

การเพิ่มมูลค่าเนื้อผลกาแฟเป็นสารเชิงหน้าที่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

Value Added of Coffee Pulp as Functional Ingredient in Skin Care Cosmetic

นิชชีมา บุญอยู่¹ ลภัสรดา มุ่งหมาย² เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน³ ณัฐวุฒิ หวังสมนึก¹ และดวงพร อมรเลิศพิศาล^{3*}

Nitchima Boonyu¹, Lapatrada Mungmai², Kriangsak Mengamphan³

Nattawut Whangsomnuek¹ and Doungporn Amornlerdpison^{3*}

¹หลักสูตรสหวิทยาการเกษตร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

³ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Interdisciplinary Agriculture Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Cosmetic Science, School of Pharmaceutical Sciences, University of Phayao, Phayao Thailand 56000

³Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: doungpornfishtech@gmail.com

Received: August 04, 2020

Revised: April 20, 2021

Accepted: June 21, 2021

Abstract

Coffee pulp (CP) is a waste from the industrial coffee production which cause a problem in management of environment including acidic soil quality and unpleasant odors. In this study, Arabica CP was value added as functional ingredient in cosmetic product. The CP was extracted with water and dried via freeze drying to obtained coffee pulp extract (CPE). The total phenolic content of CPE was determined to be 45.12 ± 1.08 mg GAE/g extract. The chlorogenic acid, a bioactive compound in CP was found to be 17.8 mg/kg. In the biological evaluation, it was found that CPE showed antioxidant activity in 3 assays of ABTS, DPPH and superoxide radicals-scavenging. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) were 0.59, 0.94 and 9.53 mg/ml, respectively. Furthermore, CPE was shown inhibition of tyrosinase, this enzyme plays an important role in melanogenesis which IC_{50} was 125.21 mg/ml. From the above experiments, CPE exhibits functional properties for anti-aging cosmetics. CPE was formulated in facial cream product and then the stability test was evaluated in various conditions such as 4°C, room temperature and 45°C for 90 days as well as accelerated stability test under 6 heat-cool cycle. The facial cream demonstrated good physical stability under 4 various conditions. Therefore, CPE has the potential to add the value as functional ingredient in cosmetic products.

Keywords: coffee pulp extract, phenolic compound, antioxidant, anti-tyrosinase, cosmetic product

บทคัดย่อ

เนื้อผลกาแฟ (Coffee Pulp; CP) เป็นส่วนเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดกาแฟ จัดเป็นเศษเหลือทิ้งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมทั้งคุณภาพดินที่เป็นกรดและกลิ่นไม่พึงประสงค์ การศึกษาครั้งนี้จึงนำ CP สายพันธุ์ราบิเก่าที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งมาเพิ่มมูลค่าเป็นสารเชิงหน้าที่ในเครื่องสำอางบำรุงผิว โดยนำ CP มาทำการสกัดด้วยน้ำและทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งได้เป็นสารสกัดเนื้อผลกาแฟ (Coffee Pulp Extract; CPE) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกพบว่า CPE มีฟีนอลิกรวม 45.12 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมของสารสกัด โดยมีกรดคลอโรจีนิกซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเท่ากับ 17.8 มก./กก. ในส่วนของการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า CPE มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS, DPPH และ superoxide ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 0.59, 0.94 และ 9.53 มก./มล. นอกจากนี้ยังพบว่า CPE สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นสาเหตุของการสังเคราะห์เมลานิน มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 125.21 มก./มล. จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า CPE มีคุณสมบัติเป็นสารเชิงหน้าที่เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเครื่องสำอาง จึงนำไปพัฒนาในตำรับครีมบำรุงผิวหน้า และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ใน 4 สภาวะ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง 4°C. และ 45°C. เป็นเวลา 90 วัน และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งโดยการทดสอบแบบร้อนสลับเย็นจำนวน 6 รอบ ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นมีความคงตัวดีทั้ง 4 สภาวะ ดังนั้น CPE จึงมีศักยภาพในการนำมาเพิ่มมูลค่าเป็นสารเชิงหน้าที่ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิว

คำสำคัญ: เนื้อผลกาแฟ สารประกอบฟีนอลิก
สารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์
ไทโรซิเนส ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

คำนำ

กาแฟ (Coffee) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการนำไปผลิตเป็นเครื่องดื่ม เนื่องจากการดื่มกาแฟจะส่งผลให้รู้สึกสดชื่น ตื่นตัว ช่วยลดอาการง่วงซึม และผ่อนคลายความรู้สึกตึงเครียดลงได้ ดังนั้นจึงมีการเพิ่มปริมาณการปลูกกาแฟทั้งในประเทศและต่างประเทศมากขึ้น อุตสาหกรรมกระบวนการแปรรูปกาแฟเพื่อให้ได้เมล็ดกาแฟจำนวนมากย่อมส่งผลให้มีส่วนเหลือทิ้งปริมาณมากตามมา โดยหลังจากการกะเทาะเปลือกกาแฟเพื่อนำเมล็ดด้านในมาผลิตเป็นเครื่องดื่มจะเหลือเศษของเนื้อผลกาแฟ (Coffee Pulp; CP) ซึ่งหากขาดการจัดการที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม เนื่องจากส่งกลิ่นไม่พึงประสงค์และทำให้ดินเป็นกรด แต่เดิมมีการนำ CP ที่เป็นเศษเหลือทิ้งนั้นไปใช้ประโยชน์ในการทำปุ๋ยหมักนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ใช้เป็นพื้นที่สำหรับเพาะปลูกเห็ดต่างๆ (Rathinavelu and Graziosi, 2005) อย่างไรก็ตามยังไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ทางเศรษฐศาสตร์ และการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมเท่าที่ควร

งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าเนื้อผลกาแฟ (Coffee Pulp; CP) ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก คาเฟอีน และแทนนิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความเสื่อมของเซลล์ และยังมีน้ำมันที่ช่วยบำรุงผิวได้ (Pandey *et al.*, 2000; Ramirez-Martinez, 1988) นอกจากนี้ยังตรวจพบกรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid) ในปริมาณสูงร้อยละ 42.2 อีพิแคตชิน (Epicatechin) ร้อยละ 21.6 (Rodriguez de Sotillo and Hadley, 2002) และแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ที่เป็นสารสีที่ให้สีแดงม่วง และน้ำเงิน (Murthy and Naidu, 2012) ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารดังกล่าวมีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสี

เมลานินซึ่งเป็นสาเหตุของผิวสีเข้มขึ้น ชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนัง จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัตถุดิบหรือส่วนผสมในเครื่องสำอาง (Barbulova *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014)

ในปัจจุบันเริ่มมีผู้สนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับวัสดุเศษเหลือทิ้ง (By-product) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางมากขึ้น (Barbulova *et al.*, 2015; Murthy and Naidu, 2012) นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชยังมีประสิทธิภาพ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสังเคราะห์ทางเคมี (Soto *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตามการศึกษานำเนื้อผลกาแฟเป็นสารสำคัญในเครื่องสำอางยังมีรายงานไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มมูลค่าของเนื้อผลกาแฟที่เป็นเศษเหลือมาพัฒนาเป็นสารสกัดจากเนื้อผลกาแฟ (Coffee Pulp Extract; CPE) มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยชะลอวัย จากนั้นนำ CPE ไปใช้เป็นสารเชิงหน้าที่ในตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางร่วมกับการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดตัวอย่างเนื้อผลกาแฟ

ตัวอย่าง CP สายพันธุ์อาราบิก้าได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ฮิลล์คอฟฟ์ จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ โดยนำ CP ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C. แล้วนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำผง CP ปริมาณ 100 กรัม ทำการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 60°C. นาน 2 ชั่วโมง และทำการแยกตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที จากนั้นนำไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งได้เป็นสารสกัด CPE นำไปใช้ตั้งตำรับเครื่องสำอางและคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดดังสมการ

ผลผลิตของสารสกัด (ร้อยละ) = $\frac{[\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)}]}{[\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)}]} \times 100$

การวิเคราะห์สารสำคัญจาก CPE

1) วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิก

ตามวิธีการดัดแปลงจาก Hammerschmidt and Pratt (1978) โดยผสม Folin-ciocalteu ร้อยละ 10 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร สารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และ CPE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดความยาวคลื่นที่ 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ต่อน้ำหนัก CPE ปริมาณ 1 กรัม โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

2) วิเคราะห์หาปริมาณกรดคลอโรจีนิก

ตามวิธีของ Erdem *et al.* (2016) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว (High Performance Liquid Chromatography, HPLC; Agilent Technologies 1200 series) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ เมทานอล (สาร A) และสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 2 (สาร B) โดยมี Condition ดังนี้ ที่ 9 นาทีแรก คือ ร้อยละ 12 ของสาร A ในสาร B; ที่เวลา 0-5 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 12-15 ของสาร A ในสาร B (Linear gradient); ที่เวลา 5-15 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 15-30 ของสาร A ในสาร B (Linear gradient); ที่เวลา 15-19 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 30 ของสาร A ในสาร B (Isocratic); ที่เวลา 19-27 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 30-50 ของสาร A ในสาร B (Linear gradient) โดยมี Flow rate เท่ากับ 0.5 มล./นาที ปริมาณกรดคลอโรจีนิกทำการตรวจวัดที่ 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก

การศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของ CPE

1) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี

ABTS radical scavenging ตามวิธีดัดแปลงจาก Re *et al.* (1999) โดยเตรียมอนุมูล ABTS โดยผสม 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

ความเข้มข้น 7 กับ 2.45 มิลลิโมลาร์ $K_2S_2O_8$ ในอัตราส่วน 1:0.5 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12 ชั่วโมง ก่อนใช้งานทำการเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 ± 0.50 ทำการทดลองโดยนำ CPE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น) และเติมอนุโมล ABTS ปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ผลการทดลองเปรียบเทียบกับโทรลอกซ์และรายงานผลในรูปแบบ มิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมของสารสกัด

2) ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี

DPPH radical scavenging ตามวิธีการดัดแปลงจาก Mensor *et al.* (2001) โดยเติม CPE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (ชุดควบคุมใช้เมทานอล) ผสมกับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ที่เตรียมในเมทานอล ทำการผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ผลการทดลองเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก และรายงานในรูปแบบ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

3) ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี

Superoxide radical scavenging ตามวิธีการดัดแปลงจาก Nishikimi *et al.* (1972) เตรียมสารละลายทั้งหมดใน 100 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer (pH 8) ทำการทดลองโดยเติม CPE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (ชุดควบคุมใช้ Phosphate buffer) ผสมกับสารละลาย 156 มิลลิโมลาร์ Nitroblue Tetrazolium (NBT) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ด้วยสารละลาย 468 ไมโครลิตร β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate (NADH) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ 60 มิลลิโมลาร์ Phenazine Methosulphate (PMS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ผลการทดลอง

เปรียบเทียบกับกรดแกลลิกและรายงานค่าเช่นเดียวกับอนุโมล DPPH

4) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตามวิธีของ Masuda *et al.* (2005) โดยทำการเตรียมสารทั้งหมดด้วย 20 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer (pH 6.8) ทำการทดลองโดยใช้ 96-wel plate แต่ละหลุมประกอบด้วย CPE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ชุดควบคุมใช้ Phosphate buffer) ผสมกับเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ Phosphate buffer 140 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้นาน 10 นาที และทำการเติม L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มอีกครั้งนาน 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ผลการทดลองเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์ไทโรซิเนส (%inhibition) ทำการคำนวณดังสมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

โดยที่ $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ปราศจาก CPE และ $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงชุดทดลองที่เติม CPE

การพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางผสม CPE

นำ CPE ไปพัฒนาตำรับเป็นเครื่องสำอางบำรุงผิว โดยการตั้งตำรับครีมที่มีส่วนผสมของวัฏภาคน้ำ (Water phase) และน้ำมัน (Oil phase) ดังแสดงรายชื่อสารประกอบเครื่องสำอาง (Cosmetic ingredients) ใน Table 1 จากนั้นเทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ และปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 โดย CPE ขนาด 0.5-1.5% ถูกนำไปพัฒนาในตำรับ ซึ่งพิจารณาจากขนาดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์จากฤทธิ์ขจัดอนุมูลได้ทั้ง 3 ชนิด และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Table 1 Facial cream formulation

Phase	Cosmetic ingredients
Water	Distilled water Disodium EDTA Glycerin Butylene glycol Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer CPE
Oil	Glycerin (and) hydrogenated lecithin (and) hydroxypropyl methylcellulose stearoxy ether (and) squalane (and) sodium methyl stearoyl taurate (Nikkomulse LH®) Squalene Dimethicone Cetyl alcohol Stery alcohol Sodium hydroxide Caprylhydroxamic acid (and) 1,2-hexanediol (and) butylene glycol

การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางผสม CPE

ทำการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพและเคมีจากสี กลิ่น ค่า pH ความหนืด และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ 4 สภาวะ โดยการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่ 3 อุณหภูมิ ดังนี้ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4°C. และอุณหภูมิ 45°C. เป็นเวลา 90 วัน และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์แบบเร่งโดยการทดสอบแบบร้อนสลับเย็น ที่อุณหภูมิ 45°C. และอุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ (Whangsomnuek *et al.*, 2019) วัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด โดยใช้หัวเข็ม R6 ความเร็วรอบ 70 รอบ/นาที เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ในสภาวะต่างๆ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวัดค่าความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ในการวิเคราะห์

ความคงตัวของผลิตภัณฑ์เพื่อศึกษาค่าการเปลี่ยนแปลงแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบของ Tukey test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ในการพิจารณาความแตกต่างนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for Social Science)

ผลการวิจัย**สารสกัดเนื้อผลกาแฟ**

สารสกัด CPE ที่ทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งเมื่อทำการบดด้วยโม่บดสาร พบว่ามีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้มสามารถละลายน้ำได้ดี และมีร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%yield) เท่ากับ 38.50 ± 0.89

ปริมาณฟีนอลิกรวมและกรดคลอโรจีนิกจาก CPE

ผลการวิเคราะห์สารสำคัญพบว่า CPE มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 45.12 ± 1.08 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมของสารสกัด และเมื่อตรวจวัดปริมาณกรดคลอโรจีนิกซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก

ที่สำคัญในเนื้อผลกาแฟด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว พบว่าจากโครมาโทแกรม (Figure 1) กรดคลอโรจีนิกมีค่ารีเทนชันไทม์ (Retention time) เท่ากับ 20.15 นาที และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกพบว่ามีค่าเท่ากับ 17.8 มก./กก.

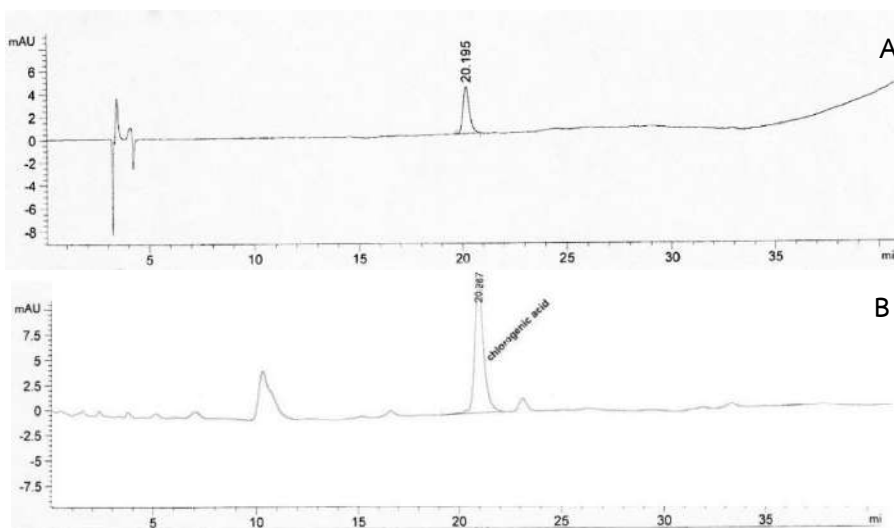


Figure 1 HPLC chromatogram of chlorogenic acid standard (A), and CPE (B)

ฤทธิ์ชีวภาพของ CPE

1) ฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS ด้วยวิธี Decolorization assay โดยอาศัยคุณสมบัติของปฏิกิริยารีดักชันซึ่งทำให้อนุมูล ABTS ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินและตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร มีปริมาณลดลง จากการทดลองดังแสดงใน Table 2 พบว่า CPE ที่ความเข้มข้น 0.20-1.00 มก./มล. สามารถยับยั้งอนุมูล ABTS โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 77.92 ± 1.79 เมื่อคำนวณปริมาณสารที่สามารถต้านอนุมูลได้ร้อยละ 50 หรือค่าครึ่งหนึ่งของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 0.59 ± 0.01 มก./มล.

2) ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH จะอาศัยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยผลการทดสอบจะตรวจวัดการเปลี่ยนสีของอนุมูลในสารละลายจากสีม่วง

เป็นสีเหลือง ผลการทดลองพบว่า CPE ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.10-1.50 มก./มล. สามารถต้านอนุมูล DPPH โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 73.76 ± 0.48 เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของ CPE และสารมาตรฐานกรดแกลลิกพบว่าเท่ากับ 0.94 ± 0.01 และ 0.01 ± 0.00 มก./มล. ตามลำดับ (Table 2)

3) ฤทธิ์การต้านอนุมูล Superoxide ทำการทดสอบโดยอาศัยสารทดสอบไปต้านอนุมูล Superoxide ในปฏิกิริยารีดักชันของ NBT ให้กลายเป็น Diformazan ซึ่งมีสีน้ำเงินสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ผลการทดสอบพบว่า CPE ความเข้มข้นในช่วง 3.00-15.00 มก./มล. มีค่าร้อยละของการยับยั้งสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 63.47 ± 1.44 เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ดังแสดงใน Table 2 พบว่า CPE และสารมาตรฐานกรดแกลลิกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.53 ± 0.11 และ 1.37 ± 0.05 มก./มล. ตามลำดับ

Table 2 Antioxidant activity of coffee pulp extract

Sample	ABTS assay		DPPH assay		Superoxide assay	
	TEAC (mg/g extract)	IC ₅₀ (mg/mL)	GEAC (mg/g extract)	IC ₅₀ (mg/mL)	GEAC (mg/g extract)	IC ₅₀ (mg/mL)
CPE	61.24±3.78	0.59±0.01	5.05±0.11	0.94±0.01	164.38±4.76	9.53±0.11
Trolox	-	0.04±0.00	-	-	-	-
Gallic acid	-	-	-	0.01±0.00	-	1.37±0.05

Values are expressed as means ± standard deviation (n = 3).

4)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองพบว่า CPE สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดย CPE ที่ความเข้มข้น 150 มก./มล. มีประสิทธิภาพ

สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 82.64±0.32 ดังแสดงใน Table 3 พบว่าค่า IC₅₀ ของ CPE และสารมาตรฐานกรดโคจิกมีค่าเท่ากับ 125.21±4.90 และ 0.20±0.05 มก./มล. ตามลำดับ

Table 3 Effect of CPE on tyrosinase inhibition activity

Sample	IC ₅₀ (mg/mL)	Kojic acid equivalent (mg/g extract)
CPE	125.21±4.90	6.94±0.05
Kojic acid	0.20±0.05	-

Values are expressed as means ± standard deviation (n = 3).

พัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์จาก CPE

ตำรับเครื่องสำอางบำรุงผิวหน้าผสม CPE 1% ถูกเลือกมาทดสอบความคงตัว เนื่องจากเมื่อใช้สารสกัดมากกว่า 1% ผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้าจะไม่คงตัวและมีสีน้ำตาลเข้มทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่น่าใช้ โดยผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้าที่มีปริมาณ CPE 1% มีลักษณะทางกายภาพดังแสดงใน Table 4 เนื้อครีมสีขาวอมเหลือง เนื้อสัมผัสเนียนนุ่ม สามารถกระจายตัวบนผิวได้ดี เมื่อทำการทดสอบความคงตัวในสภาวะแตกต่างกันนาน 90 วันพบว่าลักษณะทางกายภาพของเนื้อครีมไม่เปลี่ยนแปลงประกอบด้วย สี กลิ่น เนื้อสัมผัส การแยกชั้น ส่วน pH

พบว่ามีค่าคงที่ทุกสภาวะของการทดสอบ นอกจากนี้พบว่าความหนืดของครีมมีความคงตัวในสภาวะอุณหภูมิห้อง 4°C. และแบบร้อนสลับเย็น (H/C) แต่พบว่าที่ 45°C. ค่าความหนืดลดลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งอาจเป็นผลมาจากความร้อนเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพด้านอื่น (Table 4) ดังนั้นตำรับเครื่องสำอางผสม CPE สามารถเก็บไว้ได้ในระยะเวลาโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ความหนืด และลักษณะทางกายภาพ แต่ควรหลีกเลี่ยงในสภาวะที่ร้อนจัด

Table 4 Stability test of CPE cream under various conditions

Parameter	pH	Viscosity (Pa.s)	Separation and precipitation
Initial	5.52±0.01	9.12±0.13 ^a	x
RT	5.53±0.02	9.19±0.09 ^a	x
4°C	5.55±0.02	9.08±0.04 ^a	x
45°C	5.54±0.02	8.46±0.15 ^b	x
H/C (6 cycles)	5.52±0.03	9.08±0.23 ^a	x

RT: room temperature H/C: heating/cooling cycles X: not separation and precipitation.

For the viscosity value, not sharing the same letter indicates significant difference at $p < 0.05$.

วิจารณ์ผลการวิจัย

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีการเติบโตอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว โดยเฉพาะเครื่องสำอางจากธรรมชาติที่ช่วยปรับโทนผิวให้กระจ่างใส (Burger *et al.*, 2016) ลดเลือนริ้วรอย ชะลอความแก่ของผิวหนัง (Plainfossé *et al.*, 2018) เนื่องจากผู้คนในปัจจุบันหันมาใส่ใจกับการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมากขึ้น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติยังพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางหรือเวชสำอาง (Soto *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015) ดังนั้นเมื่อผลกาแฟที่พบว่ามีปริมาณเป็นจำนวนมากซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จึงมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นสารเชิงหน้าที่ในทางเครื่องสำอางบำรุงผิว โดยทำการสกัดเนื้อผลกาแฟด้วยน้ำ เนื่องจากเป็นตัวย่อยสลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและหลีกเลี่ยงสารละลายอินทรีย์ที่อาจเป็นอันตราย (Plotka-Wasyłka *et al.*, 2017) จากการทดลองพบว่า CPE มีปริมาณผลผลิตของสารสกัดน้ำค่อนข้างสูง โดยตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS, DPPH และ Superoxide ได้ดี โดยอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่ทำให้ผิวแก่ เสื่อมสภาพ เกิดริ้วรอย เกิดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นสาเหตุของกระและฝ้า (Uwa,

2017) จากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ อนุมูล ABTS ใช้โทรออกซ์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ส่วนอนุมูล DPPH และ Superoxide ใช้กรดแกลลิกซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายกลุ่มจึงมีการเลือกใช้สารมาตรฐานที่ต่างกัน เพื่อให้ทราบว่าสารที่ทดสอบมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้หลายกลุ่ม CPE มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ โดยสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง จึงมีฤทธิ์ในการขจัดอนุมูล ABTS, DPPH และ Superoxide นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารประกอบฟีนอลิกในพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส คอลลาจีเนส อิลาสเทส และปกป้องผิวจากรังสียูวี เป็นต้น (Ribeiro *et al.*, 2015; Zillich *et al.*, 2015) ใน CPE ที่สกัดได้ยังตรวจพบกรดคลอโรจีนิก ซึ่งเป็นกรดฟีนอลิกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในทางเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ช่วยชะลอการแก่ของผิวหนัง ช่วยต้านการอักเสบ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Naveed *et al.*, 2018; Bessada *et al.*, 2018) และสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 Murine melanoma cells ได้ (Li *et al.*, 2014)

CPE มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวจะช่วยปรับสภาพผิวให้กระจ่างใสในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวได้ ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนอื่นของกาแฟ พบว่าส่วนเมล็ดของ *Coffea arabica* และ *Coffea canephora* ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kiattisin *et al.*, 2016) ส่วนใบของกาแฟ *Coffea arabica* ที่ทำการสกัดด้วยเอทานอลสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารเชิงหน้าที่ในเครื่องสำอางที่สามารถต้านอนุมูล ABTS, DPPH และ Lipid peroxidation (Kiattisin *et al.*, 2019) ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น CPE จึงมีคุณสมบัติในการเป็นสารเชิงหน้าที่ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเวชสำอางชะลอวัยและปรับสภาพผิวให้กระจ่างใสเมื่อมีการพัฒนาตำรับที่เหมาะสม

จากการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวหน้าผสม CPE พบว่าตำรับครีมที่พัฒนาขึ้นมีสีเหลืองนวล มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นผลไม้ ลักษณะทางกายภาพและเคมีมีความคงตัวในสถานะที่แตกต่างกัน แต่มีข้อควรระวังไม่ควรเก็บครีมไว้ในที่ร้อน ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวผสมสารสกัดเนื้อผลกาแฟจากงานวิจัยนี้จะศึกษาเพิ่มเติมประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวผสม CPE ในอาสาสมัครเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

เนื้อผลกาแฟจัดเป็นเศษเหลือจากอุตสาหกรรมกาแฟ ถูกนำมาเพิ่มมูลค่าโดยสกัดเป็น CPE ที่มีสารสำคัญชนิดกรดคลอโรจีนิกซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และมีฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยชะลอการเสื่อมสภาพของผิว ช่วยต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวจะช่วยปรับสภาพผิวให้กระจ่างใสในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวได้ ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนอื่นของกาแฟ พบว่าส่วนเมล็ดของ *Coffea arabica* และ *Coffea canephora* ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kiattisin *et al.*, 2016) ส่วนใบของกาแฟ *Coffea arabica* ที่ทำการสกัดด้วยเอทานอลสามารถประยุกต์ใช้เป็นสารเชิงหน้าที่ในเครื่องสำอางที่สามารถต้านอนุมูล ABTS, DPPH และ Lipid peroxidation (Kiattisin *et al.*, 2019) ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น CPE จึงมีคุณสมบัติในการเป็นสารเชิงหน้าที่ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเวชสำอางชะลอวัยและปรับสภาพผิวให้กระจ่างใสเมื่อมีการพัฒนาตำรับที่เหมาะสม

ใส นอกจากนี้จากผลการวิจัยนอกจากช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่เนื้อผลกาแฟซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรแล้ว ยังช่วยลดการกำจัดของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกาแฟที่มีปริมาณมากซึ่งส่งผลเสียให้กับสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่งด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และบริษัท อิลล์คอฟฟ์ จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาโท ในโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) (รหัสโครงการ MSD60I0031) และขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ และศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Barbulova, A., G. Colucci and F. Apone. 2015. New trends in cosmetics: by-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics* 2(2): 82-92.
- Bessada, S.M.F., R.C. Alves and M.B.P.P. Oliveira. 2018. Coffee silverskin: a review on potential cosmetic applications. *Cosmetics* 5(1): 5.
- Burger, P., A. Landreau, S. Azoulay, T. Michel and X. Fernandez. 2016. Skin whitening cosmetics: feedback and challenges in the development of natural skin lighteners. *Cosmetics* 3(4): 36.

- Erdem, S.A., F.S. Senol, E. Budakoglu, I.E. Orhan and B. Sener. 2016. Exploring *In Vitro* neurobiological effects and high–pressure liquid chromatography–assisted quantitation of chlorogenic acid in 18 Turkish coffee brands. **J Food Drug Anal.** 24(1): 112-120.
- Hammerschmidt, P.A. and D.E. Pratt. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **J Food Sci.** 43(2): 556-559.
- Kiattisin, K., T. Nantararat and P. Leelapornpisid. 2016. Evaluation of antioxidant and anti–tyrosinase activities as well as stability of green and roasted coffee bean extracts from *Coffea arabica* and *Coffea canephora* grown in Thailand. **J Pharmacognosy Phytother** 8(10): 182-192.
- Kiattisin, K., N. Nitthikan, W. Poomanee, P. Leelapornpisid, H. Viernstein and M. Mueller. 2019. Anti-inflammatory, antioxidant activities and safety of *Coffea arabica* leaf extract for alternative cosmetic ingredient. **Chiang Mai J Sci.** 46(2): 284-294.
- Li, H.R., M. Habasi, L.Z. Xie and H.A. Aisa. 2014. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. **Molecules** 19: 12940-12948.
- Masuda, T., D. Yamashita, Y. Takeda and S. Yonemori. 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. **Biosci Biotechnol Biochem.** 69(1): 197-201.
- Mensor, L.L., F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, T.C.D. Santos, C.S. Coube and S.G. Leitão. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res.** 15(2): 127-130.
- Murthy, P.S. and M.M. Naidu. 2012. Sustainable management of coffee industry by–products and value addition–a review. **Resour Conserv Recy.** 66: 45-58.
- Naveed, M., V. Hejazi, M. Abbas, A.A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmad, D. Babazadeh, X. FangFang, F. Modarresi–Ghazani, L. WenHua and Z. XiaoHui. 2018. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research. **Biomed Pharmacother** 97: 67-74.
- Nishikimi, M., N.A. Rao and K. Yagi. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochem Biophys Res Commun.** 46(2): 849-854.

- Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam, D. Brand, R. Mohan and S. Roussos. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochem Eng. J.** 6(2): 153-162.
- Plainfossé, H., P. Burger, S. Azoulay, A. Landreau, G. Verger-Dubois and X. Fernandez. 2018. Development of a natural anti-age ingredient based on *Quercus pubescens* willd. leaves extract—a case study. **Cosmetics** 5(1): 15.
- Plotka-Wasyłka, J., M. Rutkowska, K. Owczarek, M. Tobiszewski and J. Namiesnik. 2017. Extraction with environmentally friendly solvents. **Trends Anal Chem.** 91: 12-25.
- Ramirez-Martinez, J.R. 1988. Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. **J Sci Food Agr.** 43(2): 135-144.
- Rathinavelu, R. and Graziosi, G. 2005. **Potential alternative use of coffee wastes and by-products.** [Online]. Available <http://www.ico.org/documents/ed1967e.pdf> (4 June 2019).
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med.** 26(9-10): 1231-1237.
- Ribeiro, A.S., M. Estanqueiro, M.B. Oliveira and J.M.S. Lobo. 2015. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. **Cosmetics** 2(2): 48-65.
- Rodriguez de Sotillo, D.V. and M. Hadley. 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. **J Nutr Biochem.** 13(12): 717-726.
- Soto, M.L., E. Falqué and H. Domínguez. 2015. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. **Cosmetics** 2(3): 259-276.
- Uwa, L.M. 2017. The anti-aging efficacy of antioxidants. **Curr Trends Biomedical Eng & Biosci.** 7(4): 2-4.
- Whangsomnuek, N., L. Mungmai, K. Mengamphan and D. Amornlerdpison. 2019. Efficiency of skin whitening cream containing *Etlingera elatior* flower and leaf extracts in volunteers. **Cosmetics** 6(3): 39.
- Zillich, O.V., U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner and M. Kerscher. 2015. Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. **Int J Cosmetic Sci.** 37: 455-464.