

ผลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดและวิธีการปั่นผสมต่อสมบัติของ สารสกัดแอสตาแซนทินที่กักเก็บในไลโปโซม

Effects of Phospholipid Concentration and Mixing Methods on Properties of Astaxanthin Extract-loaded Liposomes

อนันทิตา แสงสุริยวงษ์^{1/} มารุจ ลิ้มปะวัฒนะ^{2/} ดาลัด ศิริวัน^{3/} ภัศราภา แก้วเนิน^{4/}
และ วรณวิมล คล้ายประดิษฐ์^{1/*}

Anantita Sangsuriyawong^{1/}, Maruj Limpawattana^{2/}, Dalad Siriwan^{3/}, Passarapa Kaewnern^{4/}
and Wanwimol Klaypradit^{1/*}

^{1/}ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

^{1/}Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900

^{2/}ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพฯ 10160

^{2/}Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok 10160

^{3/}สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

^{3/}Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok 10900

^{4/}กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง 50 เขตคลองจั่น กรุงเทพฯ 10900

^{4/}Fish Inspection and Quality Control Division, Department of Fisheries, 50 Kaset-Klang Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author: Email: ffishwak@ku.ac.th

(Received: 9 February 2016; Accepted: 24 June 2016)

Abstract: This study was aimed to improve stability of natural astaxanthin extracted from white shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*) by using liposomal encapsulation technique. Three different concentrations of phospholipids at 0.8, 1.6 and 2.0% w/v together with two different mixing methods including homogenization and sonication were employed. Astaxanthin extract-loaded liposomes were investigated for entrapment efficiency (%EE), antioxidant activity determined by DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical scavenging capacity and ferrous metal ion chelating activity, morphology of liposomes by using transmission electron microscopy (TEM) and properties changing during 8 weeks storage at 4 °C. It was found that %EE of liposomes prepared from 2.0% w/v phospholipids and mixed by sonication revealed the least decrease of %EE as compared to that of day 0. Antioxidant activity to eradicate DPPH free radicals and metal ion chelating activity of free astaxanthin was decreased by 76.7% and 56%, respectively which was much lower than that encapsulated in liposomes of all treatments as compared to that of day 0. TEM image of astaxanthin extract-loaded liposomes prepared by sonication demonstrated a lamellar structure. The results suggest the potential use of liposomal encapsulation to protect astaxanthin properties for further application.

Keywords: Astaxanthin, liposome, antioxidant, white shrimp shell

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มความคงตัวให้กับแอสตาแซนทินธรรมชาติที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยใช้เทคโนโลยีการกักเก็บด้วยไลโปโซม ซึ่งเตรียมจากฟอสโฟลิพิดที่มีปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (0.8, 1.6 และ 2.0%w/v) และทำการบ่มผสมด้วยวิธีที่ต่างกัน 2 วิธี คือวิธีโฮโมจีไนเซชันและวิธีโซนิเคชัน สารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่ได้นำไปวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ประสิทธิภาพในการกักเก็บ (%EE) ประสิทธิภาพในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH และประสิทธิภาพการจับโลหะ) ลักษณะโครงสร้างของไลโปโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและการเปลี่ยนแปลงของสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า ค่า %EE ของไลโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิพิดความเข้มข้น 2.0%w/v ที่บ่มผสมด้วยวิธีโซนิเคชัน ให้ %EE ลดลงน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น สำหรับประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH และในด้านประสิทธิภาพการจับโลหะของสารสกัดแอสตาแซนทินที่ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซมพบว่าประสิทธิภาพลดลงถึง 76.7% และ 56% ตามลำดับ ซึ่งลดลงมากกว่าสารสกัดแอสตาแซนทินที่กักเก็บในไลโปโซมในทุกตัวอย่างเมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น นอกจากนี้โครงสร้างภายใต้กล้อง TEM ของไลโปโซมที่บ่มผสมด้วยวิธีโซนิเคชันมีลักษณะเป็นโครงสร้างที่เรียงตัวซ้อนกัน ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การกักเก็บด้วยเทคนิคไลโปโซมนั้นสามารถช่วยป้องกันและรักษาสสมบัติของแอสตาแซนทินได้เพื่อนำไปใช้ต่อไป

คำสำคัญ: แอสตาแซนทิน ไลโปโซม สารแอนติออกซิแดนท์ เปลือกกุ้งขาว

คำนำ

แอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นแคโรทีนอยด์ (carotenoid) กลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเบตาแคโรทีน (β -carotene) ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแคนธาแซนทิน (canthaxanthin) ประมาณ 10 เท่าและมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินอีประมาณ 100 เท่า (Naguib, 2000) ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนทินมีทั้งส่วนที่มีขั้ว และไม่มีขั้วในโมเลกุลจึงทำให้สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน แต่ให้ประสิทธิภาพในการละลายในน้ำมันที่สูงกว่า ในทางการค้าพบว่าแอสตาแซนทินผลิตได้จากสองแหล่งหลักที่สำคัญคือจากการสังเคราะห์ และจากธรรมชาติ (พิเชต, 2558) โดยที่แอสตาแซนทินจากธรรมชาติที่มีจำหน่ายในท้องตลาดปัจจุบัน ส่วนใหญ่ผลิตได้จากสาหร่ายที่สำคัญคือสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแอสตาแซนทินจากธรรมชาติจากแหล่งอื่นจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ ซึ่งเศษเหลือจากอุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็งเป็นแหล่งที่มีศักยภาพในการนำมาทำเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอสตาแซนทิน เนื่องจากมีความเหมาะสมในด้านของปริมาณที่มีจำนวนมาก ราคา

วัตถุดิบที่ถูก และเป็นการเพิ่มมูลค่าในการใช้ประโยชน์จากเศษเหลืออุตสาหกรรมการผลิตกุ้งแช่แข็งให้มากขึ้น อีกทั้งแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากเศษเหลือของกุ้ง ยังไม่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อจำหน่ายในทางการค้า

แอสตาแซนทินมีสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันได้ จึงนิยมนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญที่พบเมื่อมีการประยุกต์ใช้แอสตาแซนทินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ คือความไม่คงตัวเนื่องจากลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของแอสตาแซนทินที่มีความไม่อิ่มตัวสูง จึงทำให้แอสตาแซนทินเกิดการเสียสภาพได้ง่ายจากสภาวะแวดล้อม เมื่อได้รับแสง ความร้อน และออกซิเจน เป็นต้น ทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตหรือการเก็บรักษา

จากปัญหาดังที่กล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำไลโปโซมซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งของเทคโนโลยีเอนแคปซูลเลชันมาช่วยในการกักเก็บและเพิ่มความคงตัวให้กับแอสตาแซนทิน ทั้งนี้ไลโปโซมเป็นโครงสร้างขนาดเล็กของสารไขมันประเภทฟอสโฟลิพิดที่มีสมบัติเป็น amphipathic คือโครงสร้างมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว เมื่อปริมาณความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่มากพอผสมกับน้ำ โมเลกุลส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะรวมเป็นกลุ่ม

เข้าหากัน ในขณะที่ส่วนที่ชอบน้ำจะยึดเกาะกับน้ำ ซึ่งเกิดการเรียงเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันเป็นผนังสองชั้น (lipid bilayer) ได้มากกว่าหนึ่งชุด (Kraft *et al.*, 2014) ซึ่งมีผลทำให้สามารถกักเก็บสารทั้งประเภทที่ละลายได้ในน้ำ และละลายได้ในไขมัน เนื่องจากฟอสโฟลิพิดมีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษ และมีโครงสร้างคล้ายกับองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนในร่างกายมนุษย์ จึงมีผลดีในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่ง และดูดซึมสารสำคัญต่าง ๆ ในร่างกายได้ (Kraft *et al.*, 2014) สำหรับการเตรียมไลโปโซมในปัจจุบันส่วนใหญ่จะใช้เครื่อง sonicator ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดและวิธีการเตรียมไลโปโซมโดยเปรียบเทียบการใช้เครื่อง sonicator และเครื่อง homogenizer ต่อประสิทธิภาพการกักเก็บแอลตาแซนทินและสมบัติการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดแอลตาแซนทินในไลโปโซม

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

เปลือกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จากบริษัท ไทยยูเนี่ยน โฟรเซ่น โปรดักส์ จำกัด (มหาชน) จังหวัดสมุทรสาคร

ฟอสโฟลิพิดที่มีปริมาณฟอสฟาติดิลโคลีน 23% (PC=23%) (Ultralec F, ADM, USA)

วิธีการ

1) การสกัดแอลตาแซนทินจากเปลือกกุ้งขาว

การสกัดแอลตาแซนทินจากเปลือกกุ้งขาว (ดัดแปลงจากวิธีของ Sachindra *et al.*, 2006) ทำโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยนำเปลือกกุ้งมาปั่นกับเอทานอลในอัตราส่วนของเปลือกกุ้งต่อเอทานอล 1:2 (w/v) หลังจากนั้นนำไปกรองเอาเปลือกกุ้งออกด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ นำสารสกัดที่ได้ใส่ในขวดสีชาและทำการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2) การวิเคราะห์สมบัติของสารสกัด

2.1) การคำนวณปริมาณของสารสกัด

คำนวณน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ โดยคำนวณในอัตราส่วนน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักเปลือกกุ้งขาวที่ใช้ในการสกัด แสดงดังสมการที่ (1)

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณของสารสกัด} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง}}{\text{น้ำหนักเปลือกกุ้งเริ่มต้น}} \times 100 \\ (\% \text{ Yield}) & \end{aligned} \quad \text{----สมการที่ (1)}$$

2.2) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดแอลตาแซนทิน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสกัดแอลตาแซนทินด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ดัดแปลงจากวิธีของ Higuera-Ciapara *et al.* (2004) ทำโดยนำสารสกัดแอลตาแซนทินปริมาณ 1 กรัม ไปละลายในสารละลายผสมของไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 25:75 (HPLC grade) แล้วนำไปกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นนำสารตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร และใช้คอลัมน์ชนิด C18 ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ (mobile phase) คือสารละลายที่มีเมทานอล 85% ไดคลอโรมีเทน 5% อะซิโตไนไตรต์ 5% และน้ำ 5% ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการวัดปริมาณแอลตาแซนทินโดยใช้ detector (Agilent LC 1200 Series) ที่ detection wavelength 480 นาโนเมตร เป็นเวลา 25 นาที และปริมาณของแอลตาแซนทินที่ออกมาจะทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลตาแซนทิน (Ehrenstorfer GmbH, Germany)

2.3) การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดแอลตาแซนทิน

2.3.1) ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (DPPH) radical scavenging)

การวิเคราะห์สมบัติแอนติออกซิแดนท์โดยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Wu *et al.* (2003) ทำโดยนำสารสกัดแอลตาแซนทินมาละลายในเมทานอล จากนั้นจึงนำมาเติมสารละลาย DPPH ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง

ด้วยเครื่อง 96 well microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับเบตาแคโรทีนซึ่งเป็น positive control แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH แสดงดังสมการที่ (2)

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})) / A_{\text{control}}] \times 100$$

-----สมการที่ (2)

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ในเมทานอล

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH และสารละลายของสารสกัด แอสตาแซนทิน

$A_{\text{blank sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ สารละลายของสารสกัดแอสตาแซนทิน

2.3.2) ประสิทธิภาพในการจับโลหะ (ferrous ion chelating (FIC) assay)

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะโดยวิธี Ferrous ion chelating ดัดแปลงจากวิธีของ Dinis *et al.* (1994) โดยละลายสารสกัดแอสตาแซนทินในเมทานอล จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย ferrozine และสารละลาย FeCl_2 ในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับ EDTA ซึ่งเป็น positive control แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละในการจับโลหะ (% chelating ability) แสดงดังสมการที่ (3)

$$\% \text{ Chelating ability} = [(A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank sample}})) / A_{\text{control}}] \times 100$$

-----สมการที่ (3)

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย FeCl_2 และสารละลาย ferrozine

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารสกัดแอสตาแซนทินที่ใส่สารละลาย FeCl_2 และสารละลาย ferrozine

$A_{\text{blank sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารสกัดแอสตาแซนทิน

3) การเตรียมไลโปโซมเพื่อกักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทิน

การเตรียมไลโปโซมใช้วิธี thin film hydration ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Pintea *et al.* (2005) โดยใช้ฟอสโฟลิพิดที่ระดับความเข้มข้น 0.8, 1.6 และ 2.0%w/v โดยนำฟอสโฟลิพิดมาละลายในเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อละลายเข้ากัน จึงเติมสารสกัดแอสตาแซนทินปริมาณ 0.8 กรัม ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศจนได้ฟิล์มบางของฟอสโฟลิพิด จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงบนฟิล์มบางของ ฟอสโฟลิพิด แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 40°C เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปั่นผสมด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ (1) วิธีโฮโมจีไนเซชัน (homogenization) โดยใช้เครื่อง homogenizer (IKA-T25, Ultra-Turrax) ที่ความเร็วรอบ 16,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่ปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จะร่อนน้ำแข็งตลอดการปั่นเพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิ และ (2) วิธีโซนิเคชัน (sonication) โดยนำสารตัวอย่างไปตั้งไว้ในอ่าง sonicator (Crest) ที่ 38.5 kHz เป็นเวลา 30 นาที (ทำที่อุณหภูมิห้อง 25°C)

4) การวิเคราะห์สมบัติของสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซม

4.1) ประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซม

นำไลโปโซมที่เตรียมได้จากข้อ (3) มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกักเก็บแอสตาแซนทิน โดยนำไลโปโซมไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที (ดัดแปลงจากวิธีของ Marsanasco *et al.*, 2011) หลังจากนั้นนำไลโปโซมมาทำให้แตกโดยใช้สารละลาย triton X-100 (10% v/v) เพื่อให้ไลโปโซมปลดปล่อยสารสกัดแอสตาแซนทินที่ถูกกักเก็บไว้ออกมา และนำมาวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทิน โดยใช้เทคนิค HPLC รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในข้อ (2.2) แล้วคำนวณหาปริมาณแอสตาแซนทินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาประสิทธิภาพการกักเก็บสารแอสตาแซนทินดังสมการที่ (4)

$$\text{ประสิทธิภาพการกักเก็บ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณแอสตาแซนทีนในไลโปโซม}}{\text{ปริมาณแอสตาแซนทีนเริ่มต้นที่เติมลงไปทั้งหมด}} \times 100$$

-----สมการที่ (4)

4.2) ประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดแอสตาแซนทีนที่กักเก็บในไลโปโซม

4.2.1) ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging)

การวิเคราะห์สมบัติแอนติออกซิแดนท์โดยวิธี DPPH ของสารสกัดแอสตาแซนทีนที่กักเก็บในไลโปโซม รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังข้อ (2.3.1)

4.2.2) ประสิทธิภาพในการจับโลหะ (Ferrous ion chelating (FIC) assay)

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดแอสตาแซนทีนที่กักเก็บในไลโปโซม รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงดังข้อ (2.3.2)

5) การศึกษาลักษณะโครงสร้างของไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทีนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy, TEM)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทีน ทำโดยหยดสารละลายไลโปโซมที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 10 เทาลงบนกริด (Formvar-carbon coated copper grid) แล้วย้อมตัวอย่างแบบ negative staining ด้วย uranyl acetate ความเข้มข้น 1% หลังจากนั้นนำกริดที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง TEM (Hitachi HT7700) โดยถ่ายภาพขยายแบบไบรตฟิลด์ (bright field image) ที่ความต่างศักย์ 80 kV

6) การวิเคราะห์ความคงตัวของไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทีน

นำไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทีนใส่ในขวดสีชาและเติมก๊าซไนโตรเจน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในระหว่างการเก็บรักษา ได้ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกักเก็บ

แอสตาแซนทีนในไลโปโซม และประสิทธิภาพในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ รายละเอียดดังแสดงในข้อ (4) โดยทำการวิเคราะห์ทุก ๆ 1 สัปดาห์ จนครบระยะเวลา 8 สัปดาห์

7) การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการศึกษาค้นคว้านี้วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1) ปริมาณของสารสกัดและความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนในสารสกัดจากเปลือกกุ้ง

สารสกัดที่ได้จากเศษเหลือเปลือกกุ้งขาว พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 20.39 ± 1.02 มิลลิกรัมต่อเปลือกกุ้ง 1 กรัม ซึ่งค่าที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Taksima *et al.* (2015) ที่สกัดสารแอสตาแซนทีนจากเปลือกกุ้งชนิดเดียวกันด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้เท่ากับ 24.66 ± 2.91 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเปลือกกุ้ง 1 กรัม และเมื่อนำสารสกัดที่ได้จากเปลือกกุ้งไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบพีคของสารสกัดแอสตาแซนทีนที่นาที่ 3.92 (ภาพที่ 1a) ซึ่งใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐานแอสตาแซนทีน (นาที่ 3.91 ภาพที่ 1b) ซึ่งเป็นการพิสูจน์ให้ทราบว่าสารสกัดที่ได้จากเปลือกกุ้งขาวมีองค์ประกอบของแอสตาแซนทีน และเมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอสตาแซนทีนในสารสกัด พบว่ามีค่าเท่ากับ 9.0 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 1 กรัม ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yang *et al.* (2015) ที่วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารแอสตาแซนทีนจากเปลือกกุ้งขาวที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 8.72 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด

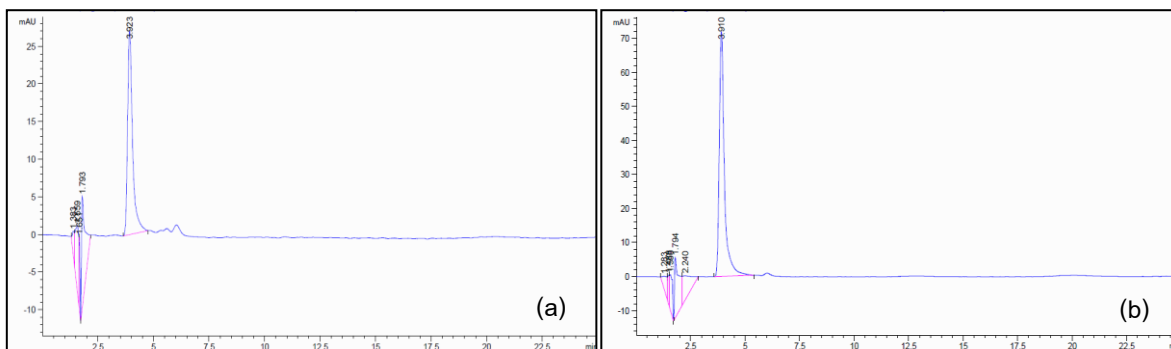


Figure 1 Chromatogram of (a) astaxanthin extract from white shrimp shell and (b) astaxanthin standard

2) ประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซม

ผลการทดลองด้านประสิทธิภาพการกักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่ระดับความเข้มข้นและวิธีการบั่นผสมต่าง ๆ ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ได้แสดงเป็นค่า % entrapment efficiency (%EE) แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บแอสตาแซนทินเริ่มต้น (วันที่ 0) มีค่าสูงกว่า 85% ในทุกตัวอย่างไลโปโซม โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า %EE ของไลโปโซมที่ใช้วิธีการบั่นผสมแบบเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดเพิ่มมากขึ้น ค่า %EE ให้ค่าที่สูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งไลโปโซมที่กักเก็บแอสตาแซนทินมีค่า %EE สูงที่สุดเมื่อใช้ฟอสโฟลิพิดที่ความเข้มข้น 2.0%w/v และเมื่อเก็บรักษาไลโปโซมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไลโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิพิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และบั่นผสมด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชัน มีประสิทธิภาพในการกักเก็บแอสตาแซนทิน ลดลงคิดเป็นร้อยละ 26.3-53.8 ส่วนไลโปโซมที่บั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชัน มีประสิทธิภาพในการกักเก็บลดลงเพียงร้อยละ 23.4-34.0 เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น ดังนั้นจะเห็นว่าการบั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชัน ส่งผลให้ค่า %EE ลดลงน้อยกว่าการบั่นผสมด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชัน โดยเฉพาะไลโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิพิดความเข้มข้น 2.0%w/v ให้ %EE ลดลงน้อยที่สุดภายหลังการเก็บรักษา 8 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น ทั้งนี้การบั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชัน เป็นเทคนิคที่ใช้คลื่นเสียงในการลดขนาดอนุภาคของไลโปโซมโดยผ่านตัวกลางคือน้ำ และไม่ได้สัมผัสกับตัวอย่างโดยตรง ทำให้เกิดการจัดเรียงเป็น

ไลโปโซมได้ค่อนข้างสมบูรณ์ ดังจะเห็นได้จากภาพแสดงลักษณะโครงสร้างของไลโปโซมภายใต้กล้อง TEM (ภาพที่ 2b) ซึ่งคลื่นเสียงช่วยให้โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดเกิดการจัดเรียงตัวในน้ำได้เสถียร โดยเสริมให้โมเลกุลของฟอสโฟลิพิดหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาโมเลกุลของน้ำ และหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหากัน ส่วนการบั่นผสมด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชัน เป็นการลดขนาดของอนุภาคในเฟสกระจายโดยใช้แรงเฉือนสูง และช่วยเพิ่มจำนวนของอนุภาค และสามารถทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของไลโปโซมได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการใช้แรงที่สูงอาจจะมีส่วนทำให้อนุภาคบางส่วนเกิดเป็นไลโปโซมที่ไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 2a) และมีผลต่อการลดลงของ %EE สำหรับงานวิจัยที่ศึกษาทางด้านการกักเก็บแอสตาแซนทินในไลโปโซมมีค่อนข้างน้อย โดย Peng *et al.* (2010) ได้ศึกษาการนำส่งแอสตาแซนทินสังเคราะห์เข้าสู่เซลล์ตับ Hep3B และ HepG2 โดยใช้เทคนิคการนำส่งไลโปโซม ซึ่งพบว่ามีปริมาณของแอสตาแซนทินอยู่ในไลโปโซมเท่ากับ 89.0 ± 8.6 มิลลิกรัมต่อกรัม และแอสตาแซนทินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ดีมากกว่าแอสตาแซนทินที่ไม่ผ่านการกักเก็บในไลโปโซม นอกจากนี้ มีผลงานวิจัยที่ศึกษากระบวนการห่อหุ้มสารแอสตาแซนทินโดยวิธีเอนแคปซูลเลชันวิธีอื่น เช่น งานวิจัยของ Shen and Quek (2014) ศึกษากระบวนการห่อหุ้มสารแอสตาแซนทินธรรมชาติทางการค้า (Bioastin) โดยใช้เทคนิค spray dry จากการศึกษพบว่ากระบวนการห่อหุ้มสารสามารถเพิ่มความคงตัวให้สารแอสตาแซนทินได้ โดยมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสูงถึงร้อยละ 92.69-95.19 และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแอสตาแซนทินในสภาวะเร่ง

Table 1 Entrapment efficiency (%) of astaxanthin extract in liposomes prepared from different concentration of phospholipid and stored at 4 °C for 8 weeks

Method of mixing	Concentration of phospholipid (%w/v)	Entrapment efficiency (%EE)								
		Day 0	week 1	week 2	week 3	week 4	week 5	week 6	week 7	week 8
homogenization	0.8	89.53 ^{Ca} ±0.38	86.34 ^{Cb} ±0.35	82.99 ^{Dc} ±0.54	81.21 ^{Bd} ±0.40	69.71 ^{Fe} ±0.33	51.08 ^{Df} ±0.43	49.02 ^{Dg} ±0.34	46.06 ^{Dh} ±0.68	44.90 ^{Di} ±0.57
	1.6	90.75 ^{Ba} ±0.47	88.72 ^{Bb} ±0.26	84.73 ^{Bc} ±0.48	81.16 ^{Bd} ±0.32	71.01 ^{Be} ±0.48	48.37 ^{Ef} ±0.38	46.20 ^{Es} ±0.63	43.07 ^{En} ±0.49	41.86 ^{Ei} ±0.49
	2.0	91.65 ^{Aa} ±0.30	89.29 ^{Ab} ±0.34	85.83 ^{Ac} ±0.55	83.38 ^{Ad} ±0.73	83.05 ^{Ad} ±0.51	71.13 ^{Af} ±0.29	69.91 ^{Ag} ±0.60	68.16 ^{Ah} ±0.67	67.48 ^{Al} ±0.81
sonication	0.8	86.14 ^{Ea} ±0.55	84.55 ^{Eb} ±0.10	82.00 ^{Ec} ±1.01	80.76 ^{Cd} ±0.40	72.80 ^{De} ±1.31	61.63 ^{Cf} ±1.27	60.02 ^{Cg} ±0.98	57.69 ^{Ch} ±0.73	56.79 ^{Di} ±1.19
	1.6	88.05 ^{Da} ±0.63	85.05 ^{Dh} ±0.60	83.01 ^{Cc} ±1.33	80.66 ^{Cd} ±0.56	75.08 ^{Ce} ±1.12	64.85 ^{Bi} ±1.24	63.37 ^{Bg} ±0.44	61.24 ^{Bh} ±0.70	60.42 ^{Bi} ±1.30
	2.0	88.24 ^{Da} ±0.72	86.35 ^{Ch} ±0.81	84.80 ^{Bc} ±1.21	83.36 ^{Ad} ±1.61	79.56 ^{Be} ±1.41	71.17 ^{Af} ±0.59	69.95 ^{Ag} ±0.78	68.21 ^{Ah} ±1.31	67.53 ^{Al} ±0.89

^{AB} Value with different letters within a column were significantly (p<0.05) different according to concentration of phospholipid and method of mixing

^{ab} Value with different letters within a row were significantly (p<0.05) different according to storage time

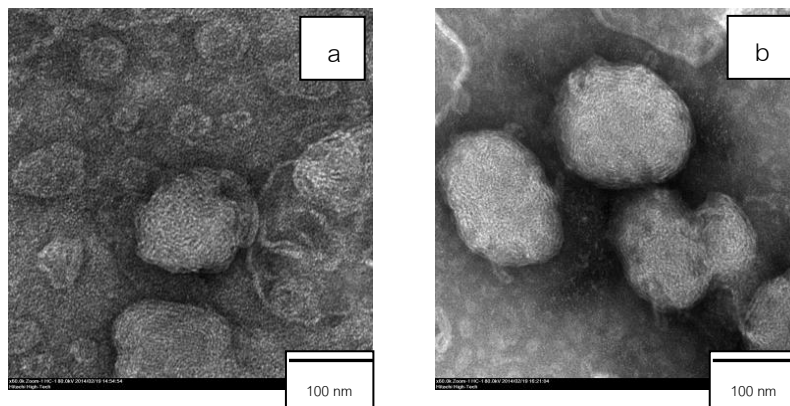


Figure 2 Transmission electron microscope images of liposomes (magnification: 60000x)

(a) liposome made from phospholipid 2.0 %w/v and mixed with homogenizer

(b) liposome made from phospholipid 2.0 %w/v and mixed with sonicator

พบว่าปริมาณของแอสตาแซนทินลดลงเล็กน้อยตลอด 10 วันที่ทำการทดลอง

3) ประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซม

3.1) ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH จัดเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระของสารแอนติออกซิแดนท์ โดยสารแอนติออกซิแดนท์จะทำหน้าที่ให้อนุมูลไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH โดยตรง ส่งผลให้โครงสร้างของอนุมูล DPPH เปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างที่ไม่ใช้อนุมูลอิสระ (Sanchez-Moreno *et al.*, 1999) โดยผลการทดลองเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH แสดงผลการทดลองในค่าของ %Inhibition

ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงดังตารางที่ 2 พบว่าประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดแอสตาแซนทินวันเริ่มต้นมีประสิทธิภาพสูงถึง 81.76% ซึ่งมีประสิทธิภาพที่สูงกว่าสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมในทุกตัวอย่าง และเมื่อเก็บรักษาสารสกัดแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินในไลโปโซมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดแอสตาแซนทินที่

ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซมมีประสิทธิภาพลดลงคิดเป็นร้อยละ 76.7 และเบตาแคโรทีน (positive control) มีประสิทธิภาพลดลงคิดเป็นร้อยละ 79.8 ส่วนสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิพิดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นและปั่นผสมด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชันมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ลดลงในช่วงร้อยละ 48.6-52.5 ส่วนแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นที่ปั่นผสมด้วยวิธีโซโนเคชันมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 43.6-47.9 โดยเฉพาะไลโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิพิดที่ความเข้มข้น 2.0%w/v มีประสิทธิภาพลดลงน้อยที่สุดโดยลดลงเพียงร้อยละ 43.6 และจากผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นแอนติออกซิแดนท์ของสารสกัดแอสตาแซนทินธรรมชาติที่ได้จากเศษเหลือเปลือกกุ้งทั้งที่อยู่ในรูปของสารสกัดและที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมโดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดแอสตาแซนทินมีสมบัติในการเป็น primary antioxidant คือเป็นสารที่สามารถหยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากแอสตาแซนทินมีลักษณะโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยแกนไฮโดรคาร์บอนแบบโพลีอิน (polyene) และปลายทั้งสองข้างเป็นวงแหวนแบบปิดตรงปลายวงแหวนทั้งสองข้างมีออกซิเจนและหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ซึ่งสามารถให้อนุมูลไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ (Liu and Osawa, 2007) ทำให้อนุมูลอิสระเหล่านั้นเปลี่ยนเป็นสารที่มีความเสถียร อีกทั้งลักษณะโครงสร้างแบบโพลีอินสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้

เช่นกัน (Conn *et al.*, 1991) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sowmya and Sachindra (2012) ที่ศึกษาความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ของแอสตาแซนทินที่สกัดจากเปลือกกุ้ง (*Penaeus indicus*) พบว่าแอสตาแซนทินมีประสิทธิภาพในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์สูงกว่าวิตามินอี (α -tocopherol)

3.2) ประสิทธิภาพในการจับโลหะ (ferrous ion chelating)

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะด้วยวิธี ferrous ion chelating (FIC) จัดเป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันในบทบาทการเป็น secondary antioxidant โดยสารต้านออกซิเดชันจะทำให้เหล็กที่จับโลหะ (Fe^{2+}) ที่มีบทบาทในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากขึ้นได้ (Gordon, 1990) โดยประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดแอสตาแซนทินและแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงดังตารางที่ 3 จากผลการทดลอง พบว่าประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดแอสตาแซนทินภายหลังการเตรียมมีประสิทธิภาพเท่ากับ 56.27% ซึ่งให้ค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซม สำหรับ EDTA ซึ่งเป็น positive control มีประสิทธิภาพในการจับโลหะเริ่มต้นเท่ากับ 72.76 และเมื่อเก็บรักษาสารสกัดแอสตาแซนทินและสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมนาน 8 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดแอสตาแซนทินที่ไม่ผ่านการกักเก็บในไลโปโซมมีประสิทธิภาพการจับโลหะลดลงคิดเป็นร้อยละ 55.9 แตกต่างกับแอสตาแซนทินที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม โดยไลโปโซมที่เตรียมจากฟอสโฟลิพิดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นที่ปั่นผสมด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชันมีประสิทธิภาพในการจับโลหะลดลงในช่วงร้อยละ 28.7-43.3 ส่วนไลโปโซมที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นที่ปั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชันมีประสิทธิภาพในการจับโลหะลดลงในช่วงร้อยละ 32.1-41.6 สำหรับ EDTA มีประสิทธิภาพในการจับโลหะลดลงร้อยละ 45.5 อย่างไรก็ตาม โดยรวมพบว่าสารสกัดแอสตาแซนทินมีประสิทธิภาพในการเป็น secondary antioxidant ได้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ

แอสตาแซนทินไม่จำเพาะกับการจับโลหะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Senphan *et al.* (2014) ที่ศึกษาความสามารถในการจับอนุมูล DPPH และความสามารถในการจับโลหะของสารที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง พบว่าสารที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งมีความสามารถในการจับอนุมูล DPPH มากกว่าความสามารถในการจับโลหะ นอกจากนี้ยังพบว่าสมบัติของสารขึ้นอยู่กับสภาวะในการเก็บรักษา ซึ่งจากการทดลองได้ศึกษาสมบัติของสารสกัดแอสตาแซนทินเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำ พบว่าสามารถรักษาสสมบัติของแอสตาแซนทินไว้ได้ ซึ่งมีรายงานสนับสนุนว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของแอสตาแซนทิน โดย Meléndez *et al.* (2006) ได้รายงานว่ปฏิกิริยาการสลายตัวของสารให้สีในกลุ่มแคโรทีนอยด์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การสลายตัวจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและการสลายตัวจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปฏิกิริยาการสลายตัวทั้ง 2 แบบมีอุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิดการสลายตัวได้เร็วขึ้น และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pu *et al.* (2011) ที่ทดลองสกัดแอสตาแซนทินจากเศษเปลือกของกุ้ง (*Litopenaeus setiferus*) แล้วนำไปกักเก็บในโซเดียมเคซีนเตและแล็กโทส จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณแอสตาแซนทินในไมโครแคปซูลมีแนวโน้มลดลงตามอุณหภูมิการเก็บรักษาที่สูงขึ้น โดยมีปริมาณแอสตาแซนทินเหลืออยู่ในไมโครแคปซูลเท่ากับ 12.24, 10.88 และ 9.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

4) ลักษณะโครงสร้างของไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทิน

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของไลโปโซมที่กักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทินซึ่งเตรียมจากวิธีการปั่นผสมที่ต่างกันด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชัน (ภาพที่ 2a) และวิธีโซนิเคชัน (ภาพที่ 2b) พบว่าสามารถทำให้เกิดการจัดเรียงตัวเป็นอนุภาคของไลโปโซมได้ทั้งสองวิธี อย่างไรก็ตามการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชัน มีผลทำให้ลักษณะอนุภาคบางส่วนเกิดการจัดเรียงเป็นไลโปโซมที่ไม่สมบูรณ์ ส่วนไลโปโซมที่ปั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชันให้ลักษณะการจัดเรียงตัวที่สมบูรณ์มากกว่าโดยมีลักษณะ

Table 2 Entrapment efficiency (%) of astaxanthin extract in liposomes prepared from different concentration of phospholipid and stored at 4 °C for 8 weeks

Method of mixing	Concentration of phospholipid (%w/v)	Entrapment efficiency (%EE)								
		Day 0	week 1	week 2	week 3	week 4	week 5	week 6	week 7	week 8
homogenization	0.8	89.53 ^{Ca} ±0.38	86.34 ^{Ch} ±0.35	82.99 ^{Dc} ±0.54	81.21 ^{Bd} ±0.40	69.71 ^{Fe} ±0.33	51.08 ^{Ff} ±0.43	49.02 ^{Dg} ±0.34	46.06 ^{Dh} ±0.68	44.90 ^{Di} ±0.57
	1.6	90.75 ^{Ba} ±0.47	88.72 ^{Bb} ±0.26	84.73 ^{Bc} ±0.48	81.16 ^{Bd} ±0.32	71.01 ^{Ec} ±0.48	48.37 ^{Ef} ±0.38	46.20 ^{Ed} ±0.63	43.07 ^{En} ±0.49	41.86 ^{Ei} ±0.49
	2.0	91.65 ^{Aa} ±0.30	89.29 ^{Ab} ±0.34	85.83 ^{Ac} ±0.55	83.38 ^{Ad} ±0.73	83.05 ^{Ad} ±0.51	71.13 ^{Al} ±0.29	69.91 ^{Ag} ±0.60	68.16 ^{Ah} ±0.67	67.48 ^{Al} ±0.81
sonication	0.8	86.14 ^{Ea} ±0.55	84.55 ^{Eb} ±0.10	82.00 ^{Ec} ±1.01	80.76 ^{Cd} ±0.40	72.80 ^{De} ±1.31	61.63 ^{Cf} ±1.27	60.02 ^{Cg} ±0.98	57.69 ^{Ch} ±0.73	56.79 ^{Cl} ±1.19
	1.6	88.05 ^{Da} ±0.63	85.05 ^{Db} ±0.60	83.01 ^{Cc} ±1.33	80.66 ^{Cd} ±0.56	75.08 ^{De} ±1.12	64.85 ^{Bf} ±1.24	63.37 ^{Bg} ±0.44	61.24 ^{Bh} ±0.70	60.42 ^{Bi} ±1.30
	2.0	88.24 ^{Da} ±0.72	86.35 ^{Ch} ±0.81	84.80 ^{Bc} ±1.21	83.36 ^{Ad} ±1.61	79.56 ^{Ba} ±1.41	71.17 ^{Al} ±0.59	69.95 ^{Ag} ±0.78	68.21 ^{Ah} ±1.31	67.53 ^{Al} ±0.89

^{AB} Value with different letters within a column were significantly (p<0.05) different according to concentration of phospholipid and method of mixing

^{ab} Value with different letters within a row were significantly (p<0.05) different according to storage time

Table 3 Chelating effect on FIC of astaxanthin extract in liposomes prepared from different concentration of phospholipid and stored at 4 °C for 8 weeks

Method of mixing	Concentration of phospholipid (%w/v)	Chelating effect on FIC (%Chelating)								
		Day 0	week 1	week 2	week 3	week 4	week 5	week 6	week 7	week 8
astaxanthin extract	-	56.27 ^{D_a} ±0.37	47.39 ^{D_b} ±0.29	44.61 ^{D_c} ±0.26	39.27 ^{E_d} ±0.52	38.24 ^{D_e} ±0.44	37.63 ^{D_f} ±0.42	33.52 ^{F_g} ±0.36	27.16 ^{G_h} ±0.19	24.82 ^{G_i} ±0.47
homogenization	0.8	51.19 ^{E_a} ±0.23	43.17 ^{E_b} ±0.17	42.17 ^{E_c} ±0.69	41.72 ^{D_d} ±0.29	40.64 ^{C_e} ±0.27	38.17 ^{C_f} ±0.52	37.02 ^{D_g} ±0.63	35.26 ^{D_h} ±0.54	30.28 ^{D_i} ±0.25
	1.6	50.53 ^{F_a} ±0.42	42.74 ^{F_b} ±0.31	40.64 ^{F_c} ±0.31	39.15 ^{E_d} ±0.57	38.32 ^{D_e} ±0.61	36.42 ^{E_f} ±0.17	35.18 ^{E_g} ±0.38	32.65 ^{E_h} ±0.25	28.64 ^{E_i} ±0.64
	2.0	63.47 ^{B_a} ±0.90	60.03 ^{B_b} ±0.54	59.51 ^{A_c} ±0.45	57.62 ^{A_d} ±0.14	56.41 ^{A_e} ±0.39	53.08 ^{A_f} ±0.24	50.43 ^{B_g} ±0.21	47.61 ^{B_h} ±0.35	45.23 ^{B_i} ±0.52
sonication	0.8	44.08 ^{G_a} ±0.31	38.14 ^{G_b} ±0.36	36.47 ^{G_c} ±0.47	35.31 ^{F_d} ±0.18	32.45 ^{E_e} ±0.62	30.23 ^{F_f} ±0.54	29.25 ^{G_g} ±0.15	28.13 ^{F_h} ±0.53	25.75 ^{F_i} ±0.14
	1.6	68.19 ^{A_a} ±0.68	61.73 ^{A_b} ±0.43	58.24 ^{B_c} ±0.32	57.08 ^{B_d} ±0.28	56.15 ^{A_e} ±0.25	53.46 ^{A_f} ±0.36	51.29 ^{A_g} ±0.12	49.38 ^{A_h} ±0.11	46.26 ^{A_i} ±0.33
	2.0	61.49 ^{C_a} ±0.21	55.63 ^{C_b} ±0.54	53.22 ^{C_c} ±0.53	51.65 ^{C_d} ±0.53	49.07 ^{B_e} ±0.41	47.15 ^{B_f} ±0.38	45.65 ^{C_g} ±0.08	44.12 ^{C_h} ±0.49	40.43 ^{C_i} ±0.41

^{A_B} Value with different letters within a column were significantly (p<0.05) different according to concentration of phospholipid and method of mixing

^{a_b} Value with different letters within a row were significantly (p<0.05) different according to storage time

เป็นทรงกลมแสดงในภาพที่ (2b) ซึ่งสอดคล้องกับค่าประสิทธิภาพการกักเก็บแอสตาแซนทินในไลโปโซม โดยไลโปโซมที่ปั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชันนั้นให้ประสิทธิภาพการกักเก็บที่สูงกว่าการปั่นผสมด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชัน

สรุป

การเตรียมไลโปโซมสำหรับกักเก็บสารสกัดแอสตาแซนทิน โดยใช้ฟอสโฟลิพิดที่ความเข้มข้น 2.0 %w/v และปั่นผสมด้วยวิธีโซนิเคชันทำให้ไลโปโซมมีการจัดเรียงตัวที่สมบูรณ์ มีผลให้ประสิทธิภาพการกักเก็บประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH และประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดแอสตาแซนทินลดลงน้อยที่สุด ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น ซึ่งสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซมที่ได้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพทางเลือกใหม่สำหรับผู้บริโภค รวมทั้งกระบวนการผลิตสารสกัดแอสตาแซนทินในไลโปโซม สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการกักเก็บสารสกัดที่มีความคงตัวต่ำชนิดอื่น ๆ ต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

- พิเชต พลายเพชร. 2558. การจัดการทางโภชนาการสำหรับการอนุบาลและการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม. วารสารเกษตร 31(1): 89-105.
- Conn, P.F., W. Schalch and T.G. Truscott. 1991. The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 11, 41-47.
- Dinis, T.C.P., V.M.C. Madeira and L.M. Almeida. 1994. Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, Salicylate and 5-Aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315(1): 161-169.
- Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. *In: B.J.F. Hudson (Ed.), Food antioxidants.* Elsevier Applied Science, England.
- Higuera-Ciajara, I., L. Felix-Valenzuela, F.M. Goycoolea and W. Arguëlles-Monal. 2004. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers* 56: 41-45.
- Kraft, J.C., J.P. Freeling, Z. Wang and R.J.Y. Ho. 2014. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103: 29-52
- Liu, X. and T. Osawa. 2007. *Cis* astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-*trans* isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357:187-193.
- Marsanasco, M., A.L. Márquez, J.R. Wagner, S.V. Alonso and N.S. Chiaramoni. 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International* 44: 3039-3046.
- Meléndez, A., G. Britton, I. Vicario and F. Heredia. 2006. Relationship between the color and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry* 101: 1145-1150.
- Naguib, Y.M.A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1150-1154.
- Peng, C.H., C.H. Chang, R.Y. Peng and C.C. Chyau. 2010. Improved membrane transport of astaxanthine by liposomal encapsulation.

- European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 75: 154-161.
- Pintea, A., H.A. Diehl, C. Momeu, L. Aberle and C. Socaciu. 2005. Incorporation of carotenoid esters into liposomes. Biophysical Chemistry 118: 7-14.
- Pu, J., J.D. Bankston and S. Sathivel. 2011. Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. Biosystems Engineering 108: 121-132.
- Sachindra, N.M., N. Bhaskar and N.S. Mahendrakar. 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. Waste Manage. 26: 1092-1098.
- Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri and F. Saura-Calixto. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wine, grape juices and related polyphenolic constituents. Food Research International 32: 407-412.
- Senphan, T., S. Benjakul and H. Kishimura. 2014. Characteristics and antioxidative activity of carotenoprotein from shells of Pacific white shrimp extracted using hepatopancreas proteases. Food Bioscience 5: 54-63.
- Shen, Q. and S.Y. Quek. 2014. Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. Journal of Food Engineering 123: 165-171.
- Sowmya, R. and N.M. Sachindra. 2012. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by *in vitro* assays and in membrane model system. Food Chemistry 134: 308-314.
- Taksima, T., M. Limpawattana and W. Klaypradit. 2015. Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. LWT - Food Science and Technology 62: 431-437.
- Wu, H.C., H.M. Chen and C.Y. Shiau. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International 36: 949-957.
- Yang, S., Q. Zhou, L. Yang, Y. Xue, J. Xu and C. Xue. 2015. Effect of thermal processing on astaxanthin and astaxanthin esters in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Oleo Science 64: 243-253.
-