Published Online: 16 OCT 2026

การศึกษาปริมาณโปรตีนและความเป็นพิษต่อเซลล์คอนโดรไซต์ของสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทย

Protein Content and Cytotoxicity of Spanish and Thai Eggshell Membrane Extracts in Chondrocytes

ราศี จุลศิริ
อีเมล: 6752003275@lamduan.mfu.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
นายแพทย์จรัสพล รินทระ
อีเมล: jarasphol.rin@mfu.ac.th
สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

เยื่อเปลือกไข่ไก่มีองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ โปรตีน คอลลาเจน และไกลโคซามิโนไกลแคน ซึ่งอาจมีศักยภาพด้านสุขภาพข้อต่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมและประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์คอนโดรไซต์ C28/I2 ของสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่จากแหล่งวัตถุดิบสเปนและไทย โดยสกัดด้วย Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid (BCA) assay ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์ประเมินจากลักษณะสัณฐานวิทยาและความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) หลังบ่มร่วมกับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนมีปริมาณโปรตีน 3.30±0.14–3.96±0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่สารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยมีปริมาณ 5.19±0.23–6.36±0.14 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดยการสกัดด้วย 1% SDS ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดในกลุ่มตัวอย่างจากประเทศไทย หลังบ่มร่วมกับสารสกัด เซลล์ยังคงมีรูปร่างและการยึดเกาะใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ไม่พบการหดตัวหรือการหลุดลอกอย่างชัดเจน และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 70 ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ จึงไม่สามารถกำหนดค่า CC_{50} ได้แน่นอน โดยสารสกัดจากแหล่งสเปนมีค่า CC_{50} มากกว่า 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากแหล่งไทยมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปได้ว่า สารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยให้ปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้สูงกว่าสารสกัดจากแหล่งสเปนภายใต้สภาวะการสกัดที่ศึกษา ขณะที่สารสกัดจากทั้งสองแหล่งไม่แสดงความเป็นพิษอย่างเด่นชัดต่อเซลล์ C28/I2 ในช่วงความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทดสอบ ผลการศึกษานี้สนับสนุนศักยภาพเบื้องต้นของเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยในการพัฒนาเป็นสารต้นแบบเชิงชีวภาพด้านสุขภาพข้อต่อ

คำสำคัญ: เยื่อเปลือกไข่ไก่, โปรตีนรวม, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เซลล์คอนโดรไซต์, เซลล์ C28/I2, สารสกัดเยื่อเปลือกไข่

Abstract

Chicken eggshell membrane contains proteins, collagen, and glycosaminoglycans that may benefit joint health. This study determined the total protein content and cytotoxicity of eggshell membrane extracts from Spanish and Thai sources using 0.5% and 1% of Sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100. Protein content was measured by the bicinchoninic acid (BCA) assay, while cytotoxicity toward C28/I2 chondrocytes was evaluated by cell morphology and the Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay after 24 hours.

Protein content ranged from 3.30±0.14–3.96±0.04 mg/g dry weight in Spanish extracts and 5.19±0.23–6.36±0.14 mg/g dry weight in Thai extracts. The highest detectable protein content in Thai samples was obtained using 1% SDS. Both extracts maintained normal cell morphology and adhesion, with cell viability above 70% at all tested concentrations. The CC_{50} values were therefore greater than 200 µg/mL for the Spanish extract and 500 µg/mL for the Thai extract.

In conclusion, Thai eggshell membrane extracts yielded a higher detectable protein content than Spanish extracts under the conditions tested. Extracts from both sources showed no apparent cytotoxicity toward C28/I2 cells, supporting the preliminary potential of Thai eggshell membrane for future joint health applications.

Keywords: chicken eggshell membrane, total protein, cytotoxicity, C28/I2 chondrocytes, eggshell membrane extract

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis; OA) และภาวะการอักเสบเรื้อรังนับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่มีความสำคัญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากรายงานทางระบาดวิทยาในปี 2021 พบว่า ประชากรทั่วโลกมีภาวะโรคข้ออักเสบมากถึง 607 ล้านคน หรือคิดเป็นร้อยละ 7.7 ของประชากรทั้งหมด โดยปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่ โรคอ้วนและภาวะน้ำหนักเกิน ร่วมกับปัจจัยร่วมอื่น ๆ เช่น พันธุกรรม ความดันโลหิตสูง มวลกระดูกที่ลดลง และความแข็งแรงของกล้ามเนื้อที่ลดลง (Miao et al., 2025; Sanchez-Lopez et al., 2022; Xie et al., 2025) ทั้งนี้ ในประชากรผู้สูงอายุไทยพบแนวโน้มเพิ่มขึ้น และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ (Dharmakulsakti et al., 2022)

ปัจจุบันการรักษาโรคข้อเสื่อมทางการแพทย์แผนปัจจุบันมุ่งเน้นการบรรเทาอาการปวดและลดการอักเสบ โดยมักใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ หรือยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ในบางกรณี อย่างไรก็ตาม การใช้ยาดังกล่าวในระยะยาวอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงหลายระบบ (Bensa et al., 2024; da Costa et al., 2021; Honvo et al., 2019) จึงมีความพยายามพัฒนาสารจากธรรมชาติหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้เป็นทางเลือกหรือแนวทางเสริมในการดูแลโรคข้อเสื่อม เช่น กลูโคซามีนและคอนดรอยตินซัลเฟต ซึ่งแม้จะมีรายงานผลการศึกษาบางส่วนที่สนับสนุนประโยชน์ต่ออาการและการทำงานของข้อ แต่หลักฐานเชิงประสิทธิผลยังคงมีความหลากหลายระหว่างการศึกษา (Bishnoi et al., 2016; Sifre et al., 2022; Vo et al., 2023)

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา เยื่อเปลือกไข่ได้รับความสนใจในฐานะวัตถุดิบชีวภาพที่มีศักยภาพ เนื่องจากประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ คอลลาเจน คอนดรอยตินซัลเฟต กรดไฮยาลูโรนิก และกลูโคซามีน ซึ่งสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านการอักเสบและการส่งเสริมสุขภาพข้อต่อ งานวิจัยต่างประเทศรายงานว่าสารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบและสนับสนุนการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพข้อต่อในแบบจำลองเซลล์ (Canovas et al., 2022; Casado-Santos et al., 2024; García-Muñoz et al., 2024; Park et al., 2024) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาจากแหล่งวัตถุดิบในประเทศไทยยังมีจำกัด โดยเฉพาะการประเมินฤทธิ์ในระดับเซลล์คอนโดรไซต์ อีกทั้งวัตถุดิบเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้มีต้นทุนสูงและข้อจำกัดด้านการขนส่ง ด้วยเหตุนี้ การศึกษาศักยภาพของเยื่อเปลือกไข่ไก่จากแหล่งวัตถุดิบภายในประเทศจึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งและการพัฒนาสารต้นแบบเชิงชีวภาพ

ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงมุ่งวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมและประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์คอนโดรไซต์ C28/I2 ของสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่จากแหล่งวัตถุดิบสเปนและไทย เพื่อยืนยันศักยภาพเบื้องต้น

ของวัตถุดิบภายในประเทศ ซึ่งอาจช่วยลดการใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งและสนับสนุนการพัฒนาสารต้นแบบเชิงชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพข้อต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทย (บริษัท โอโว่ ฟู้ดเทค จำกัด) และเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปน (บริษัท เพียว เคมิเคิล จำกัด) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีของ Kaweewong และคณะ โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม เติมสารละลายสกัด 10 มิลลิลิตร (Tris-HCl 50 mM, pH 8.8 ร่วมกับ 2-mercaptoethanol ร้อยละ 0.1 และ SDS ร้อยละ 0.5-1 หรือ Triton X-100 ร้อยละ 0.5-1) บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนเหนือตะกอน 400 ไมโครลิตร มาตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตนเย็นปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มต่อที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนเหนือตะกอนทิ้ง ผึ่งให้แห้ง แล้วละลายตะกอนโปรตีนด้วยน้ำบริสุทธิ์พิเศษ (Milli-Q water) 100 ไมโครลิตร (Kaweewong et al., 2013)

2. ตัวอย่างสำหรับทดสอบในเซลล์ ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร กวนด้วยความเร็วคงที่ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที (15 นาที, 4 องศาเซลเซียส) แยกส่วนเหนือตะกอนมากรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 μm ก่อนนำไปใช้ทดลอง (Casado-Santos et al., 2024)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเยื่อเปลือกไข่ไทย

วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic Acid (BCA) Assay โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0–2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เจือจางด้วยน้ำ Milli-Q) หยดสารละลายมาตรฐานและสารสกัดตัวอย่างหลุมละ 10 ไมโครลิตร ลงในเพลทชนิด 96 หลุม (ทดสอบ 3 ซ้ำ) เติม BCA working reagent หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยอ่านไมโครเพลท นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน (μg/mL) จากกราฟมาตรฐาน BSA และแปลงเป็นปริมาณโปรตีนรวมในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเยื่อเปลือกไข่ (mg/g dry weight) ตามสมการที่ (1)

$$\text{ปริมาณโปรตีน } (\text{mg/g dry weight}) = \frac{\mathbf{C \times V \times DF}}{\mathbf{W \times 1{,}000}} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

โดย

C = ความเข้มข้นโปรตีนที่วัดได้จากเครื่อง หน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

V = ปริมาตรรวมของบัฟเฟอร์/ตัวทำละลายที่ใช้สกัดโปรตีนทั้งหมด หน่วยเป็น มิลลิลิตร

DF = ค่าปัจจัยการเจือจาง (Dilution Factor) ในการทดลองนี้ คือ 2

W = น้ำหนักแห้งของเยื่อเปลือกไข่ไก่ที่เริ่มต้นนำมาสกัด หน่วยเป็น กรัม

การทดสอบความเป็นพิษในเซลล์คอนโดรไซต์ (Cell Viability Assay)

ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทยต่อเซลล์คอนโดรไซต์ด้วยวิธี MTT Assay โดยเตรียมเซลล์ความเข้มข้น 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในเพลทชนิด 96 หลุม (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบโดยสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนใช้ที่ช่วงความเข้มข้น 6.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยใช้ที่ช่วงความเข้มข้น 15.63–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เจือจางแบบอนุกรมทีละ 2 เท่า, ทำ 3 ซ้ำ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายออกแล้วเติม MTT (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, 100 ไมโครลิตรต่อหลุม) บ่มต่อ 3 ชั่วโมง ดูดสารละลายออกแล้วเติม DMSO (100 ไมโครลิตรต่อหลุม) เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท แล้วคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (สมการที่ 2) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

$$\text{ร้อยละของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์} = \left(\frac{\text{OD treated}}{\text{OD untreated}}\right) \times 100 \qquad \text{สมการที่ 2}$$

โดย

OD = Optical Density

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistical Analysis)

ข้อมูลจากการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation; SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแบบเป็นอิสระต่อกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองวิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) และเมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำการทดสอบเปรียบเทียบเชิงซ้อนพหุคูณ (post-hoc multiple comparisons) ด้วยวิธี Dunnett's test กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p < 0.05$ การประมวลผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดดำเนินการโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8

ผลวิจัย (Results)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทย

เยื่อเปลือกไข่เป็นโครงสร้างธรรมชาติที่อยู่ระหว่างเปลือกไข่และไข่ขาว ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจากเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทยโดยใช้สารลดแรงตึงผิว 2 ชนิด ได้แก่ SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ และ Triton X-100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 0.5 จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี BCA assay พบว่าสารละลายสกัดแต่ละสภาวะมีความสามารถในการสกัดโปรตีนแตกต่างกัน โดยเมื่อคำนวณปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทย ที่แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ตารางที่ 1) พบว่า เยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยในกลุ่มที่สกัดด้วย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 สกัดโปรตีนได้ในปริมาณสูงสุด คือ 6.36±0.14 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่สเปนมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในแต่ละกลุ่มของสารละลาย ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยดีสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนของเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทยที่ใช้ตัวทำละลายต่างกัน

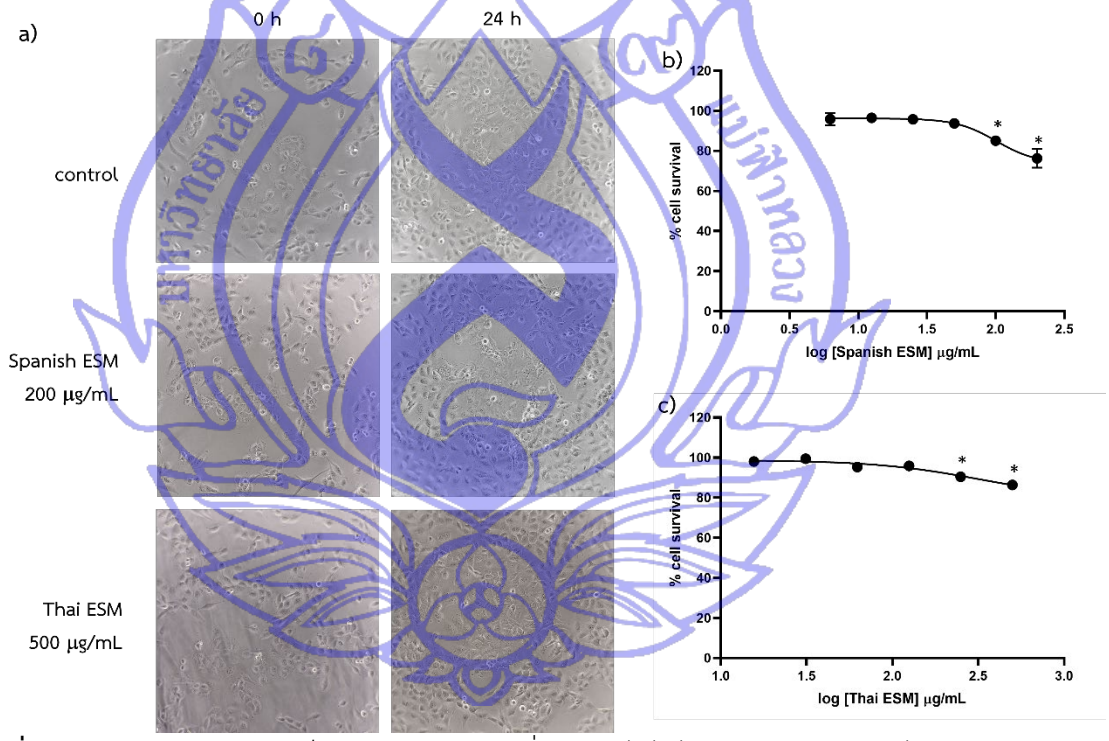
	ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	
ชนิดของตัวทำละลาย	**เยื่อเปลือกไข่ไก่สเปน**	**เยื่อเปลือกไข่ไก่ไทย**
SDS ร้อยละ 1	3.67±0.22	6.36±0.14
SDS ร้อยละ 0.5	3.30±0.14	5.19±0.23
Triton X-100 ร้อยละ 1	3.83±0.13	5.48±0.18
Triton X-100 ร้อยละ 0.5	3.96±0.04	5.19±0.50
p value	0.05	0.05

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนออกจากเยื่อเปลือกไข่สเปนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีปริมาณโปรตีนที่สกัดได้อยู่ในช่วง 3.30±0.14 ถึง 3.96±0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่การสกัดจากเยื่อเปลือกไข่ไทยให้ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 5.19±0.23 ถึง 6.36±0.14 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แม้ปริมาณโปรตีนที่

สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่ไทยจะมีแนวโน้มสูงกว่าเยื่อเปลือกไข่สเปนภายใต้สภาวะการทดสอบดังกล่าว แต่การสรุปผลความแตกต่างสามารถวิเคราะห์ได้ค่า p-value ได้แล้ว เหมือนเปลือกไข่สเปน

ผลการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์คอนโดรไซต์ (Cell Viability Assay)

การประเมินสัณฐานวิทยาของเซลล์คอนโดรไซต์ C28/I2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับหลังบ่มร่วมกับสารสกัดเยื่อเปลือกไข่สเปน (6.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และไทย (15.62–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37°C และ CO_2 ร้อยละ 5 แสดงให้เห็นว่า แม้ที่ความเข้มข้นสูงสุด (200 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) เซลล์ยังคงมีรูปร่างปกติ ยึดเกาะดี และไม่พบการหดตัวหรือหลุดลอกเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1a) ผลการทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธี MTT ยืนยันว่าเซลล์ในทุกระดับความเข้มข้นมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1b–c) ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ทั้งสองแหล่งไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงความเข้มข้นและเวลาที่ทดสอบ



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยต่อเซลล์คอนโดรไซต์ โดย a) แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์คอนโดรไซต์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มร่วมกับสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไทยที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ กำลังขยาย 10× และ b-c) อัตราการอยู่รอดของเซลล์คอนโดรไซต์ภายหลังการบ่มร่วมกับสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนและไทยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ ประเมินด้วยวิธี MTT assay จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง * มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อบ่มเซลล์คอนโดรไซต์ C28/I2 กับสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนที่ความเข้มข้น 6.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยที่ความเข้มข้น 15.63–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (การทดลอง 3 ซ้ำเป็นอิสระต่อกัน) มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 96.47±0.69 ถึง 76.26±2.68ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปน และ 99.39±0.95 ถึง 86.37±1.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทย จะเห็นได้ว่า ค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทำการบ่มกับสารสกัดทั้ง 2 แหล่งสูงกว่าร้อยละ 70 ตลอดทุกช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ โดยในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้นระดับต่ำถึงปานกลาง เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงร้อยละ 100 และพบแนวโน้มลดลงเล็กน้อยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด อย่างไรก็ดี สารสกัดทั้งสองชนิดไม่ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงถึงร้อยละ 50 ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเยื่อเปลือกไข่จากทั้งสองแหล่งไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อความมีชีวิตของเซลล์คอนโดรไซต์อย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะการทดสอบนี้

อภิปรายผล (Discussion)

เยื่อเปลือกไข่ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 90 ไขมันร้อยละ 3 น้ำตาลร้อยละ 2 และแร่ธาตุอื่น ๆ ในปริมาณเล็กน้อย เช่น แคลเซียมและแมกนีเซียม โดยโปรตีนหลักในเยื่อเปลือกไข่ ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1, 5 และ 10 รวมถึงโปรตีนบางส่วนที่มาจากไข่ขาว (Han et al., 2023; Matsuoka et al., 2019) จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA assay พบว่า ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากเยื่อเปลือกไข่สเปนอยู่ในช่วง 3.30 ± 0.14 ถึง 3.96 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเยื่อเปลือกไข่ไทยอยู่ในช่วง 5.19 ± 0.23 ถึง 6.36 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่กับชนิดของสารลดแรงตึงผิว (ตารางที่ 1) โดย SDS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากเยื่อเปลือกไข่ไทยได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ Triton X-100 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เนื่องจาก SDS เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เซลล์แตกและทำให้โปรตีนเสียสภาพ (protein denaturation) โดยเฉพาะโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์หรือโปรตีนที่มีโครงสร้างไม่ชอบน้ำสูง โดยจะเข้าไปทำลายแรงยึดเหนี่ยวในโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีน ทำให้โปรตีนคลายตัวและปลดปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อ (Zhou et al., 2012) นอกจากนี้ เยื่อเปลือกไข่ไทยให้ค่าความเข้มข้นของ

โปรตีนที่วัดได้สูงกว่าเยื่อเปลือกไข่สเปนภายใต้สภาวะการสกัดและวิธีการวิเคราะห์ด้วย BCA assay ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้อาจเกิดจากแหล่งที่มาของวัตถุดิบ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติจำเพาะทางกายภาพและเคมีของวัตถุดิบต้นทาง หรือประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดที่ตอบสนองต่อโครงสร้างของเยื่อเปลือกไข่แต่ละแหล่งแตกต่างกัน

จากผลการวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คอนโดรไซต์เมื่อบ่มกับเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนที่ความเข้มข้น 6.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยที่ความเข้มข้น 15.63–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ไม่สามารถกำหนดค่า CC_{50} ที่แน่นอนได้ เนื่องจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไม่ได้ลดลงถึงร้อยละ 50 ภายในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ซึ่งแสดงว่าสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่สเปนมีค่า $CC_{50} > 200$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยมีค่า $CC_{50} > 500$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลลัพธ์ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารสกัดเยื่อเปลือกไข่ทั้งสองชนิดไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์คอนโดรไซต์อย่างมีนัยสำคัญตลอดช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ ผลลัพธ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในระดับเซลล์และงานวิจัยทางคลินิกหลายฉบับที่ผ่านมา เช่น งานวิจัยของ Casado-Santos และคณะ (Casado-Santos et al., 2024) รวมถึง Canovas และคณะ (Canovas et al., 2022) ที่รายงานว่าสารสกัดจากเยื่อเปลือกไข่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง (biocompatibility) และมีความปลอดภัยในการนำมาประยุกต์ใช้กับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับข้อต่อ นอกจากนี้องค์ประกอบหลักในเยื่อเปลือกไข่ เช่น คอลลาเจน ไกลโคซามิโนไกลแคน (GAGs) และโปรตีนชีวภาพอื่น ๆ (Han et al., 2023; Matsuoka et al., 2019) เป็นสารธรรมชาติที่ไม่ก่อให้เกิดภาวะความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงสนับสนุนศักยภาพของเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยในการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือสารต้นแบบทางยาสำหรับดูแลสุขภาพข้อต่อได้อย่างปลอดภัย

งานวิจัยนี้เพิ่มองค์ความรู้ใหม่ด้วยการเปรียบเทียบสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่จากแหล่งวัตถุดิบไทยและสเปนภายใต้เงื่อนไขการสกัดเดียวกัน พบว่า ตัวอย่างจากไทยให้ปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้สูงกว่าโดยเฉพาะเมื่อสกัดด้วย SDS ร้อยละ 1 นอกจากนี้ ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงว่าสารสกัดจากทั้งสองแหล่งไม่แสดงความเป็นพิษเด่นชัดต่อเซลล์คอนโดรไซต์ C28/I2 ในช่วงความเข้มข้นและเวลาที่ทดสอบ จึงสนับสนุนศักยภาพของเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยในการพัฒนาเป็นสารต้นแบบเชิงชีวภาพสำหรับสุขภาพข้อต่อต่อไป

ข้อจำกัดสำคัญของการศึกษานี้ คือ ความแตกต่างของช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบระหว่างสารสกัดทั้งสองชนิด ส่งผลให้ไม่สามารถทำการเปรียบเทียบผลทางชีวภาพทางสถิติโดยตรงได้

ข้อเสนอแนะ (Suggestion)

ในการต่อยอดองค์ความรู้และพัฒนาสารสกัดเยื่อเปลือกไข่ไก่ไทยสู่การประยุกต์ใช้จริงอย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาครั้งต่อไปควรขยายการวิเคราะห์ไปสู่กลไกการออกฤทธิ์ในระดับชีวโมเลกุลให้ครอบคลุมมากขึ้น โดยประเมินการแสดงออกและการหลั่งของไซโตไคน์ก่อการอักเสบ ตัวบ่งชี้ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน และตัวบ่งชี้การสลายของเมทริกซ์นอกเซลล์ ควบคู่กับวิถีสัญญาณของ NF-κB เพื่อยืนยันกลไกต้านการอักเสบของสารสกัดอย่างชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ควรมีการเปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบมาตรฐานในความเข้มข้นที่ใช้ทางคลินิก เพื่อประเมินขนาดฤทธิ์ของสารสกัดเมื่อเทียบกับยาแผนปัจจุบัน และเพิ่มความชัดเจนต่อศักยภาพในการประยุกต์ใช้เชิงวิชาการและเชิงพาณิชย์ต่อไป

รายการอ้างอิง

Bensa, A., Salerno, M., Moraca, G., Boffa, A., McIlwraith, C. W., & Filardo, G. (2024, Jul). Intra-articular corticosteroids for the treatment of osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis on the comparison of different molecules and doses. *J Exp Orthop, 11*(3), e12060. https://doi.org/10.1002/jeo2.12060

Bishnoi, M., Jain, A., Hurkat, P., & Jain, S. K. (2016, 2016/10/01). Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. *Glycoconjugate Journal, 33*(5), 693-705. https://doi.org/10.1007/s10719-016-9665-3

Canovas, F., Abellan-Ruiz, M. S., Garcia-Munoz, A. M., Luque-Rubia, A. J., Victoria-Montesinos, D., Perez-Pinero, S., Sanchez-Macarro, M., ...Lopez-Roman, F. J. (2022, Jun 3). Randomised Clinical Trial to Analyse the Efficacy of Eggshell Membrane to Improve Joint Functionality in Knee Osteoarthritis. *Nutrients, 14*(11). https://doi.org/10.3390/nu14112340

Casado-Santos, A., La Nuez-García, M. A., Álvarez-Rodríguez, P., González-Cubero, E., González-Rodríguez, Y., Luisa González-Fernández, M., ...Villar-Suárez, V. (2024, 2024/05/01/). Anti-inflammatory and regenerative effects of MKARE® Eggshell Membrane: An in vitro osteoarthritis model and placebo-controlled clinical study. *Journal of Functional Foods, 116*, 106119. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106119

da Costa, B. R., ... G. A., & Jüni, P. (2021). Effectiveness and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioid treatment for knee and hip osteoarthritis: network meta-analysis. *BMJ, 375*, n2321. https://doi.org/10.1136/bmj.n2321

Dharmakulsakti, P., Roopsawang, I., & Aree-Ue, S. (2022, 01/01). Sarcopenia among Older Adults with Knee Osteoarthritis: A Cross-Sectional Study of Prevalence and Its Associated Factors. *Pacific Rim International Journal of Nursing Research, 26*, 121-134.

García-Muñoz, A. M., Abellán-Ruiz, M. S., García-Guillén, A. I., & Victoria-Montesinos, D. (2024). Efficacy of eggshell membrane in knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients, 16*(16).

Han, C., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D., & Wang, D. (2023, 2023-March-16). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies [Review]. *Volume 10 - 2023*. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126

Honvo, G., Leclercq, V., Geerinck, A., Thomas, T., Veronese, N., Charles, A., Rabenda, V., Beaudart, C., Cooper, C., Reginster, J.-Y., & Bruyère, O. (2019, 2019/04/01). Safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: Outcomes of a systematic review and meta-analysis. *Drugs & Aging, 36*(1), 45-64. https://doi.org/10.1007/s40266-019-00661-0

Kaweewong, K., Garnjanagoonchorn, W., Jirapakkul, W., & Roytrakul, S. (2013). Solubilization and identification of hen eggshell membrane proteins during different times of chicken embryo development using the proteomic approach. *Protein J., 32*, 297.

Matsuoka, R., Kurihara, H., Yukawa, H., & Sasahara, R. (2019, May 9). Eggshell membrane protein can be absorbed and utilised in the bodies of rats. *BMC Res Notes, 12*(1), 258. https://doi.org/10.1186/s13104-019-4306-0

Miao, Z., Li, S., Luo, Y., Li, S., Chu, Z., Zheng, W., Li, X., Lu, Q., & Liu, P. (2025, 2025/05/01/). Trends, inequalities and time-series based prediction of knee osteoarthritis attributed to high body-mass-index: findings from global burden of

disease 2021. *Journal of Orthopaedic Translation, 52*, 209-219. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jot.2025.03.022

Park, S., Ko, S.-H., Yoon, N.-K., Kim, B.-K., Kim, J., Kang, E.-B., Oh, M., Son, C.-G., & Lee, E.-J. (2024, 2024/10/01/). Efficacy of natural eggshell membrane for knee osteoarthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods, 121*, 106449. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106449

Sanchez-Lopez, E., Coras, R., Torres, A., Lane, N. E., & Guma, M. (2022, 2022/05/01). Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nature Reviews Rheumatology, 18*(5), 258-275. https://doi.org/10.1038/s41584-022-00749-9

Sifre, V., Soler, C., Segarra, S., Redondo, J. I., Doménech, L., Ten-Esteve, A., Vilalta, L., Pardo-Marín, L., & Serra, C. I. (2022, May 30). Improved joint health following oral administration of glycosaminoglycans with native type II collagen in a rabbit model of osteoarthritis. *Animals (Basel), 12*(11). https://doi.org/10.3390/ani12111401

Vo, N. X., Le, N. N. H., Chu, T. D. P., Pham, H. L., Dinh, K. X. A., Che, U. T. T., Ngo, T. T. T., & Bui, T. T. (2023, Jul 14). Effectiveness and safety of glucosamine in osteoarthritis: A systematic review. *Pharmacy (Basel), 11*(4). https://doi.org/10.3390/pharmacy11040117

Xie, X., Zhang, K., Li, Y., Li, Y., Li, X., Lin, Y., Huang, L., & Tian, G. (2025). Global, regional, and national burden of osteoarthritis from 1990 to 2021 and projections to 2035: A cross-sectional study for the Global Burden of Disease Study 2021. *PLoS One, 20*(5), e0324296. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0324296

Zhou, J. Y., Dann, G. P., Shi, T., Wang, L., Gao, X., Su, D., Nicora, C. D., Shukla, A. K., Moore, R. J., Liu, T., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D., & Qian, W. J. (2012, Mar 20). Simple sodium dodecyl sulfate-assisted sample preparation method for LC-MS-based proteomics applications. *Anal Chem, 84*(6), 2862-2867. https://doi.org/10.1021/ac203394r