	Yes	Cartilage, bone, cornea, blood vessels
Chondroitin 6-sulfate	10,000-30,000	Glucuronate and <i>N</i> -acetylglactosamine	<i>N</i> -Acetylglactosamine	Yes	Cartilage, bone, cornea, blood vessels
Dermatan	10,000-30,000	Glucuronate (or iduronate) and <i>N</i> -acetylglactosamine	<i>N</i> -Acetylglactosamine	Yes	Heart valves, skin, blood vessels

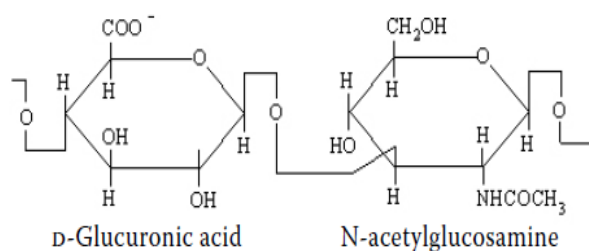
ที่มา: Gartner and Hiatt (2001)

6. กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid; HA)

6.1 องค์ประกอบของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกผลิตขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายมนุษย์เป็นสารประเภทไกลโคซามิโนไกลแคน พอลิเมอร์สายยาวประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาล 2 ชนิด คือ D-glucuronic acid (GlcA) และ N-acetylglucosamine (Glc-NAC) เรียงตัวสลับกัน (Kim *et al.*, 2008) เชื่อมกันด้วยพันธะ β (1-3) ไกลโคซิดิกและระหว่างไคแซคาไรด์เชื่อมกันด้วยพันธะ β (1-4) ไกลโคซิดิก (Volpi and Maccari, 2006) ดังภาพที่ 7 เชื่อมกันมากกว่า 25,000 หน่วยของ ไคแซคาไรด์ สามารถจับกับประจุบวกได้ดี เช่น K^+ , Na^+ และ Ca^{2+} นอกจากนี้ยังมีหมู่ฟังก์ชัน กลุ่มคาร์บอกซิล และ เอ็น-แอซิดที่มีขั้วอยู่ในปริมาณสูงเมื่อละลายน้ำ หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำได้ (Tlapak-Simmons *et al.*, 1999)

กรดไฮยาลูโรนิกหรือไฮยาลูโรเนต (เมื่ออยู่ในสารละลายที่มี pH เท่ากับในสิ่งมีชีวิต) มีลักษณะใส หนืด กรดไฮยาลูโรนิกโมเลกุลที่ยาวและขนาดใหญ่จะผลิตสารที่ให้ความหนืดสูง (สารหล่อลื่น) จะช่วยด้านการบีบอัดและช่วยข้อต่อและผิวหนังของเราในการรับน้ำหนัก ในปี ค.ศ. 1934 Meyer และ Palmer ค้นพบกรดไฮยาลูโรนิก ครั้งแรกจากวุ้นตาของวัว (Weigel *et al.*, 1997) ต่อมายังพบว่ากรดไฮยาลูโรนิกสามารถพบได้ที่ผิวหนังของสัตว์และมนุษย์ น้ำไขข้อและเอ็น สายสะดือ ผิวหนังปลาฉลาม หงอนของไก่และในเซลล์แบคทีเรีย กรดไฮยาลูโรนิกทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น cell adhesion, cell migration และ cell proliferation (Lee *et al.*, 2000) ที่น่าสนใจอย่างมากคือ การควบคุมความชื้นในเนื้อเยื่อ เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกมีความสามารถในการดูดเก็บน้ำได้ดี และยังมีหน้าที่ในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ (Amstrong *et al.*, 1997) จึงมีการนำกรดไฮยาลูโรนิกมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ และในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง



ภาพที่ 7 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก

ที่มา: Necas *et al.* (2011)

ในระยะแรก ๆ นั้นการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในทางการค้าส่วนใหญ่ผลิตได้โดยการสกัดจากหางของไก่ สายสะดือ และเนื้อเยื่อของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งวิธีการสกัด และทำให้บริสุทธิ์นั้นค่อนข้างยากจึงทำให้ต้นทุนในการผลิตมีราคาแพง และในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ในการผลิตพบเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเนสที่สามารถย่อยกรดไฮยาลูโรนิกได้ ทำให้กรดไฮยาลูโรนิกที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีผลทำให้ความหนืด และคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำลดลงไปด้วย

(Morita *et al.*, 1991)

6.2 คุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

คุณสมบัติทางชีวภาพของกรดไฮยาลูโรนิกประกอบด้วย การรักษาความหนืดและความยืดหยุ่น (viscoelastic) ของของเหลวในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น ของเหลวไขข้อ ของเหลวในลูกตา การควบคุมความชุ่มชื้นของเนื้อเยื่อและการขนถ่ายของเหลว อีกทั้งยังมีบทบาทในการแยกเซลล์และลดการอักเสบ มีความสามารถในการสร้างพันธะกับน้ำและเป็นสารหล่อลื่นในการเคลื่อนที่ของส่วนต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ข้อต่อและกล้ามเนื้อ กรดไฮยาลูโรนิก ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกมีความสามารถในการเข้ากันได้ดีกับร่างกายของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) และไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ (non-immunogenicity) จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ เช่น นำมาใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคไขข้ออักเสบ เพื่อเพิ่มความสามารถในการหล่อลื่นบริเวณข้อต่อ เป็นตัวช่วยในการรักษาและการฟื้นฟูจากบาดแผลผ่าตัด ใช้ใน

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว นอกจากนั้นกรดไฮยาลูโรนิกยังสามารถทำหน้าที่เป็นสารตัวพาในการนำยาเข้าสู่ร่างกาย (Necas *et al.*, 2008)

6.3 การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

Swann (1968) ศึกษาการเตรียมและคุณสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่พันธุ์ White leghorn และ Rhode island white โดยสกัดกรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง ออกเป็น 4 Fractions โดย Fraction 1 สกัดด้วยน้ำกลั่น Fraction 2 ได้จากการนำตะกอนในส่วนแรกจากการเหวี่ยงแยกมาบดและสกัดด้วยน้ำกลั่น นำตะกอนจาก Fraction 2 มาสกัดด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ได้เป็น Fraction 3 นำตะกอนจาก Fraction 3 ละลายในสารละลายทริส บัฟเฟอร์และย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โพรเนส (Pronase) พบว่า Fraction 2 ที่มีการบดและใช้น้ำกลั่นในการสกัด ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุดและการใช้สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์และเอนไซม์โพรเนสเป็นการช่วยสกัดกรดไฮยาลูโรนิกที่ยังเหลืออยู่ในหงอนไก่ออกมา ซึ่งผลได้คิดเป็นปริมาณร้อยละของกรดไฮยาลูโรนิกทั้งหมดที่สกัดได้คือร้อยละ 6 ของหงอนไก่แห้ง

Sahu and Lynn (1978) สกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากสารคัดหลั่งจากปอดของผู้ป่วยโรคหอบหืดรุนแรงในช่วงอายุ 22 – 34 ปี โดยกำจัดไขมันออกจากตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล (2 : 1, v/v) และย่อยด้วยเอนไซม์โพรเนส เติมกรดไทรคลอโรแอซิดิกในรูปของแข็งจนได้ความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/v) หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน ล้างตะกอนด้วยกรดไทรคลอโรแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 5 และตกตะกอนไกลโคซามิโนไกลแคนด้วยเอทานอลที่ประกอบด้วยกรดแอซิดิกร้อยละ 1 (v/v) และโพแทสเซียมแอซิเตตร้อยละ 1 (w/v) ปริมาตร 3 เท่าของสารละลาย เติมเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและหมุนเหวี่ยง ล้างตะกอนด้วยเอทานอลและทำแห้ง เติมซิทิลไพรดีเนียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ใน 0.03 โมลาร์ของโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ลงไปในตัวอย่างที่ได้จากการทำแห้งจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนและล้างตะกอนด้วยน้ำเปล่าเพื่อแยกซิทิลไพรดีเนียมคลอไรด์ แยกสารประกอบเชิงซ้อนด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 2 โมลาร์ ตามด้วย เอทานอล : น้ำ : กรดแอซิดิก (อัตราส่วน 24 : 7 : 1, v/v/v)

ปริมาตร 10 เท่าของสารละลายเดิม หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนแล้วล้างส่วนตะกอนด้วยเอทานอลและนำไปทำแห้ง ปริมาณไกลโคซามิโนไกลแคนที่สกัดได้มีปริมาณ 2-3 มิลลิกรัมจาก 100 มิลลิกรัมของสารคัดหลั่งจากปอดของผู้ป่วย ซึ่งไกลโคซามิโนไกลแคนส่วนใหญ่ที่สกัดได้จะพบอยู่ในส่วนของเหลวมากกว่าส่วนที่ตกตะกอนที่ได้จากขั้นตอนการสกัด

Mizuno *et al.* (1990) ศึกษาความหนืดของกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาของปลาทุ่นำครีบลีโงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.5 M โดยใช้ด้วยเครื่องวัดความหนืด Ubbelohde พบว่าความหนืดภายใน (intrinsic viscosity, η) มีค่าเท่ากับ 10.85 dl/g ความหนืดเฉลี่ยที่คำนวณได้เท่ากับ 5.6×10^5 จากสมการ $[\eta] = 0.036 \times M^{0.78}$ ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดภายในกับน้ำหนักโมเลกุล (M) ของกรดไฮยาลูโรนิก ค่าคงที่ของการตกตะกอนของกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาของปลาทุ่นำครีบลีโงคำนวณได้เท่ากับ 7.2 ซึ่งสูงกว่าที่สกัดได้จากหางของไก่

Lago *et al.* (2005) ศึกษาการแยก การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากสายสะดือคน โดยการแยกกรดไฮยาลูโรนิกปรับจากวิธีของ Balazs (1979) โดย Lago และคณะกล่าวว่าไม่เคยมีการรายงานการใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์และการกำจัดกรดนิวคลีอิกและนิวคลีโอไทด์ด้วยเอทานอลร้อยละ 25 ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีใหม่ที่เหมาะสมในการแยกกรดไฮยาลูโรนิกจากสายสะดือ เพราะเมื่อนำกรดไฮยาลูโรนิกไปศึกษาคุณสมบัติประกอบและลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธีทางเคมี พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้มีลักษณะใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน

Rosa *et al.* (2007) ได้ศึกษาการสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณและการหามวลโมลาร์ (molar mass) ของกรดไฮยาลูโรนิกจากหางของไก่โดยใช้ไก่อายุ 48 วัน สัตว์ส่วนใหญ่ต่อตัวเมียเท่ากับ 50 ต่อ 50 ซึ่งสกัดด้วย สารละลายบัฟเฟอร์และเอนไซม์ปาเปน (papain) ที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยซัลไฟริคเนียมคลอไรด์ พบว่าสามารถสกัดกรดไฮยาลูโรนิกได้ 14.9 ไมโครกรัมเฮกซูโรนิกแอซิดต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของหางไก่ (วิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีคาร์บาไฮล) และมีมวลโมลาร์ประมาณ 1.27×10^6 ดาลตัน

Amagai *et al.* (2009) ทำการพัฒนากระบวนการสกัดกรดไฮยาโลโรนิกจากลูกตาของปลาเทราต์ พบว่าได้กรดไฮยาโลโรนิกประมาณ 10.5 มิลลิกรัมจากลูกตาปลาเทราต์ 1 ลูก และ 0.42 กรัม ต่อ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตรของน้ำเลี้ยงลูกตาปลาเทราต์ ซึ่งปริมาณที่ได้นี้สูงกว่าในการทดลองก่อน ๆ คือ 0.13 กรัมต่อ 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร จากนั้นน้ำเลี้ยงลูกตา สำหรับวิธีการเดิมที่เคยใช้ในการสกัด เมื่อได้น้ำเลี้ยงจากลูกตา น้ำเลี้ยงจะปนเปื้อนด้วยเลือดและไขมัน จากการแช่แข็งวัตถุดิบและทำละลายน้ำแข็ง ทำให้เสียเวลาในการนำสิ่งที่ปนเปื้อนเหล่านี้ออก วิธีการที่ปรับปรุงใหม่นี้แยกน้ำเลี้ยงออกจากลูกตาในสภาพที่แช่แข็งอยู่ ดังนั้นจะได้ น้ำเลี้ยงที่มีสิ่งปนเปื้อนน้อย ซึ่งช่วยทำให้เวลาในการสกัดและทำบริสุทธิ์สั้นลง อีกทั้งยังหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงของกรดไฮยาโลโรนิกจากความร้อนและสารเคมีในระหว่างการสกัด กรดไฮยาโลโรนิกที่ได้ จากการปรับปรุงกระบวนการสกัด จะใช้เวลาในการสกัดเพียงครึ่งหนึ่งของการสกัดแบบเดิม น้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกที่ได้จากการปรับปรุงกระบวนการสกัดเท่ากับ 1.04×10^6 ซึ่งใกล้เคียงกับกรดไฮยาโลโรนิกจากหางของไก่และ *Streptococcus zooepidemicus*

7. การวิเคราะห์กรดไฮยาโลโรนิก

7.1 วิธีวิเคราะห์ในรูปกรดยูโรนิกโดยใช้วิธีคาร์บาโซล

การวิเคราะห์ด้วยวิธีคาร์บาโซลอาศัยหลักการที่กรดซัลฟิวริกเข้มข้นจะเข้าไปสลายองค์ประกอบที่เป็นไคแซคคาไรด์ของไกลโคซามิโนไกลแคนให้กลายเป็นมอนอแซ็กคาไรด์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับคาร์บาโซลเกิดเป็นอนุพันธ์ที่มีสีสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณกรดยูโรนิกได้ โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้ ดี-กลูคูโรโนแลกโตน (D-glucuronolactone) เป็นสารมาตรฐาน สามารถวิเคราะห์ปริมาณของกรดยูโรนิกได้ในช่วง 200 นาโนกรัมถึง 20 ไมโครกรัม (Bitter and Muir, 1962; Kosakai and Yosizawa, 1979; Beaty and Mello, 1987; Chaplin and Kennedy, 1987; Venkatesan *et al.*, 2000)

Sahu and Lynn (1978) วิเคราะห์ปริมาณไกลโคซามิโนไกลแคนที่สกัดจากสารคัดหลั่งจากปอดในผู้ป่วยโรคหอบหืด ด้วยวิธีคาร์บาโซล พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกมีส่วนประกอบโดยน้ำหนักคือกรดเฮกซูโรนิกร้อยละ 48.8 เฮกโซซามินร้อยละ 41.6 และกรดแอมิโนร้อยละ 3 ซึ่งในเฮกโซซามินเป็นกลูโคซามิน ร้อยละ 98 ส่วนที่เหลือคือกาแล็กโทซามิน

Rosa *et al.* (2007) ศึกษาการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากหอนของไก่อายุ 48 วันด้วยวิธีคาร์บาโซล พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้มีความเข้มข้น 14.9 ไมโครกรัมของกรดเฮกซูโรนิกต่อมิลลิกรัมหอนไก่แห้ง เมื่อเทียบกับ Nakano และ Sim (1989) ที่สกัดจากหอนของไก่ที่มีอายุ 52 สัปดาห์ สามารถสกัดได้ถึง 42.1 ไมโครกรัมกรดเฮกซูโรนิกต่อ 1 มิลลิกรัมหอนไก่แห้ง

7.2 วิธีวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกและวิเคราะห์สารด้วยประจุของสาร นั้น ๆ ในสนามไฟฟ้า ในทางชีวเคมี ชีววิทยาระดับโมเลกุลและเทคโนโลยีชีวภาพ นิยมใช้เทคนิคนี้ในการแยกและวิเคราะห์สมบัติของพอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่ โปรตีน (protein) กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกหรือดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) และกรดไรโบนิวคลีอิกหรืออาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) เทคนิคนี้มีความสามารถในการจำแนกสารตัวอย่างได้สูง สามารถจำแนกชีวโมเลกุลที่มีประจุหรือมวลแตกต่างกัน แม้เพียงเล็กน้อยได้ และสามารถประยุกต์ในงานด้านต่าง ๆ ได้มาก จึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (สุกัญญา, 2549) ระดับความเข้มข้นในการตรวจวิเคราะห์ไกลโคซามิโนไกลแคนด้วยวิธีนี้อยู่ในช่วงน้อยกว่า 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม (Volpi and Maccari, 2006) การวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในแบบต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสและสภาวะในการวิเคราะห์ของพอลิแซ็กคาไรด์และอนุพันธ์ของพอลิแซ็กคาไรด์

Electrophoretic technique	Limit of detection	GAGs detected	Procedure	Application
Cellulose acetate	0.001 – 1 µg (alcian blue)	HA, HA, CSA, DS, KS, Hep	Discontinuous separation by using increasing % of ethanol	Evaluation of GAGs in mixtures and purity of single GAGs
Nitrocellulose	0.1 – 0.3 µg (azur-A)	HA, CS, DS, SMHep, HS/FMHep	Continuous separation	Evaluation of GAGs in mixtures and purity of single GAGs
Agarose-gel	>0.1 µg (toluidine blue)	CS, DS, SMHep, HS/FMHep	Discontinuous separation by using two different buffers	Evaluation of GAGs in mixtures and purity of single GAGs
Agarose-gel	>1 µg (precipitation in cetyltrimethylammonium bromide)	CS, DS, SMHep, HS/FMHep	GAGs fixed in the agarose-gel and recovered	Evaluation of the structure and properties of GAGs
Agarose-gel	0.1 µg (alcian blue/toluidine blue)	Nonsulfated GAGs, CS, DS, SMHep, HS/FMHep	Blotting GAGs on membrane after electrophoretic separation and immunodetection by antibodies	Evaluation of the nature of GAGs

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Electrophoretic technique	Limit of detection	GAGs detected	Procedure	Application
Agarose-gel	Approximately 0.001 µg (azur-A/ammoniacal silver)	HA, CS,DS, KS, HS, Hep	Sequential staining by means azur-A and ammoniacal silver	Evaluation of GAGs in mixtures and purity of single GAGs
Agarose-gel	0.01 µg (toluidine blues/Stains-All)	Nonsulfated GAGs, CS, DS, SMHep, HP/FMHep	Sequential staining by means toluidine blue and Stain-All	Evaluation of GAGs in mixtures and purity of single GAGs, Determination of The nature of GAGs
Polyacrylamide gel (PAGE)	0.05 µg (alcian blue/ammoniacal silver)	HA, CS, DS, HS, Hep	Discontinuous or continuous separation of single GAGs	Evaluation of the molecular mass and distribution of single GAGs
Polyacrylamide gel (PAGE)	0.001 µg (azur- A/ammoniac silver)	Oligosaccharide from HA, CS, DS, HS, Hep	Discontinuous separation of GAG oligosaccharides	Evaluation of the structure and properties of GAGs

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Electrophoretic technique	Limit of detection	GAGs detected	Procedure	Application
High-performance capillary electrophoresis (HPCE)	0.03 µg (detection at 230 nm)	Nonsulfated GAGs, LPS	Electrokinetic chromatography with sodium dodecyl sulfate	Quantitative evaluation and determination of some properties of nonsulfated GAGs
High-performance capillary electrophoresis (HPCE)	Depends on the technique	GAGs disaccharide and oligosaccharide	Depends on technique	Quantitative evaluation and determination of the structure and properties of GAGs
Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE)	Approximately 0.005 µg	Disaccharide and oligosaccharide from HA, CS, DS, KS, HS, Hep and bacterial polysaccharide	Separation of labeled derivatives based on a PAGE	Determination of the fine structure and properties of GAGs

ที่มา: Volpi and Maccari, (2006)

7.2.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอซีเตต (cellulose acetate electrophoresis)

การแยกสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอซีเตต มีการพัฒนานำเอาแผ่นเซลลูโลสแอซีเตต (cellulose acetate membrane) มาใช้เป็นตัวกลาง ค้ำจุนหมู่ไฮดรอกซิลของเซลลูโลสส่วนมากจะถูกเปลี่ยนเป็นหมู่แอซีเตต จึงไม่ดูดซับสารชีวโมเลกุลเป็นการเพิ่มความสามารถในการแยกสารชีวโมเลกุลได้ดีขึ้น โดยผลการแยกจะปรากฏเป็นแถบแคบ ๆ เทคนิคนี้ทำได้รวดเร็วโดยใช้เพียงความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ (สุกัญญา, 2549)

Mizuno *et al.* (1990) ได้ทดสอบตัวอย่างกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากลูกตาปลาทูนาคีรีบเหลืองด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส 2 มิติ โดยใช้แผ่นเซลลูโลสแอซีเตต ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร พบว่า ตำแหน่งการเคลื่อนที่ของตัวอย่างบนอิเล็กโทรโฟรีซิส 2 มิติสอดคล้องกับกรดไฮยาลูโรนิก จึงสามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างบริสุทธิ์ที่ได้จากลูกตาปลาทูนาคีรีบเหลืองคือกรดไฮยาลูโรนิก

Nakano *et al.* (2002) ทดสอบการเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกจากเยื่อเปลือกไข่ที่ใช้เอนไซม์ปาเปนในการย่อยด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอซีเตต พบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอย่างบนแผ่นเซลลูโลสแอซีเตต แสดงให้เห็นแถบออกมา 2 แถบ โดยแถบแรกมีการเคลื่อนที่ช้าและอยู่ใกล้กับแถวของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน ส่วนอีกแถบที่เคลื่อนที่เร็วจะเห็นอยู่ระหว่างแถบของสารมาตรฐานของกรดไฮยาลูโรนิกกับเคอร์มาแทนซัลเฟต แถบที่เคลื่อนที่ช้าจะหายไปเมื่อย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเนส จาก *Streptomyces* และเช่นเดียวกับแถบที่เคลื่อนที่เร็วจะไม่ปรากฏแถบดังกล่าวเมื่อใช้เอนไซม์คอนครอยตินเนส ABC ในการย่อยสารสกัด ดังนั้นสารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่คือกรดไฮยาลูโรนิก คอนครอยตินซัลเฟตและเคอร์มาแทนซัลเฟต

Amagai *et al.* (2009) ใช้วิธี cellulose acetate membrane electrophoresis ทดสอบการเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่สกัดได้จากลูกตาปลาตาโดโดย พบว่าการเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกเป็นไปในทางเดียวกันกับการเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานและใช้เหตุผลในการยืนยันเอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้

7.3 วิธีวิเคราะห์โดยใช้ฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy)

เครื่องมือทางสเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาธรรมชาติทางเคมีของสาร โดยอาศัยการฉายแสงอินฟราเรดในช่วง เลขคลื่น ที่สนใจไปยังตัวอย่างแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในช่วงคลื่นที่สนใจ (วิชัย และคณะ, 2526) พลังงานที่ดูดกลืนเข้าไปจะไปทำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะการสั่นของพันธะโมเลกุลจากสถานะพื้นไปสู่การสั่นที่สถานะกระตุ้น เนื่องจากสารอินทรีย์แต่ละชนิดประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน ดังนั้นการดูดกลืนพลังงานเพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะการสั่นจึงแตกต่างกันตามไปด้วย (เย็นหทัย, 2549) ช่วงคลื่นอินฟราเรดที่ถูกนำมาใช้มากอยู่ในช่วง $4000 - 670 \text{ cm}^{-1}$ เป็นช่วงที่มีประโยชน์มากที่สุดในการวิเคราะห์ทางเคมี เป็นช่วงที่มีความถี่ตรงกับความถี่ของการสั่นของพันธะ โคเวเลนต์ในโมเลกุลของสาร การสั่น หรือ การหมุน ของพันธะของโมเลกุลจะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การยืดออก การบิดงอ แถบการดูดกลืนจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของหมู่ฟังก์ชันและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของโมเลกุลในรูปแบบสเปกตรัม (นิพนธ์และคณิดา, 2547) ประโยชน์เด่นชัดของเทคนิคนี้ คือ สามารถบอกหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารประกอบ ซึ่งสารประกอบแต่ละชนิดมีสเปกตรัมที่จำเพาะที่บ่งบอกลายพิมพ์ (fingerprint) ของสารนั้น ๆ (อรทัย, 2546)

Servaty *et al.* (2001) ได้นำวิธีการวิเคราะห์ด้วยฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี เทคนิค ATR (Attenuated Total Reflectance) มาใช้ในการศึกษาสมบัติการจับกับน้ำของกรดไฮยาลูโรนิกและคอนดรอยดินซัลเฟตที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระดูกอ่อน

Rosa *et al.* (2007) ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันเพื่อบ่งชี้และระบุเอกลักษณ์ของสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหางของไก่อายุ 48 วันด้วยวิธี FT-IR เทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน พบว่าสเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้มีลักษณะเหมือนกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน จึงสามารถบ่งชี้ว่าสารสกัดที่ได้นั้นเป็นกรดไฮยาลูโรนิก

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 ลูกตาของปลานิลจากตลาดคลองเตย ซึ่งปลานิลที่เป็นวัตถุดิบมีขนาด 1 กิโลกรัมต่อตัว

1.2 ลูกตาปลาพญาพันธุ์ทองแถบแซ่แข็ง ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไทยรวมสิน พัฒนาอุตสาหกรรม จำกัด มีขนาดประมาณ 3 กิโลกรัมต่อตัว

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี

- 2.1.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid, Merck)
- 2.1.2 กรดบอริก (Boric acid, Merck)
- 2.1.3 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, Ajax)
- 2.1.4 คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต (Copper (II) sulfate, Fisher)
- 2.1.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Ajax)
- 2.1.6 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, Merck)
- 2.1.7 ปีโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether, Fisher)
- 2.1.8 เมทิลเรด (Methyl red, Pocreac)
- 2.1.9 โบรโมครีซอล กรีน (Bromocresol green, Ajax)

2.2 สารเคมีสำหรับสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

2.2.1 เฮกซะเดซิลไพริดีเนียม คลอไรด์ โมโนไฮเดรตหรือ ซิทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

(Hexadecyl pyridinium chloride, Fluka)

2.2.2 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, Ajax)

2.2.3 โพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate, Sigma-Aldrich)

2.2.4 เอทานอลบริสุทธิ์ (99.99% Ethanol, Merck)

2.2.5 Trizma® base

2.2.6 เอนไซม์ปาเปน (Papain; EC 3.4.22.2, Sigma-Aldrich)

2.2.7 กรดไทรคลอโรอะซีติก (Trichloroacetic acid, Fisher)

2.2.8 แอซีโตน (Acetone, Fisher)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

2.3.1 คาร์บาโซล (Carbazole, Fluka)

2.3.2 โซเดียมเตทราโบเรต (Sodium tetraborate, Ajax)

2.3.3 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid, Merck)

2.3.4 เอทานอลบริสุทธิ์ (99.99% Ethanol, Merck)

2.3.5 ดี-กลูคูโรโนแลกโตน (D-glucuronolactone, Fluka)

2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์สมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

2.4.1 กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (Sodium salt hyaluronate, Sigma-Aldrich)

2.4.2 ไพริดีน (Pyridine, Ajax)

2.4.3 กรดอะซีติก (Acetic acid, Merck)

2.4.4 โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide, Ajax)

2.4.5 สีอัลคียนบลู 8 จีเอ็กซ์ (Alcian blu 8 GX, Sigma-Aldrich)

2.4.6 เอทานอลบริสุทธิ์ (99.99% Ethanol, Merck)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

- 3.1.1 ถ้วยอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
- 3.1.2 เครื่องย่อยโปรตีน (Digestion Unit K-435, Buchi)
- 3.1.3 หลอดย่อยโปรตีน (Digestion Unit K-435, Buchi)
- 3.1.4 เครื่องกลั่นวิเคราะห์โปรตีน (Disstillation Unit B-324, Buchi)
- 3.1.5 เครื่องดักจับไอกรด (Scrubber B-414, Buchi)
- 3.1.6 อุปกรณ์ไทเทรต
- 3.1.7 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
- 3.1.8 ตู้อบลมร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Memmert)
- 3.1.9 เตาเผาไฟฟ้าปรับและควบคุมอุณหภูมิ (Muffle Furnace size 3, Gallenkamp)
- 3.1.10 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec System HT 1043 Extraction Unit, Tecator)
- 3.1.11 Thimble สำหรับวิเคราะห์ไขมัน
- 3.1.12 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Advanced, Ohaus)
- 3.1.13 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Plus, Ohaus)
- 3.1.14 โถดูดความชื้น
- 3.1.15 กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 4 (Whatman)
- 3.1.16 Glass bead
- 3.1.17 อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- 3.1.18 เครื่องปั่นผสมอาหาร (HR2011/70, Philips)
- 3.1.19 ตู้แช่แข็ง

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

- 3.2.1 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Sorval RC 5C Plus Superspeed Centrifuge, Sorvall)
- 3.2.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Edelstahl, Post Frei และ BS-11, Lab Companion)
- 3.2.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Advanced, Ohaus)
- 3.2.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Plus, Ohaus)
- 3.2.5 เครื่องกวนควบคุมอุณหภูมิและความเร็วรอบ (MSH basic, Yellowline)
- 3.2.6 เครื่องผสมสาร (VX 100, Labnert)
- 3.2.7 ถุงไดอะลิซิส (ขนาดรูพรุน 6,000 – 8,000 ดาลตัน, Cellu Sep)
- 3.2.8 ตู้แช่เย็น

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

- 3.3.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- 3.3.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Edelstahl, Post Frei และ BS-11, Lab Companion)
- 3.3.3 เครื่องผสมสาร (VX 100, Labnert)
- 3.3.4 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genesis 10 series, Thermo)

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์สมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก

- 3.4.1 เครื่องวัดพีเอช (pH-Vision 6071, Jenco)
- 3.4.2 เครื่องอิเล็กโทรโพรีซิสแบบเซลล์โลสแอชีเทต (Titan Plus, Helena Laboratories)
- 3.4.3 แผ่นเซลล์โลสแอชีเทต (Titan III, Helena Laboratories)
- 3.4.4 ตู้อบลมร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Mettler)
- 3.4.5 เครื่องฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Tensor 27, Bruker)

3.4.6 แผ่นแก้วเบรียมฟลูออไรด์

3.4.7 เครื่องเป่าแห้งชนิดลมเย็น

3.4.8 กระดาษเช็ดเลนส์ (Kimwipes, Kimtech)

วิธีการ

1. การหาน้ำหนักลูกตาและปริมาณน้ำเลี้ยงในลูกตาปลานิลและปลาเทโพน้ำหนัก 67 กรัม

แยกลูกตาออกจากหัวปลา นำมาล้างทำความสะอาดบรรจุถุงพลาสติกแล้วนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากแช่แข็งประมาณ 1 – 2 วัน นำตัวอย่างลูกตาปลานิลและปลาเทโพน้ำหนัก 67 กรัมแช่แข็งมาชั่งน้ำหนักเริ่มต้นเพื่อคำนวณเป็นร้อยละของลูกตาปลาเทียบกับน้ำหนักตัวปลา ตัดแยกเอาส่วนน้ำเลี้ยงลูกตา (vitreous humor) ซึ่งเป็นก้อนใสคล้ายวุ้นที่อยู่ในสภาพแช่แข็งนำไปชั่งน้ำหนักบันทึกน้ำหนักลูกตาแต่ละลูก เพื่อคำนวณเป็นร้อยละของน้ำเลี้ยงลูกตาเทียบกับน้ำหนักลูกตาปลา โดยใช้ลูกตาปลานิลและปลาเทโพจำนวน 67 ลูกและ 42 ลูก ตามลำดับ และวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีในส่วน of ลูกตาปลาและน้ำเลี้ยงลูกตา

2. การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของลูกตาของปลานิลและปลาเทโพน้ำหนัก 67 กรัม

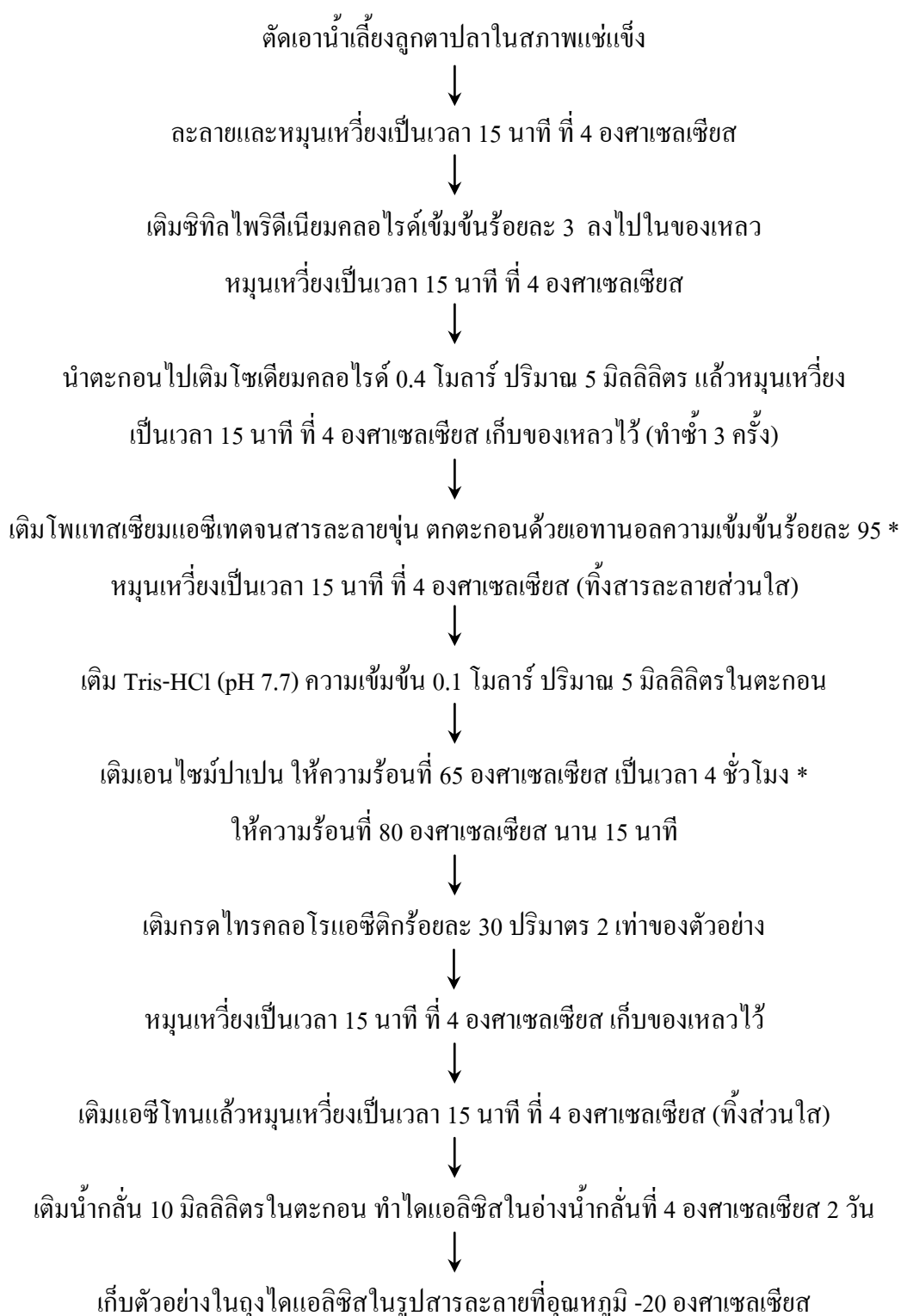
สุ่มตัวอย่างลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตา (ก้อนใส ๆ คล้ายวุ้น) ปลานิลสดจำนวน 40 ลูกและปลาเทโพจำนวน 30 ลูก ตามวิธีในข้อ 1 มาวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมันและเถ้า โดยวิธีการของ AOAC (1999) (ภาคผนวก ก) ส่วนปริมาณของคาร์โบไฮเดรตจะได้จากการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\% \text{ ความชื้น} + \% \text{ เถ้า} + \% \text{ โปรตีน} + \% \text{ ไขมัน})$$

โดยนำตัวอย่างลูกตามาบดผสมแล้วสุ่มตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวข้างต้น

3. การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลา

นำลูกตาปลาไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเอาส่วนน้ำเลี้ยงลูกตาในสภาพที่เป็นของแข็ง ปล่อยให้เกิดการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง เหยี่ยงแยกของแข็งที่ 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการสกัดได้มีการดัดแปลงจาก Amagai *et al.* (2009) โดยนำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมซิทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (Cetylpyridinium chloride, CPC หรือ Hexadecyl pyridinium chloride) เพื่อตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสออกแล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.4 M ลงไปในตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกกรดไฮยาลูโรนิกจากสารประกอบ CPC นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บของเหลวที่แยกได้ (ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง) ของเหลวทั้งหมดที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงข้างต้นนำมาเติมโพแทสเซียมแอซิเตตและตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส แยกตะกอนมาเติม Tris-HCl 0.1 M (pH 7.7) และเอนไซม์ปาเปน ให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยให้ความร้อนแก่สารละลายผสมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมกรดไทรคลอโรแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสไว้ เติมแอซิโตนลงไปในสารละลายแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปเติมน้ำกลั่นและทำไดเอลิซิสเป็นเวลา 2 วัน (เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกวัน) จนน้ำกลั่นนอกถุงไดเอลิซิสมีพีเอชเท่ากับน้ำกลั่นก่อนทำการไดเอลิซิส เก็บตัวอย่างสารละลายในถุงไดเอลิซิสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป กระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกแสดงในภาพที่ 8 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดคือ 40 และ 30 ลูกตาในปลานิลและปลาทูน่าทองแถบ ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำจะสุ่มตัวอย่างน้ำเลี้ยงลูกตาปริมาณ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ตัวอย่างเพื่อสกัดกรดไฮยาลูโรนิกตามวิธีการดังกล่าว



ภาพที่ 8 แผนภาพกระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลา

หมายเหตุ *ขั้นตอนที่มีการดัดแปลงจากวิธีการของ Amagai *et al.* (2009)

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีคาร์บาโซล

การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกของสารที่สกัดได้ด้วยวิธีคาร์บาโซล (Bitter and Muir, 1962) โดยใช้ ดี-กลูคิวโรโนแลกโตนเป็นสารมาตรฐาน แล้วรายงานผลในรูปกรดไฮยาลูโรนิก (ภาคผนวก ข)

5. การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก

5.1 การทดสอบพีเอชของสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งผ่านการสอบเทียบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4 และพีเอช 7 ก่อนการทดสอบตัวอย่าง

5.2 การพิสูจน์ยืนยันเอกลักษณ์ของสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาทั้ง 2 ชนิดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลล์โลสแอซีเทต โดยดัดแปลงวิธีจาก Nakano *et al.* (1994) และวิธีฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี ด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance (ATR) ในช่วง เลขคลื่น $2000-800\text{ cm}^{-1}$ โดยเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ppm (ภาคผนวก ค)

6. การเก็บรักษาลูกตาของปลานิล

การเก็บรักษาลูกตาปลานิลที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งต่อปริมาณและสมบัติบางประการของกรดไฮยาลูโรนิก ในการทดลองจะใช้ตัวอย่างลูกตาของปลานิลที่ผ่านการแยกจากหัวปลา ล้างทำความสะอาดแล้วบรรจุลงถุงพลาสติก จำนวน 2 ชุด ๆ ละ 70 ลูก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 2 และ 4 เดือน ตามลำดับ เมื่อครบกำหนด นำตัวอย่างแยกเอาน้ำเลี้ยงลูกตาออกและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างไปสกัดกรดไฮยาลูโรนิกตามวิธีการในข้อ 3. ทำการสกัด 2 ครั้ง จำนวน 2 ตัวอย่างต่อ 1 ครั้ง และวิเคราะห์สมบัติของสารสกัดตามวิธีการในข้อ 4-5 ต่อไป

7. ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ

7.1 ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เพื่อศึกษาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลและปลาเทโพท้องแถบ รวมทั้งปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากการเก็บลูกตาปลานิลแช่แข็งเป็นระยะเวลา 0, 2 และ 4 เดือน โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ ใช้จำนวนตัวอย่าง 2 ตัวอย่างต่อ 1 ซ้ำ

7.2 นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0

ผลและวิจารณ์

1. องค์ประกอบทางเคมีของลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาทูลำท้อ

1.1 ผลการศึกษาน้ำหนักของลูกตา น้ำเลี้ยงจากลูกตาปลานิลและปลาทูลำท้อ

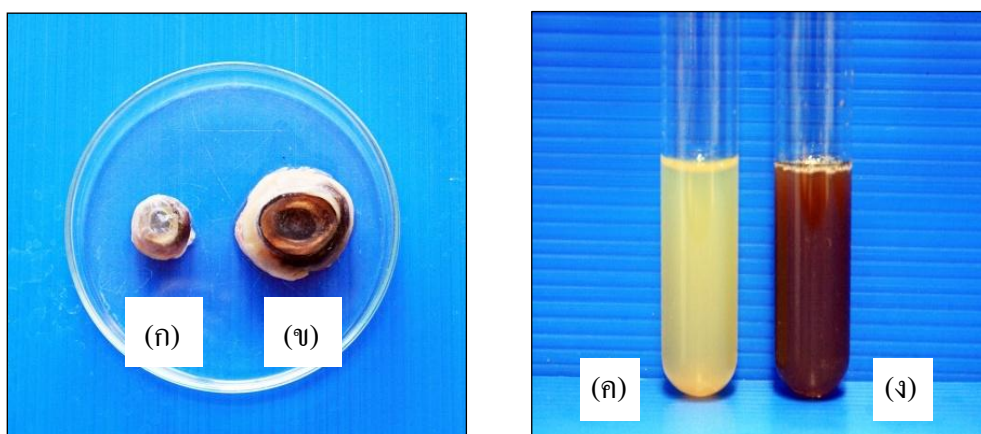
ตัวอย่างปลานิลและปลาทูลำท้อที่ใช้ในงานวิจัยมีขนาด 1 กิโลกรัมและ 3 กิโลกรัม ตามลำดับ สัดส่วนของลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตา แสดงในตารางที่ 3 โดยปลานิล 1 ตัว มีปริมาณลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตา ร้อยละ 0.88 และ 0.13 (w/w)ตามลำดับ ขณะที่ปลาทูลำท้อมีร้อยละ 0.78 และ 0.14 (w/w) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าสัดส่วนของลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาจากปลานิลและปลาทูลำท้อต่อน้ำหนักปลาทั้งตัวมีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 1) จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีผู้ค้นพบกรดไฮยาลูโรนิกครั้งแรกในลูกตาวัว (Meyer and Palmer, 1934) และต่อมามีรายงานในลูกตาปลาทูลำท้อเหลือง (Mizuno *et al.*, 1990) และปลาทูลำท้อดำ (Amagai *et al.*, 2009) จากข้อมูลนี้จึงเป็นแนวทางในการศึกษาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในลูกตาปลานิล และลูกตาปลาทูลำท้อ โดยปลานิลมีการแปรรูปเพื่อส่งออกเป็นจำนวนมากและในกลุ่มปลาทูลำท้อปลาทูลำท้อมีการนำเข้ามาแปรรูปมากที่สุดในประเทศไทย จากข้อมูลการส่งออกเนื้อปลานิลแบบฟิเลต์แช่แข็งในช่วงสี่เดือนแรกของปี 2555 มีปริมาณถึง 126.6 ตัน (เกวดิน, 2555) คิดเป็นปลานิลจำนวน 506,400 ตัว (ประมาณการจากผลได้ของฟิเลต์ร้อยละ 25 และปลานิลหนัก 1 กิโลกรัมต่อตัว) ดังนั้นในแต่ละปีจะมีลูกตาปลานิลเป็นของเหลือจากกระบวนการแปรรูปเนื้อปลานิลแบบฟิเลต์จำนวนมาก สามารถนำมาสกัดกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เกษษกรรม และอุตสาหกรรมอาหาร โดยกรดไฮยาลูโรนิกบริสุทธิ์มีราคา 4,500 บาทต่อ 100 มิลลิกรัม (Sigma-Aldrich, ราคา ณ วันที่ 5 ตุลาคม 2555) ในทำนองเดียวกันปลาทูลำท้อมีการนำเข้ามากที่สุดถึง 402,219 ตันต่อปี (กรมการค้าต่างประเทศ, 2554) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมทูลำท้อบรรจุกระป๋อง จึงมีเศษเหลือเป็นลูกตาปลาทูลำท้อจำนวนมาก

ตารางที่ 3 น้ำหนักลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาเทโพนาท้องแถบ

ชนิดของตัวอย่าง	ปลานิล		ปลาเทโพนาท้องแถบ	
	1 ลูก	1 ตัว	1 ลูก	1 ตัว
น้ำหนักลูกตาเฉลี่ย ¹ (กรัม)	4.40±0.49	8.80±0.49	11.67±1.91	23.35±1.91
ปริมาณร้อยละ (ต่อน้ำหนักตัวปลา)		0.88		0.78
น้ำหนักน้ำเลี้ยงจากลูกตา ¹ (กรัม)	0.64±0.19	1.29±0.19	2.15±0.80	4.29±0.80
ปริมาณร้อยละ (ต่อน้ำหนักตัวปลา)		0.13		0.14

หมายเหตุ ¹ค่าเฉลี่ยจากลูกตาปลานิลและปลาเทโพนาท้องแถบจำนวน 67 และ 42 ลูก ตามลำดับ

จากภาพที่ 9 จะสังเกตเห็นลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันของลูกตาปลานิลและปลาเทโพนาท้องแถบ (ภาพที่ 9 (ก) และ (ข)) เนื่องจากปลานิลที่ใช้มีความสดใหม่ ลูกตามีลักษณะนูนใส บ่งชี้คุณภาพความสดสูง (Ben-gigirey *et al.*, 1999) และสูงกว่าปลาเทโพนาท้องแถบซึ่งเป็นปลาที่เก็บรักษาโดยการแช่แข็ง ลูกตาของปลาเทโพนาท้องแถบมีลักษณะเหี่ยวตาขาวและน้ำเลี้ยงลูกตามีสีแดงเนื่องจากมีเลือดปนอยู่และสีคล้ำ (ภาพที่ 9 (ง)) จัดระดับความสดเทียบเท่ากับคุณภาพปานกลาง (Ben-gigirey *et al.*, 1999) สิ่งที่ปนเปื้อนในน้ำเลี้ยงลูกตานี้จะต้องทำการแยกออก การที่มีเลือดปนอยู่ในน้ำเลี้ยงลูกตานี้นี้อาจเป็นผลจากการแช่แข็งและการเก็บรักษา รวมถึงขั้นตอนการทำละลาย ปลาเทโพนาแช่แข็งเพื่อนำเข้าสู่กระบวนการทำปลากระป๋อง ดังนั้นการจัดการวัตถุดิบปลาจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องดูแลเพื่อให้ได้ลูกตาปลาที่สด ใหม่และไม่มีการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ ที่รบกวนต่อการสกัดสารสำคัญคือกรดไฮยาลูโรนิก เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ เกษษกรรมและอุตสาหกรรมอาหาร การนำลูกตาปลามาสกัดกรดไฮยาลูโรนิกเป็นแนวทางหนึ่งในการสร้างมูลค่าเพิ่มที่น่าสนใจ



ภาพที่ 9 ลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาก่อนการสกัด (ก) ปลานิล (ข) ปลาทูน่าท้องแถบ
(ค) น้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและ (ง) น้ำเลี้ยงลูกตาปลาทูน่าท้องแถบ

1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตา

จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมี (ความชื้น ไขมัน เถ้า โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต) จากลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาทูน่าท้องแถบเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำลูกตาปลาทั้ง 2 ชนิดไปใช้ให้เกิดประโยชน์ พบว่า ทั้งลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลาทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณความชื้นสูง โดยเฉพาะน้ำเลี้ยงลูกตามีความชื้นมากกว่าร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4) เนื่องจากลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลาเป็นของเหลวเป็นองค์ประกอบหลัก เช่นเดียวกับของเหลวในลูกตาของมนุษย์ที่มีลักษณะเป็นเจลที่ประกอบด้วยโครงสร้างของเส้นใยคอลลาเจนและกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งเป็นไฮโดรเจลที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ลูกตาของมนุษย์มีปริมาณของเหลวมากถึงร้อยละ 98-99 (Swindle and Ravi, 2007) รองลงมาคือปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและเถ้าตามลำดับ ซึ่งน้ำเลี้ยงลูกตามีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบ โดยสารนี้เป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต ถึงแม้สารนี้จะมีปริมาณน้อย แต่ในทางการค้ากรดไฮยาลูโรนิกมีมูลค่าสูงและเป็นสารสำคัญที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน อีกทั้งการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกเป็นการลดปริมาณของเสียในส่วน of ลูกตาปลาจากอุตสาหกรรมและลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียเหล่านี้ได้

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีในลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาทูลำท้อ

องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)	ปลานิล		ปลาทูลำท้อ	
	ลูกตา	น้ำเลี้ยงลูกตา	ลูกตา	น้ำเลี้ยงลูกตา
ความชื้น	49.15 ± 0.41	97.97 ± 0.01	73.75 ± 0.27	90.50 ± 0.03
เถ้า	0.36 ± 0.16	0.08 ± 0.00	0.50 ± 0.07	0.06 ± 0.01
ไขมัน	38.58 ± 0.11	0.68 ± 0.06	11.81 ± 0.31	2.44 ± 0.03
โปรตีน ¹	7.90 ± 0.79	1.25 ± 0.09	12.96 ± 0.13	3.88 ± 0.09
คาร์โบไฮเดรต ²	4.01 ± 0.36	0.02 ± 0.04	0.98 ± 0.19	3.12 ± 0.09

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง

$$^1 \% \text{โปรตีน} = \% \text{ไนโตรเจน} \times 6.25$$

$$^2 \% \text{คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\% \text{ความชื้น} + \% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{เถ้า})$$

2. การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

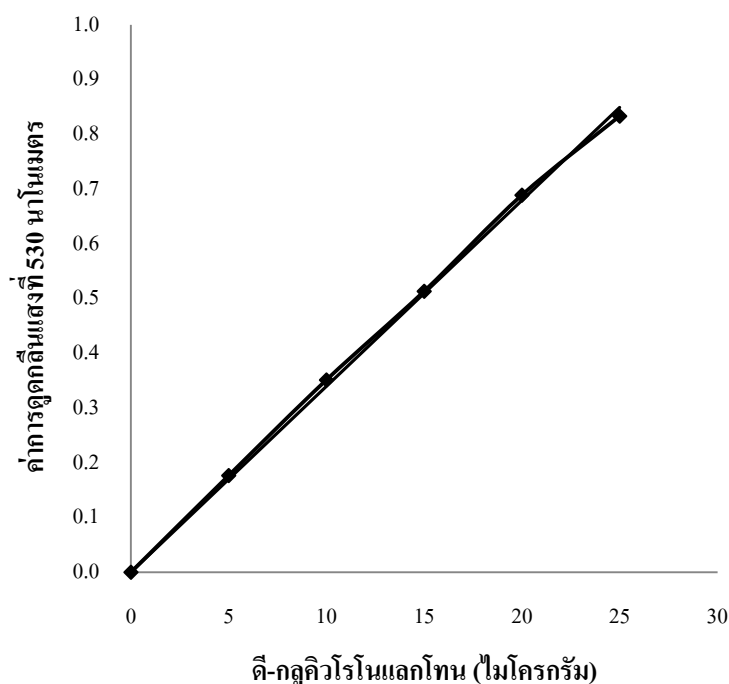
2.1 กระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลา

กระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกแสดงในภาพที่ 8 โดยนำตัวอย่างของเหลวจากน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาทูลำท้อที่ผ่านการเหวี่ยงแยกของแข็งแล้วปริมาณ 5 มิลลิลิตร มาสกัดกรดไฮยาลูโรนิกตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Amagai *et al.* (2009) โดยเพิ่มความเร็วในการหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง จาก 2,220 g เป็น 6,000 g เพื่อเพิ่มอัตราเร่งในการตกตะกอนของอนุภาคที่ไม่ละลายออกจากของเหลวได้ดียิ่งขึ้น ในการศึกษาพบว่าใช้ซิลิกาฟริดิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 จำนวน 15 และ 60 หยด สำหรับตัวอย่างน้ำเลี้ยงลูกตาปริมาณ 5 มิลลิลิตรจากปลานิลและ

ปลาทุ่นน้ำท้องแถบ ตามลำดับ ปริมาณดังกล่าวเพียงพอที่ทำให้เกิดตะกอนปูนจากการจับตัวกันของ สารประกอบเชิงซ้อนของซิทิลไพริดีนียมคลอไรด์กับไกลโคซามิโนไกลแคนในน้ำเลี้ยงลูกตาปลา เนื่องจากไกลโคซามิโนไกลแคนสามารถทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยสารประกอบกลุ่มควอเทอร์นารี แอมิโน (Lindhal, 1969) และซิทิลไพริดีนียมคลอไรด์นี้เป็นดีเทอร์เจนต์ในกลุ่มควอเทอร์นารี แอมโมเนียม ซึ่งมีควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไอออนที่มีประจุบวก (QN^+) สามารถเกิด สารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำกับโมเลกุลที่มีประจุลบมาก ๆ ได้แก่ ไกลโคซามิโนไกลแคน ซึ่งรวมมวคอปอลิแซ็กคาไรด์ในรูปกรด (acidic mucopolysaccharide) (Scott, 1962) จากนั้นนำ สารละลายที่มีตะกอนไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อ แยกตะกอนของซิทิลไพริดีนียมกับไกลโคซามิโนไกลแคนและล้างตะกอนด้วยสารละลายโซเดียม คลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ปริมาณ 5 มิลลิลิตรเพื่อให้สารประกอบเชิงซ้อนของซิทิลไพริดีนียมกับกรดไฮยาลูโรนิกละลายแยกออกจากตะกอน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส โดยการล้างตะกอนจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งได้ของเหลวรวมกัน ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ของเหลวที่ได้นำมาตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกด้วยโพแทสเซียมแอซิเตตร้อย ละ 10 ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในการศึกษาพบว่าจะต้องเติมโพแทสเซียมแอซิเตตใน รูปของแข็งลงไปในสารสกัดจนกระทั่งไม่เกิดความขุ่นเพิ่มขึ้น จึงเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เพื่อตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ของเหลวที่ได้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนมาเติม Tris-HCl (pH 7.7) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ปาเปน (EC 3.4.22.2) ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตรเพื่อย่อยโปรตีนไโกลแคน แทนการใช้เอนไซม์ไมโคไลซิน ใช้สภาวะการย่อยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ความร้อนเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมไทรคลอโรแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาณ 2 เท่าของสารละลายเดิมในตัวอย่างเพื่อ ตกตะกอนโปรตีนไโกลแคนออกจากสารละลาย โดยกรดไทรคลอโรแอซิดิกเหนี่ยวนำให้โครง- สร้างของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Sivaraman *et al.* (1997) ที่ใช้ กรดไทรคลอโรแอซิดิกความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 5-40 ในการตกตะกอนโปรตีนและรายงานว่า ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 15-30 โปรตีนในสารละลายส่วนใหญ่จะตกตะกอนออกมามากที่สุด แยกตะกอนโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำ สารละลายส่วนในมาตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิกโดยใช้แอซิโตน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว

6,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำการไดอะไลซิสในอ่างน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เปลี่ยนน้ำกลั่นทุก 24 ชั่วโมง) จนพีเอชของน้ำกลั่นนอกถุงไดอะไลซิสมีพีเอชเท่ากับน้ำกลั่นก่อนทำการไดอะไลซิส เก็บตัวอย่างสารละลายในถุงไดอะไลซิสในรูปสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก ด้วยวิธีการบาโซล (Bitter and Muir, 1962) โดยใช้สารละลายของ ดี-กลูคิวโรโนแลกโตน เป็นสารละลายมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกจากกราฟมาตรฐานโดยใช้ ดี-กลูคิวโรโนแลกโตน เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากกรดไฮยาโลโรนิกมีโครงสร้างเป็นหน่วยย่อยของไดแซคคาไรด์พอลิเมอร์สายยาวและมีกรดยูโรนิกเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง วิธีการวิเคราะห์ปริมาณมีหลักการ คือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้นจะเข้าไปสลายองค์ประกอบที่เป็นไดแซคคาไรด์ของไกลโคซามิโนไกลแคนให้กลายเป็นมอนอแซ็กคาไรด์ ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับคาร์บาโซลเกิดสารประกอบที่มีสี สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรได้และให้ผลกราฟมาตรฐานของ ดี-กลูคิวโรโนแลกโตน ดังภาพที่ 10

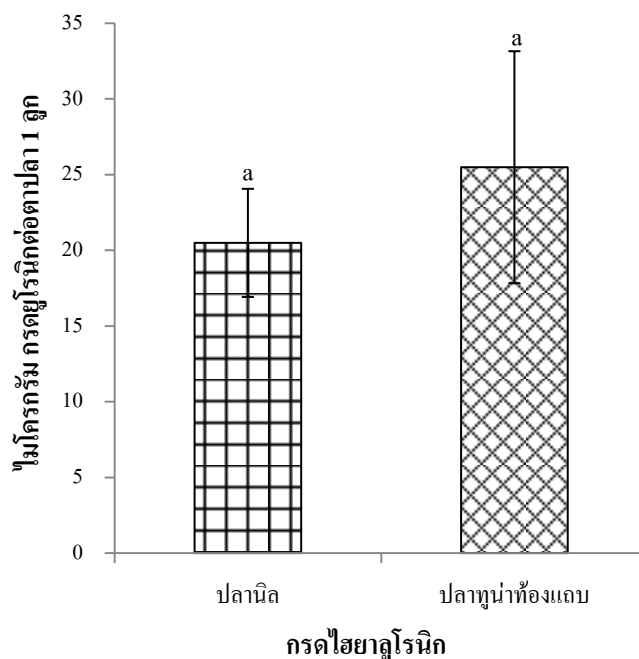


ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายของ ดี-กลูคิวโร โน-แลกโทน กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร สมการแสดงความสัมพันธ์คือ

$$y = 0.034x \text{ มีค่า } R^2 = 0.9989$$

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

ใช้กราฟมาตรฐานของ ดี-กลูคิวโร โน-แลกโทน จากสมการ $y = 0.034x$ เพื่อคำนวณปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในตัวอย่างที่สกัดได้จากน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลและปลาหมอสี เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นมอโนเมอร์ในโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก จึงใช้สมการดังกล่าวเพื่อคำนวณหาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในตัวอย่างที่สกัดได้ ซึ่งพบว่า ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในตัวอย่างลูกตาปลานิลและปลาหมอสีมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเฉลี่ย 20.49 ± 3.50 และ 25.49 ± 7.66 ไมโครกรัมกรดไฮยาลูโรนิกต่อลูกตาปลานิลและปลาหมอสี 1 ลูก ตามลำดับ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาเนิลและปลาทูน่าท้องแถบ
(ไมโครกรัม กรดยูโรนิก)

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทางสถิติ

เมื่อเทียบปริมาณสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาเนิลและปลาทูน่าท้องแถบกับ สารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหางของไก่จากการทดลองของ พิมพ์พร (2556) (ไก่เพศผู้อายุ 4-5 สัปดาห์) หางไก่แห้งจากการทดลองของ Nakano *et al.* (1994) (ไก่เพศผู้อายุ 52 สัปดาห์) และ Rosa *et al.* (2007) (ไก่เพศผู้ร่วมกับเพศเมีย อายุ 7 สัปดาห์) ซึ่งรายงานในหน่วยไมโครกรัมกรดยูโรนิกเช่นกัน พบปริมาณต่างกัันดังตารางที่ 5 ทั้งนี้ชนิดของวัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก นอกจากนั้นวิธีการรายงานปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกมีทั้ง รายงานเป็นปริมาณกรดยูโรนิกที่ได้จากการเทียบกับสารมาตรฐานดังในการทดลองนี้ หรือรายงานเป็นน้ำหนักสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิก หลังการทำแห้งแบบระเหิด (freeze-drying) ดังรายงานของ Amagai *et al.* (2009) ซึ่งการรายงานปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกทั้งสองแบบยังมีข้อจำกัด กล่าวคือ สารสกัดของกรดไฮยาลูโรนิกอาจประกอบด้วยกรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ

กัน การคำนวณจึงแสดงเป็นจำนวนหน่วยย่อยหรืออนุพันธ์ของกรดไฮยาลูโรนิกต่อ 1 หน่วยน้ำหนักวัตถุดิบ สำหรับการรายงานเป็นน้ำหนักแห้งของสารสกัดนั้นหากสารสกัดไม่บริสุทธิ์จะทำให้ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกมากกว่าความเป็นจริง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณและพีเอชของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากแหล่งต่าง ๆ

ตัวอย่าง	กรดไฮยาลูโรนิก	pH	แหล่งอ้างอิง
ดาปลานิล 1 ลูก (μg uronic acid)	20.49 ^a	6.56 ^a	ผลการศึกษา
ดาปลาทูน่าท้องแถบ 1 ลูก (μg uronic acid)	25.49 ^a	5.76 ^b	ผลการศึกษา
ดาปลาทูน่าดาโต 1 ลูก (มิลลิกรัม)	10.5	ND	Amagai <i>et al.</i> (2009)
หงอนไก่ 1 หงอน (μg uronic acid) (ไก่เพศผู้อายุ 5 – 6 สัปดาห์)	800	ND	พิมพ์พร (2556)
หงอนไก่แห้ง 1 มิลลิกรัม (μg uronic acid) (ไก่เพศผู้อายุ 52 สัปดาห์)	44.1	ND	Nakano <i>et al.</i> (1994)
หงอนไก่แห้ง 1 มิลลิกรัม (μg uronic acid) (ไก่เพศผู้รวมกับเพศเมียอายุ 7 สัปดาห์)	14.9	ND	Rosa <i>et al.</i> (2007)

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b ในแนวดังที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทางสถิติ

ND = ไม่ปรากฏข้อมูล

2.3 การศึกษาสมบัติและการบ่งชี้เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก

2.3.1 พีเอชของกรดไฮยาลูโรนิก

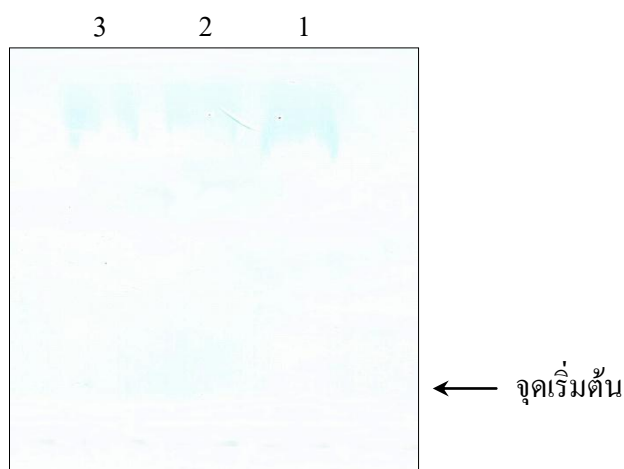
ค่าพีเอชของสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกดาปลานิลและปลาทูน่าท้องแถบแสดงในตารางที่ 5 โดยพีเอชของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากลูกดาปลานิลและปลาทูน่าท้องแถบมีค่าใกล้เคียงกับสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (Sigma-Aldrich) ที่ความเข้มข้น

10 ppm ซึ่งมีพีเอช 6.26 ทั้งนี้ค่าพีเอชของกรดไฮยาลูโรนิกขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลาย ค่าพีเอชที่ได้จากการศึกษาเป็นเพียงการบอกความเป็นกรด-เบสของสารสกัดเท่านั้น แต่ยังไม่อาจยืนยันได้ว่าเป็นกรดไฮยาลูโรนิก จึงต้องมีการวิเคราะห์ด้วยวิธีการอื่น ๆ เพื่อใช้ยืนยันและบ่งชี้เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้เทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน เช่น การวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุล เป็นต้น

2.3.2 การวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลล์ูโลสแอซิเตด

นำตัวอย่างกรดไฮยาลูโรนิกจากการสกัดมาวิเคราะห์ผลเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (HA จากหองของไก่, Sigma Aldrich) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลล์ูโลสแอซิเตด ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นกรด (acidic polysaccharide) และวิธีนี้เป็นที่ยอมรับในการแยกและวิเคราะห์ของพอลิแซ็กคาไรด์ วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัมเมื่อเทียบกับวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิสอื่น ๆ (Szewczyk, 1983; Volpi and Maccari, 2006)

ผลการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลล์ูโลสแอซิเตดในตัวอย่างปลานิลและปลาเทโพนำท้องแถบดังแสดงในภาพที่ 12 จะเห็นว่าสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทั้ง 2 ชนิดมีแถบการเคลื่อนที่บนแผ่นเซลล์ูโลสแอซิเตดอยู่ในตำแหน่งเดียวกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน โดยเริ่มต้นที่จุดเดียวกัน จึงยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้นั้น คือ กรดไฮยาลูโรนิกจริง (Mizuno *et al.*, 1990; Amagai *et al.*, 2009) โดยกรดไฮยาลูโรนิกมีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกซึ่งอยู่ด้านขอบบนในภาพ การเคลื่อนที่ขึ้นกับจำนวนประจุต่อน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง การเคลื่อนที่มาอยู่ในตำแหน่งเดียวกันของสารสกัดและสารมาตรฐานจึงแสดงว่าสารสกัดที่ได้เป็นกรดไฮยาลูโรนิก



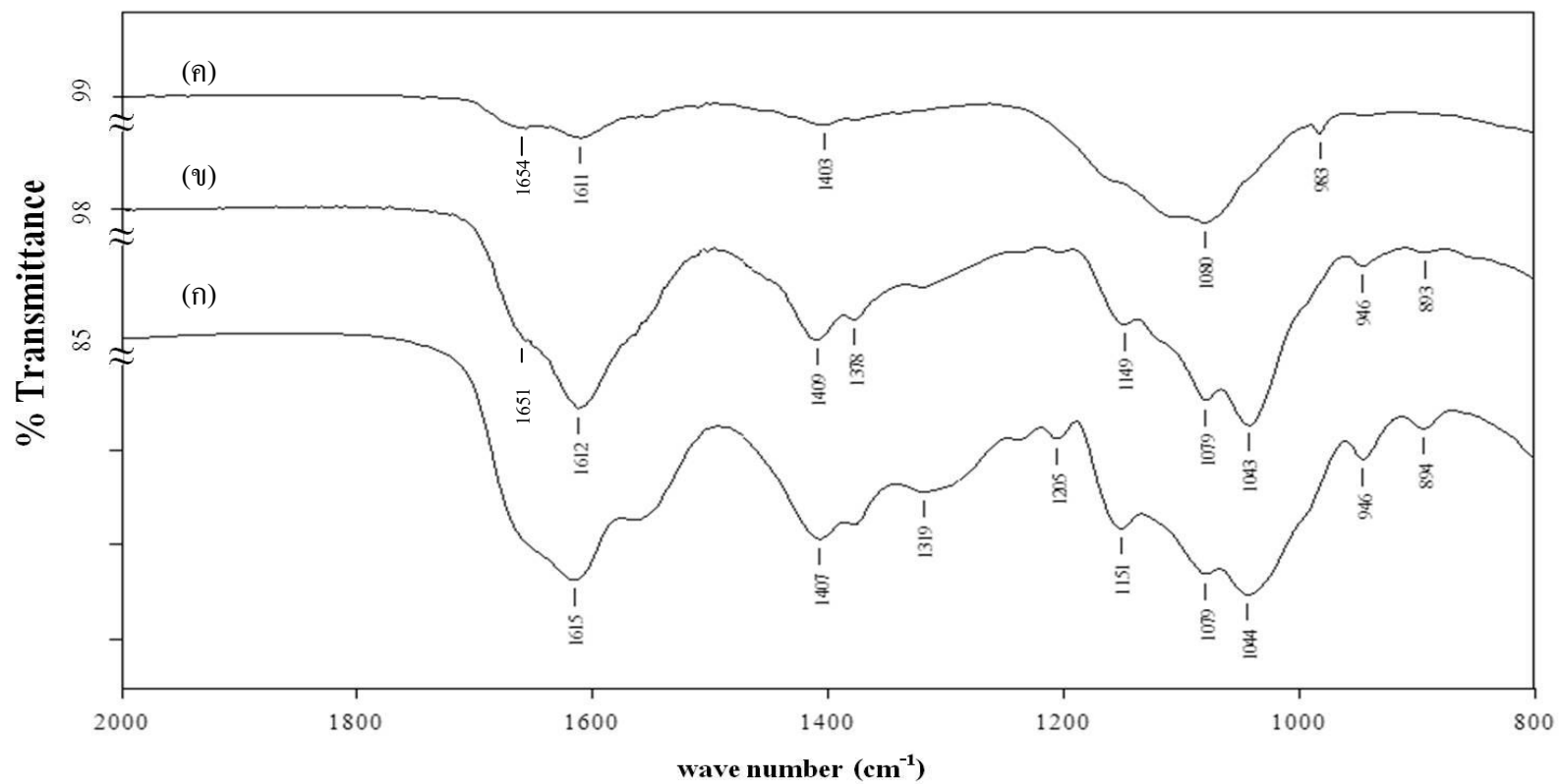
ภาพที่ 12 การเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกบนแผ่นเซลลูโลสแอซีเตด 1 = กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (HA จากหงอนของไก่, Sigma Aldrich) 2 = กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลา นิลสด และ 3 = กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลา ทูน่าทองแถบ

2.3.3 การวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี

ฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานที่เกิดจากการสั่น ภายในโมเลกุลเมื่อสารตัวอย่างได้รับพลังงานจากคลื่นรังสีอินฟราเรด ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ เลขคลื่น $2000-800\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นคลื่นรังสีอินฟราเรดช่วงกลาง (mid infrared, $4000-200\text{ cm}^{-1}$) โมเลกุลของสารจะเกิดการดูดซับพลังงานบางส่วนขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ที่ประกอบในโมเลกุลทำให้ปรากฏเป็นสเปกตรัม (spectrum) นำไปใช้ระบุหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน (รัชนี, 2550)

สเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากลูกตาปลา นิลสดและปลา ทูน่าทองแถบ เทียบเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานให้ผลดังแสดงในภาพที่ 13 พบว่ารูปแบบสเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากตัวอย่างลูกตาปลาทั้งสองชนิดใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน โดยหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญสรุปดังตารางที่ 6 กล่าวคือบริเวณช่วง เลขคลื่น $1600-1651\text{ cm}^{-1}$ ในกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานมีพิกซ์เจนที่ เลขคลื่น 1615 cm^{-1} ซึ่งบ่งชี้ถึงหมู่ฟังก์ชันของ amide II

แต่ไม่พบ carboxyl, amide I ที่ เลขคลื่น $1651-1654\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งพบในกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดจากตาปลา นิลและทูน่าทองแถบ จากการศึกษาของ Tomihata และ Ikada (1997) ได้ทำการทดลองเปลี่ยนกรดไฮยาลูโรนิกในรูปเกลือ โซเดียมไฮยาลูโรเนตให้อยู่ในรูปกรดไฮยาลูโรนิก ผลการทดลองพบความแตกต่างของการเกิดพีคของ amide group โดยกรดไฮยาลูโรนิกในรูปเกลือพบพีคของ amide II และกรดไฮยาลูโรนิกในรูปกรดพบพีค amide I จึงสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในตาปลา เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานที่นำมาให้อยู่ในรูปโซเดียมไฮยาลูโรเนต สำหรับพีคอื่นที่พบในตัวอย่างมาตรฐานแต่ไม่พบในสารสกัดคือ พีคของ C-OH ที่ เลขคลื่น 1044 cm^{-1} (ไม่พบในสารสกัดจากตาปลาทูน่าทอง-แถบ) แต่พบพีค C-O with C=O combination ที่ เลขคลื่น 1101 cm^{-1} ในปลาทูน่า เหตุผลประการหนึ่งซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปลาทูน่าที่ใช้ในการทดลองผ่านการแช่แข็งนานหลายเดือนขณะที่ปลานิลเป็นปลาสด โดยรวมของกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาทั้งสองชนิดมีสเปกตรัมที่ใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (Sigma-Aldrich) จึงสามารถยืนยันเอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้



ภาพที่ 13 สเปกตรัมของกรดไฮยาโลโรนิก (ก) กรดไฮยาโลโรนิกมาตรฐาน (ข) กรดไฮยาโลโรนิกจากกลูตาปลาโนล และ (ค) กรดไฮยาโลโรนิกจากกลูตาปลาพุน้ำ
ท้องแถบ

ตารางที่ 6 หมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาโลโรนิกจากตาปลานิลและปลาทูน่าทองแถบ

หมู่ฟังก์ชัน	เลขคลื่น (cm ⁻¹)		
	สารมาตรฐาน (Sigma-Aldrich)	ปลานิล	ปลาทูน่าทองแถบ
CONH- carboxyl amide I	-	1651	1654
Amide II	1615	1612	1611
C-O group (acid)	1407	1409	1403
CH ₂ , CH ₃	1379	1378	1377
C-O-C (O-bridge)	1151	1149	1153
C-O with C=O combination	-	-	1101
C-O-C (ring mode)	1079	1079	1080
C-OH group	1044	1043	-
O-H deformation	946	946	983

หมายเหตุ การระบุหมู่ฟังก์ชันและ เลขคลื่น อ้างอิงจาก Alkrad *et al.* (2003);

Bezakowa *et al.* (2008); Choi *et al.* (2010)

3. การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บแช่แข็งลูกตาปลานิลต่อปริมาณและสมบัติของกรดไฮยาโลโรนิก

การแช่แข็งลูกตาปลานิลซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมและเพื่อให้ได้ปริมาณตัวอย่างที่มากพอต่อการสกัดกรดไฮยาโลโรนิก ทั้งนี้การเก็บรักษาโดยการแช่แข็งนั้นอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและสมบัติบางประการของกรดไฮยาโลโรนิก จึงมีการศึกษาผลของระยะเวลาการแช่แข็งลูกตาปลานิลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและสมบัติของกรดไฮยาโลโรนิก โดยนำลูกตาปลานิลที่ทำความสะอาดแล้ว บรรจุในถุงพลาสติกจำนวน 70 ลูกตาต่อถุง นำไปแช่

แข็งในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างลูกตาปลานิลแช่แข็งที่ระยะเวลา 2 และ 4 เดือน นำมาแยกน้ำเลี้ยงลูกตาออกในสภาพแช่แข็ง โดยแยกตัวอย่างออกเป็น 2 ชุด ๆ ละ 35 ลูกตา เพื่อนำน้ำเลี้ยงที่แยกได้ไปสกัดกรดไฮยาลูโรนิก สำหรับการหาน้ำหนักของน้ำเลี้ยง ใช้ค่าเฉลี่ยจากลูกตาปลานิลจำนวน 40 ลูก วิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากสารสกัดด้วยวิธีการบาชิลและวิเคราะห์สมบัติบางประการของกรดไฮยาลูโรนิกเทียบกับสารมาตรฐาน

จากตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลที่ผ่านการเก็บแช่แข็งเป็นเวลา 0, 2 และ 4 เดือน จะเห็นว่าระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างโดยการแช่แข็งมีผลต่อปริมาณน้ำเลี้ยงจากลูกตา โดยระยะเวลาการแช่แข็งที่เพิ่มขึ้น น้ำเลี้ยงจากลูกตาปลานิลจะมีปริมาณลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสด้วยวิธีการแช่แข็งแบบช้า ทำให้ได้ผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ ภายในเซลล์และในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Makri, 2009) จึงอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มน้ำเลี้ยงลูกตา ทำให้เกิดการสูญเสียมวลสารที่อยู่ภายในไปบางส่วน นอกจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพแล้วยังอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสาเหตุอื่น เช่น ปฏิกริยาของเอนไซม์ และปฏิกริยาเคมีของสารที่ประกอบอยู่ในน้ำเลี้ยงลูกตาปลา จากการสังเกตลูกตาปลาที่เก็บแช่แข็งพบการหดเหี่ยวของลูกตา และลักษณะตาขาวมีสีเปลี่ยนไปจากเดิม (ไม่ได้แสดงภาพประกอบ) ซึ่งสาเหตุข้างต้นอาจจะกระทบต่อปริมาณและสมบัติบางประการของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยลูกตาและน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 0, 2 และ 4 เดือน

ระยะเวลาการแช่แข็ง	น้ำหนักเฉลี่ย (มิลลิกรัม) ¹	
	ลูกตาปลานิล	น้ำเลี้ยงลูกตาปลานิล
0 เดือน	446.6 ^a ± 0.48	679.9 ^a ± 0.17
2 เดือน	386.2 ^b ± 0.66	590.9 ^b ± 0.15
4 เดือน	307.6 ^c ± 0.33	464.4 ^c ± 0.12

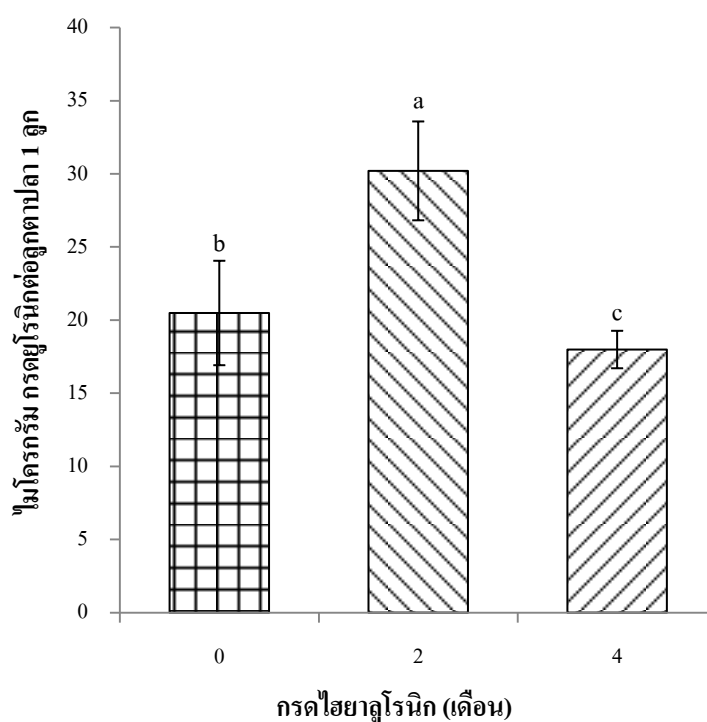
หมายเหตุ ¹ ค่าเฉลี่ยคำนวณจากลูกตาปลานิลจำนวน 40 ลูก (Mean ± SD)

ตัวอักษร (a, b, c) ที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ทางสถิติ

3.1 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากการแช่แข็งในเวลาต่างกัน

การเก็บรักษาลูกตาปลานิลแช่แข็งเป็นเวลา 2 และ 4 เดือน เพื่อศึกษาผลกระทบต่อปริมาณและสมบัติบางประการของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ พบว่าระยะเวลาในการเก็บแช่แข็ง มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากภาพที่ 14 ลูกตาปลาที่แช่แข็งเป็นเวลา 2 เดือน จะมีปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงที่สุดซึ่งเท่ากับ 30.21 ± 3.38 ไมโครกรัม กรดยูโรนิกต่อลูกตาปลานิล 1 ลูก เนื่องจากอาจเกิดการระเหิดของน้ำจากผลึกน้ำแข็งในน้ำเลี้ยงลูกตาทำให้สารละลายกรดไฮยาลูโรนิกในลูกตาปลานิลมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ในขณะที่การแช่แข็งนาน 4 เดือน ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกลดลงเหลือเท่ากับ 18.40 ± 1.28 ไมโครกรัม กรดยูโรนิกต่อลูกตาปลานิล 1 ลูก การเก็บแช่แข็งเป็นเวลานานขึ้น ทำให้ลูกตาปลาแตกต่างจากลูกตาปลาสดมากขึ้น เกิดการระเหิดของผลึกน้ำแข็งปริมาณน้ำเลี้ยงในลูกตาจึงลดลง (ดังตารางที่ 7) และมีการหายไปขององค์ประกอบบางอย่างในน้ำเลี้ยงลูกตาเนื่องจากการlixationของเนื้อเยื่อและเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น ออกซิเดชัน การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน รวมถึงปฏิกิริยาเคมีอื่น ซึ่งอาจกระทบต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในลูกตา ดังนั้นการแช่แข็งเป็นระยะเวลานานเกินไปจะไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาลูกตาปลาเพื่อนำมาสกัดกรดไฮยาลูโรนิก อย่างไรก็ดี อุณหภูมิขณะเก็บรักษาหากเกิดความแปรปรวนมากจะทำให้คุณภาพวัตถุดิบเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว



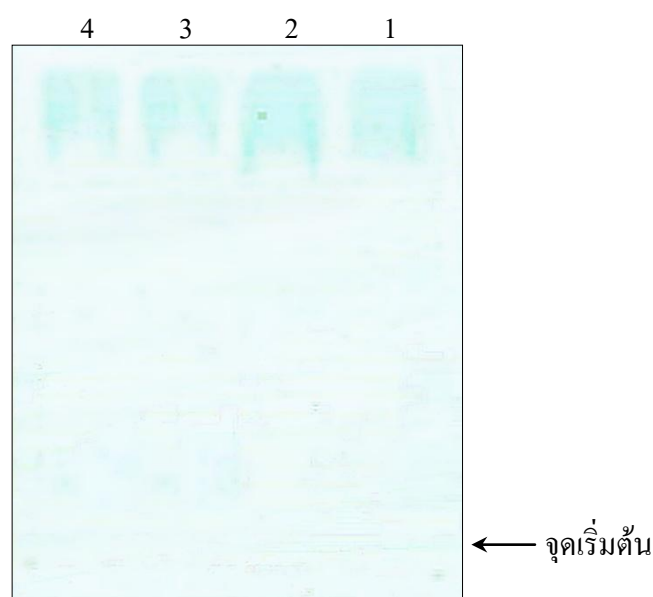
ภาพที่ 14 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาที่เก็บแช่แข็ง (-20 °C)
เป็นเวลา 0, 2, 4 เดือน

หมายเหตุ ตัวอักษร (a, b) ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทางสถิติ

3.2 การศึกษาสมบัติและการบ่งชี้เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก

3.2.1 การวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยเซลล์โลสแอชีเทดอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำตัวอย่างกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากตาปลาที่แช่แข็ง 0, 2 และ 4 เดือน มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลล์โลสแอชีเทด โดยเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลาสดและกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (Sigma Aldrich) ผลดังแสดงในภาพที่ 15

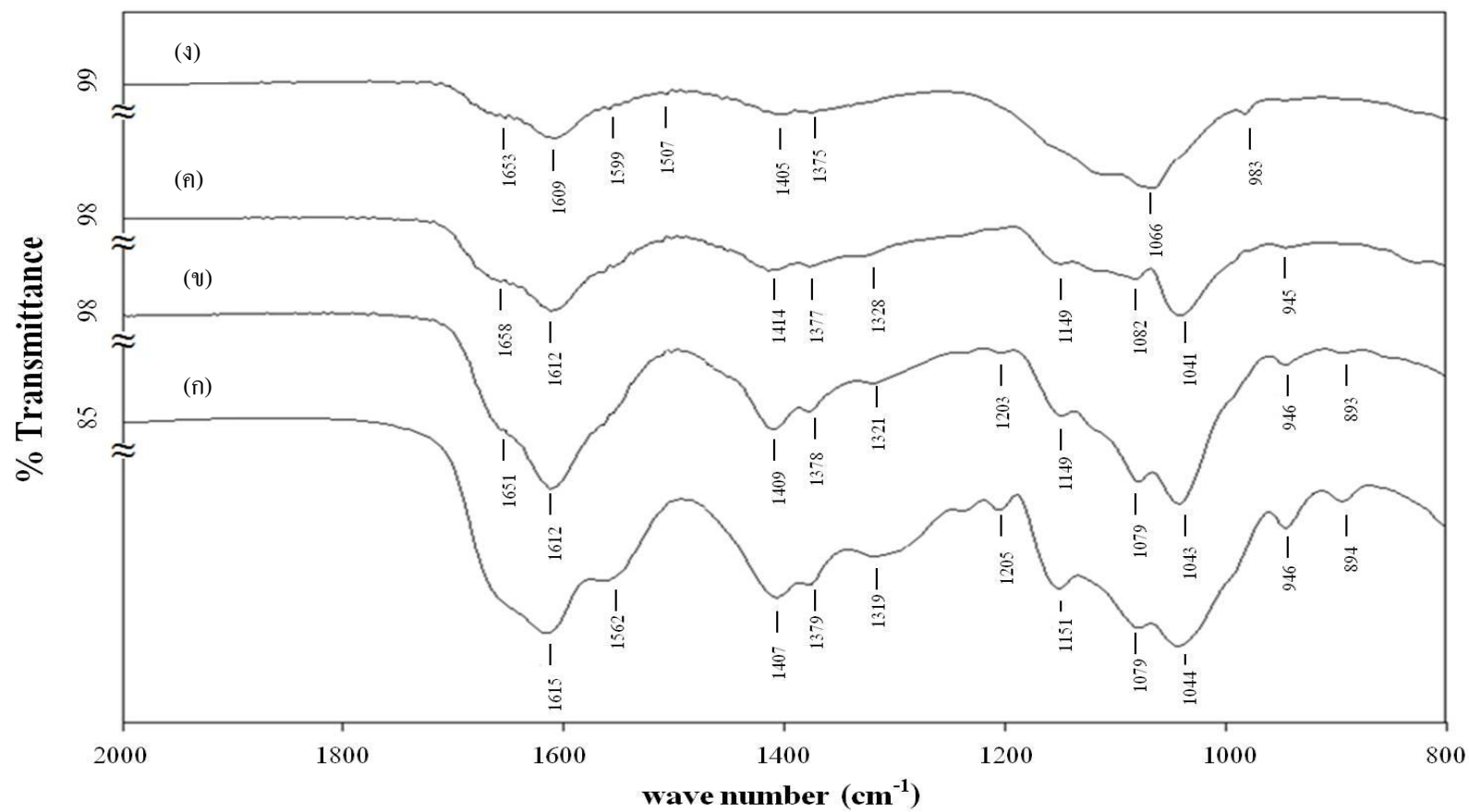


ภาพที่ 15 การเคลื่อนที่ของกรดไฮyalูโรนิกบนแผ่นเซลลูโลสแอซีเทต 1 = กรดไฮyalูโรนิกมาตรฐาน 2 = กรดไฮyalูโรนิกจากลูกตาปลานิลสด 3 = กรดไฮyalูโรนิกจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 2 เดือนและ 4 = กรดไฮyalูโรนิกจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 4 เดือน

ผลการวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอซีเทตของกรดไฮyalูโรนิกสกัดจากลูกตาปลานิลแช่แข็งเป็นเวลา 2 และ 4 เดือนเทียบกับกรดไฮyalูโรนิกจากลูกตาปลานิลสดและกรดไฮyalูโรนิกมาตรฐาน จะเห็นว่ากรดไฮyalูโรนิกจากการแช่แข็งลูกตา 0, 2 และ 4 เดือน มีแถบการเคลื่อนที่บนแผ่นเซลลูโลสแอซีเทตในตำแหน่งเดียวกับกรดไฮyalูโรนิกมาตรฐานที่จุดเริ่มต้นเดียวกัน จึงยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้นั้น คือ กรดไฮyalูโรนิก (Mizuno *et al.*, 1990; Amagai *et al.*, 2009) ดังนั้นการเก็บลูกตาปลานิลด้วยวิธีการแช่แข็งยังคงนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดกรดไฮyalูโรนิกได้

3.2.2 การวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี

ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้โดยใช้วิธีฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี ด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance (ATR) เทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (สกัดจากหงอนไก่, Sigma-Aldrich) ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่ารูปแบบสเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากตัวอย่างสดและตัวอย่างแช่แข็งเป็นเวลา 2 และ 4 เดือนมีลักษณะใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน โดยหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญสรุปดังตารางที่ 8 กล่าวคือกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐานมีพีคที่ เลขคลื่น 1615 cm^{-1} ซึ่งบ่งชี้หมู่ฟังก์ชันของ amide II แต่ไม่พบหมู่ฟังก์ชัน carboxyl amide I เนื่องจากสารมาตรฐานเป็นเกลือของกรดไฮยาลูโรนิก ส่วนตัวอย่างที่สกัดจากลูกตปลาสดและลูกตปลาที่เก็บแช่แข็งนาน 0,2 และ 4 เดือนพบพีคของ carboxyl amide I ที่ เลขคลื่น $1651 - 1653\text{ cm}^{-1}$ และพีคของ amide II ที่ เลขคลื่น $1609 - 1612\text{ cm}^{-1}$ ไม่พบพีคของ C-O-C (O-bridge) และ C-OH group ในตัวอย่างลูกตปลาแช่แข็ง 4 เดือนซึ่งพบในตัวอย่างที่สกัดได้จากตปลาสด และลูกตปลาแช่แข็ง 2 เดือนจากการศึกษาหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกบ่งชี้ว่าการเก็บรักษาวัตถุดิบตปลาแช่แข็งเป็นเวลานานมีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสมบัติทางหน้าที่ของกรดไฮยาลูโรนิก หรือไม่ เพียงใด เป็นคำตอบที่จะต้องศึกษาในโอกาสต่อไป



ภาพที่ 16 สเปกตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก (ก) กรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน (ข) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลสด (ค) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 2 เดือนและ (ง) กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 4 เดือน

ตารางที่ 8 หมู่ฟังก์ชันของกรดไฮยาโลโรนิกที่สกัดจากลูกตาปลานิลแช่แข็ง 0, 2 และ 4 เดือนเทียบกับกรดไฮยาโลโรนิกมาตรฐาน

หมู่ฟังก์ชัน	เลขคลื่น (cm ⁻¹)			
	สารมาตรฐาน (Sigma-Aldrich)	ตาปลานิลแช่แข็ง (ระยะเวลา, เดือน)		
		0	2	4
CONH- carboxyl amide I	-	1651	1654	1653
Amide II	1615	1612	1612	1609
C-O group (acid)	1407	1409	1414	1405
CH ₂ , CH ₃	1379	1378	1377	1375
C-O-C (O-bridge)	1151	1149	1149	-
C-O-C (ring mode)	1079	1079	1082	1066
C-OH group	1044	1043	1041	-
O-H deformation	946	946	945	983

หมายเหตุ การระบุหมู่ฟังก์ชันและ เลขคลื่น อ้างอิงจาก Alkrad *et al.*, (2003);

Bezakowa *et al.*, (2008); Choi *et al.*, (2010)

สรุป

ปลานิลและปลาเทโพที่เลี้ยงใช้ในการศึกษามีขนาดประมาณ 1 กิโลกรัมและ 3 กิโลกรัม ต่อตัว โดยลูกตาปลานิลสดและปลาเทโพที่มีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละ 0.88 และ 0.78 ของ น้ำหนักตัวปลา ส่วนน้ำเลี้ยงลูกตาปลานิลสดและปลาเทโพที่มีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละ 0.13 และ 0.14 ของน้ำหนักตัวปลา ตามลำดับ น้ำเลี้ยงลูกตาปลาที่มีปริมาณน้ำมากกว่าร้อยละ 90 (w/w) รองลงมาคือโปรตีน ไขมัน เกลือและคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ ของเหลวในลูกตามีองค์ประกอบของ กรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีมูลค่าสูงในทางการค้า

กรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลสดและปลาเทโพที่มีปริมาณ 20.49 ± 3.50 และ 25.49 ± 7.66 ไมโครกรัมกรดยูโรนิกต่อลูกตาปลานิลและปลาเทโพ 1 ลูก ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์สมบัติด้วยเซลลูโลสแอซิติทและบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้จากตาปลา ทั้งสองชนิดเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน พบว่าสารสกัดที่ได้คือกรดไฮยาลูโรนิก

การเก็บแช่แข็งลูกตาปลานิลเป็นเวลา 2 และ 4 เดือนเพื่อศึกษาผลกระทบต่อปริมาณและ สมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก โดยเทียบกับกรดไฮยาลูโรนิกจากลูกตาปลานิลสด พบว่าการเก็บแช่ เยือกตัวอย่างเป็นเวลา 2 เดือน สกัดกรดไฮยาลูโรนิกได้สูงที่สุดเท่ากับ 30.21 ± 3.38 ไมโครกรัมกรด ยูโรนิกต่อลูกตาปลานิล 1 ลูก และที่ 4 เดือน สกัดสารได้น้อยลงและมีปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 18.40 ± 1.28 ไมโครกรัมกรดยูโรนิกต่อลูกตาปลานิล 1 ลูก เมื่อวิเคราะห์สมบัติด้วยเซลลูโลสแอซิติทและ บ่งชี้เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ พบว่าสารสกัดมีลักษณะการเคลื่อนที่บนแผ่น เซลลูโลส-แอซิติทในตำแหน่งเดียวกับกรดไฮยาลูโรนิกมาตรฐาน ถึงแม้รูปแบบ FT-IR สเปกตรัม สารสกัดจากตาปลานิลแช่แข็ง 4 เดือนจะไม่ปรากฏหมู่ฟังก์ชัน C-O-C (O-bridge) ที่ เลขคลื่น 1149 cm^{-1} และ C-OH group ที่ 1044 cm^{-1} ในสารสกัดจากลูกตาปลาที่เก็บแช่แข็ง 4 เดือน แสดงให้เห็นว่า การเก็บแช่แข็งส่งผลบางประการต่อโครงสร้างในโมเลกุลกรดไฮยาลูโรนิก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. 2554. ปลาทูน่ากระป๋อง (HS ๑๖๐๔๑๔๐๑๐๐).

แหล่งที่มา:

http://www.dft.go.th/Portals/0/ContentManagement/Document_Mod785/ปลาทูน่ากระป๋อง_ไตรมาส2-54@25541128-1436112211.pdf, 16 ธันวาคม 2555

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2555. รายงานสถานการณ์สินค้าปลานิลและผลิตภัณฑ์ในไตรมาสแรกปี

พ.ศ.2555. แหล่งที่มา:

<http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic>, 21 ธันวาคม 2555

นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์ และ คณิดา ตั้งคณานุรักษ์. 2547. สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์.

พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 555น.

ประสิทธิ์ สิทธิไธรวงษ์. 2011. อวัยวะรับรู้รส. แหล่งที่มา:

<http://203.158.253.5/wbi/Agriculture/مينวิทยา/unit1101.html#pict1102>, 12 มีนาคม 2554.

พิมพ์พร ศรีสันติแสง. 2556. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากหางอนไก่.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เย็นหทัย เน้นหนา. 2549. สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 530น.

รัชณี ดันตะพานิชกุล. 2550. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 3 (Organic Chemistry Laboratory III)

CM 328. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์รามคำแหง, กรุงเทพฯ. 201น.

วิชัย รัตระกูล, โกศลย์ คูตำราญ, พิเชษฐ์ วิริยะจิตรรา, สุรชัย นิมจิรวัดน์ และ อภิชาติ สุขตำราญ.

2526. การประยุกต์สเปกโตรสโคปีในเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์หน้าอักษร
การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 298น.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพัทลุง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2012. **ปลานิล**. แหล่งที่มา:

[http://www.fisheries.go.th/if-phattalung/web2/index.php?option=com_content&view=](http://www.fisheries.go.th/if-phattalung/web2/index.php?option=com_content&view=article&id=61:2010-12-27-03-59-02&catid=4:2009-07-14-06-20-29&Itemid=9)
[article&id=61:2010-12-27-03-59-02&catid=4:2009-07-14-06-20-29&Itemid=9,](http://www.fisheries.go.th/if-phattalung/web2/index.php?option=com_content&view=article&id=61:2010-12-27-03-59-02&catid=4:2009-07-14-06-20-29&Itemid=9)
15 กุมภาพันธ์ 2555.

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล กรมประมง. 2555. **ปลาทูน่า**. แหล่งที่มา:

<http://www.fisheries.go.th/marine/deepsea/images/ปลาทูน่า>, 2 กรกฎาคม 2555.

สุกัญญา สุนทรส. 2549. **อิเล็กทรอนิกส์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 193น.

อรทัย ลีลาพจนานพร. 2549. **Fourier Transform Infrared Spectrometer**. แหล่งที่มา:

http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/lpd_10_2546_ft-ir.pdf, 19 กุมภาพันธ์ 2555.

อุเทน เรืองนพคุณ. 2547. **การเลี้ยงปลานิล**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์อักษรสยามการพิมพ์,
กรุงเทพฯ. 95น.

Albert, B. 2002. **Molecular Biology of The Cell**. 4th. Garland Science, New York.

Alkrad, J. A., Y. Mrestani, D. stroehl, S. Wartewig and R. Neubert. 2003. Characterization of
enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis
spectroscopies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 31: 545-550

- Amagai, I., Y. Tashiro and H. Ogawa. 2009. Improvement of the extraction procedure for hyaluronan from fish eyeball and the molecular characterization. **Fish science**. 75: 805-810.
- Amstrong, D. C., M. J. Cooney and M. R. John. 1997. Growth and amino acid requirements of hyaluronic acid producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 47: 309-312
- AOAC. 1999. **Official Method of Analysis**. 17 ed. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Bailey, A.J. and N.D. Light. 1989. **Connective Tissue in Meat and Meat Products**. Elsevier Applied Science, London.
- Baino, F. 2010. The Use of Polymers in the Treatment of Retinal Detachment: Current Trends and Future Perspectives. **Polymers**. 2: 286-322.
- Beaty, N. B. and R. J. Mello. 1987. Extracellular mammalian polysaccharides: glycosaminoglycans and proteoglycans. **Journal of Chromatography**. 418: 187-222.
- Ben-gigirey, B., J. M. V. B. D. Sousa, T. G. Villa and J. Barros-velazquez. 1999. Chemical Changes and Visual Appearance of Albacore Tuna as Related to Frozen Storage. **Journal of Food Science**. 64: 20-24.
- Bezakowa, Z., M. Hermannova, E. Drimalova, A. Malovikova, A. Ebringerova and V. Velebny. 2008. Effect of microwave irradiation on the molecular and structural properties of hyaluronan. **Carbohydrate Polymers**. 73:640-646

- Bitter, T. and H. Muir. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**. 4: 330-334.
- Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1987. **Carbohydrate Analysis: a practical approach**. Oxford, IRL Press.
- Choi, J. I., J. K. Kim, D. K. Kweon and J. W. Lee. 2010. Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment. **Carbohydrate Polymers**. 79: 1080-1085.
- FAO. 1986. Manual of Food Quality Control 7. Food Analysis: General Technique, Additive, Contaminants and Composition. Food and Agricultural Organization of the United Nation, Rome.
- Gartner, L. P. and J. L. Hiatt. 2001. **Color Textbook of Histology**. 2nd ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Gilli, R., M. Kacurakova, M. Mathlouti, L. Navarini and S. Paoletti. 1994. FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. **Carbohydrate Research**. 263: 315–326.
- Hyalogic. 2011. **Hyaluronic Acid: History, Chemical Structure, and its Benefits for the Body**.
Available Source: http://www.hyalogic.com/main/about_hyaluronic_acid, 1 March 2011
- Jeffrey, D. R. and I. Watt. 2003. Imaging hyaline cartilage. **The British Journal of Radiology**. 76: 777-787.

- Kiernan, J.A. 1999. **Histological & Histochemical Method**. 3rd ed. Butterworth Heineman, Oxford.
- Kim, J. K., S. Srinivasan, J. H. Kim, J. Choi, H. J. Park, M. W. Byun and J. W. Lee. 2008. Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid. **Food Chemistry**. 109: 763-770.
- Kim, S. K., Y. J. Jeon, H. G. Byeun, Y. T. Kim and C. K. Lee. 1997. Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. **Fisheries Science**. 63: 421-427.
- Kosakai, M. and Z. Yosizawa. 1979. A partial modification of the carbazole method of bitter and muir for quantitation of hexuronic acids. **Analytical Biochemistry**. 93: 295-298.
- Lago, G., L. Oruña, J. A. Cremata, C. Pérez, G. Coto, E. Lauzan and J. F. Kennedy. 2005. Isolation, purification and characterization oh hyaluronan from human umbilical cord residues. **Carbohydrate Polymers**. 62: 321-326.
- Lee J. Y., and A.P. Spicer. 2000. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. **Current Opinion in Cell Biology**. 12: 581-586.
- Lindhal, U. 1969. Comment on the use cetylpyridinium choride in the isolation in connective-tissue proteoglycan. **Biochemical Journal**. 113: 569-570.
- Lodish, H. 2001. **Molecular C ell Biology**. 3rd ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Loewy, A. G. 1991. **Cell Structure and Function**. 3rd ed. Saulders College Publishing, Philadelphia.

- Makri, M. 2009. Biochemical and textural properties of frozen stored (-22°C) gilthead seabream (*Sparus aurata*) fillets. **African Journal of Biotechnology**. 8(7): 1287-1299.
- Mizuno, H., N. Iso, T. Saito, H. Ogawa, H. Sawairi and M. Saito. 1990. Characterization of Hyaluronic Acid of Yellowfin Tuna Eyeball. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 57: 517-519.
- Morita, H., and M. Fujii. 1991. Process for preparing hyaluronic acid. United state patent no.5071751. 10 December 1991.
- Nakano, T., N. Ikawa and L. Ozimek. 2002. Galactosaminoglycan Composition in Chicken Eggshell. **Poultry Scienc**. 81:709-714
- Nakano, T., K. Nakano and J. S. Sim. 1994. A simple rapid method to estimate hyaluronic acid concentrations in rooster comb and wattle using cellulose acetate electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42: 2766-2768
- Necas, J., L. Bartosikova, P. Brauner and J. Kolar. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Veterinarni Medicina**. 53(8): 397-411.
- Prasertsan, P., P. Wuttijumnong, P. Sopanodora and W. Choorit. 1988. Seafood processing industries within Songkhla-Hatyai region : The survey of basic data emphasis on waste. Songkhlanakarin. **Journal of Science and Technology**. 20: 17-21.
- Rosa, C.S., J. Rotta, P.L.M. Barreto and L.H. Beirao. 2007. Extraction, quantification and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest. **Alimentos e Nutricao Araraquara**. 18(3): 237-240.

- Sahu, S. and W. Lynn. 1978. Hyaluronic acid in the pulmonary secretions of patients with asthma. **Biochemical Journal.** 173: 565-568.
- Scott, J.E. 1962. [11] Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts, pp. 38-44. In Whistler, R. L. and J. N. BeMiller, eds. **Methods in Carbohydrate Chemistry vol.1.** Academic Press Inc., New York.
- Scott, J. E. and Heatley, F. 1999. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ^{13}C NMR study. **Proceedings National Academy of Science of USA.** 96: 4850–4855.
- Servaty, R., J. Schiller, H. Binder and K. Arnold. 2001. Hydration of polymeric component of cartilage an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules.** 28: 121-127.
- Sivaraman, T., T. K. S. Kumar, G. Jayaraman and C. Yu. 1997. The mechanism of 2, 2, 2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. **Journal of Protein Chemistry.** 16: 291-297.
- Swann, D.A. 1968. Studies on hyaluronic acid: 1. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. **Biochemical Biophysical Acta.** 156: 17-30.
- Swindle, K. E. and N. Ravi. 2007. Recent advances in polymeric vitreous substitutes. **Expert Review of Ophthalmology.** 2: 255-265.

- Szewczyk, B. 1983. A sensitive staining method for detecting acidic polysaccharides in cellulose acetate and agarose gels. **Analytical Biochemistry**. 130: 60-64
- Tlapak-Simmons, V. L., B. A. Baggenstoss, K. Kumari, C. Heldermon and P. H. Weigel. 1999. Kinetic Characterization of the Recombinant Hyaluronan Synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. **The Journal of Biological Chemistry**. 274: 4246-4253
- Tomihata, K. and Y. Ikada. 1997. Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. **Biomaterials**. 18: 189-195
- Venkatesan, N., T. Ebihara, P.J. Roughley and M.S. Ludwig. 2000. Alterations in large and small proteoglycans in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 161: 2066-2073.
- Volpi, N. and F. Maccari. 2006. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. **Journal of Chromatography B**. 834: 1-13.
- Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi. 1997. Hyaluronan synthase. **Journal of biological Chemistry**. 272: 13997-14000.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (AOAC, 1999)

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 อบภาระสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นจนเย็น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

1.1.2 กระทำเช่นข้อ 1.1.1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 1 – 3 มิลลิกรัม

1.1.3 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ประมาณ 1 – 2 กรัมใส่ภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

1.1.4 นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4 – 5 ชั่วโมง

1.1.5 นำออกจากตู้อบลมร้อนใส่โถดูดความชื้นจนเย็น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก

1.1.6 อบตัวอย่างซ้ำที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จนได้น้ำหนักไม่เกิน 1 – 3 มิลลิกรัม

1.1.7 คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

2.1 วิธีวิเคราะห์

2.1.1 เผาด้วยกระบี่เบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง รอจนอุณหภูมิลดลงแล้วนำออกจากเตาเผา นำไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

2.1.2 เฝ้าซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาทีและกระทำเช่นข้อ 2.1.1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.1.3 ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 – 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้วันจนหมดควันแล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเตาเผาไว้ที่ 600 องศาเซลเซียสและกระทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2 และ 2.1.3

2.1.4 คำนวณหาปริมาณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (วิธี Kjeldhal)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารผสมระหว่างคอปเปอร์(II)ซัลเฟต ($\text{Cu(II)SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) อัตราส่วน 1:10

1.1.2 กรดซัลฟิวริก (conc. H_2SO_4)

1.1.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น ร้อยละ 40

1.1.4 กรดบอร์ริกที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 4

1.1.5 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

1.1.6 อินดิเคเตอร์ เป็นสารผสมระหว่าง เมธิลเรดและโบร โมครีซอลกรีน

1.2 การ standardize สารละลายกรดซัลฟิวริกมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล

1.2.1 ชั่งแอนไฮดรัส โซเดียมคาร์บอเนตประมาณ 5 กรัม ใส่ในโกรงบดให้ละเอียด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงแล้วทิ้งให้เย็นในโถสุญญากาศ

1.2.2 ชั่งแอนไฮดรัส โซเดียมคาร์บอเนตที่อบมาแล้ว 0.13 กรัมอย่างละเอียดใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด แล้วไทเทรตกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู จดเป็นปริมาตร A_1

1.2.3 นำสารละลายไปต้มจนเดือด (ประมาณ 2 – 3 นาที) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วไทเทรตกับกรดซัลฟิวริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้ง จดเป็นปริมาตร A_2 แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟิวริก จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (โมลาร์)} = \frac{\text{น้ำหนักโซเดียมคาร์บอเนต(g)} \times 2000}{\text{น้ำหนักโมลกุลของโซเดียมคาร์บอเนต} \times (A_1 + A_2)}$$

1.3 วิธีวิเคราะห์

1.3.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5 – 1 กรัม ลงในหลอดย่อยโปรตีน

1.3.2 ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา คอปเปอร์(II)ซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมซัลเฟต 9.5 กรัม และเติมกรดซัลฟิวริก 20 มิลลิลิตร

1.3.3 นำไปย่อยบนเตาไฟฟ้าที่ต่อกับชุดจกจับไอกรด ให้ความร้อนจนสารละลายตัวอย่างไม่มีควันและสารละลายใส ทิ้งให้เย็น

1.3.4 นำเข้าเครื่องกลั่น เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 ปริมาณ 90 มิลลิลิตร กลั่นประมาณ 3 นาที

1.3.5 นำขวดรูปชมพู่ที่เติมกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาณ 25 มิลลิลิตรและหยดอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด รองรับสารตัวอย่างจากการกลั่น

1.3.6 ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทา จดปริมาตรแล้วคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{(A - B) \times N \times 14.007 \times 100}{W}$$

$$\% \text{ โปรตีน (น้ำหนักเปียก)} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25$$

A = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (มิลลิลิตร)

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (soctex)

2.1 วิธีวิเคราะห์

2.1.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แห้งบนกระดาษกรองเบอร์ 1 (ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน) แล้วใส่ลง thimble จากนั้นใส่ใน thimble holder แล้วนำเข้าเครื่องสกัด

2.1.2 เติมน้ำมันละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ใส่ถ้วยสกัดไขมันที่ผ่านการอบแห้ง ประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่เครื่องสกัดไขมัน

2.1.3 สกัดไขมันเป็นเวลา 45 นาทีแล้วทำการ rinsing 10 นาที เมื่อครบตามเวลาสกัด ทำการ evaporation เพื่อกำจัดตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์

2.1.4 นำถ้วยสกัดไขมันอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.1.5 ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.1.6 คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมันร้อยละโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิธีคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต จากการหักลบออกจาก 100 เปอร์เซนต์

$$\% \text{ คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\% \text{ ความชื้น} + \% \text{ เถ้า} + \% \text{ ไขมัน} + \% \text{ โปรตีน})$$

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีคาร์บาโซล

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาโลโรนิกด้วยวิธีคาร์บาโซล (Bitter and Muir, 1962)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายโซเดียมเททระบอเรต 0.025 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น เตรียมโดยชั่งโซเดียมเททระบอเรต 0.9534 กรัม ละลายในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ที่ไว้ข้ามคืนเพื่อให้โซเดียมเททระบอเรตละลายอย่างสมบูรณ์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายคาร์บาโซลความเข้มข้นร้อยละ 0.125 เตรียมโดยชั่งคาร์บาโซล 0.125 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์และปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 เติมสารละลายโซเดียมเททระบอเรต 0.025 โมลาร์ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองและทำให้เย็นโดยใช้น้ำแข็ง เติมสารละลายมาตรฐานหรือสารที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตรลงบนผิวของสารละลายอย่างระมัดระวัง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในอ่างน้ำแข็งแล้วนำออกมา ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วเพื่อให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง เมื่อเย็นลงจึงเติมสารละลายคาร์บาโซล 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้า (ไม่ให้ติดข้างหลอด) นำไปผสมให้เข้ากันอีกครั้ง และให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ ดี-กลูคิวโรโนแลกโตน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีการข้างต้น แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก

1. อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอซีเตต (Cellulose acetate electrophoresis)

(Nakano *et al.*, 1994)

1. สารเคมี

1.1 บัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 (ไพรีดีน : กรดแอซีติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 9 : 115 v/v/v)

1.2 สารละลายกรดแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

1.3 สารละลายกรดแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.02

1.4 สารละลายอัลเซียน บลู 8 จีเอ็กซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (เตรียมโดยใช้สารละลายในข้อ 1.3)

1.5 สารละลายมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกความเข้มข้น 1000 ppm (Sigma-Aldrich)

2. วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสแอซีเตต ทำโดยดัดแปลงวิธีการจาก Nakano *et al.* (1994) เริ่มจากการแช่แผ่นเซลลูโลสแอซีเตต (Titan III, 60 x 76 mm, Helena Laboratories) ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 อย่างน้อย 30 นาที และรินบัฟเฟอร์ลงในแชมเบอร์ จากนั้นบรรจุตัวอย่าง และสารมาตรฐานลงในช่องบรรจุสารละลาย กดแอปพลิเคชันลงบนช่องบรรจุสาร และนำมากดบนแผ่นเซลลูโลสแอซีเตต แล้วนำแผ่นตัวกลางมาวางพาดในแชมเบอร์ เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 150 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที นำแผ่นเซลลูโลสแอซีเตต มาย้อมสีด้วยสารละลายอัลเซียน บลู 8 จีเอ็กซ์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในกรดแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 เป็นเวลา 5 นาที ล้างสีด้วยกรดแอซีติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 2 นาที และอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดกรดไฮyaluronิกเทียบกับกรดไฮyaluronิกมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1000 ppm ด้วยวิธีฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี ด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance (ATR) ในช่วง เลขคลื่น ระหว่าง $2000-800\text{ cm}^{-1}$ โดยหยดสารละลายกรดไฮyaluronิกมาตรฐานลงบนแผ่นแบเรียมฟลูออไรด์ (BaF_2) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วเป่าแห้งด้วยเครื่องเป่าแห้งชนิดลงเย็น ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากพอ แล้วนำไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่องฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี เพื่อใช้เปรียบเทียบกับกรดไฮyaluronิกที่สกัดได้ จากนั้นนำสารสกัดกรดไฮyaluronิกมาวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันตามวิธีการเช่นเดียวกับกรดไฮyaluronิกมาตรฐาน แล้วนำสเปกตรัมที่ได้เทียบกับกรดสเปกตรัมกรดไฮyaluronิกมาตรฐานเพื่อบ่งชี้หมู่ฟังก์ชันของกรดไฮyaluronิกที่สกัดได้