



การประเมินสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ชีวภาพทางเครื่องสำอาง
จากวัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้
ASSESSMENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND COSMETIC
BIOACTIVITIES FROM COCOA BEAN RESIDUES

หฤทชนา บุญรอดกลับ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การประเมินสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ชีวภาพทางเครื่องสำอาง
จากวัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้
ASSESSMENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AND COSMETIC
BIOACTIVITIES FROM COCOA BEAN RESIDUES

หฤทษญา บุญรอดกลับ

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

การค้นคว้าอิสระเรื่อง การประเมินสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ชีวภาพทางเครื่องสำอางจากวัสดุ
เศษเหลือเมล็ดโกโก้

Assessment of Phenolic Compounds and Cosmetic Bioactivities from
Cocoa Bean Residues

ผู้ประพันธ์ ฤทธิชญา บุญรอดกลับ

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีชะแย้ม

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ)

คณบดี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสิจิตรประภา)

กิตติกรรมประกาศ

ในโอกาสที่ผลงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอแสดงความขอบคุณอย่างสูงแด่ผู้ที่มีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือตลอดกระบวนการ ดังนี้

ก่อนอื่น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ ที่ปรึกษางานวิจัยนี้ ซึ่งได้มอบคำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และการติดตามประเมินผลในการวางแผนการทดลอง วิเคราะห์ผล และเรียบเรียงผลงานจนก้าวสู่ความสำเร็จ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง รวมทั้งอาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ เจ้าหน้าที่ และบุคลากรทุกท่านที่ให้ความรู้ ให้ได้ปฏิบัติจริง และแนะนำช่วยเหลืออำนวยความสะดวก ขอขอบพระคุณเพื่อนนักศึกษา สำหรับการแลกเปลี่ยนความคิดเห็น ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจซึ่งเป็นแรงสนับสนุนสำคัญในระหว่างการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ กลุ่มโกโก้นางัว ต.นางัว อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ ที่อนุเคราะห์จัดหาวัตถุดิบ ได้แก่ เมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติพร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือด้านภาคสนาม ข้อมูล และความร่วมมือในการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่วิจัย ทดลอง สิ่งอำนวยความสะดวก และการอำนวยความสะดวกในการทดลอง

ด้วยความเคารพอย่างสูง ขอขอบพระคุณค่ะ

หฤทษญา บุญรอดกลับ

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	การประเมินสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ชีวภาพทางเครื่องสำอางจากวัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้
ผู้ประพันธ์	หฤทฤษฎา บุญรอดกลับ
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพการเป็นสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางของวัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้ ได้แก่ เมล็ดโกโก้แฉก เมล็ดโกโก้ลิบ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ เปรียบเทียบกับเมล็ดโกโก้ปกติ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า สารสกัดเปลือกเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ปกติมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (269.09 ± 1.85 และ 260.87 ± 15.26 mg GA/g extract ตามลำดับ) สารสกัดเมล็ดโกโก้ปกติมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (260.16 ± 13.09 mg QE/g extract) ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าเมล็ดโกโก้ปกติมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (179.85 ± 1.89 และ 346.58 ± 8.31 mg TE/g extract ตามลำดับ) ในขณะที่สารสกัดเมล็ดโกโก้แฉกมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงที่สุดอยู่ที่ $591.394 \pm 12.69a$ mg kojic acid/g extract ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งว่าสารสกัดทุกชนิดมีความปลอดภัยสูงต่อเซลล์ โดยมีค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่า 100 ที่น่าสนใจคือเมล็ดโกโก้แฉกแสดงศักยภาพทางชีวภาพที่โดดเด่นและครบถ้วนที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อยู่ที่ 0.100 ± 0.000 mg/ml นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ปกป้องและกระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ได้สูงสุดถึงร้อยละ 170.01 ± 12.86 ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวัสดุเศษเหลือของเมล็ดโกโก้ โดยเฉพาะเมล็ดโกโก้แฉก มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางธรรมชาติที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการสร้างเมลานิน และช่วยฟื้นฟูปกป้องเซลล์

คำสำคัญ: วัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้, ฤทธิ์ชีวภาพทางเครื่องสำอาง, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Independent Study Title Assessment of Phenolic Compounds and Cosmetic Bioactivities from Cocoa Bean Residues

Author Haritchaya Boonrodklub

Degree Master of Science (Cosmetic Science)

Advisor Assistant Professor Phanuphong Chaiwut, Ph. D.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate potential of cocoa bean residues including, sprouted cocoa beans, flat cocoa beans, and cocoa bean shells as cosmetic active ingredients compared to normal cocoa beans. The extracts were evaluated for total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, tyrosinase inhibitory activity, and cell cytotoxicity. The results showed that the bean shell and normal bean extracts exhibited the highest total phenolic contents (269.09 ± 1.85 and 260.87 ± 15.26 mg GAE/g extract, respectively), while the highest total flavonoid content was found in normal bean extract (260.16 ± 13.09 mg QE/g extract). Antioxidant assays via DPPH and FRAP revealed that the normal bean extract had the strongest antioxidant capacity (179.85 ± 1.89 and 346.58 ± 8.31 mg TE/g extract, respectively). The highest tyrosinase inhibitory activity was observed in sprouted cocoa bean extract with minimum inhibitory concentration of 0.100 ± 0.000 mg/ml. The cytotoxicity tests showed that all extracts were highly safe, with cell survival rates exceeding 100% across all tested concentrations boosting cell survival up to $170.01 \pm 12.86\%$. This study demonstrated that the cocoa bean residue extract especially the sprouted bean extract possessed wide ranges of cosmetic biological activity and could be utilized as the natural cosmetic ingredients with antioxidant, anti-pigmentation and cell-reparative properties.

Keywords: Cocoa Bean Residues, Cosmetic Biological Activity, Cell Cytotoxicity

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 แนวคิด ทฤษฎี งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วิธีการดำเนินการวิจัย	13
3.1 สารเคมี	13
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	15
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	15
4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	22
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดและร้อยละผลผลิตสารสกัด	22
4.2 ผลการทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม	24
4.3 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม	24
4.4 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	25
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	27
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	29
4.7 การเปรียบเทียบราคาต้นทุน ฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง และความคุ้มค่าของสารสกัดวัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้	32
5 สรุป	34
รายการอ้างอิง	36
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้ประพันธ์	43

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
3.1 สารเคมี	17
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	15
3.3 สรุปขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบโกโก้แต่ละชนิด	16
4.1 ร้อยละผลผลิต (% Yield) ของการสกัดไขมันโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	23
4.2 ร้อยละผลผลิต (% Yield) ของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	23
4.3 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	24
4.4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	25
4.5 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, %Inhibition และ IC50 ของสารสกัดโกโก้ ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	26
4.6 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	27
4.7 ปริมาณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, %Inhibition และ IC50 ของสารสกัดโกโก้ ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ	28
4.8 ราคาวัตถุดิบเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลึบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ ปกติ ที่ใช้สำหรับผลิตสารสกัดโกโก้ 1 กิโลกรัม	32

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 รูปต้นโกโก้ และผลโกโก้ จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว	4
2.2 รูปการกระเทาะผลโกโก้ จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว	5
2.3 รูปผลโกโก้สด, การกระเทาะผลโกโก้ และการหมักโกโก้ในถังหมัก จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว	6
2.4 รูปการตากแดดเมล็ดโกโก้ และการ cut test จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว	6
2.5 รูปสินค้าช็อกโกแลตที่ได้จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว	6
2.6 รูป Cocoa byproducts	7
2.7 รูป Cocoa byproducts	7
2.8 รูปขั้นตอนการผลิตและการได้มาซึ่ง Cocoa byproducts	9
4.1 สารสกัดจากโกโก้ที่สกัดด้วย 75 เปอร์เซ็นต์เอทานอล (ก) เมล็ดโกโก้ปกติ (ข) เมล็ดโกโก้สกัด (ค) เมล็ดโกโก้ดิบ (ค) เปลือกโกโก้	22
4.2 กราฟแสดง % cell survival ของเมล็ดโกโก้สกัด	29
4.3 กราฟแสดง % cell survival ของเปลือกโกโก้	30
4.4 กราฟแสดง % cell survival ของเมล็ดโกโก้ดิบ	30
4.5 กราฟแสดง % cell survival ของเมล็ดโกโก้ปกติ	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาปัญหาและความสำคัญ

โกโก้ (Theobroma cacao L.) เป็นเมล็ดพืชที่นิยมนำมาทำเป็นช็อกโกแลต เนื่องจากเมล็ดโกโก้มีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ไขมันโกโก้และสารสำคัญในเมล็ดโกโก้สามารถนำมาใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ เช่นผสมในครีมบำรุงผิวเพื่อป้องกันริ้วรอยและเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว (สมัชญา งามสุข, 2565) สารสกัดจากโกโก้ยังได้รับการระบุว่าเป็นส่วนผสมที่ได้มาตรฐานสำหรับเครื่องสำอาง โดยทำหน้าที่เป็น “skin-conditioning agent” และ “antioxidant” ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว ซึ่งช่วยปกป้องผิวจากอนุมูลอิสระและลดสัญญาณการเสื่อมของผิว เช่น ริ้วรอย และการสร้างเม็ดสีผิว โกโก้ประกอบไปด้วยสารอาหารและแร่ธาตุที่สำคัญหลายชนิด นอกจากนี้โกโก้ยังเป็นแหล่งของสารประกอบโพลีฟีนอลที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางเภสัชหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีสารโปรไซยานิดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง เช่น การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งมะเร็ง การยับยั้งการเกิดโรคเบาหวาน ลดการอักเสบ ลดการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดและอื่น ๆ (สมัชญา งามสุข, 2565)

โกโก้ จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่เป็นที่ต้องการในตลาด เนื่องจากโกโก้เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดกลาง เจริญเติบโตได้ดีในลักษณะภูมิอากาศของประเทศเขตร้อนชื้น ตั้งแต่ประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตศูนย์สูตรจนถึงประเทศที่มีอุณหภูมิระหว่าง 15-30°C และโกโก้ยังต้องการปริมาณน้ำฝนที่สม่ำเสมอตลอดปี (วลีพรรณ รกติกุล และคณะ, 2565) จึงทำให้ประเทศไทยเหมาะสมและสามารถปลูกโกโก้ได้เป็นอย่างดี ทำให้เกษตรกรและผู้แปรรูปในประเทศไทยหันมาให้ความสนใจและปลูกโกโก้

ขั้นตอนการทำเมล็ดโกโก้แห้งเริ่มต้นจากการแกะเมล็ดโกโก้ออกจากผล เมื่อแกะเมล็ดโกโก้ ออกแล้วต้องนำมาหมักอีกเป็นเวลาประมาณ 6 วัน เพื่อให้ได้กลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้น จากนั้นนำเมล็ดโกโก้มาตากแห้ง ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ เพื่อลดความชื้นจากร้อยละ 60 ของน้ำหนักเปียกให้เหลือร้อยละ 7 (จันทิมา ชั่งสิริพร และคณะ, 2566) เพื่อนำไปเข้าสู่กระบวนการผลิตเป็นช็อกโกแลตต่อไป ในกระบวนการผลิตช็อกโกแลตนี้ถ้าเป็นกลุ่มที่ทำในแนว premium craft จะคัดเมล็ดที่ตรงตามคุณลักษณะที่ต้องการเท่านั้น คือจะคัดเลือกเมล็ดโกโก้ “ปกติ” ที่สมบูรณ์ ซึ่งหมายถึงเมล็ดซึ่งไม่งอก ไม่สับ ส่วนเมล็ดที่มีรากงอก เมล็ดสับ จะไม่นำมาใช้เนื่องจากทำให้รสชาติของช็อกโกแลตเปลี่ยนแปลงจากที่ต้องการ ทำให้มีเมล็ดงอกและเมล็ดสับถูกคั่วทิ้งจำนวนมากซึ่งไม่ก่อให้เกิดรายได้

และในขั้นตอนการผลิตช็อคโกแลตจะมีเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ที่เป็น byproduct อีก1ส่วนที่ยังไม่ค่อยได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากนัก ดังนั้นเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ ถูกมองว่าเป็นเศษเหลือ (by-products) หรือวัสดุที่ถูกทิ้ง ทั้งที่งานวิจัยชี้ว่าวัสดุเศษเหลือเหล่านี้ก็มีสารโพลีฟีนอลและองค์ประกอบทางชีวภาพที่น่าสนใจ

ดังนั้น การศึกษา “วัสดุเศษเหลือ” เช่น เมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ นั้น มีความสำคัญทั้งในแง่ของการเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากรที่ถูกมองข้าม และในแง่ของการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเปรียบเทียบกับเมล็ดโกโก้ปกติที่ได้รับการใช้มากแล้ว งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อประเมินศักยภาพของวัสดุเศษเหลือ เพื่อใช้ในการประยุกต์เป็นส่วนผสมเครื่องสำอางที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ ด้วยวิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound-Assisted Extraction) เปรียบเทียบกับเมล็ดโกโก้ปกติ

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม, ฟลาโวนอยด์, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ เปรียบเทียบกับเมล็ดโกโก้ปกติ

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1.3.1 การเก็บตัวอย่างและวิธีการเตรียมตัวอย่างเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

1.3.2 สกัดสารออกฤทธิ์จากเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

1.3.3 ทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

1.3.4 ทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

1.3.5 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

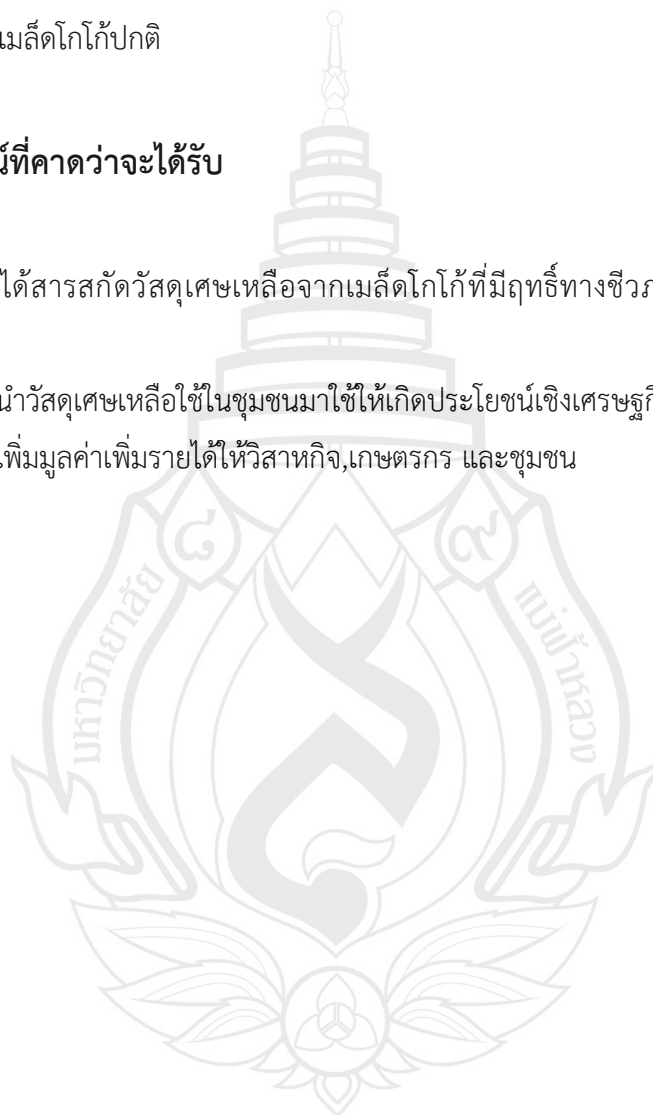
1.3.6 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สารสกัดวัสดุเศษเหลือจากเมล็ดโกโก้ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

1.4.2 นำวัสดุเศษเหลือใช้ในชุมชนมาใช้ให้เกิดประโยชน์เชิงเศรษฐกิจ

1.4.3 เพิ่มมูลค่าเพิ่มรายได้ให้วิสาหกิจ,เกษตรกร และชุมชน



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิด ทฤษฎี งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โกโก้ (Cocoa) มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Theobroma cacao* L. เป็นไม้ผลยืนต้นมีอายุยาวนานเป็น 70 ปีแต่อายุการให้ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวในเชิงพาณิชย์ได้อยู่ระหว่าง 30-40 ปี เป็นพืชที่ชอบร่มเงาบาง ๆ เริ่มออกดอกติดผลเมื่ออายุต้นได้ 2-3 ปี ออกดอกติดผลบริเวณลำต้นและกิ่งแก่ดอกมีสีขาวขนาดเล็กออกเป็นกระจุกจำนวนมาก โดยต้นโกโก้จะทยอยออกดอกติดผลและเก็บเกี่ยวได้ตลอดทั้งปี แต่ระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวผลผลิตได้มากนั้นอยู่ในช่วงระยะต้นฤดูหนาวตั้งแต่เดือนตุลาคมไปจนถึงต้นฤดูร้อนเดือนมีนาคมของทุกปี ต้นโกโก้ที่ได้น้ำอย่างสม่ำเสมอจะออกดอกติดผลและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดทั้งปี

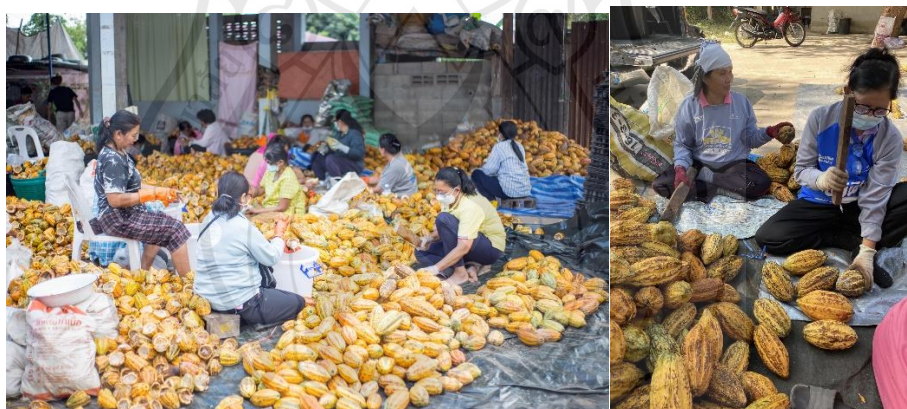


ภาพที่ 2.1 รูปต้นโกโก้ และผลโกโก้ จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว

Shahanas et al. (2019) โกโก้เรียกได้ว่าเป็นสุดยอดอาหารระดับซูเปอร์ฟู้ด (Super food) ตัวหนึ่งเพราะมีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพสูงมาก โกโก้มีคาร์โบไฮเดรต (31%), โปรตีน (11%), ไขมัน (54%), กากใย (16%) และมีแร่ธาตุต่าง ๆ โกโก้เป็นแหล่งที่ดีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เช่นโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่ประกอบไปด้วยฟลาโวนอยด์ และที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซ็อกโกแลตที่มีฟลาโวนอยด์สูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหลอดเลือดแดงส่วนปลาย ซ็อกโกแลตช่วยยับยั้งโมเลกุลเชิงซ้อนที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ ฉะนั้นโกโก้จึงเป็นอาหารที่ดีต่อสุขภาพ

Domínguez-Pérez et al. (2020) ประโยชน์ของโกโก้เพื่อสุขภาพ การหมักโกโก้ไม่ใช่แค่ได้แค่กลิ่นและรสชาติแต่นำมาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ การศึกษานี้มุ่งตรงไปที่การสกัดโปรตีนจากเมล็ดโกโก้ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (cocoa bean protein hydrolysis) กับไบโอแอคทีฟเปปไทด์ (bioactive peptides) ประโยชน์เพื่อสุขภาพของโปรตีนจากเมล็ดโกโก้ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสกับไบโอแอคทีฟเปปไทด์ มีทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ลดความดันโลหิต, ป้องกันหรือบรรเทาอาการโรคเบาหวาน, ลดภาวะสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์, ป้องกันหรือลดโรคอ้วน และยับยั้งการเจริญของเนื้องอกได้ด้วย

โกโก้เป็นผลไม้ที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นช็อกโกแลต ซึ่งกระบวนการผลิตช็อกโกแลตจะต้องนำเมล็ดโกโก้ไปผ่านกระบวนการหมัก เพื่อสร้างสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสช็อกโกแลตออกมา เมื่อหมักได้ที่แล้วก็นำไปตากแดดให้แห้ง จะใช้เวลาตากแดดอยู่ประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วนำเมล็ดแห้งแล้วทำการคั่วแบบทั้งเมล็ด (รวมเปลือก) เรียกว่า “bean roasting” คั่วเสร็จแล้วก็นำมาแกะเปลือกแล้วจึงนำเอาส่วนของเนื้อใน มาบดละเอียดจนมีลักษณะเหลวข้นหนืดที่เรียกว่าโกโก้แมส (cocoa mass) จะทำการใส่น้ำตาลหรือสารปรุงแต่งอื่น ๆ ในระหว่างการบดก็ได้ แล้วนำไปทำการเทมเปอร์ แล้วจึงนำไปหล่อลงพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อขึ้นรูปช็อกโกแลต ดังภาพข้างล่างนี้



ภาพที่ 2.2 รูปการแกะเปลือกผลโกโก้ จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว



ภาพที่ 2.3 รูปผลโกโก้สด, การกะเทาะผลโกโก้ และการหมักโกโก้ในถังหมัก จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว



ภาพที่ 2.4 รูปการตากแดดเมล็ดโกโก้ และการ cut test จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว



ภาพที่ 2.5 รูปสินค้าช็อกโกแลตที่ได้จากวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว

จากขั้นตอนการผลิตช็อกโกแลตในอุตสาหกรรมอาหารนั้น จะมีกากเหลือทิ้งและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือเป็นผลพลอยได้ที่ได้จากการผลิตผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตนั้นเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากดังเช่น การศึกษาของ Agudelo et al. (2021) บอกว่าในการผลิตช็อกโกแลตจะมีกากเหลือทิ้งและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือเป็นผลพลอยได้จากการผลิตช็อกโกแลตมากถึง 80% เช่น เปลือกผลโกโก้ (cocoa pod husks ;PH), โกโก้เมล็ดดิบแบน (flat cocoa beans) หรือเรียกว่า “pasilla”(PA), เมล็ดโกโก้ที่มีกลิ่นเหม็นหืน (musty cocoa beans ;MC), เมล็ดโกโก้เกรดรองลงมา (second quality cocoa beans ;SQ) และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (cocoa bean shells) ดังในภาพต่อไปนี้



ที่มา Agudelo et al. (2021)

ภาพที่ 2.6 รูป Cocoa byproducts

และในการศึกษาของ Llerena et al. (2023) ก็ยังมีเมือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (mucilage) และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (bean shells) ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือเป็นผลพลอยได้ของโกโก้อีกด้วย

Sample: Cocoa variety	Cocoa By-products				
	 % Pod husks	 % Cocoa beans	 % Mucilage	 % Bean shell	 % Cocoa placenta
Nacional x Trinitario type	79.90	14.45	3.50	1.40	0.75
CCN51	68.40	20.90	5.30	2.20	3.20

ที่มา Llerena et al. (2023)

ภาพที่ 2.7 รูป Cocoa byproducts

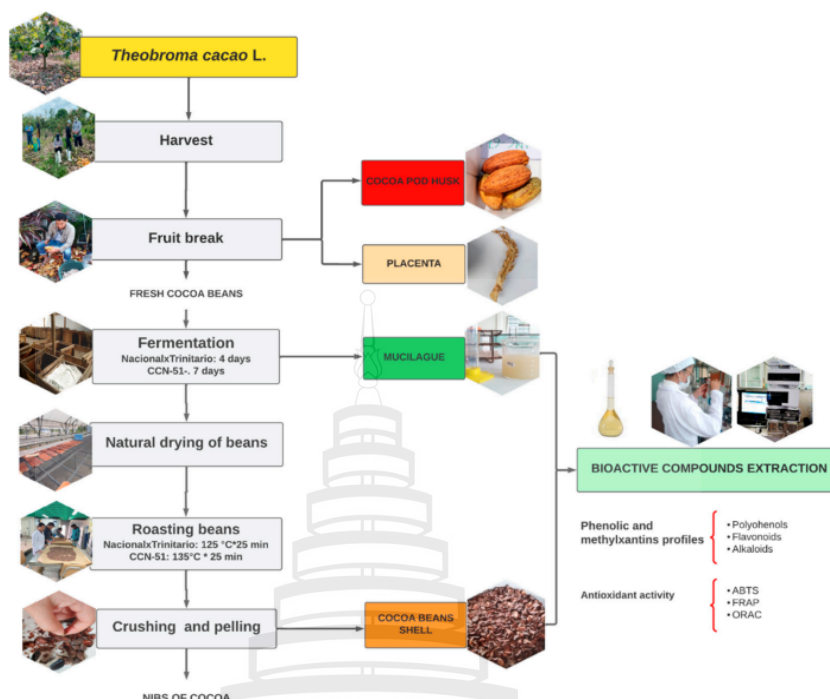
ในการศึกษาเหล่านี้ยังบ่งบอกถึงว่ากากเหลือทิ้งและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือผลพลอยได้ที่ได้จากการผลิตผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตนั้นยังมามีสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร, ยา และเครื่องสำอาง ดังได้เห็นในการศึกษาหลาย ๆ งานวิจัยทั่วโลก และตัวอย่างงานวิจัยดังต่อไปนี้

Llerena et al. (2023) ศึกษาหาฤทธิ์ทางชีวภาพของกากมอลชีวภาพเหลือทิ้งของโกโก้ 2 ส่วน คือ เมือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (mucilage) และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (bean shells), และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโกโก้ 2 ชนิด Nacional X Trinitario type (Fine Aroma) และ CCN-51 ศึกษาหา Total polyphenol content, and total flavonoid content และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) cation bleaching, ferric-reducing antioxidant power และ oxygen radical absorbance capacity เมือกหุ้มเมล็ดโกโก้ของชนิด Nacional X Trinitario มีค่าสูงกว่า คือ TPC 105.08 mg gallic acid equivalents (GAE)/100 mL, TFC 36.80 mg catechin equivalents (CE)/100 mL, catechin (CAT) 35.44 mg/g, pro-cyanidins (PCB2: 35.10; PCB1: 25.68; PCC1: 16.83 mg/L), epicatechin (EPI) 13.71 mg/L, caffeine (CAF) 0.90% และ theobromine (TBR) 2.65%. ส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (bean shells) ชนิด CCN-51 มีค่าเหล่านี้สูงกว่า TPC (42.17 mg GAE/100 g) and TFC (20.57 mg CE/100 g). แต่อย่างไรก็ตามค่า CAT (16.16 mg/g), CAF (0.35%) and TBR (1.28%) ในชนิด Nacional X Trinitario ให้ค่าที่สูงกว่า

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS, FRAP and ORAC ชนิด CCN-51 สูงกว่า Nacional X Trinitario เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (bean shells) ทั้ง 2 ชนิดได้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 171.32, 192.22 และ 56.87 mg Trolox equivalents (TE)/g, และ 167.06, 160.06 and 52.53 mg TE/g, ค่าต้านอนุมูลอิสระ (ABTS, FRAP and ORAC) ของเมือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้มีความสัมพันธ์กันมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (<0.99) กับ procyanidins (B1, B2 and C1), EPI และ CAT (0.94) มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ methylxanthines

การสกัดเมือกหุ้มเมล็ดโกโก้ ของ Llerena et al. (2023) เก็บเมือกหุ้มเมล็ดโกโก้จากขั้นตอนการหมักแล้วนำน้ำที่ไหลออกมาจากการหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ 5200× g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บเฉพาะส่วนใสไม่มีตะกอนมาในหลอดต่อไป

การสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (bean shells) ของ Llerena et al. (2023) ใช้เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ 0.3 g เติมน้ำเมทานอล 0.005 L น้ำกลั่นและ formic acid ในอัตราส่วน (70:30:0.1%; v/v/v) นำไปปั่นบด 4 ครั้ง แล้วนำไปสกัดบน ultrasound bath เป็นเวลา 5 และ 10 นาที, แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง centrifuge เป็นเวลา 10 นาที ที่รอบปั่น 2706× g อุณหภูมิ 5 °C ส่วนต่าง ๆ ได้มาจากขั้นตอนดังในภาพนี้



ที่มา Llerena et al. (2023)

ภาพที่ 2.8 รูปขั้นตอนการผลิตและการได้มาซึ่ง Cocoa byproducts

Huynh et al. (2023) ศึกษาการสกัดสาร alkaloid และ phenolic compounds โดยวิธี ultrasound และ Viscozyme L ของเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) shells (CBS) โดยมีตัวแปร 4 ตัว คือ อุณหภูมิการสกัดเครื่อง ultrasound (25–75°C), ระยะเวลาการสกัดบน ultrasonic (25–65 นาที); ความเข้มข้นของ enzyme (Viscozyme L, 0.5–2.5%), และระยะเวลาการบ่มของ enzymatic (10–180 นาที) จากการศึกษาพบว่า อุณหภูมิการสกัดและระยะเวลาการสกัดที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) และ antioxidant capacity (AC) มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจาก TPC, TFC, AC 2.35g เป็น 4.15 g gallic acid equivalents/100 g dry weight (DW); 6.45–10.76 g rutin equivalents/100 g DW; และ 14.91–26.19 mol Trolox equivalents/100 g DW, อุณหภูมิการสกัดที่ 55°C และระยะเวลาการสกัดที่ 55 นาทีเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโพลีฟีนอล ระยะเวลาการบ่มของ 2.0–2.5% Viscozyme L ทำให้ได้ค่า TPC และ TFC ที่สูงขึ้น นอกเหนือจากนั้นระยะเวลาการบ่ม enzymatic ที่เวลา 10 นาที ทำให้ได้ค่า caffeine, AC, TFC และ TPC และระยะเวลาการบ่ม enzymatic ที่เวลา 40–50 นาที ทำให้ได้ค่า theobromine and catechin ที่สูงที่สุด

การเตรียมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (bean shells) ของ Huynh et al. (2023) ทำโดยการบดและนำไปสกัดไขมันออกด้วยเครื่อง Soxhlet 4 ชั่วโมงและใช้ hexanes เป็นตัวทำละลาย

หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งในเครื่อง fume hood ข้ามคั้นจนความชื้นอยู่ที่ 13.08% แล้วจึงนำผงเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ ที่สกัดไขมันออกแล้วไปสกัดด้วยน้ำกลั่นและ Viscozyme L ต่อไป

Agudelo et al. (2021) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ของ anti-skin aging ต่าง ๆ ของกากเหลือทิ้งจากการอุตสาหกรรมอาหาร จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากเมล็ดโกโก้ที่หมิ่นหมิ่น (Musty cocoa beans; MC) และสารสกัดจากเมล็ดโกโก้เกรดรองลงมา (second-quality cocoa beans; SQ) มี polyphenol contents และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด ในการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ collagenase และ elastase สารสกัดจากเมล็ดโกโก้เกรดรองลงมา (second-quality cocoa beans; SQ) ก็สามารถยับยั้งเอนไซม์ collagenase ได้ถึง 86% และสามารถยับยั้งเอนไซม์ elastase ได้ถึง 36% และยังมี catechin และ epicatechin สูงถึง 18.15 mg/100 g และ 229.8 mg/100 g เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้เรียกได้ว่าเป็นแหล่งของ methylxanthine เพราะมี theobromine สูงถึง 1085 mg และมี caffeine 267 mg/100 g

การเตรียมสารสกัดของ Agudelo et al. (2021) นำวัตถุดิบที่ผ่านการหมักมาตากแห้งที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 5 วัน พอแห้งแล้วนำมาบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปสกัดบนเครื่อง ultrasonic-assisted extraction 2 ครั้งโดยใช้ 100 mg ของตัวอย่างที่จะสกัดมาสกัดเอาไขมันออกด้วย hexane นำไปสกัดที่ ultrasonic bath 700 W เป็นเวลา 8 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 15 นาทีที่รอบการปั่น 13,000× g rpm นำตัวอย่างที่สกัดเอาไขมันออกแล้วมาทำให้แห้งแล้วจึงนำมาสกัดสารสกัดที่ต้องการด้วย 2 mL ด้วยตัวทำละลาย aqueous ethanol (70%) เป็นเวลา 50 นาทีที่เครื่อง ultrasonic อุณหภูมิ 30 ± 4 °C แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 × g rpm เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เสร็จแล้วเลือกใช้ส่วนที่ใสไม่มีตะกอนเพื่อนำมาวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต่อไป

การศึกษานี้ของ Agudelo et al. (2021) ยังใช้ response surface methodology (RSM) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้บนเครื่อง high-intensity ultrasound จากการศึกษาสามารถหาค่า methylxanthines ได้ 2 g ต่อนาทีและ epicatechin ได้ 0.2 g ต่อนาที

Agus et al. (2018) ศึกษาและวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, proximate, phytosterol ของเมล็ดโกโก้ที่ไม่หมัก, เมล็ดโกโก้ที่ไม่คั่ว, เมล็ดโกโก้ที่คั่วและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ของโกโก้ Peninsular ประเทศมาเลเซีย จากการศึกษา proximate, total phenolic compound (Folin-Ciocalteu reagent assay), antioxidant activity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging assay) และส่วนประกอบ phytosterol พบว่า crude fiber ของเมล็ดโกโก้ที่ไม่คั่วและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้สูงขึ้นจาก 17.19 ไปเป็น 28.45% และ 13.86 ไปเป็น 16.06% หลังจากผ่านการคั่ว การคั่วทำให้กากใยอาหารของโกโก้สูงขึ้นโดยการทำปฏิกิริยากันของ polysaccharides, protein, polyphenolic และผลิตภัณฑ์ที่มีปฏิกิริยา Maillard ที่ใช้ความร้อนสูง ค่าของสาร total phenolic

ในเมล็ดโกโก้และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้อยู่ที่ 2.42 ถึง 10.82 $\mu\text{g GAE/ml}$ เมล็ดโกโก้ที่ไม่หมักมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (92.3%) สูงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ อย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) และพบว่า cholesterol, stigmasterol และ β -sitosterol มีอยู่ในเมล็ดโกโก้ที่คั่วและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้

Pattanakitjaroenchai et al. (2025) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้ในทางเครื่องสำอางโดยใช้เปลือกโกโก้มาสกัดด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ (MAE) กับตัวทำละลายที่ใช้โพลีออล (polyol-based solvents) ได้มีการเปรียบเทียบระหว่างชนิดของโพลีออล (propylene glycol (PG), butylene glycol, glycerin, hexylene glycol, and 1,2-hexanediol) ความเข้มข้น (20 %, 40 %, 60 %, and 80 % w/v), อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการสกัด แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC), ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Propylene glycol (PG) ในสภาวะที่เหมาะสม (60% w/v, อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:50, 100 °C, การสกัด 30 นาที) ช่วยเพิ่มปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ที่ 59.57 ± 1.33 มก. GAE/กรัมตัวอย่าง, ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) อยู่ที่ 242.24 ± 2.95 มก. QE/กรัมตัวอย่างและการยับยั้งไทโรซิเนสอยู่ที่ 4.75 ± 0.35 มก. KAE/กรัมตัวอย่างได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ EtOH และในการวิเคราะห์ LC-QQQ พบสารเคอร์ซีติน, คาเทชิน และไตรโกเนลลินซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการยับยั้งไทโรซิเนสและลดปริมาณเมลานิน อีกทั้งยังมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยความเข้มข้น 1, 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากสารสกัด PG-MAE และ EtOH-MAE จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากความมีชีวิตรอดของเซลล์ยังคงสูงกว่า 80% ในทางกลับกันความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่งผลให้มีความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงต่ำกว่า 80%

การเตรียมวัตถุดิบและการสกัดของ Agus et al. (2018) เมล็ดโกโก้ที่คั่วทำโดยนำเมล็ดมาคั่วที่ 140 °C เป็นเวลา 40 นาที ปอกเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ทั้งที่ผ่านการคั่วและไม่ผ่านการคั่วแล้วจึงนำไปบด ส่วนการสกัดสาร นำตัวอย่างแต่ละส่วนทั้ง (unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells) มาอย่างละ 10 g มาสกัดกับ 80% ethanol และเขย่าที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเลือกใช้ส่วนที่ใสไม่มีตะกอนมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 541) นำส่วนใสมาสกัดซ้ำ 2 ครั้งด้วย ethanol เพื่อนำมาวิเคราะห์สารออกฤทธิ์

Pico-Hernández et al. (2020) ศึกษาพบค่า Polyphenol Extracts (PE) ของโกโก้ที่ไม่ผ่านการหมักอยู่ที่ 95.35, 7.45 และ 21.75 mg EE (epicatechin equivalents)/ g ds ของ monomers, dimers, and oligomers ตามลำดับ และพบค่า AC สูงสุดใน dimers การสกัด Solid-liquid โดยใช้ผงโกโก้ที่บดแล้วและสารละลาย 50% (v/v) ethanol ในอัตราส่วน 1:120 บน ultrasound bath ที่ 20 kHz อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ปรับ pH 6.0 โดยใช้ citric acid (10

mM) สกัดเป็นเวลา 30 min ที่อุณหภูมิ 70 °C แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เลือกใช้ส่วนที่ใสไม่มีตะกอนมากรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) นำไประเหย ethanol ออกด้วยเครื่อง vacuum evaporation (55 °C 13,500 Pa) แล้วนำ crude extract มาระเหยแห้งอีกทีด้วยเครื่อง freeze-dried รอบครั้งแรก ที่อุณหภูมิ -40°C 13000 Pa เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และรอบครั้งที่สองที่อุณหภูมิ -10 °C- 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนํานอกมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ (-80 °C) และเก็บไว้ในตู้มีดก่อนการนำมาวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต่อไป



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 สารเคมี

Chemical	Molecular Weight (g/mol)	Company
Acetic acid (analytical grade, purity 99.8%)	60	Qrec (New Zealand)
Aluminum chloride (AlCl ₃), analytical grade, purity 98%	241.43	Qrec (New Zealand)
Catechin, HPLC grade, purity 98%	290.26	Sigma-Aldrich
DI water	-	-
Dimethyl sulfoxide (DMSO), purity 99%	78.13	LOBA CHEMIE™ (India)
Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄), analytical grade	174.18	Ajax Finechem™ (Australia)
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), HPLC grade	394.32	Sigma-Aldrich
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	-	Thermo Fisher Scientific (USA)
Ethanol, analytical grade, purity 99.7%	46.07	RCI Labscan (Ireland)
Ferric chloride (FeCl ₃), analytical grade, purity 99%	162.2	Qrec (New Zealand)
Fetal bovine serum (FBS)	-	Gibco (USA)
Folin–Ciocalteu’s phenol reagent, analytical grade	94.11	LOBA CHEMIE PVT. LTD. (India)
Gallic acid, HPLC grade, purity 99%	188.13	Sigma-Aldrich
Hexane, analytical grade, purity 99%	86.17	RCI Labscan (Ireland)

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

Chemical	Molecular Weight (g/mol)	Company
Hydrochloric acid (HCl), analytical grade, purity 37%	36.5	Carlo (Italy)
L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)	197.19	Sigma-Aldrich
Methanol, analytical grade, purity 99.8%	32.04	Qrec (New Zealand)
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), analytical grade	136.09	Ajax Finechem™ (Australia)
Sodium acetate (CH_3COONa), analytical grade, purity 99.5%	136.08	Qrec (New Zealand)
Sodium carbonate (Na_2CO_3), analytical grade, purity 99.5%	105	LOBA CHEMIE PVT. LTD. (India)
Sodium hydroxide (NaOH), analytical grade, purity 98.5%	40	Carlo Erba (Thailand)
Sodium nitrite (NaNO_2), analytical grade, purity 98%	69	Carlo Erba (Thailand)
2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), HPLC grade, purity 98%	312.33	Sigma-Aldrich
Trolox, HPLC grade, purity 99.87%	250.29	Sigma-Aldrich
Tyrosinase (from mushroom)	-	Sigma-Aldrich

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

Instrument	Model	Company
Arium pro ultrapure water system (18.2 M Ω ·cm)	Sartorius	Germany
Buchner funnel filtration set	Jipo	Germany
Centrifuge (bench type)	Velocity 18R Pro – Thermo Scientific	USA
Electronic analytical balance (4 decimal places)	Model MS204TS – Mettler Toledo	Switzerland
Hot air oven	Memmert – Metrittech Co., Ltd.	Thailand
Micro pipette (10–100 μ L and 100–1000 μ L) and pipette tips	Pipet-Lite PL+ – Mettler Toledo	Switzerland
Rotary evaporator	Model R300 – BUCHI	Switzerland
Ultrasonic cleaner set	Model WUC-D03H – DAIHAN Scientific	Korea
Ultrasonic-Assisted Extraction	Model DW-IID – DRAWELL	China
UV-Visible spectrophotometer	SPECORD 200 PLUS	Germany
Vortex mixer	Vortex-Genie 2 – Scientific Industries	USA

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างวัสดุเศษเหลือโกโก้

วัตถุดิบโกโก้ทั้งหมด ได้แก่ เมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ ปกติถูกจัดหามาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนโกโก้บ้านจั่ว ตำบลนาจั่ว อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ โดย เมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก เมล็ดโกโก้สับ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ ถือเป็นผลพลอยได้ที่ปกติจะถูกคัดทิ้ง ซึ่ง วัตถุดิบเหล่านี้เป็นส่วนที่เหลือจากการแปรรูปเพื่อผลิตช็อกโกแลต

การเตรียมเมล็ดโกโก้ทำโดยกะเทาะเปลือกออกจากผลโกโก้สดแล้วเลือกเฉพาะเมล็ดโกโก้สดที่มีรากงอกออกมา แล้วนำไปทำแห้งโดยการนำไปตากแดดโดยเกลี่ยเมล็ดทุก ๆ ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดโกโก้ไม่ติดกันและแห้งเท่ากันทั่วเมล็ด ใช้เวลาการตาก 7-12 วัน พอเมล็ดแห้ง (วัดค่าความชื้นของเมล็ดโกโก้แห้งได้ไม่เกิน 7%) ก็เก็บเมล็ดไว้ในถุงปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้นและแสงแดดจนกว่าจะนำมาผ่านกรรมวิธีการสกัดต่อไป

การเตรียมเมล็ดโกโก้สับ เมล็ดโกโก้สับได้จากการคัดเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักและตากแห้งแล้ว โดยคัดเมล็ดที่ขนาดปกติไปทำช็อคโกแลตและเมล็ดที่สับไม่ได้ขนาดวิสาหกิจชุมชนโกโก้แห่งนี้คัดทิ้ง แล้วจึงเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้สับนี้มาเก็บไว้ในถุงปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้นและแสงแดดจนกว่าจะนำมาผ่านกรรมวิธีการสกัดต่อไป

การหมักเมล็ดโกโก้ทำโดยการนำเมล็ดโกโก้สดมาใส่ในลังที่วางใบตองไว้ข้างในทั้งสี่ด้านรวมถึงนำใบตองมาวางปิดข้างบนเมล็ดโกโก้ด้วยและวางลังไว้ในที่อุณหภูมิห้อง อยู่ภายใต้หลังคาไม่ตากแดด หลังจากนั้น 3 วัน นำใบตองออกทั้งหมดและเริ่มการกลับกอง โดยจะคลุกกลับกองทุก ๆ 2 วัน จนการหมักนั้นสมบูรณ์ทั่วกัน ใช้เวลาการหมักทั้งหมด 7-8 วัน หลังจากนั้นนำเมล็ดโกโก้สดมาตากแดดโดยเกลี่ยเมล็ดทุก ๆ ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดโกโก้แห้งเท่ากันทั่วเมล็ด ใช้เวลาการตาก 7-12 วัน พอเมล็ดแห้ง (วัดค่าความชื้นของเมล็ดโกโก้แห้งได้ไม่เกิน 7%) แล้วจึงนำมาคัดเมล็ดและเก็บเมล็ดไว้ในถุงปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้นและแสงแดดจนกว่าจะนำมาผ่านกรรมวิธีการสกัดต่อไป

การเตรียมเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้จะได้จากขั้นตอนการนำเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักและผ่านการคัดเมล็ดแล้วนำไปคั่วแล้วจึงแยกส่วนเปลือกและเนื้อในเมล็ดออกจากกัน ซึ่งเนื้อในเมล็ดก็นำไปทำช็อคโกแลตต่อไป

การเตรียมเมล็ดโกโก้ปกติ ทำโดยกะเทาะเปลือกออกจากผลโกโก้สดแล้วเลือกเฉพาะเมล็ดโกโก้สดที่ปกติไม่มีรากงอกออกมา แล้วนำไปทำแห้งโดยการนำไปตากแดดโดยเกลี่ยเมล็ดทุก ๆ ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดโกโก้ไม่ติดกันและแห้งเท่ากันทั่วเมล็ด ใช้เวลาการตาก 7-12 วัน พอเมล็ดแห้ง (วัดค่าความชื้นของเมล็ดโกโก้แห้งได้ไม่เกิน 7%) ก็เก็บเมล็ดไว้ในถุงปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้นและแสงแดดจนกว่าจะนำมาผ่านกรรมวิธีการสกัดต่อไป

ตารางที่ 3.3 สรุปขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบโกโก้แต่ละชนิด

ชนิดวัตถุดิบ	การคัดเลือก/กระบวนการหลัก	สถานะการหมัก	สถานะการคั่ว
เมล็ดโกโก้สด	กะเทาะฝัก → ตากแห้ง	ไม่หมัก	ไม่คั่ว
เมล็ดโกโก้สับ	หมัก → ตากแห้ง	ผ่านการหมัก	ไม่คั่ว
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	หมัก → ตากแห้ง → คั่ว → แยกส่วนเปลือกหุ้มออก	ผ่านการหมัก	ผ่านการคั่ว
เมล็ดโกโก้ปกติ	กะเทาะฝัก → ตากแห้ง	ไม่หมัก	ไม่คั่ว

การเตรียมเมล็ดโกโก้ปกติและเมล็ดโกโก้แห้ง (Fresh-Dried Path) วัตถุดิบเหล่านี้ได้จากการคัดแยกเมล็ดสดออกจากผลโกโก้ทันที เมล็ดปกติคือเมล็ดที่ไม่มีรากงอก ส่วนเมล็ดงอกคือเมล็ดที่มีรากงอกออกมา

การเตรียมเมล็ดโกโก้สับ (Fermented and Culling Path) เมล็ดโกโก้สับได้มาจากการคั้ทิ้งหลังกระบวนการหมักและการตากแห้ง เมล็ดสับคือเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งถูกคั้ทิ้งออกจากเมล็ดที่ใช้ผลิตช็อกโกแลต

การเตรียมเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ (Fermented, Roasted, and Winnowing Path) เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้เป็นผลพลอยได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมเนื้อในเมล็ด เมล็ดเหล่านี้ผ่านขั้นตอนการหมักและการคั้เมล็ดสมบูรณ์ตามปกติ ก่อนจะถูกนำไป คั่ว (Roasting) แล้วจึงแยกส่วนเปลือกหุ้มออกจากเนื้อในเมล็ด

หลังจากได้ตัวอย่างข้างต้นทั้ง 4 ชนิด เมล็ดโกโก้แห้ง เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ นำวัตถุดิบแห้งทั้งสี่ชนิดมาบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นและนำมาร่อน ก่อนนำไปจัดเก็บในถุงปิดสนิทเพื่อรอการสกัด

3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากวัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้ด้วยวิธี Ultrasonic-Assisted Extraction

นำวัตถุดิบแห้งของเมล็ดโกโก้แห้ง เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติมาบดละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำมาสกัดไขมันออกโดยใช้ Hexane 150 ml ต่อโกโก้ 50 g นำมาสกัดด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic Stirrer) 15 นาที และนำไปสกัดในเครื่องสกัดคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic-Assisted Extraction) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำมากรองสุญญากาศแยกผงโกโก้ออกจากของเหลว ด้วยเครื่อง Suction ใช้กระดาษกรอง Whatman เก็บสารละลายส่วนใสทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วครั้งสุดท้ายแยกผงโกโก้ที่สกัดน้ำมันออกแล้วไปผึ่งให้แห้ง

นำสารละลายส่วนใสมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อวัดค่า Yield ของไขมันโกโก้ที่ได้ของแต่ละส่วนการสกัดทั้งเมล็ดโกโก้แห้ง เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

นำผงโกโก้ที่สกัดน้ำมันออกและผึ่งให้แห้งแล้ว มาสกัดสารสำคัญโดยเติม 75% Ethanol ปริมาณ 150 mL นำมาสกัดด้วยเครื่องกวนสาร (Magnetic Stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปสกัดในเครื่องสกัดคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic-Assisted Extraction) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแยกของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศา เป็นเวลา 15 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เก็บสารละลายส่วนใส มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) แล้วนำสารสกัดที่ได้เก็บในภาชนะป้องกันความชื้นและแสงจนกว่าจะนำไปตรวจสอบสารสำคัญในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method เปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kupina et al. (2018) และ Sansenya et al. (2021) สร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid: GA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10 30 50 70 100 150 และ 200 ppm แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์โดยเติมสารละลาย Folin-ciocalteu's ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในความมืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในความมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (ปริมาตรรวมทั้งหมด 10 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง) นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นไปวัด

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง Ultra violet -Visible Spectrophotometer (UV-VIS) จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน x คือ ความเข้มข้นในหน่วย ppm และแกน y คือ ค่าการดูดกลืน ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในตัวอย่างเมล็ดโกโก้ ปกติ, เมล็ดโกโก้สด, เมล็ดโกโก้สับ และ เปลือกของเมล็ดโกโก้ โดยเตรียมทำนองเดียวกันกับสารมาตรฐาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน นำค่าการดูดกลืนที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ได้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GA/g extract)

3.3.4 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) โดยวิธี Aluminium chloride ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kongdin et al. (2023) สร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแคทีชิน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 50 100 200 300 400 500 และ 600 ppm แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์โดยเติมสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.4 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในความมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที (ปริมาตรรวมทั้งหมด 6 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ultra violet -Visible Spectrophotometer (UV-VIS) จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน x คือ ความเข้มข้นในหน่วย ppm และแกน y คือ ค่าการดูดกลืน ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในตัวอย่าง โดยเตรียมทำนองเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน นำค่าการดูดกลืนที่วัด

ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ได้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในหน่วยมิลลิกรัมแคทีชินต่อกรัมสารสกัด (mg CA/g extract)

3.3.5 การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (DPPH) ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Sansenya et al. (2021) โดยใช้โทรลอกซ์ (Trolox) เป็นสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 50 60 และ 70 ppm ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานหรือตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในความมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาตรรวมทั้งหมด 5 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ultra violet -Visible Spectrophotometer (UV-VIS) นำค่าการดูดกลืนที่วัดได้ (A) คำนวณค่า (%Radical scavenging activity) หรือ %Inhibition ดังสมการที่ 1 จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน y คือ %Inhibition แกน x คือความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนของตัวอย่าง แล้วคำนวณหาค่า %Inhibition ดังสมการที่ 1 จากนั้นนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วยมิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด (mg TE/g extract)

ทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP assay) ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Xiao et al. (2020) สร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 25 50 100 150 200 250 และ 300 ppm แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์โดยเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐาน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ปริมาตรรวมทั้งหมด 4.1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ultra violet -Visible Spectrophotometer (UV-VIS) จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยที่แกน x คือ ความเข้มข้นในหน่วย ppm และแกน y คือ ค่าการดูดกลืน คำนวณหาความสามารถในการรีดิวซ์ FRAP

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ FRAP ในตัวอย่างสารสกัด โดยเตรียมทำนองเดียวกันกับสารละลายมาตรฐาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน นำค่าการดูดกลืนที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาความสามารถในการรีดิวซ์ FRAP ในหน่วยมิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด (mg TE/g extract)

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ขั้นแรกให้ละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สารสกัดที่ละลายจะใช้ในการเตรียมกราฟด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 0.030, 0.060, 0.090, 0.120, 0.150, 0.180, 0.210, 0.240

มล. จากนั้นผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตและเอนไซม์ไทโรซิเนสจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 นาที แล้วเติม L-DOPA ปริมาตร 360 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มปฏิกิริยาอีก 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นค่าที่ได้จะถูกคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง โดยที่ค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งจะนำไปคำนวณเป็นค่า IC_{50} และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับกรดโคจิกต่อกรัมของสารสกัด (มิลลิกรัม กรดโคจิก/กรัม สารสกัด)

3.3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ด้วยวิธี MTT assay

การวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหา cell viability โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase ใน mitochondria เพื่อทำปฏิกิริยากับสาร 3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลือง และเปลี่ยนเป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน (แต่ไม่ละลายในน้ำ) หลังจากละลายสีภายในเซลล์ ด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) จึงทำการวัดหาปริมาณ formazan product ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3.3.7.1 การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบ

ทำการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH/3T3 ในจานเพาะเลี้ยง (culture flask) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM + 10% fetal bovine serum) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มีความชื้นซึ่งประกอบด้วย CO₂ 5% เมื่อพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงมีความเข้มข้นที่เหมาะสมแก่การทำทดสอบ (Cell confluency) จึงนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate (flat bottom) โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์ 1 x10⁴ เซลล์/หลุม (10,000 cells/well) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มีความชื้นซึ่งประกอบด้วย CO₂ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เซลล์ที่เลี้ยงใน 96-well plate จะถูกนำมาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทำการปิเปตอาหารเลี้ยงออก และนำอาหารเลี้ยง (DMEM) ที่มีสารสกัดความในความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งการทดสอบจะใช้ที่ความเข้มข้นในช่วง 1-10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (treatment) โดยอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดใช้เป็นตัวแปรควบคุม (control) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มีความชื้นซึ่งประกอบด้วย CO₂ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มจึงทำการปิเปตอาหารเลี้ยงออก และนำการเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยง (DMEM) ทำการป้องกันแสงโดยการทำ well plate ห่อหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นบ่มที่

อุณหภูมิ 37 °C ในที่มีความชื้นซึ่งประกอบด้วย CO2 5% เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาบ่ม ทำการปีเปตต์สารละลาย MTT ที่จ และล้างเซลล์ด้วย PBS (Phosphate Buffered Saline) และเติม DMSO เครื่องเขย่าแบบวงโคจร (orbital shaker) เป็นเวลา 15 นาที ที่ 300 rpm ด้วย microplate reader (BMG LABTECH) เพื่อละลายตะกอนสีม่วงของ formazan ที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้นวัดค่าดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเทียบกับหลุมที่เป็น Blank (ไม่มีเซลล์) และ untreated cells (เซลล์ที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัด) อัตราการรอดชีวิตของเซลล์จะถูกคำนวณตามสมการนี้

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{(\text{Abs. of treatment} - \text{Abs. of blank})}{(\text{Abs. of control} - \text{Abs. of blank})} \times 100$$



บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเตรียมสารสกัดและร้อยละผลผลิตสารสกัด

ก่อนทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ทำการสกัดไขมันในตัวอย่างออกก่อนโดยใช้เฮกเซนทำให้ได้สารสกัดของเหลวสีเหลืองอ่อน ร้อยละผลผลิต (% Yield) ของไขมันโกโก้ที่ได้ของแต่ละส่วนซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.1

ผลการสกัดสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางโดยใช้เอทานอล 75% ด้วยวิธีกวน 1 ชั่วโมง ต่อด้วยการใช้คลื่นความถี่สูง 15 นาที ได้สารสกัดดังภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.1 สารสกัดจากโกโก้ที่สกัดด้วย 75 เปอร์เซ็นต์เอทานอล (ก) เมล็ดโกโก้ปกติ (ข) เมล็ดโกโก้แงอก (ค) เมล็ดโกโก้สับ (ด) เปลือกโกโก้

จากการวิจัยพบว่า เมื่อดำเนินการสกัดไขมันจากเมล็ดโกโก้แงอก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติออกแล้วนั้น จะได้ไขมันออกมาเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนและเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนจะกลายเป็นไขมันที่แข็งสีเหลืองอ่อน โดยมีค่าร้อยละผลผลิต (% Yield) เท่ากับ 28.65 ± 0.62 %, 24.98 ± 0.82 %, 26.31 ± 0.35 %, 19.36 ± 0.91 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลผลิต (% Yield) ของการสกัดไขมันโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

สารสกัด	ร้อยละผลผลิตของไขมันโกโก้ (% Yield)
เมล็ดโกโก้ทั้งอก	24.98± 0.82% ^c
เมล็ดโกโก้ลิบ	26.31± 0.35% ^b
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	19.36± 0.91% ^d
เมล็ดโกโก้ปกติ	28.65± 0.62% ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารสกัดจากเมล็ดโกโก้ปกติสูงกว่าส่วนอื่น เนื่องจากเป็นระยะที่ยังคงมีไขมันและสารประกอบชีวภาพต่าง ๆ อยู่ครบถ้วน ในขณะที่เมล็ดโกโก้ทั้งอกมีการใช้ไขมันบางส่วนเป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการงอก จึงทำให้ปริมาณสารสกัดลดลง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Aunillah et al. (2021)

จากการวิจัยพบว่า เมื่อดำเนินการสกัดสารสกัดโกโก้จากเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติแล้วนั้น จะได้สารสกัดโกโก้ออกมาเป็นสารสกัดหยาบสีน้ำตาลเข้ม โดยที่สารสกัดจากเมล็ดโกโก้ปกติจะมีค่าร้อยละผลผลิตเท่ากับ 18.14±0.44% ซึ่งเป็นค่าที่สูงสุดเมื่อเทียบกับวัตถุดิบอื่นซึ่งมากกว่างานวิจัยของ Aunillah et al. (2021) ที่สกัดด้วยวิธี ultrasound และเอทานอลได้ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 10.91±1.38% และรองลงมาจะเป็นเมล็ดโกโก้ทั้งอกมีค่าเท่ากับ 9.82±0.44%, เมล็ดโกโก้ลิบมีค่าเท่ากับ 6.63±0.34% และเปลือกโกโก้มีค่าร้อยละผลผลิตน้อยที่สุดเท่ากับ 4.33±0.18% ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ร้อยละผลผลิต (% Yield) ของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

สารสกัด	ร้อยละผลผลิตของสารสกัดโกโก้ (% Yield)
เมล็ดโกโก้ทั้งอก	9.82±0.44% ^b
เมล็ดโกโก้ลิบ	6.63±0.34% ^c
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	4.33±0.18% ^d
เมล็ดโกโก้ปกติ	18.14±0.44% ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05)

4.2 ผลการทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

จากการวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดโกโก้มาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของทั้งเมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปอกดีโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Assay แล้วนั้น พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ปอกดีมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอยู่ที่ 269.09 ± 1.85^a และ 260.87 ± 15.26^a mg GA/g extract ตามลำดับโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาเป็นเมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก และเมล็ดโกโก้สับที่ 185.14 ± 0.63^b และ 161.25 ± 2.94^c mg GA/g extract ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 ซึ่งงานวิจัยของ Utami et al. (2016) รายงานว่า เปลือกโกโก้เป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระและสารฟีนอลิก ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของเมล็ดโกโก้ปอกดีมีปริมาณน้อยกว่างานวิจัยของ Aunillah et al. (2021) ที่สกัดด้วยวิธี ultrasound และเอทานอล ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 306.63 ± 31.4 mg GAE/g sample แต่ยังไม่พบงานวิจัยฉบับไหนที่นำเมล็ดโกโก้สับและเมล็ดโกโก้ทั้งเปลือกมาทำการทดลอง

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปอกดี

สารสกัด	ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (mg GA/g extract)
เมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก	185.14 ± 0.63^b
เมล็ดโกโก้สับ	161.25 ± 2.94^c
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	269.09 ± 1.85^a
เมล็ดโกโก้ปอกดี	260.87 ± 15.26^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.3 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

จากการวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดโกโก้มาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของทั้งเมล็ดโกโก้ทั้งเปลือก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปอกดีโดยใช้วิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay แล้วนั้น พบว่าเมล็ดโกโก้ปอกดีมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอยู่ที่ 260.16 ± 13.09^a mg CA/g extract ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Emelda and Wahyudin (2014) เท่ากับ 272 mg CA/g extract รองลงมาเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้, เมล็ด

โกโก้ผง และเมล็ดโกโก้ดิบที่ 215.71 ± 6.25^b , 156.86 ± 0.19^c , และ 41.13 ± 1.35^d mg CA/g extract ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งเมล็ดโกโก้ปอกดีและเปลือกเมล็ดโกโก้มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่างานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกเมล็ดโกโก้สำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชาจากโกโก้ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 60 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องอัลตราโซนิก มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเนื้อเมล็ดโกโก้และเปลือกเมล็ดโกโก้เท่ากับ 172.00 และ 126.10 มิลลิกรัมสมมูลของแควอซิฟลินต่อกรัมของชาแห้ง (Chungsiriporn et al., 2023) ส่วนเมล็ดโกโก้ผงและเมล็ดโกโก้ดิบยังไม่พบงานวิจัยฉบับไหนที่นำมาทำการทดลอง

ตารางที่ 4.4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ผง เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปอกดี

สารสกัด	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg CA/g extract)
เมล็ดโกโก้ผง	156.86 ± 0.19^c
เมล็ดโกโก้ดิบ	41.13 ± 1.35^d
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	215.71 ± 6.25^b
เมล็ดโกโก้ปอกดี	260.16 ± 13.09^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.4 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

จากการวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดโกโก้มาทดสอบหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, %Inhibition และ IC_{50} ของทั้งเมล็ดโกโก้ผง เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปอกดี โดยใช้วิธี DPPH Radical Scavenging Assay แล้วนั้น พบว่าเมล็ดโกโก้ปอกดี, เมล็ดโกโก้ผงและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 179.85 ± 1.89^a , 141.24 ± 0.58^b และ 107.41 ± 2.67^c mg TE/g extract, %Inhibition อยู่ที่ $84.78 \pm 0.72^a\%$, $67.94 \pm 0.31^b\%$ และ $65.69 \pm 2.67^c\%$ ได้ค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.30 ± 0.29 mg/ml, 0.37 ± 0.14 mg/ml และ 0.49 ± 1.10 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดโกโก้ปอกดีได้ค่าสูงที่สุดและค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยที่สุดในการทดลองนี้คือเมล็ดโกโก้ดิบ ซึ่งมีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 42.75 ± 0.12^d mg TE/g extract, %Inhibition อยู่ที่ $53.22 \pm 0.34^d\%$ ได้ค่า IC_{50} อยู่ที่ 1.19 ± 0.25 mg/ml ดังตารางที่ 4.6

ซึ่งได้ เมล็ดโกโก้ปกติและเปลือกโกโก้มีค่า %Inhibition น้อยกว่างานวิจัยของ Aunillah et al. (2021) ที่ได้ค่าเท่ากับ $87.49 \pm 2.48\%$ สกัดเมล็ดโกโก้ด้วยวิธี ultrasound และเอทานอล และเปลือกโกโก้ มี % inhibition เท่ากับ 86.377% (Pavlović et al., 2021) ส่วนเมล็ดโกโก้สกัดและเมล็ดโกโก้สับยังไม่พบงานวิจัยฉบับไหนที่นำมาทำการทดลอง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, %Inhibition และ IC_{50} ของสารสกัดโกโก้ของ เมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

สารสกัด	ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (mg TE/g extract)	%Inhibition	IC_{50} (mg/ml)
เมล็ดโกโก้สกัด	141.24 ± 0.58^b	67.94 ± 0.31^b	0.37 ± 0.14^c
เมล็ดโกโก้สับ	42.75 ± 0.12^d	53.22 ± 0.34^d	1.19 ± 0.25^a
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	107.41 ± 2.67^c	65.69 ± 2.67^c	0.49 ± 1.10^b
เมล็ดโกโก้ปกติ	179.85 ± 1.89^a	84.78 ± 0.72^a	0.30 ± 0.29^d
Trolox			0.047 ± 0.40^e

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP)

จากการวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดโกโก้มาทดสอบหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของทั้งเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติโดยใช้วิธี Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) แล้วนั้น พบว่าเมล็ดโกโก้ปกติ, เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้สกัด มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 346.58 ± 8.31^a , 324.20 ± 2.73^b และ 255.26 ± 6.00^c mg TE/g extract ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดโกโก้ปกติได้ค่าสูงที่สุด และค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยที่สุดในการทดลองนี้เป็นเมล็ดโกโก้สับมีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 85.94 ± 2.96^d mg TE/g extract ดังตารางที่ 4.7 ซึ่งเปลือกโกโก้มีค่ามากกว่างานวิจัยของ Botella-Martínez et al. (2021) ที่สกัดสารสกัดจากเปลือกโกโก้ที่มีขนาดที่แตกต่างกันซึ่งมีปริมาณ FRAP อยู่ในช่วง 3.84–7.62 mg TE/g extract อีกทั้งเมล็ดโกโก้ยังมีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากกว่างานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลของฝักโกโก้ที่สายพันธุ์ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างเมล็ดโกโก้, เปลือกโกโก้และฝักโกโก้ ซึ่งปริมาณต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดโกโก้ อยู่ในช่วง 23.00–38.43 mg TE/g extract และเปลือกอยู่ในช่วง 59.80–89.33 mg TE/g extract

(Abeyasinghe & Kumari, 2012) ส่วนเมล็ดโกโก้ทั้งอกและเมล็ดโกโก้ลิบยังไม่พบงานวิจัยฉบับไหนที่นำมาทำการทดลอง

ตารางที่ 4.6 ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

สารสกัด	ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mg TE/g extract)
เมล็ดโกโก้ทั้งอก	255.26±6.00 ^c
เมล็ดโกโก้ลิบ	85.94±2.96 ^d
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	324.20±2.73 ^b
เมล็ดโกโก้ปกติ	346.58±8.31 ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดโกโก้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของทั้ง เมล็ดโกโก้ทั้งอก เมล็ดโกโก้ลิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติพบว่าเมล็ดโกโก้ทั้งอกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดอยู่ที่ 591.394 ± 12.69^a mg kojic acid/g extract, มีค่า % inhibition อยู่ที่ $84.28 \pm 0.057\%$ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.100 ± 0.000^c ส่วนเมล็ดโกโก้ปกติ, เมล็ดโกโก้ลิบและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ที่ 477.451 ± 0.32^d , 529.415 ± 1.35^c , 567.099 ± 3.60^b mg kojic acid/g extract ตามลำดับ มี %inhibition อยู่ที่ $84.28 \pm 0.057\%$, 74.89 ± 0.23 , 82.47 ± 0.69 ตามลำดับ และค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.131 ± 0.001^a mg/ml, 0.114 ± 0.002^b mg/ml, 0.109 ± 0.001^b mg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งเปลือกโกโก้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่างานวิจัยของ Pattanakitjaroenchai et al. (2025) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกโกโก้ที่สกัดด้วยเอทานอลเท่ากับ 4.60 ± 0.20 mg KAE/g sample เนื่องจากในเปลือกโกโก้มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ยังไม่พบงานวิจัยที่นำเมล็ดโกโก้ทั้งอกและเมล็ดโกโก้ลิบมาทำการทดลอง มีเพียงงานวิจัยของ Abdul Karim et al. (2014) ที่ทดสอบสารสกัดจากฝักโกโก้ (cocoa pod extract) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ดีกว่า kojic acid

ตารางที่ 4.7 ปริมาณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, %Inhibition และ IC₅₀ ของสารสกัดโกโก้ของเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ

สารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (mg kojic acid/g extract)	%Inhibition	IC ₅₀ (mg/ml)
เมล็ดโกโก้สกัด	591.394±12.69 ^a	85.17±1.83	0.100±0.000 ^c
เมล็ดโกโก้ดิบ	529.415±1.35 ^c	74.89±0.23	0.114±0.002 ^b
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	567.099±3.60 ^b	82.47±0.69	0.109±0.001 ^b
เมล็ดโกโก้ปกติ	477.451±0.32 ^d	84.28±0.057	0.131±0.001 ^a

The IC₅₀ value of kojic acid is 0.054±0.0003 mg/ml

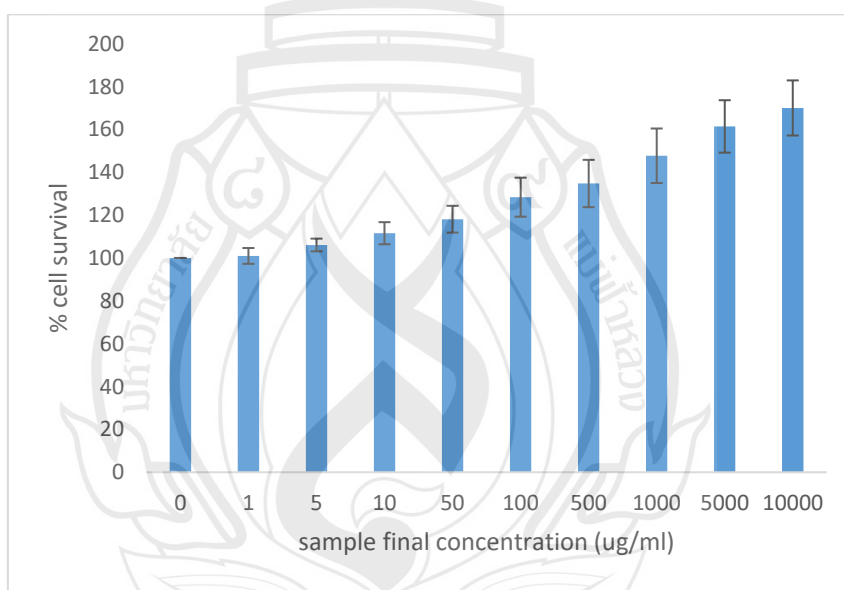
หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรที่เหมือนกันกำกับในแนวคอลัมน์บ่งชี้ว่า ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05)

ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดโกโก้สกัดมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าส่วนอื่น ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ดโกโก้ที่ทำให้มีการกระตุ้นการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางกลุ่ม อย่างมีประสิทธิภาพได้ดีกว่า สารสกัดจากเมล็ดโกโก้ที่ไม่งอก เมื่อเมล็ดโกโก้เกิดการงอก เมล็ดจะถูกกระตุ้น ส่งผลทำให้เอนไซม์ภายในเมล็ดถูกกระตุ้นและย่อยสลายของสารสำรอง เช่น คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และไขมันเพื่อเป็นพลังงานและสารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโตของเมล็ด และยังส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น (+)-catechin และ (-)-epicatechin ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดไนโกโก้ ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างที่สามารถเข้าไปจับกับตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) ของเอนไซม์ได้ ทำให้เกิดการขัดขวางไม่ให้เอนไซม์เข้าไปจับกับสารตั้งต้น (substrate) ได้ จึงสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดเม็ดสีเมลานินได้ (Brückel et al., 2024) นอกจากนี้ ค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐาน kojic acid เท่ากับ 0.054 ± 0.0003 mg/ml ต่ำกว่าสารสกัดทุกตัว ซึ่งเป็นไปตามลักษณะของสารบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สูงกว่า อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งโดยรวม สารสกัดจากเมล็ดโกโก้สกัดยังคงแสดงศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในระดับสูง และมีแนวโน้มที่จะถูกนำไปพัฒนาเป็น สารสกัดธรรมชาติสำหรับชะลอการเกิดเม็ดสีเมลานินเพื่อต่อยอดในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิวในอนาคต

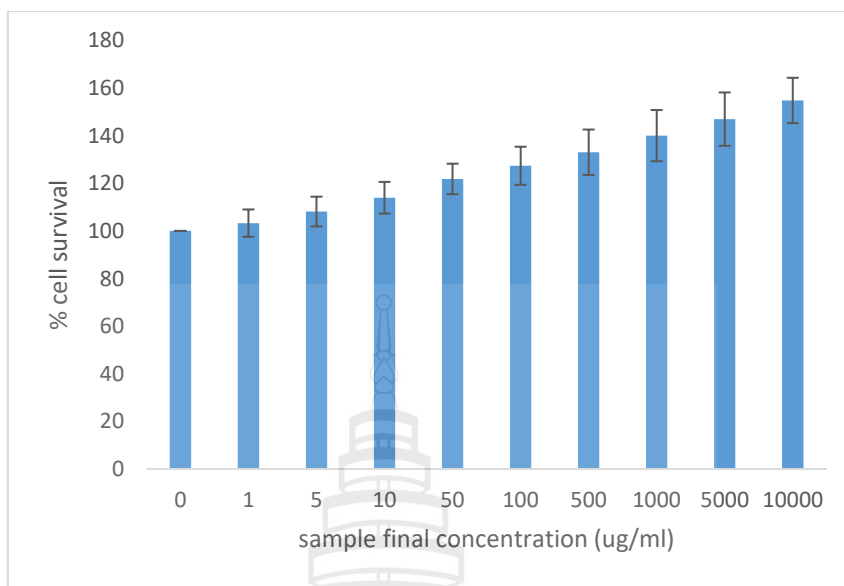
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดโกโก้ทั้งสี่ส่วน ไม่ว่าจะเป็นเมล็ดโกโก้สกัด เมล็ดโกโก้ดิบ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ ล้วนแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell Survival) สูงกว่า 100% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

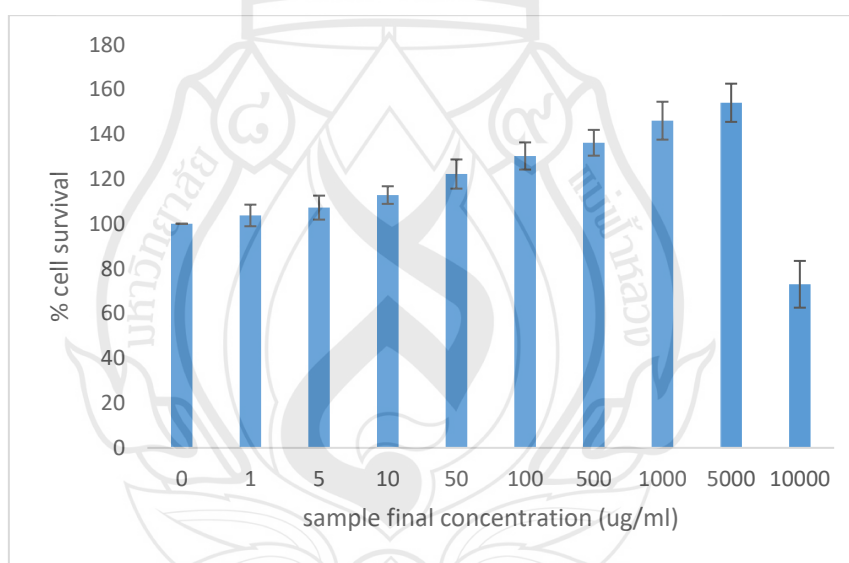
โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ความเข้มข้น 1-10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมล็ดโกโก้สกัดและเปลือกโกโก้มีค่า % cell survival อยู่ที่ 170.01 ± 12.86 และ 154.79 ± 9.52 ตามลำดับ ส่วนเมล็ดโกโก้ปกติ และเมล็ดโกโก้ดิบ ให้ค่า cell survival สูงสุดในช่วงความเข้มข้น 1-5000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมี % cell survival อยู่ที่ 136.56 ± 5.19 และ 154.01 ± 8.52 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดโกโก้ทั้ง 4 ส่วน ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากมีค่า % cell survival สูงกว่า control (100%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ de la Luz Cádiz-Gurrea et al. (2019)



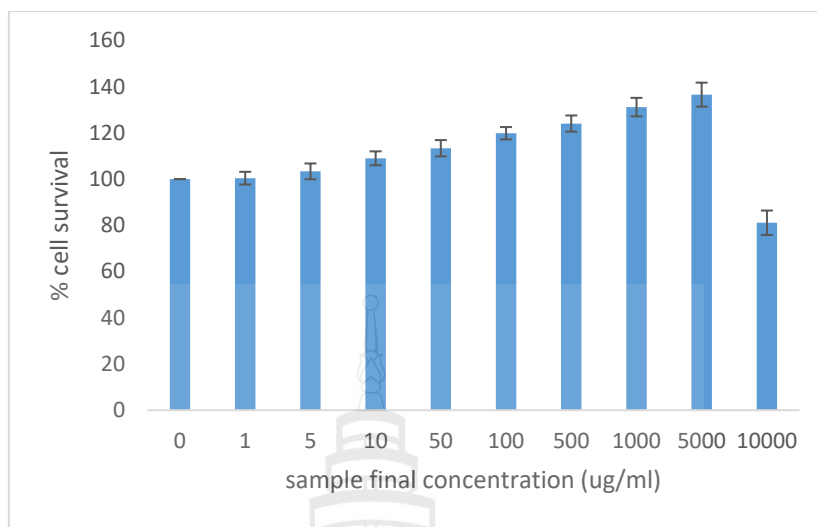
ภาพที่ 4.2 กราฟแสดง % cell survival ของเมล็ดโกโก้สกัด



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดง % cell survival ของเปลือกโกโก้



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดง % cell survival ของเมล็ดโกโก้ลิบ



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดง % cell survival ของเมล็ดโกโก้ปกติ

ซึ่งเมล็ดโกโก้ปกติมี % cell survival สูงกว่าส่วนอื่น ๆ เนื่องจากการงอกของเมล็ดส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น (+)-catechin และ (-)-epicatechin ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Brückel et al., 2024) และในเปลือกโกโก้มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง (Pattanakitjaroenchai et al., 2025)) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งสารเหล่านี้สามารถปกป้องเซลล์จาก oxidative stress ทำให้เซลล์เติบโตได้ดี

การที่ค่า % Cell Survival สูงกว่า 100% นั้น เป็นการบ่งชี้ว่าสารสกัดเหล่านี้ไม่เพียงแต่ไม่เป็นพิษเท่านั้น แต่ยังแสดงถึงผลกระทบเชิงบวก (Positive Biological Effect) ต่อสถานะของเซลล์ ผลกระทบเชิงบวกนี้สามารถตีความได้ในสองแนวทางหลัก คือ ฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell Proliferation) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการฟื้นฟูผิว หรือฤทธิ์ปกป้องเซลล์ (Cytoprotective Effect) จากความเครียดที่เกิดขึ้นในสภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยง

สารสกัดโกโก้อุดมไปด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง กลไกการปกป้องเซลล์ของสารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการป้องกันความเสียหายของโครงสร้างเซลล์และไมโทคอนเดรียจากการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) ฤทธิ์ Cytoprotective นี้มีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชะลอวัย (Anti-Aging) ป้องกันการทำลายและช่วยฟื้นฟูเซลล์ เพื่อช่วยรักษาความยืดหยุ่นและความสมบูรณ์ของเซลล์ผิวหนังในระยะยาว

โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากเมล็ดโกโก้ปกติศักยภาพในการปกป้องและกระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์สูงที่สุด 170.01% ซึ่งสูงกว่าเมล็ดโกโก้ปกติ 136.56% อย่างชัดเจน การที่เมล็ดโกโก้

งอกมีฤทธิ์เชิงบวกต่อเซลล์สูงสุดนี้มีความเชื่อมโยงกับผลการทดสอบอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงที่สุดเช่นกัน ความโดดเด่นนี้อธิบายได้จากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการงอก (Germination) การงอกจะกระตุ้นเอนไซม์และกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเมล็ด ซึ่งส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) หรือการแปรรูปของสารประกอบเดิม (Bioconversion) ให้เป็นรูปแบบที่มีประสิทธิภาพหรือสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น สารประกอบที่เปลี่ยนไปเหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพเหนือกว่าสารประกอบในเมล็ดที่ไม่ผ่านการงอก ในการต่อต้านความเครียดและส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ ดังนั้นผลการทดสอบนี้จึงสนับสนุนการใช้เมล็ดโกโก้งอกในฐานะแหล่งวัตถุดิบที่มีศักยภาพสูงสุดสำหรับการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์และลดการเกิดเม็ดสี

4.7 การเปรียบเทียบราคาต้นทุน ฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง และความคุ้มค่าของสารสกัด วัสดุเศษเหลือเมล็ดโกโก้

การประเมินความคุ้มค่าของสารสกัดจากโกโก้ในมุมมองของการใช้งานเชิงพาณิชย์ ต้องพิจารณาสองปัจจัยหลักพร้อมกัน คือ ต้นทุนวัตถุดิบ (Raw Material Cost) และประสิทธิภาพทางชีวภาพ (Biological Efficacy) ผลการวิจัยนี้ได้ทำการบูรณาการข้อมูลทั้งสองส่วนเพื่อหาจุดที่ให้ความคุ้มค่าสูงสุด

ตารางที่ 4.8 ราคาวัตถุดิบเมล็ดโกโก้งอก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติที่ใช้สำหรับผลิตสารสกัดโกโก้ 1 กิโลกรัม

ตัวอย่าง	ราคาวัตถุดิบ/ กิโลกรัม (บาท)	ปริมาณสารสกัด โกโก้ที่ได้ (g)	ราคาวัตถุดิบที่ใช้สำหรับผลิต สารสกัดโกโก้ 1 กิโลกรัม (บาท)
เมล็ดโกโก้งอก	0	98.2	0
เมล็ดโกโก้สับ	130	66.3	1,960.78
เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้	400	43.3	9,237.88
เมล็ดโกโก้ปกติ	360	181.4	1,984.56

จากราคาเมล็ดโกโก้งอก เมล็ดโกโก้สับ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ และเมล็ดโกโก้ปกติ ต่อ 1 กิโลกรัมเทียบกับปริมาณสารสกัดที่ได้พบว่า เมล็ดโกโก้งอก ถูกจัดว่ามีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์โดดเด่นที่สุด เนื่องจากเป็นวัสดุที่ไม่มีมูลค่าทางการตลาด (ไม่นิยมนำมาขาย มักถูกนำไปใช้เป็นปุ๋ยหรืออาหารสัตว์) ทำให้ต้นทุนวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารสกัด 1 กิโลกรัมเท่ากับ 0 บาท สิ่งนี้แสดงถึง

โอกาสในการเปลี่ยนวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรให้เป็นวัตถุดิบมูลค่าสูง ซึ่งตอบโจทย์แนวคิด เศรษฐกิจหมุนเวียน ถึงแม้ปริมาณผลผลิตสารสกัด (% Yield) ของเมล็ดโกโก้จะอยู่เป็นอันดับสอง (98.2 กรัม/กิโลกรัมวัตถุดิบ) แต่การมีต้นทุนวัตถุดิบหลักเป็นศูนย์ ทำให้เป็นตัวเลือกที่เหนือกว่าในมิติ เศรษฐศาสตร์

เมล็ดโกโก้ปกติเป็นตัวเลือกที่มีความคุ้มค่าสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์รองจากวัสดุเศษเหลือ เนื่องจากมีราคาวัตถุดิบอยู่ที่ 360 บาท/กิโลกรัม และใน 1 กิโลกรัมของวัตถุดิบดังกล่าวให้สารสกัดได้ 181.4 กรัม ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณจะมีต้นทุนวัตถุดิบเพื่อผลิตสารสกัดจำนวน 1 กิโลกรัม อยู่ที่ประมาณ 1,984.56 บาท

ในทางกลับกัน วัสดุเศษเหลือ เช่น เปลือกเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ลีบ แม้จะเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีโอกาส “เพิ่มมูลค่า” แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ในเชิงต้นทุนแล้วพบว่าไม่คุ้มค่าเท่ากับเมล็ดปกติ โดยเปลือกเมล็ดโกโก้มีราคาวัตถุดิบอยู่ที่ 400 บาท/กิโลกรัม และให้สารสกัดได้เพียง 43.3 กรัม ส่งผลให้ต้นทุนวัตถุดิบต่อสารสกัด 1 กิโลกรัมอยู่ที่ประมาณ 9,237.88 บาท ขณะที่เมล็ดโกโก้ลีบมีราคาวัตถุดิบอยู่ที่ 130 บาท/กิโลกรัม และให้สารสกัดได้ 66.3 กรัม เทียบเท่าต้นทุนวัตถุดิบเพื่อผลิตสารสกัด 1 กิโลกรัมอยู่ที่ประมาณ 1,960.78 บาท ราคาอ้างอิงจากราคาวัตถุดิบของวิสาหกิจชุมชน โกโก้นาวัว ณ วันที่ทำการวิจัย โดยไม่รวมค่าใช้จ่ายอื่น

เพื่อให้การประเมินความคุ้มค่ามีความครอบคลุม การวิเคราะห์ต้องรวมประสิทธิภาพทางชีวภาพเข้ากับต้นทุน ในที่นี้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพ เนื่องจากเป็นคุณสมบัติสำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์ปรับผิวให้กระจ่างใส (Skin Lightening) และผลิตภัณฑ์ชะลอวัย (Anti-Aging) เพื่อช่วยรักษาความยืดหยุ่นและความสมบูรณ์ของเซลล์ผิวหนัง ที่มีมูลค่าทางการค้าสูง

จากผลลัพธ์การทดลองเมล็ดโกโก้กาก มีความคุ้มค่าเชิงบูรณาการสูงสุดเนื่องจากมีประสิทธิภาพการยับยั้งไทโรซิเนสสูงสุด และมีผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีฤทธิ์เชิงบวกต่อเซลล์สูงสุด

เมล็ดโกโก้กากเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพสูงสุดในแง่ของต้นทุน-ประสิทธิภาพ มีคุณสมบัติปรับผิวให้กระจ่างใส มีศักยภาพในการปกป้องและหรือกระตุ้นการอยู่รอดของเซลล์ สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางชีวภาพสูงและยั่งยืน การนำวัสดุเศษเหลือที่เกษตรกรไม่ได้ใช้ประโยชน์มาสร้างมูลค่าเพิ่มเป็นการสนับสนุนหลักความยั่งยืนด้านสิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจหมุนเวียนอย่างยั่งยืน

บทที่ 5

สรุป

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการประเมินเชิงบูรณาการเพื่อค้นหาสารสกัดโกโก้ที่มีศักยภาพสูงสุดสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยมุ่งเน้นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากโกโก้ ได้แก่ เมล็ดโกโก้คั่ว เมล็ดโกโก้ดิบ และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ เปรียบเทียบกับเมล็ดโกโก้ปกติ การวิเคราะห์ได้ครอบคลุมถึงปริมาณสารออกฤทธิ์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ความปลอดภัยต่อเซลล์ และการประเมินความคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์

หลังกระบวนการสกัดไขมันออกด้วยเฮกเซน สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล 75% แสดงค่าร้อยละผลผลิต (% Yield) ที่แตกต่างกัน โดยเมล็ดโกโก้ปกติให้ผลผลิตสูงสุดที่ $18.14 \pm 0.44\%$ เนื่องจากยังคงมีสารชีวภาพครบถ้วน ซึ่งสูงกว่าเมล็ดโกโก้คั่ว ($9.82 \pm 0.44\%$) และเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ที่ให้ผลผลิตต่ำที่สุด ($4.33 \pm 0.18\%$)

ด้านปริมาณสารสำคัญ เปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้และเมล็ดโกโก้ปกติแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด โดยมีค่าใกล้เคียงกันที่ 269.09 ± 1.85^a และ 260.87 ± 15.26^a mg GA/g extract ตามลำดับ ในขณะที่เมล็ดโกโก้ปกติมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอย่างชัดเจนที่ 260.16 ± 13.09^a mg QE/g extract

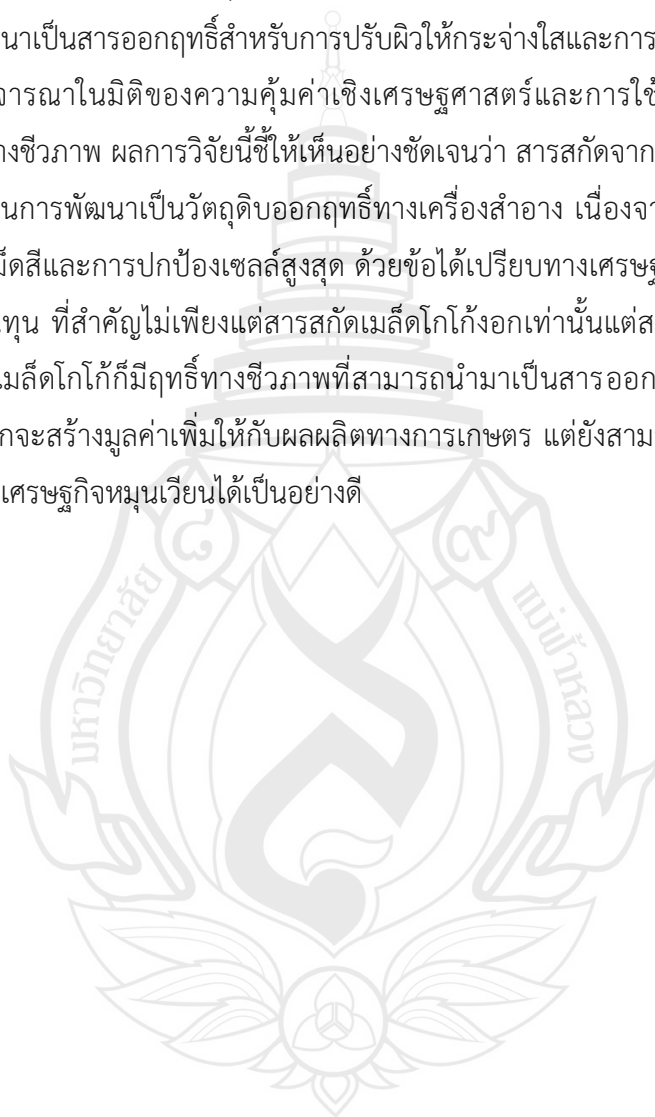
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP แสดงให้เห็นว่าเมล็ดโกโก้ปกติและเมล็ดโกโก้คั่ว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} (DPPH) อยู่ที่ 0.30 ± 0.29^d และ 0.37 ± 0.14^c mg/ml ตามลำดับ และเมล็ดโกโก้ปกติมีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) สูงที่สุดที่ 346.58 ± 8.31^a mg TE/g extract อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาฤทธิ์ทางชีวภาพที่จำเพาะเจาะจงต่ออุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ผลการทดสอบกลับชี้ไปที่ความโดดเด่นของเมล็ดโกโก้คั่วอย่างชัดเจน

โดยสารสกัดจากเมล็ดโกโก้คั่วแสดง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นกลไกหลักในการลดการเกิดเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อยู่ที่ค่า IC_{50} 0.100 ± 0.000^c mg/ml ความสามารถที่เหนือกว่านี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการงอก (Germination) ซึ่งกระตุ้นการสังเคราะห์หรือการแปรสภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์

นอกจากนี้ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ยังยืนยันว่าสารสกัดโกโก้ทั้งสี่ส่วนมีความปลอดภัยสูง เนื่องจากทุกส่วนมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell Survival) สูงกว่า 100% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือเมล็ดโกโก้คั่ว แสดงค่า % Cell Survival สูงที่สุดถึง

170.01±12.86 ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึง "ผลกระทบเชิงบวก" หรือ "ฤทธิ์ปกป้องเซลล์" สารสกัดจึงไม่เพียงแต่ไม่เป็นพิษ แต่ยังช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ คุณสมบัติการปกป้องเซลล์ที่สูงนี้มีฤทธิ์เชิงบวกต่อเซลล์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ชะลอวัย (Anti-Aging) ป้องกันการทำลายและช่วยฟื้นฟูเซลล์ เพื่อช่วยเสริมความยืดหยุ่นและความสมบูรณ์ของเซลล์ผิวในระยะยาว บวกกับความเชื่อมโยงกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เมล็ดโกโก้กัมมีศักยภาพสูงสุดในการนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์สำหรับการปรับผิวให้กระจ่างใสและการชะลอวัย

เมื่อพิจารณาในมิติของมูลค่าเชิงเศรษฐศาสตร์และการใช้งานเชิงพาณิชย์ร่วมกับประสิทธิภาพทางชีวภาพ ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า สารสกัดจากเมล็ดโกโก้กัมมีศักยภาพที่โดดเด่นที่สุดในการพัฒนาเป็นวัตถุดิบออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดเม็ดสีและการปกป้องเซลล์สูงสุด ด้วยข้อได้เปรียบทางเศรษฐศาสตร์จากการเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ไร้ต้นทุน ที่สำคัญไม่เพียงแต่สารสกัดเมล็ดโกโก้กัมเท่านั้นแต่สารสกัดจากเมล็ดโกโก้ลิบและเปลือกหุ้มเมล็ดโกโก้ก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำมาเป็นสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางได้เช่นกัน นอกจากจะสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตร แต่ยังสามารถสร้างความยั่งยืนด้านสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจหมุนเวียนได้เป็นอย่างดี



รายการอ้างอิง

- จันทิมา ชั่งสิริพร, พฤทธยา พงศ์ยี่หล้า และนิรนา ชัยฤกษ์. (2566). อิทธิพลของอุณหภูมิและความเร็วลมต่อการอบแห้งเมล็ดโกโก้แบบลมร้อน. *Journal of Engineering, RMUTT*, 21(1), 11-20.
- วลีพรรณ รกิติกุล, จินดา ศิริตา, ปิยดา ยศสุนทร, ธนายุทธ ช่างเรือนงาม, และสุรัสวดี นางแล. (2565). วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาอัตลักษณ์ของโกโก้ในจังหวัดเชียงราย. *วารสาร มรภ.ภพ. วิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์ และเทคโนโลยี*, 1(1), 19-34.
- สมัชญา งามสุข. (2565). คุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารโปรไซยานิดินของโกโก้กับประโยชน์ด้านสุขภาพ. *วารสารวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร*, 52(4), 36-49.
- Abdul Karim, A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Abd Gani, S. S., Zainudin, B. H., & Abdullah, N. A. (2014). Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 381.
- Abeyasinghe, D. C., & Kumari, I. P. N. P. (2012). Antioxidant activity and phenolic content of different pod tissues of five selected cocoa hybrid lines. *Journal of Food and Agriculture*, 5(1-2). <https://doi.org/10.4038/jfa.v5i1-2.5177>
- Agudelo, C., Bravo, K., Ramírez-Atehortúa, A., Torres, D., Osorio, E., & Carrillo-Hormaza, L. (2021). Chemical and skincare property characterization of the main cocoa byproducts: Extraction optimization by rsm approach for development of sustainable ingredients. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules2624742>
- Agus, B. A. P., Mohamad, N. N., & Hussain, N. (2018). Composition of unfermented, unroasted, roasted cocoa beans and cocoa shells from Peninsular Malaysia. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2581–2589. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9875-4>
- Aunillah, A., Purwanto, E. H., Wardiana, E., & Iflah, T. (2021, July). The effect of fermentation process, extraction methods and solvents on yield, total polyphenol, and antioxidant levels of cocoa beans. In *IOP conference series: earth and environmental science* (Vol. 828, No. 1, p. 012038). IOP Publishing.

- Botella-Martínez, C., Lucas-González, R., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2021). Assessment of chemical composition and antioxidant properties of defatted flours obtained from several edible insects. *Food Science and Technology International*, 27(5), 383-391.
- Brückel, K., Stark, T. D., Dawid, C., & Hofmann, T. (2024). Molecular Changes during Germination of Cocoa Beans, Part 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(33), 18606-18618. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c03523>
- Chungsiriporn, J., Pongyeela, P., & Chairerk, N. (2023). Antioxidant Activity of Cocoa Bean Shells for the Development of Cocoa-Based Tea Products. *Journal of Science and Technology CRRU*, 2(2), 1-9. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/jstcrru/article/view/259545>
- de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Fernández de las Nieves, I., Aguilera Saez, L. M., Fernández-Arroyo, S., Legeai-Mallet, L., Bouaziz, M., & Segura-Carretero, A. (2019). Bioactive compounds from Theobroma cacao: Effect of isolation and safety evaluation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 40-46.
- Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73, 104134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>.
- Emelda, A., & Wahyudin, E. (2014). High levels of flavonoids and HPLC profile from purified extract of cocoa bean from West Sulawesi Indonesia. *International Journal of Chem Tech Research*, 6(4), 2363-2367.
- Huynh, G. H., van Pham, H., & Hong Nguyen, H. V. (2023). Effects of enzymatic and ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from cocoa bean shells. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(5), 4650-4660. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01986-6>

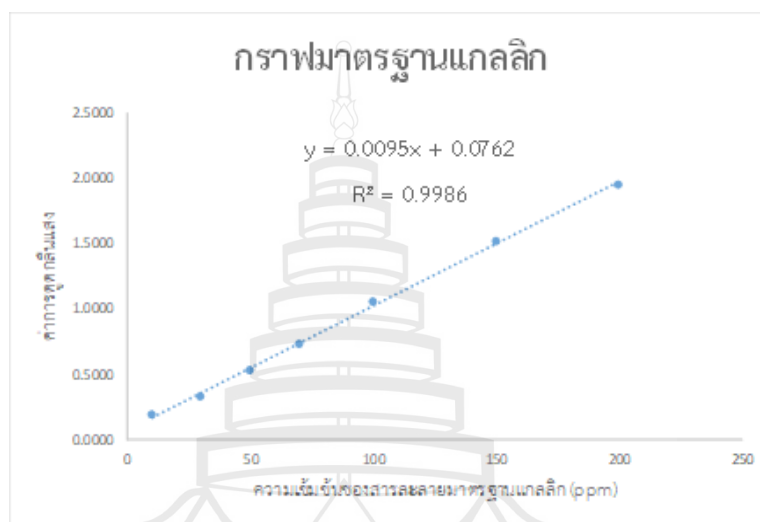
- Kongdin, M., Chumanee, S., & Sansenya, S. (2023). Gamma Irradiation Promotes the Growth Rate of Thai Pigmented Rice As Well As Inducing the Accumulation of Bioactive Compounds and Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes Inhibitors (α -Glucosidase and α -Amylase) under Salt Conditions. *Preventive nutrition and food science*, 28(4), 463–470. <https://doi.org/10.3746/pnf.2023.28.4.463>
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2018). Determination of total phenolic content using the Folin-C assay: Single-laboratory validation, first action 2017.13. *Journal of AOAC international*, 101(5), 1466-1472. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>
- Llerena, W., Samaniego, I., Vallejo, C., Arreaga, A., Zhunio, B., Coronel, Z., . . . Carrillo, W. (2023). Profile of Bioactive Components of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) By-Products from Ecuador and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Foods*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/foods12132583>
- Pattanakitjaroenchai, S., Pitsawong, P., Khat-Udomkiri, (2025). Exploration of cosmetic bioactive compounds from cocoa bean shell using polyol-based microwave-assisted extraction: Cytotoxicity, anti-tyrosinase, and anti-melanogenesis properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 10, 100454
- Pavlović, N., Jakovljević, M., Molnar, M., & Jokić, S. (2021). Ultrasound-assisted extraction of active compounds from cocoa bean shell. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*, 10(2), 77-88.
- Pico-Hernández, S. M., Murillo-Méndez, C. J., & López-Giraldo, L. J. (2020). Extraction, separation, and evaluation of antioxidant effect of the different fractions of polyphenols from cocoa beans. *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 19–27. <https://doi.org/10.15446/rcq.v49n3.84082>
- Sansenya, S., Payaka, A., Wannasut, W., Hua, Y., & Chumanee, S. (2021). Biological activity of rice extract and the inhibition potential of rice extract, rice volatile compounds and their combination against α -glucosidase, α -amylase and tyrosinase. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(4), 1865-1876. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14816>

- Shahanas, E., Panjikkaran, S. T., Aneena, E. R., Sharon, C. L., & Remya, P. R. (2019). Health benefits of bioactive compounds from cocoa (*Theobroma cacao*). *Agricultural Reviews*, 40(2), 143-149. <https://doi.org/10.18805/ag.R-1851>
- Utami R.R., Armunanto R., Rahardjo S., Supriyant (2016). Effect of Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.) Fermentation on Phenolic Content, Antioxidant Activity and Functional Group of Cocoa Bean Shell. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(10), 948-953.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1), 60-69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>

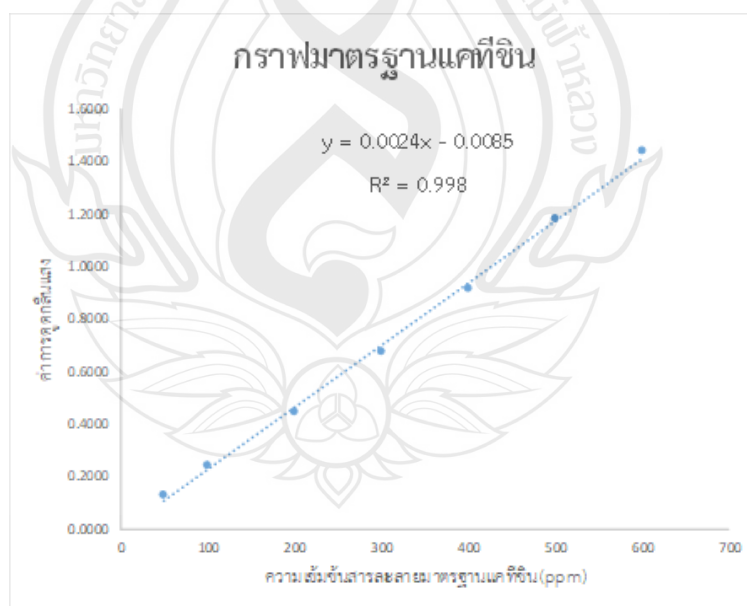


ภาคผนวก

กราฟมาตรฐาน



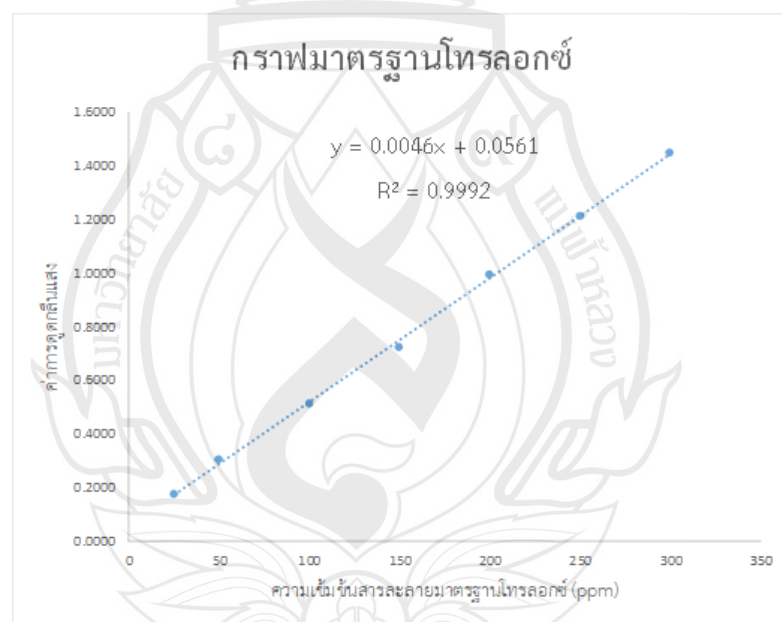
ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานแกลลิก



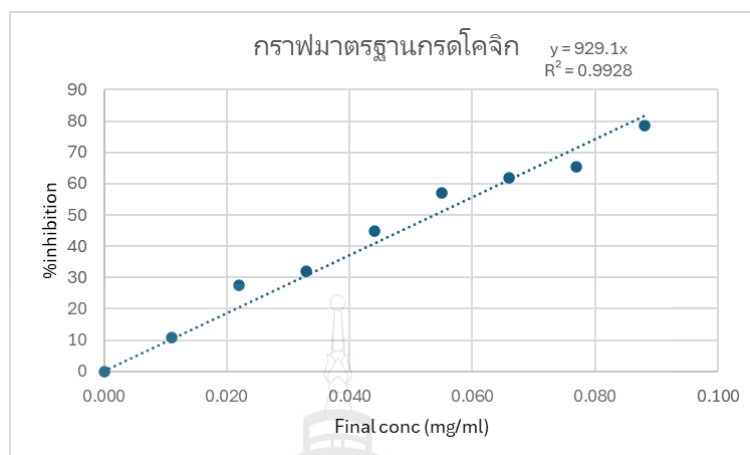
ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานแคทีชิน



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานไทรลอกซ์ (DPPH)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานไทรลอกซ์ (FRAP)



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก



ประวัติผู้ประพันธ์

ชื่อ

หฤทษณา บุญรอดกลับ

ประวัติการศึกษา

2555

ปริญญาตรี บริหารธุรกิจบัณฑิต (BBA)

สาขาการจัดการธุรกิจ มหาวิทยาลัยอัสสัมชัญ

