

บทคัดย่อ

ปลาฉลาม โรนัน และ ปลากระเบน เป็นปลากระดูกอ่อนซึ่งปัจจุบันมีการนำเนื้อไปใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม ส่วนกระดูกอ่อนเหลือทิ้งยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ ครีบลาม ซึ่งก้านครีบใช้ทำชุปหูลาม จะเหลือกระดูกอ่อนทิ้งเช่นกัน สำหรับจระเข้เป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำที่มีการฆ่าชำแหละนำหนังและเนื้อไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นกระดูกอ่อนส่วนต่างๆ เช่น หลอดคอ ซีโครงอ่อน ต้นอก และ กระดูกอ่อนจากโคนลิ้นจึงทิ้งไปโดยไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่า จากการที่กระดูกอ่อนปนเปื้อนจากฉลามมีข้อดีในการบำบัดโรคข้ออักเสบ ซึ่งเป็นผลจากสารคอนดรอยติน ซัลเฟต ที่เป็นองค์ประกอบในกระดูกอ่อน งานวิจัยนี้จึงศึกษา วิธีการสกัดสารคอนดรอยติน ซัลเฟต จากกระดูกอ่อนของปลาโรนัน ปลากระเบน จระเข้ และ กระดูกอ่อนครีบลาม ซึ่งหาได้จากตลาดสดหรือเป็นของเหลือจากโรงงาน พบว่า วิธีสกัดที่ให้ผลดีคือ ใช้เอนไซม์ปาเปน ย่อยกระดูกอ่อนปน ที่ 65 °ซ pH 7.0 นาน 48 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนจากของเหลวโดยใช้ TCA (trichloroacetic acid) แยกเอาไกลโคซอมิโนไกลแคน (GAGs) โดยตกตะกอนด้วย cetylpyridinium chloride 1.5 กรัม ต่อกระดูกอ่อน 10 กรัม กำจัด hyaluronic acid และสารประกอบ non sulfate ที่ปนอยู่โดยใช้สารละลาย NaCl จากนั้นจึงใช้ potassium thiocyanate 40 มิลลิลิตร ต่อสารละลายที่แยกได้ 100 มิลลิลิตร เพื่อแยก cetylpyridinium chloride ออกไป จะได้คอนดรอยตินซัลเฟตละลายในส่วนใส นำไปทำแห้งในตู้อบ 60°ซ จนแห้งเป็นแผ่นไม่ติดภาชนะ การศึกษาวิธีวิเคราะห์คอนดรอยติน ซัลเฟตในสารสกัดที่ได้จากกระดูกอ่อน พบว่าวิธี sulfate GAGs assay หรือ spectrophotometry โดยใช้ dimethylmethylene blue (DMMB) ทำปฏิกิริยากับหมู่ซัลเฟตของสารคอนดรอยติน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 525 nm เป็นวิธีที่สะดวกในการวิเคราะห์ปริมาณสาร การระบุชนิดของคอนดรอยติน ซัลเฟต ใช้การวิเคราะห์ด้วย FTIR spectroscopy วิธี KBr pellet technique ซึ่งทำได้ง่าย รวดเร็วและให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับวิธี HPLC จากผลการวิเคราะห์พบว่ากระดูกอ่อนกระเบน จระเข้ส่วนซีโครงอ่อน หลอดคอ ต้นอก และ โคนลิ้น ประกอบด้วยคอนดรอยติน-4-ซัลเฟต เป็นส่วนใหญ่และพบคอนดรอยติน-6-ซัลเฟตเล็กน้อย โดยพบคอนดรอยติน ซัลเฟตรวม ในปริมาณ 5.17, 5.56, 9.50, 11.55 และ 14.84 กรัม ต่อกระดูกอ่อนแห้ง 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง)ตามลำดับ ส่วนกระดูกอ่อนครีบลาม และกระดูกอ่อนโรนัน มี คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต และ คอนดรอยติน-6-ซัลเฟตในสัดส่วนที่สูงกว่ากระดูกอ่อนในกลุ่มแรก โดยพบในปริมาณรวมเท่ากับ 9.4 กรัม ต่อกระดูกอ่อนแห้ง 100 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ดังนั้นจึงนำกระดูกอ่อนจากสัตว์ดังกล่าวมาทำเป็นกระดูกอ่อนปนแห้ง โดยพัฒนากระบวนการผลิต และทำการทดสอบการละลายของกระดูกอ่อนปนแห้งในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก pH 2.0 โดยมี 0.1 % (w/v) เปปซินและควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ นาน 3 ชั่วโมง พบว่ากระดูกอ่อนสด นำมาต้มในน้ำร้อน 90-100 °ซ จนขูดแยก

(3)

เนื่องจากกระดูกได้ง่าย จึงนำมาชุดโดยใช้แรงงานคน ล้างให้สะอาด บดหรือหั่นเป็นชิ้นย่อย อบแห้งที่ 60 °ซ นาน 6 ชั่วโมง จึงนำมาบดต่อใน hammer mill แล้วร่อนแยกเฉพาะผงที่มีขนาดเล็กผ่านตะแกรง 100 mesh จะได้กระดูกอ่อนป่นแห้งที่มีความชื้นประมาณร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก ค่า Aw อยู่ในช่วง 0.175-0.245 ร้อยละการละลายในสารละลายเปปซินอยู่ในช่วงประมาณ 90-98 โดยน้ำหนัก ขึ้นกับชนิดกระดูกอ่อนและแหล่งที่มา ในการทำผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพให้บรรจุกระดูกอ่อนป่นแห้งในแคปซูล ถ้าบรรจุ 500 มก/แคปซูล จะมีคอนครอยติน ซัลเฟต 38.2 มก และ 75 มก ในกระดูกอ่อนครีบลามและโคนลินจะเข้า ตามลำดับ โดยสามารถคำนวณให้มีปริมาณสารคอนครอยติน ซัลเฟตได้ตามต้องการ

ผลการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของกระดูกอ่อนจากสัตว์ข้างต้น โดยใช้ light microscope และ transmission electron microscope พบส่วนประกอบของกระดูกอ่อนคือ chondrocyte คอลลาเจนไฟบริล และ ground substances ในตัวอย่างทั้งหมด ลักษณะโครงสร้างของกระดูกอ่อนได้แก่ ความเรียบ ช่องว่าง ปริมาณ chondrocyte จะต่างกันในตัวสัตว์ต่างชนิด และในกระดูกอ่อนตำแหน่งต่างกัน ส่วนของ ground substances ประกอบด้วย คอนครอยติน ซัลเฟต ซึ่งติดสีชนิดพิเศษคือ alcian blue pH 1.0 พบกระจายอยู่ทั่วไปในกระดูกอ่อน และ ความร้อนในการต้มกระดูกอ่อนในขั้นตอนการทำความสะอาดไม่ได้ทำให้คอนครอยติน ซัลเฟต เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยยังคงติดสี alcian blue pH 1.0 เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านที่กำลังขยายตั้งแต่ 60 K พบ โปรตีโอไกลแคนติดสีย้อม cupromeronic blue เห็นเป็นเส้นฟิลาเมนต์ที่บ่งแสงอิเล็กตรอนในบริเวณต่างๆ ของกระดูกอ่อนทั้งที่ผ่านการต้มและไม่ผ่านการต้ม โดยแต่ละเส้นฟิลาเมนต์คือโมเลกุลของ ไกลโคสอะมิโนไกลแคน และพบ fine collagen fibers มีลักษณะเป็นเส้นใยละเอียด ขนาดของโปรตีโอไกลแคนและ fine collagen fibers ในตัวอย่างกระดูกอ่อนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ผลการศึกษานี้แสดงว่า กระดูกอ่อนของ ครีบลาม โรนัน กระเบน และ ส่วนต่างๆของจระเข้ ทั้งที่ผ่านการต้มและไม่ผ่านการต้ม ใช้เป็นแหล่งของ สารคอนครอยติน ซัลเฟต ได้

(4)

Abstract

Shark and ray are cartilaginous fish serve as raw material in food industry. Their meat is processed for human consumption and cartilage are separated as waste. Crocodile cartilage (trachea, rib, sternum, and hyoid) are also classified as waste from slaughter house. Shark cartilage powder is sold as nutraceutical in some countries. It has been shown to have some curing effect on arthritis due to its claim of chondroitin sulfate content. Therefore, this study was aimed to make a value added product from under-utilized cartilage. The methods for extracting chondroitin sulfate from cartilage of violin shark, ray, shark fin and crocodile were studied. It was found that protein in cartilage could be removed by hydrolysis with papain at 65^o C pH 7.0 for 48 hrs followed by precipitation with TCA. Glycosaminoglycans (GAGs) were precipitated with 1.5 gm cetylpyridinium chloride for each 10 gm of cartilage. Hyaluronic acid and non sulfate compounds were removed by reacting with NaCl solutions. Potassium thiocyanate was added to precipitate cetylpyridinium chloride. The solution was centrifuged and the supernatant containing chondroitin sulfate was evaporated and dried. Chondroitin sulfate was analyzed quantitatively by spectrophotometric method using dimethylmethylene blue (DMMB) as indicator. The FTIR spectroscopy using KBr pellet technique was used to identify the types of chondroitin sulfate. The results were confirmed with HPLC method. The cartilage of ray, crocodile rib, crocodile trachea, crocodile sternum and hyoid consisted mostly of chondroitin-4-sulfate and a small amount of chondroitin-6-sulfate, at 5.17, 5.56, 9.50, 11.55 and 14.84 gm chondroitin sulfate per 100 gm cartilage (dry basis) respectively. Shark cartilage consisted of higher ratio of chondroitin-4-sulfate and chondroitin-6-sulfate total at 9.4 gm chondroitin sulfate per 100 gm cartilage (dry basis). The process was developed for the production of cartilage powder. The powder was tested for solubility in HCl solution pH 2.0 containing 0.1% (w/v) pepsin and incubated at 37^o C for 3 hrs. The study showed that fresh cartilage should be boiled in hot water (90-100^o C) until the unwanted tissue can be removed easily, cleaned cartilage were ground and dried in hot air oven at 60^o C for 6 hrs then powderized in hammer mill and sieved through 100 mesh sieve. The analysis of cartilage powder showed 8% moisture content, Aw of 0.175-0.245, and 90-98 % solubility. The cartilage powder can be packed in capsule and calculated for the specific dose of chondroitin sulfate which can be used as food supplement. A

capsule of 500 mg containing shark fin cartilage or crocodile hyoid cartilage powder will consist of 38.2 and 75 mg chondroitin sulfate respectively.

Observation under light and transmission electron microscopes, revealed all cartilage samples to be composed of chondrocytes, collagen fibrils and ground substances. Different types of animals and different parts of cartilage showed some differences in cartilage microstructure as can be seen from the smoothness of the matrix, number of empty holes in the matrix and number of chondrocytes. Boiling cartilage in hot water during cleaning process did not affect the structure of chondroitin sulfate as the section still showed the blue color under alcian blue pH 1.0 stained. Cupromeronic blue stained proteoglycans of both raw and boiled cartilage, which can be observed under electron microscope at 60 K magnification. Proteoglycans appeared as discrete electron-dense filaments where each filament representing a single GAG molecule. Very fine collagen fibers were also observed with less electron dense structure. The size of proteoglycans filaments and fine collagen fibers were different between cartilage from different sources. The results of this experiment showed that raw and boiled cartilage of studied animals (shark fin, violin shark, ray and crocodile) are good source of chondroitin sulfate.