Published Online: 24 JUL 2023

การศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดผงโกโก้สายพันธุ์ ชุมพร 1 เพื่อเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

Study of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Cocoa Cake Extract as an Ingredient in Cosmetics

ณัฐกานต์ ใจหาญ
อีเมล: 6351701257@lamduan.mfu.ac.th
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สริตา สังข์ทอง
อีเมล: sarita.san@mfu.ac.th
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากโกโก้เค้ก ระหว่างเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ด้วยวิธีสกัดโดยเครื่องเขย่าความถี่สูง จากการวิจัยพบว่าสารสกัดจากเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 1.50 และ 1.63 ตามลำดับ สารสกัดโกโก้จากเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าเมทานอลร้อยละ 50 อย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 188.99±21.45 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/กรัมตัวอย่าง สารสกัดโกโก้ของตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 50 และเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 33.87±1.02 และ 31.51±1.40 มิลลิกรัมสมมูลเควอเทซิน/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารสกัดมีปริมาณสารคาเทชิน คาเฟอีน และธีโอโบรมีนในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มากที่สุดเท่ากับ 1.28±0.05, 5.80±0.16 และ 25.33±3.79 มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ โดยพบว่าเอทานอลร้อยละ 50 ได้ปริมาณคาเทชินมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดสอบ DPPH radical scavenging พบว่าสารสกัดจากเอทานอลร้อยละ 50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) เท่ากับ 2.23±0.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากเทคนิค FRAP พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เท่ากับ 80.21±0.01 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิก/กรัมตัวอย่าง และจากการนำไปประยุกต์ใช้ในตำรับเซรั่มพบว่าตำรับมีความหนืดลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรพื้น อย่างไรก็ตามมีความคงตัวหลังผ่านสภาวะเร่ง จากการวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้เอทานอลร้อยละ

50 เป็นตัวทำละลายในการสกัดโกโก้เค้กที่มีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยต่อการนำไปใช้ในเครื่องสำอาง

คำสำคัญ: ผงโกโก้, ฟีนอลิกรวม, ฟลาโวนอยด์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

This study aims to compare 2 solvents for phenolic, flavonoids, caffeine, catechin, theobromine extractions and antioxidant activities from cocoa cake by using 50% ethanol and 50% methanol with sonicator. The crude obtained from each solvent is 1.50% and 1.63% respectively. 50% ethanol has total phenolic significantly more than 50% methanol equal to 188.99±21.45 mg GAE/g sample. Flavonoids contents were not significantly different from 50% ethanol and 50% methanol equal to 33.87±1.02 and 31.51±1.40 mg QE/g sample respectively. HPLC analysis reveals the 50% ethanol contains the highest amounts of catechin, caffeine and theobromine were 1.28±0.05, 5.80±0.16 and 25.33±3.79 mg/g sample, respectively. The extract from 50% ethanol has amounts of catechin significantly more than 50% methanol. Cocoa cake extract had antioxidant activities assessed by DPPH radical scavenging with IC_{50} of 50% ethanol contained 2.23±0.03 µg/mL. The FRAP scavenging activity from 50% ethanol had the highest antioxidant activity equal to 80.21±0.01 mg AAE/g sample. Crude from 50% ethanol solvent was applications in serum formulation, it was found that viscosity in serum formulation decreased compared with base formula, however, it's stable after used heating-cooling machine. From this research, using 50% ethanol as an extraction solvent of cocoa cake is efficient and safe for cosmetics formulas.

Keywords: Cocoa Cake, Total Phenolic, Flavonoids, Antioxidant Activities

บทนำ/หลักการและเหตุผล (Introduction)

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ระบุว่าในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยผลิตโกโก้ได้เป็นอันดับ 4 ของทวีปอาเซียน ในช่วงปี พ.ศ. 2559-2563 ประเทศไทยปลูกต้นโกโก้เพิ่มขึ้นร้อยละ 98.39 มีปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 30.62 รวมทั้งมีการส่งออกเมล็ดโกโก้ของไทยเพิ่มขึ้นร้อยละ 809.67 ในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจปลูกโกโก้มากขึ้นและ หวังว่าโกโก้จะเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถสร้างรายได้เสริมจากพืชหลัก ในปี พ.ศ. 2563 มียอดสั่งจองต้นพันธุ์โกโก้ลูกผสมชุมพร

ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรถึง 430,000 ต้น และเนื่องจากการปลูกต้นโกโก้ และผลิตผลิตภัณฑ์โกโก้ที่มากขึ้น (กลุ่มงานวิจัยพืชอุตสาหกรรม, 2563) ทำให้เกิดวัตถุดิบเหลือใช้เพิ่มมากขึ้น เช่น ฝักโกโก้ เนื้อโกโก้ เหงื่อโกโก้ ผงโกโก้ เปลือกโกโก้ และโกโก้เค้ก ซึ่งควรมีการจัดการที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้กระทบกับสภาพแวดล้อมมากเกินไป ซึ่งมีการศึกษานำโกโก้ไปสกัดเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง เนื่องจากในโกโก้มีสารเมทิลแซนทีน สารประกอบฟลาโวนอล และสารประกอบพอลีฟีนอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ สามารถเป็น anti-aging ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้

มีการศึกษาวิจัยตัวอย่างเมล็ดโกโก้จาก มาเลเซีย เวียดนาม และเวเนซุเอลา นำมาคั่วบดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 25 นาที 120 องศาเซลเซียส 25 นาที และ 150 องศาเซลเซียส 20 นาที สกัดด้วยตัวทำละลาย 70%เมทานอล และนำมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วย Folin-Ciocalteu (FC) assay ได้ 1,189.39 -1,803.47 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/ตัวอย่าง 100 กรัม ทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วย aluminium chloride assay ได้ 29.60 – 90.37 มิลลิกรัมสมมูลเควอเทชิน/ตัวอย่าง 100 กรัม ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และ FRAP test ได้ 776.64 – 1897.08 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิก/ตัวอย่าง 100 กรัม และ 841.30 – 894.33 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/ตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ (Siow, 2022) ทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการสกัดสารสำคัญจากโกโก้จากโกโก้เค้กที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากการผลิตเนยโกโก้ (cocoa butter) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ว่าสามารถสกัดสารสำคัญในโกโก้ได้ดีเท่าเมทานอลหรือไม่ เนื่องจากตัวทำละลายเอทานอลมีความปลอดภัยในการใช้ลงตำรับเครื่องสำอางมากกว่าเมทานอล

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu (FC) assay ดัดแปลงจาก (Obeng et al., 2020)

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิคเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออนต่าง ๆ และสารสกัดจากโกโก้เค้กที่ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ปิเปตสารมาตรฐาน หรือสารสกัดโกโก้เค้ก 10-50 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออนต่าง ๆ จนมีปริมาตร 6,000 ไมโครลิตร และเติม Folin & Ciocalteu reagent 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร และน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออนต่าง ๆ 2,000 ไมโครลิตร บ่มต่อ 10 นาที จะเกิดการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนสารละลายใส ให้มีสีเขียว นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดยูวี-วิสซิเบิลที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรทำซ้ำ 3 ครั้ง นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิก และนำค่าการดูดกลืน

แสงของแต่ละสารสกัดมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/กรัมตัวอย่าง

2. วิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ ด้วยเทคนิค aluminium chloride colorimetric assay ดัดแปลงจาก (Obeng et al., 2020)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารเควอเทชิน ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากโกโก้เค้กที่ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ปิเปตสารมาตรฐานหรือสารละลายโกโก้ปริมาตร 100 - 500 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 3,700 ไมโครลิตร เติมโซเดียมไนเตรตร้อยละ 5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมอลูมิเนียมคลอไรด์ร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย 10 วินาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดยูวี-วิสซิเบิลนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเควอเทชิน และนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละสารสกัดมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารเควอเทชิน รายงานเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลเควอเทชิน/กรัมตัวอย่าง

3. วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC

วิเคราะห์ใช้เครื่องรุ่น UHPLC Nexera X2 / 8060 LCMS มีเครื่องตรวจวัดคือ แมสสเปกโทรมิเตอร์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา คือ 30 องศาเซลเซียส Cooler อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเคลื่อนที่มี 2 ชนิด คือ ตัวทำละลาย A: กรดฟอร์มิก ร้อยละ 0.2 และตัวทำละลาย B: อะซิโตนไนไตรล์ โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีมีความสามารถในการแยกสารคาเทชิน คาเฟอีน และธีโอโบรมีนแตกต่างกัน การใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ A และ B ร่วมกันมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนไปตามเวลา ดังนี้ 0-0.3 นาที 90% A, 0.3-2.4 นาที 85% A, 2.4-3.6 นาที 80% A, 3.6-7.0 นาที 5% A, 7.0-11.0 นาที 90% A รายงานเป็นหน่วย ไมโครกรัม/กรัมตัวอย่าง

4. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากผงโกโก้ด้วยเทคนิค DPPH radical scavenging assay ดัดแปลงจาก (Obeng et al., 2020)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล และสารสกัดจากโกโก้เค้กที่ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ปิเปตสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง 10-70 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิด

ยูวี-วิสซิเบิล คำนวณหาค่าร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่าง กับร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซนต์ โดยมีกรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐาน รายงานผลหน่วยเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

5. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากผงโกโก้ด้วยเทคนิค Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจาก (Obeng et al., 2020)

เตรียมสารละลาย Acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง โซเดียมอะซีเตต ละลายด้วยน้ำที่ผ่านการกำจัดไอออนต่าง ๆ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดอะซิติก จนมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.6 TPTZ-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล่าร์ ในไฮโดรคลอริก และ$FeCl_3.6H_2O$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ใน น้ำที่ผ่านการกำจัดไอออนต่าง ๆ หลังจากนั้นเตรียม FRAP Solution โดยการผสม Acetate buffer:TPTZ: $FeCl_3$ ในอัตราส่วน 10:1:1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดโกโก้ที่ละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ปิเปตสารมาตรฐาน และสารตัวอย่าง 10-90 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetate buffer pH 3.6 จนมีปริมาตร 3,000 ไมโครลิตร เติม FRAP reagent 3,000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดยูวี-วิสซิเบิล ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาวาดกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รายงานเป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิก/กรัมตัวอย่าง

6. พัฒนาผลิตภัณฑ์โกโก้ลงในตำรับเครื่องสำอาง

ตั้งตำรับเซรั่มดังตารางที่ 1 ประกอบด้วยสูตรตำรับพื้นและสูตรตำรับที่มีส่วนผสมของสารสกัดโกโก้ และทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับเซรั่มในสภาวะเร่ง โดยเก็บเซรั่มที่สภาวะอุณหภูมิร้อนสลับเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ทุก 24 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ นำเซรั่มตัวอย่างมาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี ความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส ความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด ทั้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 1 ตำรับเซรั่ม Base และ F1

No.	Part	Ingredients	%w/w		Function
			Base	F1	
1		DI water	95.99	95.89	Solvent
2	A	Na_2EDTA	0.01	0.01	Chelating agent
3		Glycerin	1.0	1.0	Humectant
4	B	Butylene glycol	1.0	1.0	Humectant
5		Crude Cocoa	-	0.02	Active
6	C	Polyacrylamide, C13-14 Isoparaffin, Laureth-7	1.0	1.0	Thickener
7	D	Phenoxyethanol, Chlorphenesin, Aqua, Glycerin (Microcare PHC)	1.0	1.0	Preservative
		Total	**100.0**	**100.0**	

7. วิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสองค่าว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่โดยใช้ Pair t-test ดูค่าจากช่อง Sig. (2-tailed) ถ้ามีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าตัวแปรทั้งสองตัวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 และทำการวิเคราะห์ค่าความคงตัวด้วย ANOVA

ผลวิจัย (Results)

การสกัดสารสำคัญจากผงโกโก้ เพื่อประโยชน์ทางเครื่องสำอาง โดยขจัดไขมัน (defatted) โกโก้เค้กด้วยเฮกเซน พบว่าได้ผงโกโก้สีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเฉพาะตัว โดยมีร้อยละผลผลิตต่อโกโก้เค้กเท่ากับ 55.15±0.18 นำผงโกโก้ที่ผ่านการขจัดไขมันแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีร้อยละผลผลิตต่อผงโกโก้ที่ผ่านการขจัดไขมันแล้วเท่ากับ 16.30±0.47 และ 17.63±0.41 ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าโดยรวมสารสกัดจากเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้ สารสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 188.99±21.45 และ 151.23±20.57 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบ

ฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 31.51±1.40 และ 33.87±1.02 มิลลิกรัมสมมูลเควอเทชิน/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดโกโก้

ทดสอบ	ตัวทำละลาย	ปริมาณสาร ± SD
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/กรัมตัวอย่าง)	เอทานอลร้อยละ 50	188.99 ± 21.45[a]
	เมทานอลร้อยละ 50	151.23 ± 20.57[b]
ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมสมมูลเควอเทชิน/กรัมตัวอย่าง)	เอทานอลร้อยละ 50	31.51 ± 1.40[a]
	เมทานอลร้อยละ 50	33.87 ± 1.02[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของแต่ละการทดลอง ที่ค่านัยสำคัญที่ระดับ 0.05

การวิเคราะห์หาปริมาณ คาเฟอีน คาเทชิน และธีโอโบรมีน ด้วยเทคนิค HPLC ดังแสดงผลในตารางที่ 3 พบว่า ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณคาเฟอีน เท่ากับ 5.80±0.16 และ 5.43±0.02 มิลลิกรัมคาเฟอีน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ มีปริมาณคาเทชิน เท่ากับ 1.28±0.05 และ 0.89±0.07 มิลลิกรัมคาเทชิน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และมีปริมาณธีโอโบรมีน เท่ากับ 25.33±3.79 และ 20.08±5.91 มิลลิกรัมธีโอโบรมีน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ Caffeine, Catechin และ Theobromine ของสารสกัดโกโก้

สารมาตรฐาน	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น (µg/mg Sample)
คาเฟอีน	เอทานอลร้อยละ 50	5.80 ± 0.16[a]
	เมทานอลร้อยละ 50	5.43 ± 0.02[a]
คาเทชิน	เอทานอลร้อยละ 50	1.28 ± 0.05[a]
	เมทานอลร้อยละ 50	0.89 ± 0.07[b]
ธีโอโบรมีน	เอทานอลร้อยละ 50	25.33 ± 3.79[a]
	เมทานอลร้อยละ 50	20.08 ± 5.91[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของแต่ละการทดลอง ที่ค่านัยสำคัญที่ระดับ 0.05

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซนต์ เท่ากับ 2.23±0.03 และ 2.34±0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโกโก้

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	สารทดสอบ	ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
DPPH radical scavenging assay (IC_{50}) (µg/mL)	กรดแอสคอบิก	DI water	3.23 ± 0.01 [b]
	สารสกัดโกโก้	เอทานอลร้อยละ 50	2.23 ± 0.03[a]
		เมทานอลร้อยละ 50	2.34 ± 0.08[a]
FRAP ion reducing antioxidant power assay (mg AAE/mg Sample)	สารสกัดโกโก้	เอทานอลร้อยละ 50	80.21 ± 0.01[a]
		เมทานอลร้อยละ 50	67.77 ± 0.73[b]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของแต่ละการทดลองที่ค่านัยสำคัญที่ระดับ 0.05

จากการนำสารสกัดโกโก้ด้วยเอทานอลร้อยละ 50 ไปใส่ในตำรับเซรั่ม ได้เซรั่มสีน้ำตาล และพบว่า ค่าความเป็นกรด-เบส และความข้นหนืดของเซรั่มมีความคงตัว ไม่แตกต่างจากค่าก่อนทำการทดสอบผ่านสภาวะเร่ง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า pH และความหนืดของตำรับ Base และ เซรั่มที่มีสารสกัดโกโก้ (F1) ก่อน-หลังวัด Stability

		Base	F1
pH	ก่อนวัด Stability	6.19 ± 0.01[a]	6.01 ± 0.01[a]
	หลังวัด Stability	5.98 ± 0.01[a]	5.47 ± 0.01[a]
ความหนืด	ก่อนวัด Stability	4625 ± 13[a]	1820 ± 5[a]
	หลังวัด Stability	4847 ± 3[a]	1798 ± 3[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ของแต่ละการทดลองที่ค่านัยสำคัญที่ระดับ 0.05

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ผงโกโก้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์ คาเฟอีน คาเทชิน ธีโอโบรมีน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด เหมาะสำหรับการนำมาเป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

โกโก้เค้กที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกเท่ากับ 188.99 ± 21.45 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/กรัมตัวอย่าง และตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกเท่ากับ 151.23 ± 20.57 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/กรัมตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 แต่มีปริมาณมากกว่างานวิจัยที่ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกรวมจากโกโก้ ในประเทศมาเลเซีย เวียดนามและเวเนซุเอลา สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 70 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 1,189.39-1,803.47 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/ตัวอย่าง 100 กรัม (Siow, 2022).

โกโก้ที่ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 มีค่าเท่ากับ 31.51±1.40 และ 33.87±1.02 มิลลิกรัมสมมูลเควอเทชิน/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่างานวิจัยที่วิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์จากโกโก้ ในประเทศมาเลเซีย เวียดนามและเวเนซุเอลา สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 70 ได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 29.60 – 90.37 มิลลิกรัมสมมูลเควอเทชิน/ตัวอย่าง 100 กรัม (Siow, 2022).

วิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร คาเฟอีน คาเทชิน และธีโอโบรมีน พบว่า โกโก้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีปริมาณคาเฟอีน เท่ากับ 5.80±0.16 และ 5.43±0.02 ไมโครกรัมคาเฟอีน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ มีปริมาณคาเทชิน เท่ากับ 1.28±0.05 และ 0.89±0.07 ไมโครกรัมคาเทชิน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และมีปริมาณธีโอโบรมีน เท่ากับ 25.33±3.79 และ 20.08±5.91 ไมโครกรัมธีโอโบรมีน/มิลลิกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ นำไปทดสอบ pair t-test พบว่าปริมาณคาเฟอีน และธีโอโบรมีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 แต่ปริมาณคาเทชินของสารสกัดโกโก้ทั้งสองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH radical scavenging assay พบว่า กรดแอสคอบิก มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซนต์เท่ากับ 3.23 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดโกโก้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซนต์ เท่ากับ

2.23±0.03 และ 2.34±0.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เทคนิค FRAP พบว่า สารสกัดโกโก้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 และเมทานอลร้อยละ 50 มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 80.21±0.01 และ 67.77±0.73 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอบิก/ตัวอย่าง 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่างานวิจัยที่วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในโกโก้ ในประเทศมาเลเซีย เวียดนามและเวเนซุเอลา สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลร้อยละ 70 ได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 841.30–894.33 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิก/ตัวอย่าง 100 กรัม (Siow, 2022).

จากการวิจัยนี้พบว่าสามารถเป็นแนวทางในการทำมาตรฐานสารสกัดอื่นๆ เพื่อให้การนำสารสกัดโกโก้ไปใช้มีมาตรฐานมากขึ้น และก่อนการนำไปใช้ควรทำการทดสอบการระคายเคือง และประสิทธิภาพของเซรั่มในห้องปฏิบัติการ

รายการอ้างอิง

กลุ่มงานพืชอุตสาหกรรม กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน. (2563). *รายงานการวิจัย เรื่อง สถานการณ์การผลิตโกโก้.* สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

ทิพยา ไกรทอง, หยกทิพย์ สุดารีย์, ไพรัตน์ ช่วยเต็ม,อรทัย ธนัญชัย,ดารากร เผ่าชูและพันธ์ทิพย์ มีสถิตย์. (2565). *คู่มือการผลิตพันธุ์โกโก้ลูกผสมชุมพร 1*. การันตี GUARANTEE.

ปานหทัย นพชินวงศ์. (2564). *การจัดการความรู้ เทคโนโลยีการผลิตโกโก้.* การันตี GUARANTEE.

ลือชัย บุตคุป. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 31,* 443-455.

Accardo, F., Prandi, B., Terenziani, F., Tedeschi, T., & Sforza, S. (2023). Evaluation of in vitro whey protein digestibility in a protein-catechins model system mimicking milk chocolate: Interaction with flavonoids does not hinder protein bioaccessibility. *Food Research International, 169*, 112888.

Bergfeld, W, F., Belsito, D, V., Hill, R, A., Klaassen, C, D., Liebler, D, C., Marks, J, G., . . . Snyder, P, W. (2018, December 3-4). *Safety assessment of methylxanthines as used in cosmetics* [Paper presentation]. Cosmetic Ingredient Review, 1620 L Street, NW, Suite 1200, Washington DC, United States.

Bartella, L., Donna, L. D., Napoli, A., Siciliano, C., & Sindona, G. (2019). A rapid method for the assay of methylxanthines alkaloids: theobromine, theophylline and caffeine, in cocoa products and drugs by paper spray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry, 278*, 261-266.

Cadiz-Gurrea, M. L., Fernandez-Ochoa, A., Leyva-Jimenez, F. J., Guerrero-Munoz, N., Villegas-Aguilar, M. C., Pimentel-Moral, S., . . . Segura-Carretero, A. (2020). LC-MS and spectrophotometric approaches for evaluation of bioactive compounds from Peru cocoa by-products for commercial applications. *Molecules, 25*, 3177.

Cinar, Z., Atanassova, M., Tumer, T. B., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., . . . Pezzani, R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: an updated review. *Journal of Food Composition and Analysis, 103*, 104115.

Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology, 27(2),* 175-94.

Delgado-Ospina, J., Di Mattia, C. D., Paparella, A., Mastrocola, D., Martuscelli, M., & Chaves-Lopez, C. (2020). Effect of fermentation, drying and roasting on Biogenic amines and other biocompounds in Colombian criollo cocoa beans and shells. *Foods, 9*, 520.

Dai, S., Liao, P., Wang, Y., Tian, T. Tong, X., Lyu, B., . . . Wang, H. (2023). Soy protein isolate-catechin non-covalent and covalent complexes: focus on structure, aggregation, stability and in vitro digestion characteristics. *Food Hydrocolloids, 135*, 108108.

Escudero, F. R., Gonzales, S. C., Prior, A. F., Chavez, K. C., Mendoza, J. G., Carmelino, L. F., . . . Munoz, A. M. (2021). Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (Theobromo cocoa L.). *Food Science and Technology, 147,* 111629.

Herman, A., & Herman, A. P. (2012). Caffein's mechanisms of action and its cosmetic Use. *Skin Pharmacol Physiol, 26(1)*, 8-14

Meng, C. C., Jalil, A., & Ismail, A. (2009). Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecule, 14,* 200-209.

Nguyen, V., & Nguyen, N. (2017). Proximate composition, extraction, and purification of theobromine from cocoa pod husk (Theobroma Cocao L). *Technologies, 5,* 14.

Obeng, O., Kpodo, F. M., Tettey, C. O., Essuman, E. K., & Adzinyo, O. A. (2020) Antioxidant, total phenols and proximate constituents of four tropical leafy vegetables. *Scientific African, 7,* e00227.

Oracz, J., & Nebesny, E. (2016). Antioxidant properties of cocoa beans (Theobroma cacao L.) : influence of cultivar and roasting conditions. *International Journal of Food Roperties, 19,* 1242–1258.

Sauzo, Y., Davidov-pardo, G., & Arozarena, I. (2014). Effect of fermentation and roasting on the phenolic concentration and antioxidant activity of cocoa from nicaragua. *Journal of Food Quality, 37,* 50-56.

Siow, C. S., Wei, E., Chan, C., Wong, C. W., & Chee, W. N. (2022). Antioxidant and sensory evaluation of cocoa (Theobroma cocoa L.) tea formulated with cocoa bean hull of different origins. *Future Foods, 5,* 100108.

Teng, J., Yan, C., Zeng, W., Zhang, Y., & Huang, Y. (2020). Purification and characterization of theobromine synthase in a theobromine-enriched wild tea plant (Camellia gymnogyna Chang) from Dayao Mountain, China. *Food Chemistry, 311,* 125875.