Published Online: 16 JUN 2025

การเปรียบเทียบสาระสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดและกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้า

Comparison of active constituents and antioxidant activities of spent and fresh robusta and arabica coffee and coffee extracts

ศวิตา จรวงษ์
อีเมล: 6451701289@lamduan.mfu.ac.th
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ดร.นภัตสร ดิษฐาวุฒิกุล
อีเมล: naphatsorn.kum@mfu.ac.th
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

กากกาแฟเป็นส่วนที่เหลือทิ้งมากที่สุดในอุตสาหกรรมการผลิตกาแฟกระป๋อง และธุรกิจร้านกาแฟที่เกิดขึ้นอย่างแพร่หลาย ซึ่งในปัจจุบันมีการนำกากกาแฟมาใช้ประโยชน์โดยพัฒนาทั้งรูปแบบและวิธีการใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่าของกาก กาแฟที่เหลือทิ้งเหล่านี้ให้ได้มากที่สุด มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ากากกาแฟมีสารสำคัญจำนวนหลากหลายกลุ่มที่เป็นประโยชน์ในการดูแลผิวพรรณ และมีศักยภาพในการใช้ในทางเครื่องสำอาง โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ระหว่างสารสกัดกาแฟ และกากกาแฟ สายพันธุ์อาราบิก้า และสายพันธุ์โรบัสต้า โดยนำผงกาแฟที่ไม่ผ่านการชง และการผ่านชงด้วยเทคนิคการดริป มาอบแห้ง แล้วสกัดด้วยการแช่หมักกับสารละลาย 95% เอธานอล ก่อนนำไประเหยตัวทำละลายออกจนได้สารสกัดหยาบ จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่าสารสกัดจากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดคือ 1.20 ± 0.04 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกสมมูลย์ (กส) ต่อสารสกัด 1 มิลลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันกับสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (1.05 ± 0.07 มคก. กส/มล.) และ สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า (1.00 ± 0.02 มคก. กส/มล.) เมื่อทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ สารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้ามีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (0.43 ± 0.00 ไมโครกรัมของเควอร์ซิตินสมมูลย์ (คส) ต่อสารสกัด 1 มิลลิตร) ซึ่งไม่แตกต่างกันกับสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (0.39 ± 0.00 มคก. คส/มล.) และ สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า (0.38 ± 0.00 มคก. คส/มล.) เมื่อนำสารสกัดจากกาแฟทั้ง 4 ชนิด ไปทดสอบหาปริมาณคาเฟอีน พบว่าสารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีปริมาณคาเฟอีนสูงที่สุด (0.73 ± 0.01 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ต่อมาเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และเอบีทีเอส

กลับพบว่าสารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ในทั้งสองอนุมูลอิสระ จากผลการทดลองพบว่า กากกาแฟอาราบิก้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมไม่แตกต่างจากเมล็ดกาแฟที่ยังไม่ผ่าน การชง และสารสกัดจากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อต่อต้านอนุมูลอิสระและชะลอวัยต่อไป โดยควรมีการศึกษาในด้านการตั้งตำรับประเมินความคงตัวของตำรับ และทดสอบประสิทธิภาพในอาสาสมัครต่อไป

คำสำคัญ : กาแฟ, กากกาแฟ, อาราบิก้า, โรบัสต้า, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, คาเฟอีน

Abstract

In the widespread canned coffee and coffee shop industry, spent coffee grounds constitute the largest portion of waste. Presently, efforts are being made to innovate both the forms and methods of utilizing coffee grounds in order to maximize their value. Previous research indicated that both coffee and spent coffee grounds contain various bioactive compounds that are advantageous for skin care and have potential applications in the cosmetics industry. This research was aimed to analyze and compare the content of bioactive compounds and antioxidant activities presented in Arabica and Robusta coffee extracts and their spent coffee grounds. In this study, fresh coffee and spent coffee ground, which produced by coffee drip technique were dried and then extracted with 95% ethanol using the maceration technique. The solvent was removed to obtain crude extracts. Analysis of total phenolic compounds revealed that the Arabica coffee extract exhibited the highest concentration, with 1.20 ± 0.04 micrograms of gallic acid equivalent (GAE) per milliliter. This concentration was statistically indistinguishable from that of Arabica coffee grounds extract (1.05 ± 0.07 µg GAE/ml) and Robusta coffee extract (1.00 ± 0.02 µg GAE/ml). Similarly, the total flavonoid content analysis indicated that Arabica coffee extract contained the highest flavonoid concentration (0.43 ± 0.00 µg of quercetin equivalent (QE) per milliliter), which was not significantly different from Arabica coffee grounds extract (0.39 ± 0.00 µg QE/ml) and Robusta coffee grounds extract (0.38 ± 0.00 µg QE/ml). Antioxidant activity tested using the DPPH method showed that Robusta coffee extract had the highest DPPH radical scavenging activity at 0.23 ± 0.00 µg ascorbic acid

equivalent (AAE)/mL, followed by Arabica coffee extract at 0.26 ± 0.00 µg AAE/mL, Robusta coffee grounds extract at 0.35 ± 0.00 µg AAE/mL, and Arabica coffee grounds extract at 0.40 ± 0.00 µg AAE/mL. In the ABTS antioxidant activity test, Robusta coffee extract showed the highest activity at 0.05 ± 0.01 mg AAE/mL, followed by Arabica coffee extract at 0.10 ± 0.00 mg AAE/mL, Robusta coffee grounds extract at 0.12 ± 0.00 mg AAE/mL, and Arabica coffee grounds extract at 0.19 ± 0.00 mg AAE/mL.

Robusta coffee extract was found to contain the highest caffeine content (0.73 ± 0.01 %w/w) and exhibited the strongest antioxidant activity, as determined by DPPH and ABTS assays. Additionally, spent Arabica coffee grounds showed comparable levels of total phenolic and flavonoid compounds to unbrewed beans, suggesting the potential use of Robusta extract in the development of cosmetic products with antioxidant and anti-aging properties; further research should focus on product formulation, stability, and efficacy evaluation in human subjects.

Keywords: Coffee, Coffee Grounds, Arabica, Robusta, Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, Antioxidant Activity, Caffeine Content

บทนำ

ปัจจุบันแนวโน้มการบริโภคการแฟของคนไทยมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งส่งผลให้ธุรกิจกาแฟขยายตัวขึ้นเป็นวงกว้าง โดยผลจากการขยายตัวของธุรกิจกาแฟ ทำให้มีเศษเหลือทิ้งจากการชงกาแฟเพิ่มมากขึ้น และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่ากากกาแฟมีสารพฤกษเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น กลุ่มพอลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และมีรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงนำไปสู่การประยุกต์ใช้สารสกัดจากกาแฟ และกากกาแฟในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว กลุ่มลดเลือนจุดด่างดำ และกลุ่มชะลอวัยผ่านกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงคาเฟอีนที่เป็นองค์ประกอบ เมื่อนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับเส้นผม จะเป็นประโยชน์ในการดูแลผมให้แข็งแรงและลดผมร่วง

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาผู้วิจัยจึงสนใจได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ คาเฟอีน และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัด กาแฟและกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและสายพันธุ์โรบัสต้า ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์เพื่อให้ผู้ที่สนใจนำไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเส้นผมต่อไป และเพื่อลดปริมาณของเสียกาแฟเหลือทิ้ง เพิ่มมูลค่าให้แก่กากกาแฟ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดกาแฟและกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสายพันธุ์โรบัสต้า
2. เพื่อศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดกาแฟและกากกาแฟ

ขอบเขตของการศึกษา

1. สกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้าโดยกระบวนการดริป
2. ประเมินปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและสายพันธุ์โรบัสต้า
3. ทดสอบสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดกาแฟ

การทบทวนวรรณกรรม

กาแฟ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Coffea spp.* ในประเทศไทยมีการปลูกกาแฟ 2 สายพันธุ์เป็นหลัก ได้แก่ พันธุ์อาราบิก้า (Arabica) *Coffea arabica* L. และ พันธุ์โรบัสต้า (robusta) *Coffea robusta* Pierre ex Froehner L. ต้นกาแฟจัดเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 3 ถึง 5 เมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์กาแฟของแต่ละพันธุ์

เมล็ดกาแฟอาราบิก้ากับเมล็ดกาแฟโรบัสต้านั้นต่างกัน ตั้งแต่พื้นที่การเพาะปลูก ซึ่งอาราบิก้านิยมปลูกในพื้นที่ภาคเหนือ มีรูปทรงรี และโรบัสต้านิยมปลูกพื้นที่ภาคใต้จะมีรูปทรงกลม โดยกลิ่นหอม รสชาติของความเข้มข้น ความหวาน ความเปรี้ยวจะต่างกันอย่างชัดเจน จึงทำให้กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าที่มีความละมุนมากกว่า เป็นที่นิยมในร้านอาหารสำหรับเตรียมเครื่องดื่ม แต่กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าที่มีความเข้มมากนั้นจะถูกนำไปแปรรูปเป็นกาแฟสำเร็จรูป เช่น กาแฟกระป๋อง

กาแฟมีสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อร่างกายมากกว่า 300 ชนิด สารหลักที่สำคัญ เช่น คาเฟอีน สารประกอบฟีนอลิก กรดแทนนิก ไนอาซิน โดยสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สาคัญ คือ เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันนอกจากนี้ยังเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ (Anti-mutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (Free Radical) โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะ ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว และในทางเครื่องสำอางสารประกอบฟีนอลิกสามารถใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ เพื่อช่วยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในผิวหนัง ซึ่งจะช่วยเซลล์ผิวหนัง เนื้อเยื่อและเส้นใยคอลลาเจน อิลาสตินในผิวให้ถูกทำลายน้อยลง จึงมีผลทำให้ช่วยชะลอการแก่ของผิวหนังได้

กากกาแฟ คือ เศษที่ได้จากการคั่วบดกาแฟที่สกัดผ่านน้ำร้อน โดยการชงกาแฟสดแต่ละครั้งจะไม่นำกากกาแฟที่ได้มาชงซ้ำเนื่องจากทำให้กลิ่น คาเฟอีน และรส มีคุณภาพที่ต่ำลง กากกาแฟ

จัดเป็นสารอินทรีย์ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปกาแฟและร้านกาแฟ ซึ่งกากกาแฟจัดว่าเป็นกากของเสียที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และนำไปสู่ภาวะโลกร้อน เนื่องจากมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และมีเทนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก หากมีการทิ้งลงสู่แหล่งน้ำจะส่งผลให้ค่า Biological Oxygen Demand (BOD) หรือ ค่าปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์สารที่มีอยู่ในน้ำมีปริมาณสูงขึ้น และหากจัดการไม่ดีจะกลายเป็นแหล่งสะสมของเชื้อราและแบคทีเรียต่างเป็นอันตรายต่อมนุษย์ โดยปกติกากกาแฟจะถูกทิ้งในภายหลังจากการสกัดเพื่อให้ได้น้ำกาแฟ กากกาแฟมีเนื้อสัมผัสที่มีความหยาบสามารถนำมาใช้เป็นสครับแทนเกลือขัดเซลล์ผิว เป็นการผลัดเซลล์ผิวสามารถผสมขมิ้น น้ำผึ้ง น้ำนม โยเกิร์ต เพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบำรุงผิว

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกาแฟ

นำเมล็ดกาแฟเทพเสด็จ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ สายพันธุ์อาราบิก้า และเมล็ดกาแฟชุมพร บ้านถ้ำสิงห์ อ.เมือง จ.ชุมพร สายพันธุ์โรบัสต้า มาบดด้วยเครื่องบดมือ Ricco S1 Hand Grinder และ นำผงกาแฟที่ได้จากเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสายพันธุ์โรบัสต้า เข้าตู้อบลมร้อนเพื่อให้ผงกาแฟแห้งสนิท หลังจากนั้นนำผงกาแฟมาชั่งที่เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง เมื่อตัวเลขน้ำหนักของผงกาแฟที่นำมาชั่งหลังการอบมีตัวเลขที่คงที่ จึงจะสามารถนำมาใช้ต่อได้

2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดกากกาแฟ

โดยกากกาแฟที่นำไปใช้นั้นได้จากการนำเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสายพันธุ์โรบัสต้า ชั่งด้วย Timemore Black Mirror รุ่น Basic Plus ตาชั่งดิจิตอล โดยใช้ปริมาณ 10 กรัม หลังจากนั้นบดด้วยเครื่องบดมือ Ricco S1 Hand Grinder ด้วยความละเอียดเบอร์ 8 วางบนกระดาษกรองกาแฟ Hario V60 เบอร์ 02 ที่เตรียมไว้บน Hario V60 Ceramic Dripper เบอร์ 02 และรองด้วยแก้ว หลังจากนั้นค่อย ๆ เทน้ำที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส ลงไปช้า ๆ เป็นเวลา 3 นาที โดยใช้น้ำปริมาณ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำกากกาแฟที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อกากกาแฟเย็นตัวลง นำเข้าตู้อบลมร้อน จนกากกาแฟแห้งสนิท คำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบ (% Yield Crude Extract) ตามสูตรคำนวณ และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนทำการทดสอบต่อไป

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรสดที่ใช้}} \times 100$$

3. การสกัดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย (Maceration)

ชั่งสารสกัดกาแฟและสารสกัดกากกาแฟอบแห้งจากข้อ 2 โดยมีสัดส่วนของผงกาแฟต่อปริมาณตัวทำละลายคือ 1 : 10 โดยน้ำหนัก ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย ethanol 95% ลงไป 100 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดลูกชมพู่ด้วยจุกคอร์ก แล้วพัน Parafilm ให้แน่น จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลายที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการกรองกากที่เป็นกากกาแฟออกจากสารละลาย ด้วยกรวยกรอง Buchner Funnel Porcelain กระดาษกรอง Waterman®, No.1 หลังจากนั้นนำส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนได้สารสกัดหยาบ (Crude Extract) (ดัดแปลงมาจากวิธี ของ Safdar et al., 2017)

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Compound)

เตรียมสารสกัดหยาบกาแฟและกากกาแฟที่สกัดได้ ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปีเปตสารละลายสารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ลงไป 2 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 (7 % น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานของ gallic acid (ดัดแปลงมาจากวิธีของ สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ, 2558)

5. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content)

เตรียมสารสกัด 5 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย 95% เอทานอล ให้ได้ 1 มิลลิลิตร เตรียมโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 15 (w/v) โดยชั่ง $NaNO_2$ 7.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วย DI Water ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เตรียมอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 15 (w/v) โดยชั่ง $AlCl_3$ 7.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วย DI Water ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสุดท้ายเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้นร้อยละ 8 (w/v) โดยชั่ง NaOH 4 กรัม ปรับปริมาตรด้วย DI Water ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาผสมตามสัดส่วน และนำใส่หลุม96 Well Microtiter Plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ที่เครื่อง Microplate Reader นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์เซตินและรายงานผลในหน่วยไมโครกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mgQE/gDW)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนสารสำหรับการสร้างกราฟเพื่อวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัด

	Blank	**หลอดที่ 1**	**หลอดที่ 2**
Extract (μl)	-	50	100
95% Ethanol (μl)	1000	950	900
15% $NaNO_2$ (μl)	50	50	50
	บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง		
15% $AlCl_3$ (μl)	150	150	150
	บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง		
8% NaOH (μl)	700	700	700
	บ่มในที่มืดเป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง		
Total Volume (μl)	1900	1900	1900

6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl) Assay

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ ascorbic acid 1 มิลลิกรัม ใน DI Water 10 มิลลิลิตร (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ชั่ง DPPH 8 มิลลิกรัมใน 95% เอทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานโดยการผสมสารตามสัดส่วน ดังตารางที่ 2 ลงไปในหลุม96 well microtiter plate เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ที่เครื่อง microplate reader จากนั้นทำการคำนวณหาค่า %scavenging และทำการพลอตกราฟระหว่าง %Scavenging กับความเข้มข้นของ ascorbic acid จากนั้นคำนวณหาค่า SC_{50} จากกราฟ (ดัดแปลงมาจากวิธีของ สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ, 2558)

ตารางที่ 2 อัตราส่วนสารสำหรับการสร้างกราฟต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกาแฟและกากกาแฟ สายพันธุ์อาราบิก้า และโรบัสต้า ด้วยวิธี DPPH

	Blank	**Control**	**หลอดที่ 1**	**หลอดที่ 2**	**หลอดที่ 3**	**หลอดที่ 4**	**หลอดที่ 5**	**หลอดที่ 6**
Extract (μl)	-	-	10	30	50	70	90	100
95% Ethanol (μl)	200	100	90	70	50	30	10	-
DPPH (μl)	-	100	100	100	100	100	100	100
Total Volume (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (2-2´- azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) Assay

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย potassium persulfate ในอัตราส่วน 2:1 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ทดสอบ หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เพื่อให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการกำหนดหาฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ที่แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานโดยการผสมสารตามสัดส่วน ดังตารางที่ 3 ลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นดูดสารละลายแต่ละหลอดลงหลุม96 well microtiter plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นทำการคำนวณหาค่า %scavenging และทำการพลอตกราฟระหว่าง %scavenging กับความเข้มข้นของ ascorbic acid จากนั้นคำนวณหาค่า SC50 จากกราฟ

ตารางที่ 3 อัตราส่วนสารสำหรับการสร้างกราฟต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกาแฟและกากกาแฟ สายพันธุ์อาราบิก้า และโรบัสต้า ด้วยวิธี ABTS

	Blank	Control	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5	หลอดที่ 6
Extract (μl)	-	-	10	30	50	70	90	100
95% Ethanol (μl)	200	100	90	70	50	30	10	-
ABTS (μl)	-	100	100	100	100	100	100	100
Total Volume (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200

8. การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในสารสกัด

สร้างกราฟมาตรฐานของคาเฟอีน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งคาเฟอีน 1 มิลลิกรัม เติม 95% เอทานอล ให้เต็ม 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมคาเฟอีนที่ได้ กับ 95% เอทานอลใส่ในหลอดทดลอง ดังตารางที่ 4 จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis) กราฟเส้นตรงนี้จะใช้เป็นเส้นโค้งมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในสารสกัดกาแฟ คำนวณความเข้มข้นของคาเฟอีนจากสารสกัดโดยการดูดกลืนแสงตัวอย่างและสมการเชิงเส้น หลังจากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัด 1 มิลลิกรัม เติม 95% เอทานอล ให้เต็ม 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง ผสมกับเติม

95% เอทานอล ตามสัดส่วน จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ 273 นาโนเมตร และนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

ตารางที่ 4 อัตราส่วนสารสำหรับการสร้างกราฟของสารสกัดจากกาแฟและกากกาแฟ สายพันธุ์อาราบิก้า และโรบัสต้า

	Blank	**หลอดที่ 1**	**หลอดที่ 2**	**หลอดที่ 3**	**หลอดที่ 4**	**หลอดที่ 5**	**หลอดที่ 6**	**หลอดที่ 7**
Extract (μl)	-	10	20	30	40	50	100	200
95% Ethanol (μl)	1000	990	980	970	960	950	900	800
Total Volume (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

9. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล (Microsoft excel) เวอร์ชั่น 2010 สำหรับการคำนวณค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SE) และ หาค่าทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เพื่อนำค่าของข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดกาแฟ และกากกาแฟ สายพันธุ์อาราบิก้า และสายพันธุ์โรบัสต้าว่าผลที่ได้ สารสกัดใดที่ให้ค่าที่ดีกว่ากันเพื่อเป็นตัวเลือกในการตัดสินใจพัฒนาต่อยอดทางด้านเครื่องสำอาง

ผลการวิจัย

การเตรียมสารสกัดจากกาแฟคั่วสายพันธุ์อาราบิก้า โรบัสต้า และ กากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า โรบัสต้า โดยการนำผงกาแฟที่อบแห้งมาสกัดด้วยการแช่หมัก (maceration) ด้วยสารละลาย 95% เอทานอล โดยแช่สารทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker) โดยความเร็ว 150 รอบต่อนาที(rpm) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสารที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำส่วนที่เป็นสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ ที่มีลักษณะเข้มหนืด มีน้ำตาลเข้มและมีกลิ่นกาแฟ โดยค่าร้อยละของผลที่ได้ (% yield) แสดงดังตารางที่ 5 โดยพบว่า กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีค่าร้อยละของผลได้สูงที่สุด และ กากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีค่าร้อยละของผลได้ต่ำที่สุด

ตารางที่ 5 ปริมาณสารสกัด และ %yield ต่อน้ำหนักของสารสกัด ของสารสกัดกาแฟและกากกาแฟจากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และโรบัสต้า

สารสกัด	%yield ต่อน้ำหนักของสารสกัด
กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	12.07 ± 0.05%
กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	16.64 ± 0.29%
กากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	11.35 ± 0.39%
กากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	9.83 ± 0.07%

หมายเหตุ ข้อมูลของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและสายพันธุ์โรบัสต้าที่ได้มาจากการทดสอบ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดที่ได้ แสดงผลในตารางที่ 6 จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด คือ 1.20 ± 0.04 μg GAE/ml extract รองลงมาคือ สารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า และสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด และพบว่าสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด คือ 0.43 ± 0.002 μg CE/ml extract รองลงมาคือ สารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า และสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า สารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิก (μg GAE/ml extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (μg CE/ml extract)
กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	1.20 ± 0.04^{a}	0.43 ± 0.00^{a}
กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	1.00 ± 0.02^{b}	0.38 ± 0.00^{b}
กากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	1.05 ± 0.07^{b}	0.39 ± 0.00^{c}
กากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	0.64 ± 0.03^{c}	0.35 ± 0.00^{d}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), n=3

ผลการประเมินการต้านอนุมูลอิสระแสดงดังตารางที่ 7 พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH สูงสุด คือ สารสกัดกาแฟคั่วสายพันธุ์โรบัสต้า โดยมีค่าความเข้มข้นของการกำจัด

อนุมูลอิสระร้อยละ 50 (SC_{50}) เท่ากับ 0.23 ± 0.00 mg/ml และน้อยที่สุดคือสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า เท่ากับ 0.40 ± 0.00 mg/ml ตามลำดับ และ สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ ABTS สูงสุดคือสารสกัดกาแฟคั่วสายพันธุ์โรบัสต้า โดยมี SC_{50} เท่ากับ 0.05 ± 0.01 mg/ml สารสกัดกาแฟคั่วสายพันธุ์อาราบิก้าสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า และน้อยที่สุดคือสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า เท่ากับ 0.19 ± 0.00 mg/ml ตามลำดับซึ่งให้ผลสอดคล้องกัน

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัด	Antioxidant activity DPPH (SC_{50}; mg/ml)	Antioxidant activity ABTS (SC_{50}; mg/ml)
กากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	0.40 ± 0.00[a]	0.19 ± 0.01[a]
กากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	0.35 ± 0.00[b]	0.12 ± 0.00[b]
กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	0.26 ± 0.00[c]	0.10 ± 0.00[c]
กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	0.23 ± 0.00[d]	0.05 ± 0.00[d]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), n=3

ผลการทดสอบปริมาณคาเฟอีนพบว่าสารสกัดที่มีปริมาณคาเฟอีนสูงสุดคือสารสกัดกาแฟคั่วสายพันธุ์โรบัสต้า เท่ากับ 0.45 ± 0.01 mg/mL สารสกัดกาแฟคั่วสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า และน้อยที่สุดคือสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า เท่ากับ 0.23 ± 0.02 mg/mL ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบปริมาณคาเฟอีนในสารสกัดของสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า สารกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า

สารสกัด	Amount of caffeine in the extract (mg/mL)
กาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	0.73 ± 0.01[a]
กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	0.45 ± 0.01[b]
กากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า	0.30 ± 0.01[c]
กากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า	0.23 ± 0.02[d]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$), n=3

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษา พบว่าสารสกัดจากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jimena et al. (2011) ที่ระบุว่ากาแฟเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิกที่หลากหลาย โดยเฉพาะกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น เควอซิติน ทั้งนี้ผลการศึกษาของ Aisyah et al. (2022) และ Khoirul et al. (2023) ซึ่งใช้เควอซิตินเป็นมาตรฐาน ยังชี้ให้เห็นว่ากาแฟสายพันธุ์อาราบิก้ามีศักยภาพด้านสารต้านอนุมูลอิสระสูง โดยเฉพาะเมื่อใช้เอทานอล 95% เป็นตัวสกัด อย่างไรก็ตาม เมื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดจากกาแฟคั่วสายพันธุ์โรบัสต้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสายพันธุ์อาราบิก้า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Danijela et al. (2022) ที่พบว่ากาแฟโรบัสต้ามีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าอาราบิก้าประมาณร้อยละ 30 ในส่วนของปริมาณคาเฟอีน ผลการศึกษาพบว่า สายพันธุ์โรบัสต้ามีปริมาณคาเฟอีนสูงกว่าอาราบิก้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รัตนาภรณ์ วงศ์ประโคน และคณะ (2562) และ Bobková et al. (2020) ที่ระบุว่ากาแฟสายพันธุ์โรบัสต้ามีปริมาณคาเฟอีนสูง และมีความคงตัวต่อความร้อนจากกระบวนการคั่วมากกว่าอาราบิก้า จากข้อมูลดังกล่าว อาจสรุปได้ว่า แม้กาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเชิงปริมาณมากกว่า แต่สายพันธุ์โรบัสต้ากลับแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองพัฒนาตำรับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า สารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า
2. ควรศึกษาความคงตัวทางกายภาพและทางเคมีของสารสกัดกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า สารสกัดกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้า สารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า และสารสกัดกากกาแฟสายพันธุ์โรบัสต้าในสภาวะต่าง ๆ
3. ควรศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อต่าง ๆ เมื่อนำสารสกัดกากกาแฟมาใช้ในตำรับ
4. ควรมีการศึกษาความปลอดภัยและประสิทธิภาพของตำรับที่ใช้สารสกัดกาแฟ และกากกาแฟในอาสาสมัคร

รายการอ้างอิง

รัตนาภรณ์ วงศ์ประโคน, อุทัย วงศ์สุวรรณ, และนิพนธ์ โชคประสิทธิ์. (2562). การเปรียบเทียบปริมาณคาเฟอีนในกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้าในจังหวัดเลย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 50(3), 123–130.

สุชาดา มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABIS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. *Advanced Science, 15*(1), 106-117.

Aisyah, S., Pramitasari, D. A., & Saputri, R. D. (2022). การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในกาแฟโดยใช้เควอซิตินเป็นสารมาตรฐาน. Journal of Applied Chemistry, *14*(2), 100–107.

Bobková, A., Demianová, A., & Belej, Ľ. (2020). The effect of roasting on the antioxidant properties of Arabica and Robusta coffee. Molecules, *25*(3), 567.

Danijela, D., Matic, M., & Cvetkovic, D. (2022). Influence of roasting on polyphenols, antioxidant capacity and caffeine content in Arabica and Robusta coffee. Foods, *11*(19), 3016.

Khoirul, A., Hidayat, A. R., & Purnamasari, R. D. (2023). การเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างกาแฟโรบัสต้าและอาราบิก้า. KOVALEN: Jurnal Riset Kimia, *9*(3), 241–249.

Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(3), 488-500.