

การสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อราบิก้าและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

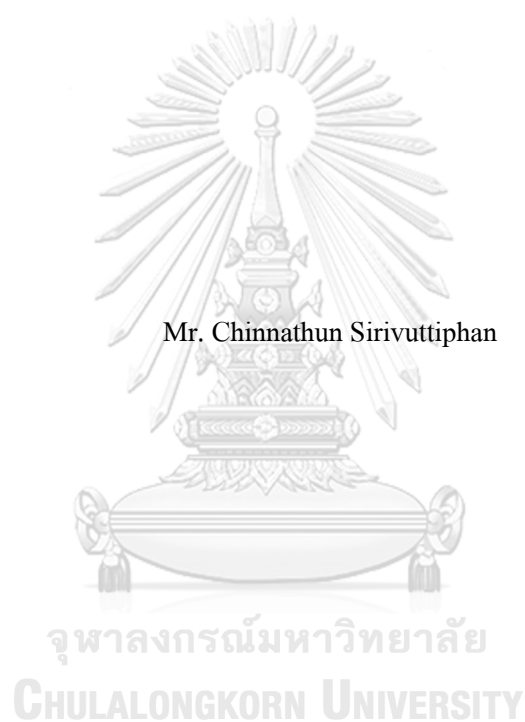
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ARABICA COFFEE SILVERSKIN EXTRACTION AND BIOLOGICAL ACTIVITY ASSAY



Mr. Chinnathun Sirivuttiphon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อราบิก้าและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ
โดย	นายชินชัย สิริวุฒิพันธ์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพร โทณานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เกศักรหญิง ดร.สรกนก วัฒนมังคัง

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล กิตติสุขกร)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพร โทณานนท์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เกศักรหญิง ดร.สรกนก วัฒนมังคัง)	
.....	กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.อาทิตย์วรรณ โชติพิฤกษ์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปลายมีน อำนวนยชีวะ)	

ชินรัชย์ สิริวิฑูพิพันธ์ : การสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อราบิก้าและการทดสอบ  
ฤทธิ์ทางชีวภาพ. ( ARABICA COFFEE SILVERSKIN EXTRACTION AND  
BIOLOGICAL ACTIVITY ASSAY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ณัฐพร โทณานนท์, อ.  
ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ภญ. ดร.สรกนก วิมลมังคัง

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ เป็นของเหลือทิ้งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ ซึ่งอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ในงานวิจัยนี้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟถูกนำมาทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัด ทำการศึกษาตัวแปร 3 ตัว ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด โดยใช้ น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล ศึกษาอุณหภูมิในช่วง 35 40 50 และ 60 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ในอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวที่ 1:25 g/ml โดยสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณสารสกัดแห้ง ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก อัตลักษณ์ของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเทคนิค TLC การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิกด้วยเครื่อง HPLC นอกจากนี้ยังทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* จากการทดลองพบว่า การสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลาย 100% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที เป็นสถานะที่เหมาะสมในการสกัดมากที่สุด ได้ปริมาณสารสกัดแห้ง 6-7% ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (29.93 mg GAE/g สารสกัดแห้ง) ปริมาณคาเฟอีน (59.38 mg/g สารสกัดแห้ง) พบสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (IC<sub>50</sub> = 0.28 mg/ml) ด้วยเหตุนี้สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอนาคตได้ เนื่องจากใช้เทคโนโลยีสีเขียวในการสกัด ทั้งนี้ยังเป็นเทคโนโลยีที่สะอาด ปลอดภัย ต้นทุนต่ำ และทำให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระสูง

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

## 6170146221 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: Coffee silverskin; Antioxidant activity; Thin-Layer Chromatography (TLC);  
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Chinnathun Sirivuttiphon : ARABICA COFFEE SILVERSKIN EXTRACTION  
AND BIOLOGICAL ACTIVITY ASSAY. Advisor: Asst. Prof. NATTAPORN  
TONANON, D.Eng. Co-advisor: Assoc. Prof. SORNKANOK  
VIMOLMANGKANG, Ph.D.

Coffee silverskin (CS) is a major by-product of the coffee roasting process which is a source of antioxidant compounds. In this research, CS is extracted to locate the optimum extraction condition as a function of three variables including the polarity of solvent (water, 50% ethanol and 100% ethanol), temperature (35, 40, 50, and 60 °C), and extraction time (30 and 60 minutes) by using solid/solvent ratio 1:25 g/ml. The extraction yield, phenolic content, the chemical fingerprint profile of the CS extract were evaluated using TLC, the contents of caffeine, and chlorogenic acid using HPLC. Furthermore, the biological activity including DPPH antioxidant activity and antimicrobial of *S. aureus* has also been investigated. The result demonstrated that the best condition for CS extraction is with 100% ethanol at 60 °C for 30 minutes. This condition resulted in the extraction yield of approximately 6-7%, the phenolic content (29.93 mg GAE/g extract), the caffeine content (59.38 mg/g extract). It could also inhibit bacteria growth and DPPH radical ( $IC_{50} = 0.28$  mg/ml). For these reasons, the extracted CS has great potential to be applied for further use in the industrial sector due to the use of eco-friendly, safe, and cost-efficient extraction technology, as well as the high level of antioxidant activity embedded in the CS extract.

Field of Study: Chemical Engineering

Student's Signature .....

Academic Year: 2019

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ในหัวข้อ “การสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์ราบีเก่าและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ” สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือและคำปรึกษาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพร โทณานนท์ และ รองศาสตราจารย์ เกษัชรหญิง ดร. สรกนก วิมลมั่งคั่ง ผู้ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางและให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเกษตรและเกษตรพฤษศาสตร์ รวมถึงศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยจากบริษัท ดอยสะเก็ด ชาไทย จำกัด ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุด

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล กิตติศุภกร ที่ได้เกียรติเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์รวมถึงศาสตราจารย์ ดร. อาทิวรรณ โชติพฤษย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปลายมีน อำนวยชีวะ คณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ที่มีส่วนให้คำแนะนำเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ชินรัตน์ สิริวุฒิพันธ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ญ
สารบัญรูป .....	ฎ
อักษรย่อและสัญลักษณ์ .....	ฏ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 .....	4
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กาแฟ (Coffee) .....	4
2.2 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silverskin) .....	4
2.3 การสกัดสารจากพืช .....	6
2.3.1 ปัจจัยในการเลือกตัวทำละลาย.....	6
2.3.2 ประเภทของการสกัดในอุตสาหกรรม .....	7
2.3.3 การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-liquid extraction) .....	7

2.4 อนุมูลอิสระ (Free radical).....	8
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) .....	8
2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ.....	9
2.6.1 สารประกอบฟีนอลิก .....	11
2.7 การศึกษา และจำแนกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดพืชสมุนไพร .....	11
2.7.1 โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) .....	11
2.8 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ .....	12
2.8.1 DPPH assay .....	12
2.9 Bioautography .....	13
2.9.1 Bioautography สำหรับการต้านแบคทีเรีย .....	13
2.9.2 Bioautography สำหรับการต้านอนุมูลอิสระ DPPH .....	14
บทที่ 3 .....	15
การทดลอง.....	15
3.1 วัสดุ.....	15
3.1.1 เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silverskin) .....	15
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	15
3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	15
3.2 การออกแบบการทดลองในการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ .....	16
3.3 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ .....	16
3.4 ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ .....	16
3.4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน .....	16
3.4.2 การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ .....	17
3.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้ง (Extraction yield).....	17
3.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก .....	17



3.6.1 การเตรียมสารมาตรฐาน .....	17
3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก.....	17
3.7 ขั้นตอนการแยกสารด้วยเทคนิค TLC .....	17
3.7.1 ขั้นตอนการเตรียมสาร .....	17
3.7.2 ขั้นตอนการศึกษากระบวนการแยกสารด้วยเทคนิค TLC.....	18
3.8 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค TLC-Bioautography	18
3.8.1 การทดสอบด้วยสารละลาย DPPH .....	18
3.9 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิค TLC-bioautography ..	18
3.9.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ.....	18
3.9.2 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Direct bioautography .....	19
3.9.3 ขั้นตอนการทดสอบด้วยสารละลาย methyl-thiazolyl-tetrazolium chloride (MTT)...	19
3.10 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิค Agar disc diffusion .	19
3.11 ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญ.....	19
3.11.1 การเตรียมสารมาตรฐาน .....	20
3.11.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง .....	20
3.11.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC.....	20
3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	20
บทที่ 4 .....	21
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	21
4.1 ผลของตัวทำละลาย เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ .....	21
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก .....	22
4.3 ผลของการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิก .....	23
4.4 ผลของการแยกสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC).....	28

4.4.1 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี.....	28
4.4.2 การวิเคราะห์หัตถ์ลักษณะของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ .....	30
4.5 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค TLC-Bioautography .....	31
4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ .....	32
4.6.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน .....	32
4.6.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ .....	34
4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> .....	35
4.7.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ด้วยเทคนิค TLC-Bioautography.....	35
4.7.2 ผลของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ด้วยวิธี Agar disc diffusion.....	37
บทที่ 5 .....	39
สรุปผลการทดลอง .....	39
5.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	39
5.2 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี.....	40
5.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ .....	40
5.3 ข้อเสนอแนะ .....	41
ภาคผนวก .....	42
บรรณานุกรม.....	80
ประวัติผู้เขียน .....	85

## สารบัญตาราง

### หน้า

ตารางที่ 1: แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ.....	5
ตารางที่ 2: แสดงตัวอย่างของตัวทำลายที่มีขี้และไม่มีขี้.....	6
ตารางที่ 3: แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ.....	10
ตารางที่ 4: แสดงรายละเอียดของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	15
ตารางที่ 5: แสดงเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดแห้ง.....	21
ตารางที่ 6: แสดงปริมาณของสารฟีนอลิกในตัวอย่าง.....	22
ตารางที่ 7: แสดงปริมาณสารคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิก.....	27
ตารางที่ 8: แสดงตำแหน่งของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟบนแผ่น TLC ในรูปที่ 12 และ 14....	28
ตารางที่ 9: แสดงตำแหน่งของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟบนแผ่น TLC ในรูปที่ 15.....	32
ตารางที่ 10: แสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าโทรลอกซ์ และกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่าง.....	33
ตารางที่ 11: แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC <sub>50</sub> ).....	34
ตารางที่ 12: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างสำหรับตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบนแผ่น TLC.....	35
ตารางที่ 13: แสดงตำแหน่งของสารสกัดบนจานเพาะเชื้อ.....	37
ตารางที่ 14: แสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus ด้วยวิธี Agar disc diffusion.....	37
ตารางที่ 15: สรุปลองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ.....	39
ตารางที่ 16: สรุปลฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ.....	41
ตารางที่ 17: แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดแห้งของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ.....	43
ตารางที่ 18: แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดแห้งของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล..	44
ตารางที่ 19: แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดแห้งของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	45

ตารางที่ 20: ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก.....	46
ตารางที่ 21: ผลความยาวคลื่นของสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกครั้งที่ 1 .....	48
ตารางที่ 22: ผลความยาวคลื่นของสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกครั้งที่ 2 .....	49
ตารางที่ 23: ผลความยาวคลื่นของสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกครั้งที่ 3 .....	50
ตารางที่ 24: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารฟีนอลิกจากทั้ง 3 ครั้ง.....	51
ตารางที่ 25: แสดงค่ากราฟมาตรฐานของคาเฟอีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....	52
ตารางที่ 26: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างครั้งที่ 1 .....	53
ตารางที่ 27: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างครั้งที่ 2 .....	54
ตารางที่ 28: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างครั้งที่ 3 .....	54
ตารางที่ 29: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารคาเฟอีนของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง.....	55
ตารางที่ 30: แสดงค่ากราฟมาตรฐานของกรดคลอโรจีนิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC .....	56
ตารางที่ 31: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างครั้งที่ 1 .....	57
ตารางที่ 32: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างครั้งที่ 2 .....	58
ตารางที่ 33: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างครั้งที่ 3 .....	58
ตาราง 34: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดคลอโรจีนิกของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง .....	59
ตารางที่ 35: แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทรลอกซ์.....	60
ตารางที่ 36: แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก.....	61
ตารางที่ 37: ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm ครั้งที่ 1 .....	63
ตารางที่ 38: ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm ครั้งที่ 2 .....	64
ตารางที่ 39: ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm ครั้งที่ 3 .....	65
ตารางที่ 40: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าโทรลอกซ์ของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง .....	66
ตารางที่ 41: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดคลอโรจีนิกของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง .....	67

ตารางที่ 42: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง อนุมูลอิสระ .....	69
ตารางที่ 43: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ .....	70
ตารางที่ 44: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ .....	71
ตารางที่ 45: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ .....	73
ตารางที่ 46: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 27 .....	74
ตารางที่ 47: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 28 .....	75
ตารางที่ 48: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 29 .....	77
ตารางที่ 49: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 30 .....	78
ตารางที่ 50: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 31 .....	79

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1: โครงสร้างของผลกาแฟ .....	4
รูปที่ 2: แผนภาพการสกัด .....	8
รูปที่ 3: โครงสร้างทางเคมีของกรดคลอโรจีนิก .....	9
รูปที่ 4: โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน .....	10
รูปที่ 5: โครงสร้างพื้นฐานของเมลานอยดิน .....	10
รูปที่ 6: โครงสร้างของอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	12
รูปที่ 7: แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH .....	14
รูปที่ 8: โครมาโตแกรมสารมาตรฐานคาเฟอีน .....	23
รูปที่ 9: โครมาโตแกรมสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก .....	24
รูปที่ 10: ภาพโครมาโตแกรมของเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย (I) น้ำ (II) 50% เอทานอล (III) 100% เอทานอล (IV) เมล็ดคาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ ภายใต้ความยาวคลื่น 272 nm 25	
รูปที่ 11: ภาพโครมาโตแกรมของเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย (I) น้ำ (II) 50% เอทานอล (III) 100% เอทานอล (IV) เมล็ดคาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ ภายใต้ความยาวคลื่น 330 nm 26	
รูปที่ 12: ภาพโครมาโตแกรมแผ่น TLC ภายใต้แสง (I) UV 254 nm และ (II) UV 366 nm .....	29
รูปที่ 13: ภาพสเปกตรัมของสารมาตรฐานคาเฟอีนเทียบกับสารตัวอย่าง .....	29
รูปที่ 14: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC หลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้ (I) แสงขาว และ (II) UV 366 nm (III) พ่นด้วย 0.2% DPPH ภายใต้แสงขาว .....	30
รูปที่ 15: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC หลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้ (I) UV 366 nm และ (II) พ่นด้วย 0.2% DPPH ภายใต้แสงขาว .....	32
รูปที่ 16: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้ (I) UV 254 nm (II) UV 366 nm (III) พ่นด้วย 0.2% MTT ใน DMSO ภายใต้แสงขาว .....	36
รูปที่ 17: ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย S. aureus ด้วยวิธี Agar disc diffusion .....	37

รูปที่ 18: กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก.....	46
รูปที่ 19: กราฟมาตรฐานคาเฟอีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....	52
รูปที่ 20: กราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC .....	56
รูปที่ 21: กราฟมาตรฐานโทรลอคซ์.....	61
รูปที่ 22: กราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก.....	62
รูปที่ 23: กราฟ IC <sub>50</sub> ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ.....	69
รูปที่ 24: กราฟ IC <sub>50</sub> ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล .....	70
รูปที่ 25: กราฟ IC <sub>50</sub> ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล .....	72
รูปที่ 26: กราฟ IC <sub>50</sub> ของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำสกัดด้วยน้ำ.....	73
รูปที่ 27: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้อินฟราเรด (I) UV 254 nm (II) UV 366 nm หลังทำการพ่นด้วย 0.2% DPPH (III) ภายใต้อินฟราเรด.....	74
รูปที่ 28: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้อินฟราเรด (I) UV 254 nm (II) UV 366 nm หลังทำการพ่นด้วย 0.2% DPPH (III) ภายใต้อินฟราเรด.....	76
รูปที่ 29: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้อินฟราเรด (I) แสงขาว (II) UV 254 nm (III) UV 366 nm (IV) พ่นด้วย 0.2% DPPH ภายใต้อินฟราเรด.....	77
รูปที่ 30: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้อินฟราเรด (I) แสงขาว (II) UV 254 nm (III) UV 366 nm หลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้อินฟราเรด (IV) UV 366 nm และ หลังทำการพ่นด้วย 0.2% DPPH (V) ภายใต้อินฟราเรด.....	78
รูปที่ 31: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้อินฟราเรด (I) แสงขาว (II) UV 254 nm (III) UV 366 nm และหลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้อินฟราเรด (IV) แสงขาว และ (V) UV 366 nm....	79

## อักษรย่อและสัญลักษณ์

Abs.	=	ค่าการดูดกลืนแสง
AUC	=	พื้นที่ใต้กราฟ
Avg	=	ค่าเฉลี่ย
CFU	=	หน่วยที่ได้จากวิธีตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์
°C	=	องศาเซลเซียส
g	=	กรัม
IC <sub>50</sub>	=	ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50%
L	=	ลิตร
ml	=	มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
mg	=	มิลลิกรัม
n	=	จำนวนครั้ง
nm	=	นาโนเมตร
Rf	=	ค่าคงที่อัตราไหล
SD	=	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
UV	=	อัลตราไวโอเลต
μm	=	ไมโครเมตร
μl	=	ไมโครลิตร
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/w	=	มวลของตัวถูกละลายต่อมวลของสารละลาย



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่มีผู้บริโภครอบคอบอย่างกว้างขวางทั่วโลก ในปี 2562 ปริมาณกาแฟที่ปลูกผลิตและส่งออกทั่วโลกสูงถึง 10.16 ล้านตัน (1) ส่วนประเทศไทยในปี 2562 มีการผลิตกาแฟสูงถึง 85,500 ตัน ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นจากปี 2561 ประมาณ 1.8% แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าความต้องการบริโภคกาแฟเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปีซึ่งสายพันธุ์ของเมล็ดกาแฟที่คนนิยมบริโภคหลัก ๆ คือ กาแฟอาราบิก้า และกาแฟโรบัสต้า ในกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟจะเกิดผลพลอยได้ซึ่งก็คือ เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปีถูกกำจัดโดยการนำไปเผาหรือฝังดิน เป็นต้น โดยขั้นตอนในการกำจัดก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมลพิษทางดิน เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟอุดมไปด้วยสารที่มีความเป็นพิษ หรือสารต้านคุณค่าโภชนาการ (Anti-nutrient) เช่น caffeine, tannins และ polyphenols เป็นต้น (2, 3) ทำให้ไม่สามารถนำมากำจัดโดยการฝังดินหรือนำไปใช้ในการเกษตรได้โดยตรงเช่น การนำไปใช้เป็นปุ๋ยหรือการนำไปเป็นอาหารสัตว์โดยไม่ผ่านกระบวนการใด ๆ แต่อย่างไรก็ตามภายในเยื่อหุ้มกาแฟก็ยังอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟเป็นเยื่อหุ้มบางชั้นในสุดถูกแยกออกมาจากเมล็ดกาแฟจากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟโดยใช้เครื่องลมคัด มีประมาณ 4.2% (w/w) ของผลกาแฟ ในกระบวนการคั่วกาแฟ 4 ตันจะได้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟประมาณ 30 กิโลกรัม (4) นอกจากนี้เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟอุดมไปด้วยกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกซึ่งส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย กรดคลอโรโรจินิก สารเคมีตามธรรมชาติที่พบในพืช และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถสูงในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (5) ซึ่งสามารถนำมาสกัดเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และยาในอนาคต

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้วิธีการสกัดบนพื้นฐานของเทคโนโลยีสะอาด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดร่วมกับการศึกษารูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพของสารสกัดที่ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอุตสาหกรรมต่าง ๆ ในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟสายพันธุ์ราบีก้า

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ส่วนที่ 1: ศึกษาเทคนิคการสกัดเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟในอัตราส่วน solid/solvent ที่ 1:25 (g/ml) โดยการนำเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟ 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมตัวทำละลายปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นวางขวดรูปชมพู่บนเครื่องกวนสารละลายปั่นกวนด้วยความเร็ว 700 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการกรองสารละลาย โดยในการทดลองนี้จะทำการศึกษาถึงผลของตัวแปรที่ส่งผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระดังต่อไปนี้

- ความมีขี้ของตัวทำละลาย โดยศึกษาตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล
- อุณหภูมิในการสกัด โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 35 40 50 และ 60°C
- ระยะเวลาในการสกัดสาร โดยศึกษาในช่วง 30 และ 60 นาที
- วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้ง (Extraction yield) โดยการระเหยตัวทำละลายที่อุณหภูมิ 60°C

ส่วนที่ 2: ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay
- ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดในการยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิค agar disc diffusion
- ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบในสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิค TLC-bioautography

ส่วนที่ 3: ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟ

- ศึกษาอัตลักษณ์ทางเคมีด้วย TLC (TLC-Chemical profile) ของสารสกัดจากเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟ
- ศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric assay
- ตรวจปริมาณสารสำคัญกรดคลอโรจีนิก และคาเฟอีน ในสารสกัดจากเชื้อเห็ดเมลิคคาแฟ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แนวทางในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเทคโนโลยีสะอาด ปลอดภัย ค่าใช้จ่ายต่ำ และได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูง อีกทั้งสามารถนำไปต่อยอดกับการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในภาคอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษวัสดุเหลือทิ้ง มุ่งเน้นการใช้ทรัพยากรชีวภาพอย่างคุ้มค่า ลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดในอนาคต มุ่งแก้ไขปัญหาเพื่อลดผลกระทบต่อโลกอย่างยั่งยืน



## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

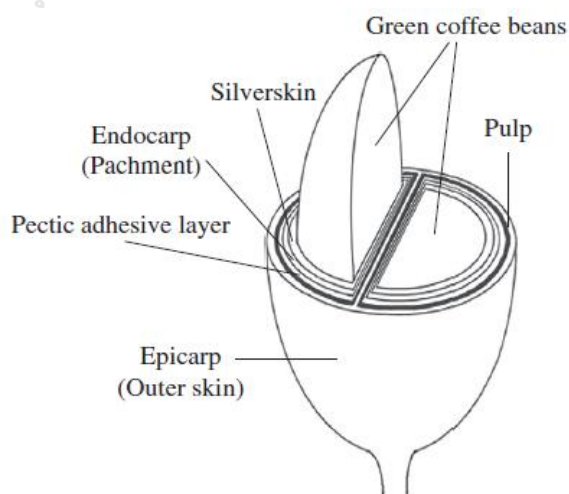
#### 2.1 กาแฟ (Coffee)

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมากเป็นอันดับต้นๆของโลก โดยสายพันธุ์ที่นิยมบริโภคมี 2 สายพันธุ์หลักๆ คือ กาแฟอาราบิก้า และกาแฟโรบัสต้า ในปี 2562 ประเทศไทยมีการผลิตกาแฟสูงถึง 85,500 ตันต่อปี และยังมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทุกปีตามความต้องการในการบริโภคกาแฟ โดยในการผลิตกาแฟจะนำเมล็ดกาแฟดิบ (Raw beans) มาผ่านกระบวนการคั่วซึ่งผลิตภัณฑ์หลักคือ เมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่ว (Roasted coffee beans) ส่วนผลพลอยได้ที่สำคัญคือ เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ ซึ่งยังไม่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง

#### 2.2 เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silverskin)

เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ เป็นเชื้อหุ้มบางชั้นในสุดที่ห่อหุ้มเมล็ดกาแฟมีประมาณ 4.2% (w/w) ของผลกาแฟ แสดงโครงสร้างตามรูปที่ 1 (6) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ส่วนใหญ่จากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ โดยในการคั่วเมล็ดกาแฟ 4 ตันจะทำให้ได้เชื้อหุ้มกาแฟประมาณ 30 กิโลกรัม ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปเมล็ดกาแฟ โดยองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังพบสมบัติที่โดดเด่นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟคือ อุดมไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเช่น กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก, เมลานอยดิน และกรดคลอโรจีนิก

### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1: โครงสร้างของผลกาแฟ

ตารางที่ 1: แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

ส่วนประกอบทางเคมีของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ	
ความชื้น (g/100 g)	4.76 ± 0.10
เถ้า (g/100 g)	8.34 ± 0.04
ไขมัน (g/100 g)	2.42 ± 0.10
โปรตีน (g/100 g)	18.8 ± 0.30
เส้นใยอาหาร (g/100 g)	56.4 ± 0.70
เส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ (g/100 g)	49.1 ± 0.44
เส้นใยที่ละลายน้ำ (g/100 g)	7.30 ± 0.07
คาร์โบไฮเดรต (g/100 g)	5.80 ± 0.20
แร่ธาตุหลัก (mg/100 g)	
โพแทสเซียม	4977 ± 151
แมกนีเซียม	2002 ± 72
แคลเซียม	584 ± 62
เหล็ก	41.8 ± 2.69
โซเดียม	5.32 ± 0.14
วิตามิน E (mg/100 g)	
α-tocopherol	2.25 ± 0.14
β-tocopherol	0.59 ± 0.05
γ-tocopherol	0.09 ± 0.01
α-tocotrienol	n.d.
β-tocotrienol	0.95 ± 0.07
γ-tocotrienol	0.17 ± 0.01
คาเฟอีน (g/100 g)	1.25 ± 0.03
กรดคลอโรจีนิค (mg/100 g)	246 ± 0.20
5-Hydroxymethylfurfural (mg/100 g)	5.68 ± 0.42

n.d. = not detected (6)

## 2.3 การสกัดสารจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชโดยใช้ตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) โดยสารสกัดหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีจากพืช ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารที่ต้องการสกัด การเลือกตัวทำละลาย และการเลือกวิธีการสกัด เป็นต้น

### 2.3.1 ปัจจัยในการเลือกตัวทำละลาย

1. ความมีขี้ของตัวทำละลาย ดังแสดงในตารางที่ 2 เป็นข้อมูลสำคัญในการสกัดสารที่ต้องการความมีขี้ใกล้เคียงกันของตัวทำละลาย และสารที่ต้องการสกัดช่วยให้สามารถสกัดสารที่ต้องการออกมาได้มากขึ้น
2. ความคงตัว โดยจะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
3. การระเหย ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดไม่ควรระเหยง่ายหรือยากเกินไป
4. จุดเดือด ตัวทำละลายควรมีจุดเดือดที่ต่ำกว่าตัวถูกละลาย เนื่องจากหลังทำการสกัดแล้วสามารถแยกตัวทำละลายออกมาได้ง่าย ทำให้สารที่ต้องการสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น
5. ความหนืด ตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำสามารถแทรกซึมเข้าไปในวัตถุดิบหรือสารผสมที่นำมาสกัดได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีความหนืดสูง ทำให้มีอัตราเร็วในการสกัดสูง (7)

ตารางที่ 2: แสดงตัวอย่างของตัวทำละลายที่มีขี้และไม่มีขี้  
ตัวทำละลายที่ไม่มีขี้

ตัวทำละลาย	จุดเดือด	ความมีขี้	ความหนาแน่น
เฮกเซน	69°C	2.0	0.655 (g/ml)
เบนซีน	80°C	2.3	0.879 (g/ml)
โทลูอิน	111°C	2.4	0.867 (g/ml)
คลอโรฟอร์ม	61°C	4.8	1.498 (g/ml)
เอทิล อะซีเตท	77°C	6.0	0.894 (g/ml)

ตารางที่ 2: แสดงตัวอย่างของตัวทำละลายที่มีขี้และไม่มีขี้ (ต่อ)

ตัวทำละลายมีขี้

ตัวทำละลาย	จุดเดือด	ความมีขี้	ความหนาแน่น
บิวทานอล	118°C	18	0.810 (g/ml)
โพรพานอล	97°C	20	0.803 (g/ml)
เอทานอล	79°C	24	0.789 (g/ml)
เมทานอล	65°C	33	0.791 (g/ml)
กรดฟอร์มิก	100.8°C	58	1.210 (g/ml)
น้ำ	100°C	80	0.998 (g/ml)

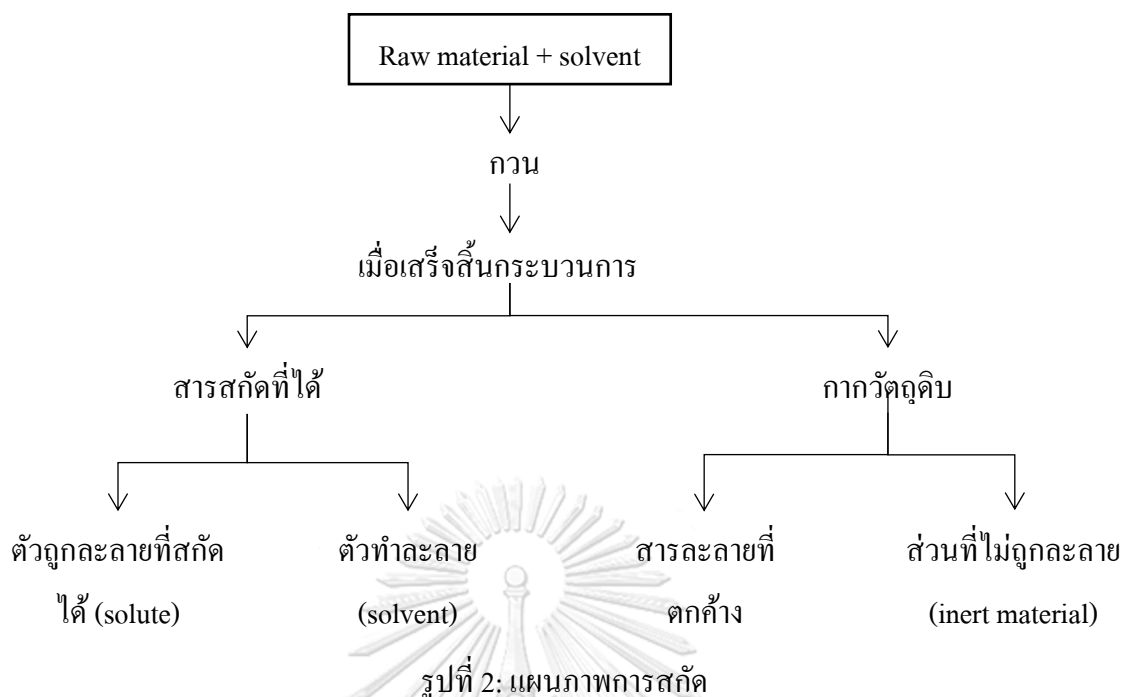
### 2.3.2 ประเภทของการสกัดในอุตสาหกรรม

1. การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-Liquid Extraction) หรือการชะ (Leaching) เป็นการ  
ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมมาละลายหรือสกัดสารที่ต้องการออกจากวัตถุดิบซึ่งเป็น  
ของแข็ง
2. การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction) เป็นการใช้ตัวทำละลายที่  
เหมาะสมมาละลายหรือสกัดสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว
3. การสกัดด้วยของเหลววิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) เป็นการใช้ตัวทำ  
ละลายที่เป็นได้ทั้งของเหลว และแก๊สในเวลาเดียวกันได้หรือที่เรียกว่าของไหล

### 2.3.3 การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-liquid extraction)

คือการสกัดตัวถูกละลายออกจากวัตถุดิบ (Feed material) ที่เป็นของแข็งโดยใช้ตัวทำ  
ละลายช่วยในการสกัด วัตถุดิบของแข็งที่นำมาสกัดประกอบด้วยสารประกอบหรือตัวถูกละลาย  
(solute หรือ soluble solid) ที่ต้องการ และส่วนที่ไม่ถูกละลาย (inert material) แสดงแผนภาพการ  
สกัดดังรูปที่ 2 (8)

กลไกการสกัดของแข็งด้วยของเหลวเกิดขึ้น โดยการแทรกซึมผ่านของตัวทำละลายเข้าไป  
ในวัตถุ, การละลายของสารสกัด, การถ่ายโอนจากอนุภาคภายในไปยังพื้นผิวของวัตถุ และการ  
กระจายตัวของตัวทำละลายรอบวัตถุโดยการแพร่ และการกวน (9) ทั้งนี้การสกัดของแข็งด้วย  
ของเหลวจะสามารถแยกออกเป็นสองส่วนหลัก ๆ คือส่วนของสารละลายที่สกัดได้ (extract) และ  
ส่วนของกากวัตถุดิบ (waste)



## 2.4 อนุมูลอิสระ (Free radical)

สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) เกิดขึ้นเมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกเป็นสารที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอนไป 1 ตัว มีความว่องไวสูงในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่หายไป หลังจากนั้น โมเลกุลที่ถูกดึงอิเล็กตรอนออกจะกลายเป็นอนุมูลอิสระ และเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อ จนเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ส่วนใหญ่อนุมูลอิสระจะอยู่ในรูปของ Reactive Oxygen Species (ROS) และยังพบในรูปของ Reactive Chlorine Species (RCS) และ Reactive Nitrogen Species (RNS) ตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ ได้แก่

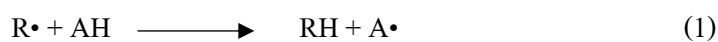
- Superoxide anion อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ( $O_2^{\cdot-}$ )
- Hydroxyl radicle อนุมูลไฮดรอกซิล ( $OH^{\cdot}$ )
- Peroxyl radicle อนุมูลเปอร์ออกซิล ( $RO_2^{\cdot}$ )
- Hydrogen peroxide ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

## 2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่มีหน้าที่ช่วยในการยับยั้ง และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในปฏิกิริยานี้จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และเข้าทำลายเซลล์ภายในร่างกาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกทำงานต้านอนุมูลอิสระหลายรูปแบบเช่น ดักจับอนุมูลอิสระ, ยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน, จับกับโลหะที่เร่งการเกิดออกซิเดชัน และหยุดปฏิกิริยา



การสร้างอนุมูลอิสระ ไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ตัวอย่างการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการที่ 1 และ 2 (10)



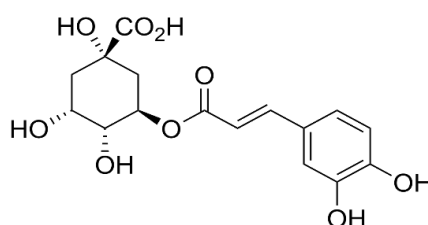
โดย  $R\cdot$  และ  $RO\cdot$  คืออนุมูลอิสระ,  $AH$  คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่งได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

## 2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดหุ้มเมล็ดกาแฟ

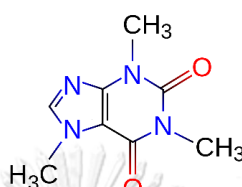
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นส่วนประกอบในอาหารที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเซลล์สัตว์หรือมนุษย์ที่บริโภค (11) ได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น

เห็ดหุ้มเมล็ดกาแฟเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพสูงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งจะประกอบไปด้วย กรดคลอโรจีนิก (1-6%) นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของคาเฟอีน (0.8-1.25%) และเมลานอยดิน (17-23%) (12) โดยตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดหุ้มเมล็ดกาแฟแสดงดังรูปที่ 3 และ 4 นอกจากนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดในเห็ดหุ้มเมล็ดกาแฟถูกแสดงในตารางที่ 3 (12)

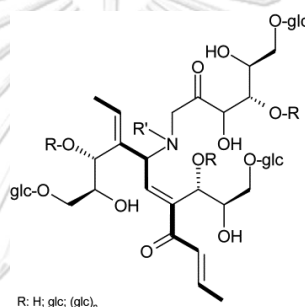


รูปที่ 3: โครงสร้างทางเคมีของกรดคลอโรจีนิก

Chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid or 3-CQA) เป็นหนึ่งในสารประกอบในกลุ่ม Caffeoylquinic acids (CQA) ซึ่งมีโครงสร้างของกรดควินิกต่อด้วยโมเลกุลของ Caffeic acid, p-coumaric acid หรือ ferulic acid หนึ่งกลุ่มหรือมากกว่าในกลุ่มนี้ยังมีสารประกอบอื่น ได้แก่ 4-O-caffeoylquinic acid (crypto-chlorogenic acid or 4-CQA), 5-O-caffeoylquinic acid (neo-chlorogenic acid or 5-CQA), 1,5-diCQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA เป็นต้น (13)



รูปที่ 4: โครงสร้างทางเคมีของคาเฟอีน



รูปที่ 5: โครงสร้างพื้นฐานของเมลานอยดิน

ตารางที่ 3: แสดงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในเชื้อหุ้มเมล็ดคาเฟ

สารประกอบ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
คาเฟอีน	สารต้านอนุมูลอิสระ, การชะลอริ้วรอย, กระบวนการเผาผลาญภายในร่างกาย และเผาผลาญเซลล์ไขมัน, ปกป้องความเสียหายจากรังสี UV, เพิ่มการไหลเวียนโลหิตภายในผิวหนัง, มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5- $\alpha$ reductase และ hyaluronidase	(14-16)
Caffeoylquinic acids/ Feruloylquinic acid/ p-coumaroylquinic acid	การชะลอริ้วรอย, ปกป้องความเสียหายจากรังสี UV, มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และต้านการอักเสบ	(17, 18)
เมลานอยดิน	สารต้านอนุมูลอิสระ, การชะลอริ้วรอย, มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และต้านการอักเสบ	(19, 20)

### 2.6.1 สารประกอบฟีนอลิก

ฟีนอลิกหรือโพลีฟีนอลมีโครงสร้างทางเคมีประกอบไปด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ hydroxyl อย่างน้อย 1 กลุ่ม ซึ่งรวมถึงหมู่อนุพันธ์อื่น ๆ เช่น (เอสเทอร์, เมทิลอีเทอร์ และไกลโคไซด์) ฟีนอลิกส่วนมากจะมีอนุพันธ์ของหมู่ hydroxyl อย่างน้อย 2 กลุ่มซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบได้ในพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางได้ สารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแทนนิน เพราะมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนแก่สารอนุมูลอิสระ มีกลไกที่สำคัญ 2 แบบคือ จะหน่วงเหนี่ยวหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสามารถยับยั้งขั้นตอนการเกิดลูกกลามของอนุมูลอิสระ (Propagation) ได้ (21) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบอีกด้วย (15)

## 2.7 การศึกษา และจำแนกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดพืชสมุนไพร

### 2.7.1 โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

การจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เพราะใช้สารสกัดปริมาณน้อย ต้นทุนต่ำ ทำได้ง่าย และใช้เวลาไม่นาน เทคนิคนี้เป็นการแยกสารแบบวัฏภาคของแข็ง-ของเหลว โดยวัฏภาคของแข็งหรือวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับส่วนมากนิยมใช้อลูมินา ( $Al_2O_3$ ) หรือ ซิลิกาเจล ( $SiO_2$ ) วัฏภาคของเหลวหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ หลักการในการแยกสารจะอาศัยความมีขั้วของสาร โดยที่สารมีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว ส่วนสารไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (22) ประเภทของโครมาโตกราฟีตามความมีขั้วของวัฏภาคคงที่ และวัฏภาคเคลื่อนที่แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

1. Normal phase จะใช้ตัวดูดซับเป็นสารมีขั้วเช่น ซิลิกาเจล อลูมินา ส่วนตัวทำละลายเป็นสารไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยเช่น hexane, ethyl acetate, methanol ทำให้สารไม่มีขั้วเคลื่อนที่ไปใกล้กับ solvent front มากกว่าสารมีขั้ว
2. Reverse phase ตัวดูดซับจะเป็นสารไม่มีขั้วเช่น RP-8, RP-18 ส่วนตัวทำละลายจะเป็นสารมีขั้วเช่น methanol, acetonitrile และน้ำ ดังนั้นสารมีขั้วจะเคลื่อนที่เข้าใกล้ solvent front มากกว่าสารไม่มีขั้ว

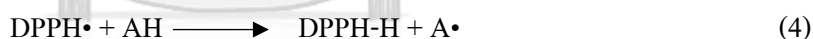
หลังการแยกสารบน โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ระยะทางในการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่นสามารถนำมาคำนวณหาค่า  $R_f$  (rate of flow) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสารขึ้นกับตัวดูดซับ และชนิดของตัวทำละลาย สารแต่ละตัวจึงมีค่า  $R_f$  ที่ไม่เท่ากันดังนั้นการบอกค่า  $R_f$  ของสารแต่ละชนิดจึงต้องบอกชนิดของตัวทำละลาย และตัวดูดซับเสมอ ในการคำนวณหาค่า  $R_f$  สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3

$$R_f \text{ (rate of flow)} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad (3)$$

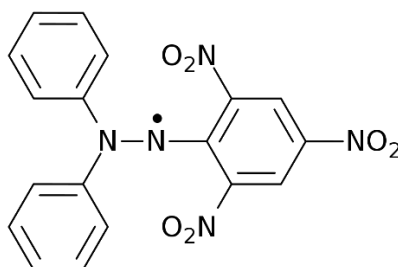
## 2.8 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

### 2.8.1 DPPH assay

เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัด โดยใช้ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) แสดง โครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 5 ซึ่งเป็น stable free radical ในสารละลายเมทานอล มีสีม่วงค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ 515 nm (23) ในการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ DPPH• กับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สารละลาย DPPH สีจางลงส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงตามสมการที่ 4 และ 5 นอกจากนี้ค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระคำนวณได้ตามสมการที่ 6



โดยที่ AH = สารต้านอนุมูลอิสระ R• = อนุมูลอิสระ



รูปที่ 6: โครงสร้างของอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_s)}{\text{Abs}_0} \right] \times 100 \quad (6)$$

โดย  $\text{Abs}_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ  $\text{Abs}_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วในการวิเคราะห์ ให้ค่าความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ อนุมูลอิสระ DPPH มีความคงตัว ไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย นอกจากนี้เนื้อเยื่อของอนุมูลอิสระถูกบดบังด้วยวงเบนซิน 3 วงและหมู่ไนโตรเจน ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลอิสระได้

## 2.9 Bioautography

การทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบเช่น ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเรียบ (planar chromatography) เช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography: HPTLC) เทคนิค TLC และเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นกระดาษ (paper chromatography) เป็นต้น หลังจากนั้นจึงนำมาทดสอบร่วมกับสารชีวภาพแล้วจึงสังเกตตำแหน่งที่เกิดการยับยั้ง (clear zone) โดยวิธีในการทดสอบสามารถแบ่งได้ดังนี้

### 2.9.1 Bioautography สำหรับการต้านแบคทีเรีย

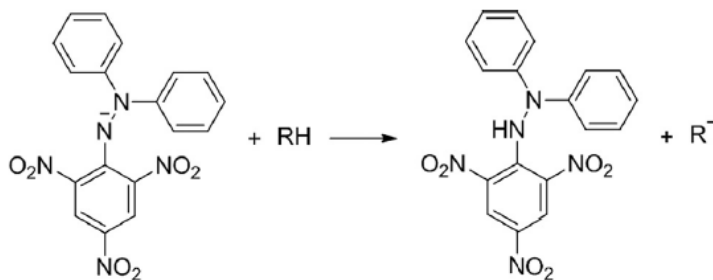
การใช้ TLC-bioautography ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ (24) สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. Agar diffusion เป็นการวางแผ่นโครมาโตแกรมบนผิวหน้าอาหารที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ ทำให้สารเคมีบนแผ่นโครมาโตแกรมแพร่สู่พื้นผิวของอาหาร หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปทำการบ่มในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ แล้วสังเกตบริเวณที่เกิดการยับยั้ง มีรายงานวิจัยด้วยวิธีนี้จากสารสกัดธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น การทดสอบฤทธิ์ของ *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium* และ *Rosa damascene mill.* ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิด *E. coli* (ATCC 25922) และ *S. aureus* (ATCC 25923) (25) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกาแฟและชาเขียวในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *S. aureus*, *B. cereus* และแบคทีเรียแกรมลบเช่น *E. coli*, *P. mirabilis* และ *K. pneumoniae* เป็นต้น (26)

2. Agar overlay bioassay เป็นการวางแผ่นโครมาโตแกรมบนอาหารแข็ง จากนั้นเทอาหารแข็งที่ผสมด้วยแบคทีเรียให้กระจายทั่วบนแผ่นโครมาโตแกรม แล้วจึงนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ มีรายงานวิจัยในการนำวิธีนี้ไปใช้ทดสอบแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* (27)
3. Direct bioautography เป็นการนำแผ่นโครมาโตแกรมมาจุ่มหรือพ่นด้วยอาหารเหลวที่มีการผสมเชื้อไว้แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ มีรายงานวิจัยด้วยวิธีนี้จากสารสกัดธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น การทดสอบฤทธิ์ของพืชสายพันธุ์ *Onopordon macrocephalum* ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. aureus* และ *B. cereus* บนแผ่น TLC (28) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทดสอบฤทธิ์ของ *S. nigra flos*, *M. officinalis* และ *V. tricolor* ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* และ *B. subtilis* (29)

### 2.9.2 Bioautography สำหรับการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เป็นการทดสอบเบื้องต้นในการหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยหลังจากทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH สารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้อนุมูลอิสระ DPPH เกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองบนแผ่น TLC แสดงปฏิกิริยาในรูปที่ 7 (30)



รูปที่ 7: แสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

### บทที่ 3

#### การทดลอง

#### 3.1 วัสดุ

##### 3.1.1 เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Coffee silverskin)

เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อราบิก้าเป็นของเหลือทิ้งที่เกิดจากกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟของโป่งแยงการเกษตร ตำบล โป่งแยง อำเภอ แมริม จังหวัด เชียงใหม่

##### 3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4: แสดงรายละเอียดของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	สูตรเคมี	มวล โมเลกุล (g/mol)	บริษัท
เอทานอล	$C_2H_5OH$	46.07	Merck
คลอโรฟอร์ม	$CHCl_3$	119.38	RCI Labscan
เมทานอล	$CH_3OH$	32.04	Merck
กรดฟอร์มิก	$CH_2O_2$	46.03	Merck
เอทิล อะซิเตท	$C_4H_8O_2$	88.11	Merck
DPPH	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394.32	Sigma-Aldrich
โทรลอกซ์	$C_{14}H_{18}O_4$	250.29	Sigma-Aldrich
ไดเมทิลซัลโฟลไซด์	$C_2H_6OS$	78.13	RCI Labscan
MTT	$C_{18}H_{16}BrN_5S$	414.32	Sigma-Aldrich
อะนิซาลดีไฮด์	$C_8H_8O_2$	136.15	Sigma-Aldrich

##### 3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เครื่อง Microplate reader
2. เครื่องอัลตราโซนิกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Ultrasonic water-bath)
3. เครื่องถ่ายภาพ TLC visualizer
4. เครื่อง spot สารกึ่งอัตโนมัติ

5. เครื่องให้ความร้อน TLC heater
6. เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hotplate magnetic stirrer)
7. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
8. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
10. เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

### 3.2 การออกแบบการทดลองในการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการออกแบบการทดลองเชิงแฟคทอเรียล 3 ปัจจัยถูกตัดแปลงมาจากวิธีของ Costa และคณะ (31) โดยปัจจัยที่ 1 คือ ตัวทำละลาย มี 3 ระดับคือ น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล ปัจจัยที่ 2 คือ อุณหภูมิ มี 4 ระดับคือ 35°C 40°C 50°C และ 60°C และปัจจัยที่ 3 คือ เวลาที่ใช้ในการสกัด มี 2 ระดับคือ 30 และ 60 นาที เพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลในการทดลองและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลในหน่วยเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารสกัดแห้ง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.3 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

การสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟถูกตัดแปลงมาจากวิธีของ Costa และคณะ (31) อัตราส่วนของแข็งต่อสารละลายที่ 1 g ต่อ 25 ml โดยการนำเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ 10 g ใส่ในขวดรูปชมพู่เติมตัวทำละลายปริมาตร 250 ml จากนั้นวางขวดรูปชมพู่บนเครื่องกวนสารละลาย ทำการสกัดที่ 35°C, 40°C, 50°C และ 60°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที ปั่นกวนด้วยความเร็ว 700 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการกรองสารละลาย แล้วเก็บในที่อุณหภูมิ 4°C

### 3.4 ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์และกรดคลอโรจีนิก ถูกตัดแปลงมาจากวิธีของ Costa และคณะ (2) ความเข้มข้น 25-175 mg/L โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดนำไปทำการเจือจาง 50 เท่า



### 3.4.2 การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Costa และคณะ (2) โดยการปีเปตต์สารตัวอย่างมา 20  $\mu$ l ผสมกับ 180  $\mu$ l ของสารละลาย DPPH ในเอทานอลที่มีความเข้มข้น 93  $\mu$ M เก็บในที่มืด 40 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm

### 3.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้ง (Extraction yield)

การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้งถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Iylia และคณะ (32) โดยการนำสารละลายหลังทำการสกัดมาทำการระเหยตัวทำละลาย โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) จากนั้นทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C ข้ามคืนจนได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) วัดปริมาณสารสกัดแห้งโดยการชั่งน้ำหนักด้วยกระดาษชั่งเริ่มต้น และน้ำหนักด้วยกระดาษชั่งหลังอบสารสกัดข้ามคืน

### 3.6 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก

#### 3.6.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Costa และคณะ (2) ความเข้มข้น 10-100 mg/L โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

#### 3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Costa และคณะ (2) โดยการนำสารสกัดแห้งในขั้นตอนที่ 3.4 จะถูกละลายด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล) ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 20  $\mu$ l ผสมกับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu ปริมาตร 100  $\mu$ l และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% w/v) เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

### 3.7 ขั้นตอนการแยกสารด้วยเทคนิค TLC

#### 3.7.1 ขั้นตอนการเตรียมสาร

สารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้ง (Extraction yield) ในขั้นตอนที่ 3.4 จะถูกละลายด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล) ให้ได้ความเข้มข้น 50 mg/ml ทำการ sonicate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อช่วยในการละลาย จากนั้นตกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส (Supernatant) ไว้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

### 3.7.2 ขั้นตอนการศึกษากระบวนการแยกสารด้วยเทคนิค TLC

การศึกษาระบบการแยกสารที่เหมาะสมด้วยเทคนิค TLC ถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Choma และคณะ (33) นำสารละลายส่วนใส (Supernatant) ถูกหยด (spot) แบบแบนลงบนแผ่น TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> ที่มีขนาดความกว้าง 10 cm ยาว 20 cm ปริมาตร 2 µl ด้วยเครื่องหยดสารที่เรียกว่า Semi-automatic applicator (CAMAG® Linomat 5) โดยแบนมีความยาวของแถบ 8 มิลลิเมตร ระยะห่างจากขอบด้านล่าง 10 มิลลิเมตร จากนั้นนำแผ่นที่หยดสารเสร็จแล้วไปทำการแยก chemical profile ใน chamber ที่อ้อมตัวด้วยสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย Chloroform : Ethyl acetate : Acetone : Formic acid (25:6:4:0.5, v/v) ซึ่งถูกพัฒนามาจากงานวิจัยของ Jesionek และคณะ (34) เพื่อทดสอบระบบการแยกสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ ร่อนกระทั่งสารละลายผสมเคลื่อนที่ได้ระยะทาง 8 เซนติเมตร จากขอบแผ่น TLC (solvent front) หลังจากนั้นเป่าแผ่น TLC ให้แห้งด้วยลมเย็น บันทึกภาพครั้งแรกภายใต้แสงทั้งหมด 3 แสง คือ แสงขาว แสงยูวีภายใต้ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ด้วยเครื่อง CAMAG® TLC Visualizer 2 จากนั้นนำแผ่นไปทำการ derivatization ด้วยการพ่นกับ anisaldehyde reagent ในสารละลายกรดซัลฟิวริก และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 97°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเพิ่ม sensitivity ในการตรวจวัด ทำการบันทึกภาพครั้งที่สองภายใต้แสงขาวและแสงยูวีภายใต้ความยาวคลื่น 366 nm โดยขั้นตอนการหยดสารและถ่ายภาพด้วยเครื่องมือจะถูกควบคุมผ่าน CAMAG® visionCATS software ระบบการแยกสารจะถูกปรับเปลี่ยนด้วยการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนหรือชนิดตัวทำละลายจนได้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

### 3.8 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค TLC-Bioautography

#### 3.8.1 การทดสอบด้วยสารละลาย DPPH

หลังจากได้ระบบการแยกสารที่เหมาะสมแล้ว นำแผ่น TLC ที่ผ่านการแยก chemical profile มาทำการพ่นด้วยสารละลาย 0.2% DPPH ที่ละลายด้วยเอทานอลตามวิธีของ Choma และคณะ (33) หลังจากนั้นนำมาเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการบันทึกภาพที่แสงขาว และความยาวคลื่น 366 nm

### 3.9 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิค TLC-bioautography

#### 3.9.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

การเพาะเลี้ยง *Staphylococcus aureus* ถูกดัดแปลงมาจากวิธีของ Akin และคณะ (25) ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ให้มีระดับความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml)

### 3.9.2 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Direct bioautography

การทดสอบเชื้อถูกคัดแปลงมาจากวิธีของ Akin และคณะ (25) ใส่แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ ปริมาตร 150  $\mu$ l ลงในอาหารเหลว TSB ปรับค่าความขุ่นให้เท่ากับสารมาตรฐาน McFarland no. 0.5 นำแผ่น TLC จุ่มในอาหารเหลวที่ผสมเชื้อเป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นนำไปวางบนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) ทำการไล่อากาศออกด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ผ่านการ development แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตบนแผ่น TLC โดยใช้คลินดามัยซินที่ละลายด้วยน้ำเป็นตัว positive control

### 3.9.3 ขั้นตอนการทดสอบด้วยสารละลาย methyl-thiazolyl-tetrazolium chloride (MTT)

หลังบ่มแผ่น TLC นำมาพ่นด้วยสารละลาย 0.2% MTT ที่ละลายใน Dimethyl sulfoxide ทำการบันทึกภาพทุก ๆ 1 ชั่วโมง

### 3.10 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิค Agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion ถูกคัดแปลงมาจากวิธีของ Akin และคณะ (25) แบคทีเรียจากขั้นตอน 3.7.1 ถูกนำมา swab บนจานเพาะเชื้อที่มี Mueller Hinton agar (MHA) หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบจากขั้นตอนที่ 3.4 จะถูกละลายด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล) ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml หยดสารสกัดปริมาตร 20  $\mu$ l ลงในกระดวยกรองแผ่นกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรแล้ววางบน MHA ใช้เอทานอลเป็น negative control และคลินดามัยซินที่ละลายด้วยน้ำเป็นตัว positive control บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลหน่วยเป็นมิลลิเมตร แล้วนำมาคำนวณหาบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ตามสมการที่ 7

$$\text{Inhibition zone (mm)} = A - B \quad (7)$$

โดย A: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disk และ โชนไสของเชื้อ

B: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disk (6 mm)

### 3.11 ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณสารสำคัญ

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และวัดปริมาณสารสำคัญในสารสกัดถูกคัดแปลงมาจากวิธีของ Xue และคณะ (35) ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

### 3.11.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

การเตรียมสารมาตรฐานของคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิกถูกตัดแปลงมาจากวิธีของ Navarra และคณะ (36) โดยการละลายสารมาตรฐานในสารละลาย 100% เอทานอล (%v/v) จนได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ทำการกรองผ่านตัวกรองเมมเบรนขนาด 0.20  $\mu\text{m}$  จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของสารมาตรฐานให้อยู่ในช่วง  $1 \times 10^{-4}$  ถึง  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml

### 3.11.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่าง 0.01 g ละลายในตัวทำละลายที่ใช้สกัด ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml ทำการกรองผ่านตัวกรองเมมเบรนขนาด 0.20  $\mu\text{m}$

### 3.11.3 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC

Column: LiChrospher RP-C18 column ขนาด (3.0  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Agilent, USA)

อุณหภูมิ 35°C

Mobile phase A: 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ

Mobile phase B: 0.1% กรดฟอร์มิกในเมทานอล

Gradient profile: เริ่มต้น โดยการใช้ความเข้มข้น 5% ของสาร B คงที่เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับสาร B เพิ่มขึ้นจนถึง 30% ภายในเวลา 15 นาที จากนั้นปรับสาร B เพิ่มขึ้นจนถึง 100% ภายในเวลา 20 นาที คงที่ไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นกลับไปให้ความเข้มข้นเริ่มต้น

Injection volume: 5  $\mu\text{l}$

Flow rate: 1 ml/min

Detection: สำหรับคาเฟอีนค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 272 nm สำหรับกรดคลอโรจีนิกค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 330 nm

### 3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองทั้งหมดจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง ถูกแสดงผลด้วย ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน (Independent t-test) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-Way ANOVA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม SPSS Statistic 22 กำหนดระดับนัยสำคัญที่  $p < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของตัวทำละลาย เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

ตารางที่ 5: แสดงเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดแห้ง

สารตัวอย่าง	เวลา (นาที)	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (°C)			
		35	40	50	60
เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ ที่สกัดด้วยน้ำ	30	10.16±0.09 <sup>a</sup>	10.52±0.57 <sup>a</sup>	10.96±0.56 <sup>a</sup>	10.75±0.11 <sup>a</sup>
	60	10.51±0.28 <sup>a</sup>	10.60±0.07 <sup>a</sup>	10.33±0.76 <sup>a</sup>	10.97±0.22 <sup>a</sup>
เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัด ด้วย 50% เอทานอล	30	7.59±0.23 <sup>a</sup>	8.10±0.19 <sup>b</sup>	8.60±0.14 <sup>c</sup>	8.55±0.01 <sup>c</sup>
	60	7.79±0.21 <sup>a</sup>	8.12±0.20 <sup>b</sup>	8.50±0.13 <sup>c</sup>	8.74±0.03 <sup>c</sup>
เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัด ด้วย 100% เอทานอล	30	5.89±0.03 <sup>a</sup>	6.60±0.24 <sup>b</sup>	6.68±0.18 <sup>b</sup>	6.78±0.26 <sup>b</sup>
	60	6.11±0.19 <sup>a</sup>	6.60±0.07 <sup>b</sup>	6.75±0.16 <sup>b</sup>	7.05±0.08 <sup>c</sup>

หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

2. ตัวอักษร a b และ c ตามแถวแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

การสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟสายพันธุ์อราบิก้าในอัตราส่วนของแข็งต่อสารละลายที่ 1:25 g/ml ด้วยตัวทำละลายน้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 35 40 50 และ 60 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที แสดงดังตารางที่ 6 พบว่าการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ตัวทำละลายเป็นน้ำมีปริมาณสารสกัดแห้ง (Extraction yield) สูงที่สุดอยู่ที่ 10-11% ในขณะที่การใช้ตัวทำละลายเป็น 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล จะได้ปริมาณสารสกัดแห้งอยู่ที่ 7-8% และ 5-6% ตามลำดับ นอกจากนี้ในตารางที่ 5 พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ได้ปริมาณสารสกัดแห้งที่สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีเอทานอลเป็นส่วนผสม เนื่องจากสารประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมีความสามารถในการละลายด้วยตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นส่วนผสม (6)

การศึกษาอุณหภูมิที่ส่งผลต่อปริมาณสารสกัดแห้ง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในการสกัดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแพร่ของตัวทำละลาย และเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟลงในตัวทำละลาย (37, 38) นอกจากนี้ในตารางที่ 5 การใช้ตัว

ทำละลายที่มีเอทานอลเป็นส่วนผสมคือ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัด ทำให้ปริมาณสารสกัดแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการใช้ตัวทำละลายที่เป็นน้ำในการสกัดพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิไม่สามารถทำให้ปริมาณสารสกัดแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของการศึกษาเวลาที่ใช้ในการสกัดพบว่า การสกัดด้วยเวลา 30 และ 60 นาที ปริมาณของสารสกัดแห้งที่อุณหภูมิเท่ากัน ไม่เกิดความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นจากมุมมองทางด้านเศรษฐกิจ การสกัดด้วยระยะเวลาที่สั้นที่สุดจะเป็นประโยชน์ในด้านความคุ้มค่าของการประหยัดเวลาในการสกัด

#### 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

สารสกัดแห้ง (Extraction yield) ที่ได้จากการสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธ์ุอาราบิก้าตามท้องตลาด ที่สกัดด้วยน้ำได้ถูกนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric assay โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกดังแสดงในตารางที่ 6 จากผลการทดลองพบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด  $38.92 \pm 2.42$  mg GAE/g สารสกัดแห้ง รองลงไปจะเป็นเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล ( $29.93 \pm 4.01$  mg GAE/g สารสกัดแห้ง) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ ( $24.87 \pm 1.24$  mg GAE/g สารสกัดแห้ง) และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธ์ุอาราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ ( $23.68 \pm 2.36$  mg GAE/g สารสกัดแห้ง) ตามลำดับ

ตารางที่ 6: แสดงปริมาณของสารฟีนอลิกในตัวอย่าง

สารตัวอย่าง	ปริมาณสารฟีนอลิก (mg GAE/g สารสกัดแห้ง)
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	$24.87 \pm 1.24^a$
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	$38.92 \pm 2.42^b$
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	$29.93 \pm 4.01^a$
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธ์ุอาราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	$23.68 \pm 2.36^a$

หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

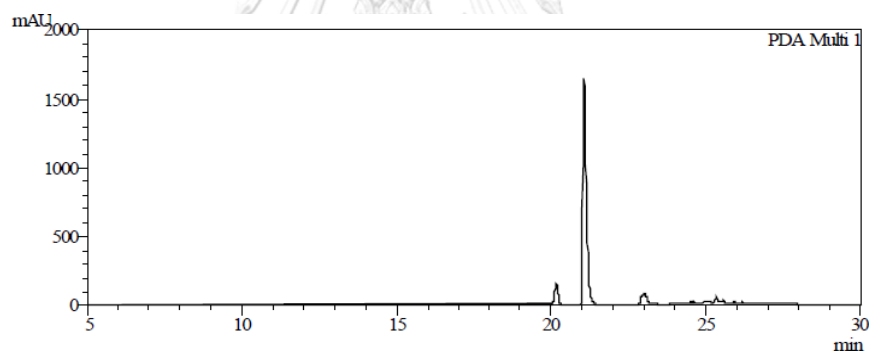
2. GAE หมายถึง Gallic acid equivalent

3. ตัวอักษร a b และ c ในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

จากรายงานของ Ballesteros และคณะ (37) พบว่า สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลาง ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกคือ 20-60% (v/v) ดังนั้นในการทดลองนี้พบว่า การใช้ตัวทำละลาย 50% เอทานอล มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

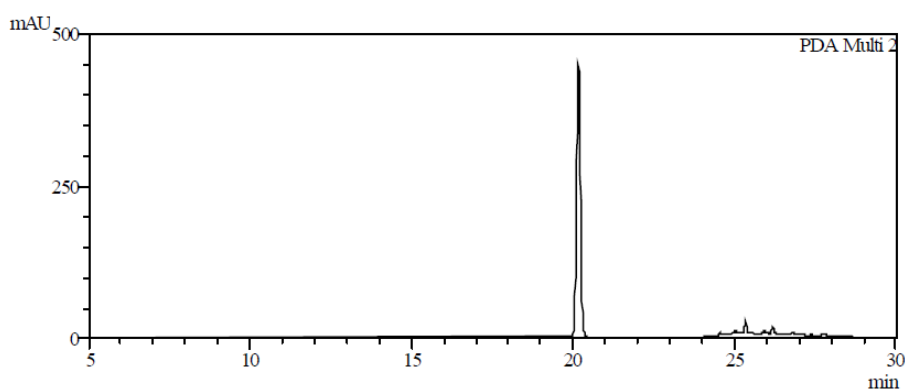
#### 4.3 ผลของการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิก

สารสกัดแห้ง (Extraction yield) ที่ได้จากการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาดที่สกัดด้วยน้ำได้ถูกนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิก ด้วยเครื่อง HPLC ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 272 และ 330 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของคาเฟอีน และ กรดคลอโรจีนิก ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่า จากระบบ HPLC พบพีคของสารมาตรฐานคาเฟอีนที่เวลา 21.057 นาที และกรดคลอโรจีนิกที่เวลา 20.163 นาที



รูปที่ 8: โครมาโตแกรมสารมาตรฐานคาเฟอีน

ภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคาเฟอีนความเข้มข้น 10 mg/ml พบว่า มีพีค (peak) เกิดขึ้นที่ช่วงเวลา (Retention time) เท่ากับ 21.057 นาที ดังแสดงในรูปที่ 8



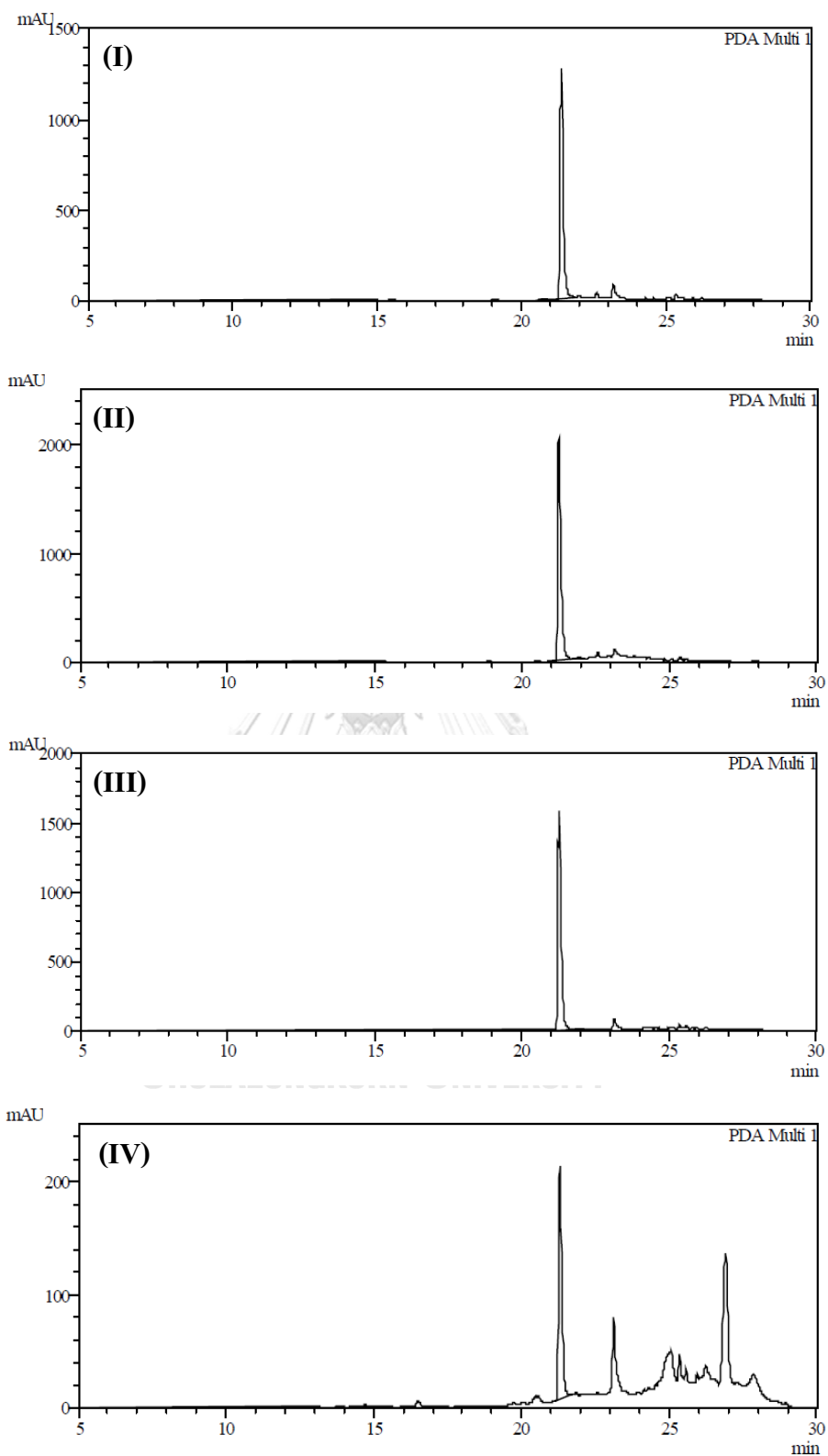
รูปที่ 9: โครมาโตแกรมสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก

ภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกความเข้มข้น 10 mg/ml พบว่า มีพีค (peak) เกิดขึ้นที่ช่วงเวลา (Retention time) เท่ากับ 20.163 นาที ดังแสดงในรูปที่ 9

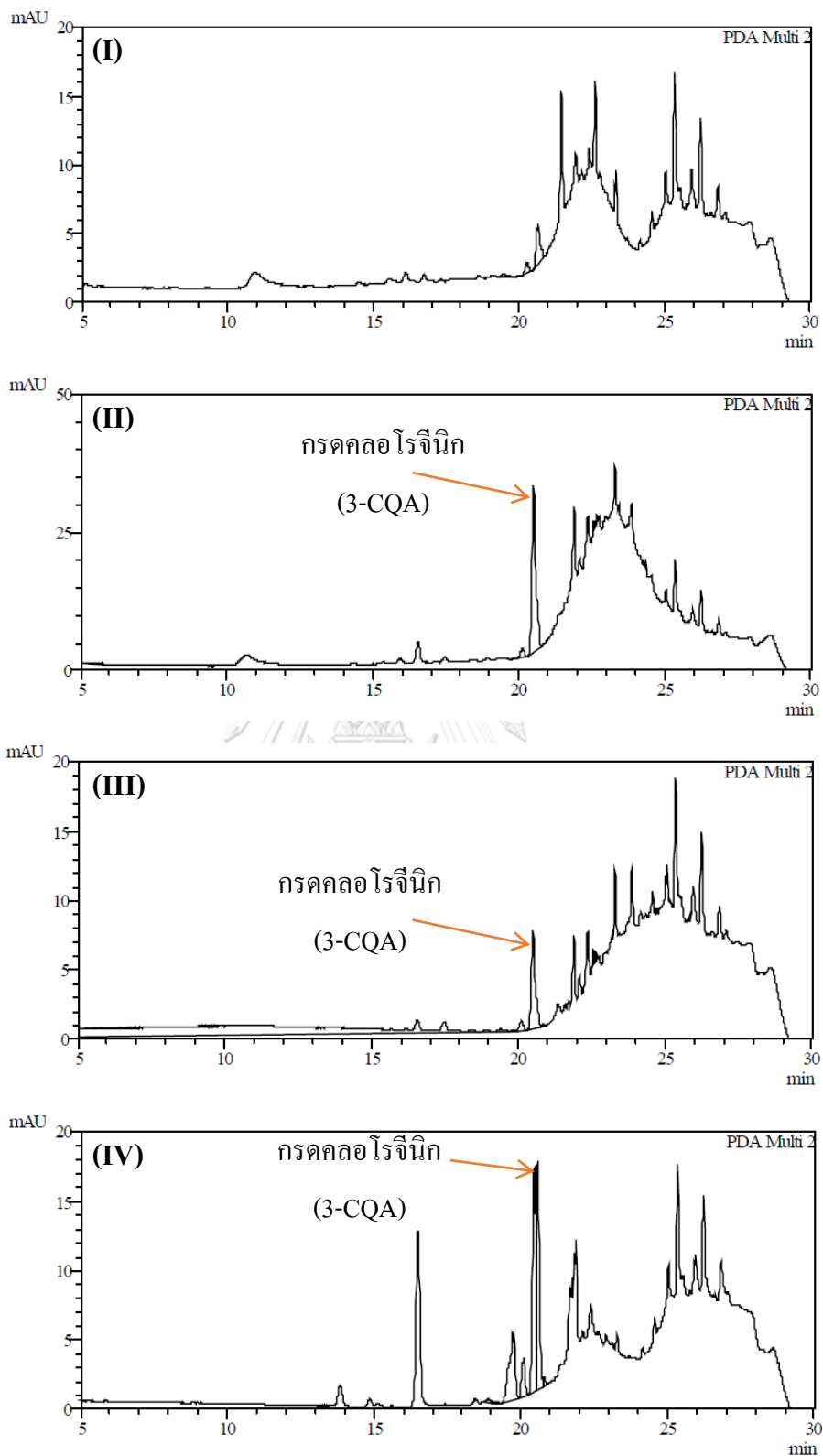
ผลภาพโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาดที่สกัดด้วยน้ำเมื่อตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 272 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของคาเฟอีน แล้วทำการสแกนสเปกตรัมบริเวณพิกัดดังกล่าว เพื่อตรวจสอบความแม่นยำว่าพิกัดดังกล่าวให้ลักษณะสเปกตรัมตรงกับสารมาตรฐานคาเฟอีน โดยพบว่าพิกัดดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ความยาวคลื่น 272 nm และวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่าง โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างที่เวลา 21.057 นาที คำนวณหาปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่าง โดยภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคาเฟอีนภายใต้ความยาวคลื่น 272 nm แสดงดังรูปที่ 8

การหาปริมาณกรดคลอโรจีนิกภาพโครมาโตแกรมเมื่อตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 330 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของกรดคลอโรจีนิก แล้วทำการสแกนสเปกตรัมบริเวณพิกัดดังกล่าว เพื่อตรวจสอบความแม่นยำว่าพิกัดดังกล่าวให้ลักษณะสเปกตรัมตรงกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก และวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในตัวอย่าง โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างที่ช่วงเวลา 20.163 นาที คำนวณหาปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่าง โดยภาพโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกภายใต้ความยาวคลื่น 330 nm แสดงดังรูปที่ 9





รูปที่ 10: ภาพโครมาโตแกรมของเยื่อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย (I) น้ำ (II) 50% เอทานอล (III) 100% เอทานอล (IV) เมล็ดคาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ ภายใต้ความยาวคลื่น 272 nm



รูปที่ 11: ภาพโครมาโตแกรมของเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย (I) น้ำ (II) 50% เอทานอล (III) 100% เอทานอล (IV) เมล็ดคาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ ภายใต้ความยาวคลื่น 330 nm

ตารางที่ 7: แสดงปริมาณสารคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิก

สารตัวอย่าง	ปริมาณคาเฟอีน (mg/g สารสกัดแห้ง)	ปริมาณกรดคลอโรจีนิก (mg/g สารสกัดแห้ง)
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	50.52±9.13 <sup>b</sup>	N.D.
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	62.47±5.01 <sup>b</sup>	1.92±0.12 <sup>c</sup>
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	59.38±0.65 <sup>b</sup>	1.07±0.03 <sup>a</sup>
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	7.46±0.29 <sup>a</sup>	1.36±0.02 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

2. ตัวอักษร a b และ c ในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

3. N.D. = ไม่สามารถตรวจพบได้

โดยปริมาณของสารคาเฟอีน และกรดคลอโรจีนิก ที่ได้จากการทดลองด้วยเครื่อง HPLC ถูกแสดงดังตารางที่ 7 พบว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีปริมาณคาเฟอีนสูงสุด (62.47±5.01 mg/g สารสกัดแห้ง) รองลงไปที่ เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล (59.38±0.65 mg/g สารสกัดแห้ง) เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ (50.52±9.13 mg/g สารสกัดแห้ง) และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ (7.46±0.29 mg/g สารสกัดแห้ง) ตามลำดับ ถูกแสดงในรูปที่ 10

นอกจากนี้ในการหาปริมาณกรดคลอโรจีนิก พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกสูงสุด (1.92±0.12 mg/g สารสกัดแห้ง) รองลงไปที่ เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ (1.36±0.02 mg/g สารสกัดแห้ง) และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล (1.07±0.03 mg/g สารสกัดแห้ง) ในขณะที่เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำดังแสดงในรูปที่ 11 (I) ไม่สามารถตรวจพบปริมาณของกรดคลอโรจีนิก เนื่องจากไม่พบพิกัดเกิดขึ้นในช่วงเวลา 20.163 นาที และค่าสเปกตรัมไม่ตรงกับความยาวคลื่น 330 nm

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ถูกสกัดด้วยน้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล อุดมไปด้วยสารคาเฟอีนในปริมาณที่สูงกว่าเมล็ดกาแฟก่อนคั่ว (2, 38) และหลังคั่วอย่างเห็นได้ชัดสอดคล้องกับการรายงานของ Affonso และคณะ (39) ในส่วนของกรดคลอโรจีนิกพบว่า มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ กรดคลอโรจีนิกสามารถเกิดการสลายตัวในกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ และสามารถเกิดการรวมตัวเป็นสารกลุ่มสารเมลานอยดินในรูป brown form (40) ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำไม่พบปริมาณกรดคลอโรจีนิกจาก

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เนื่องจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำไม่เหมาะสมในการสกัดกรดคลอโรจีนิก

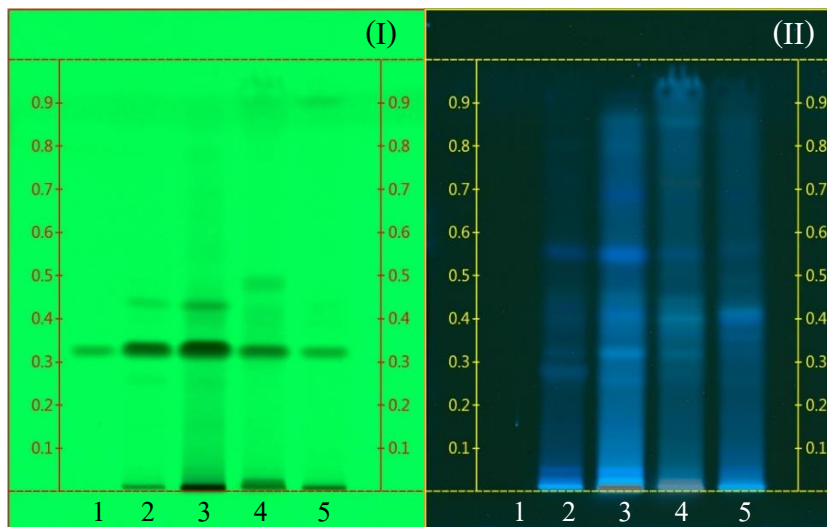
#### 4.4 ผลของการแยกสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

##### 4.4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

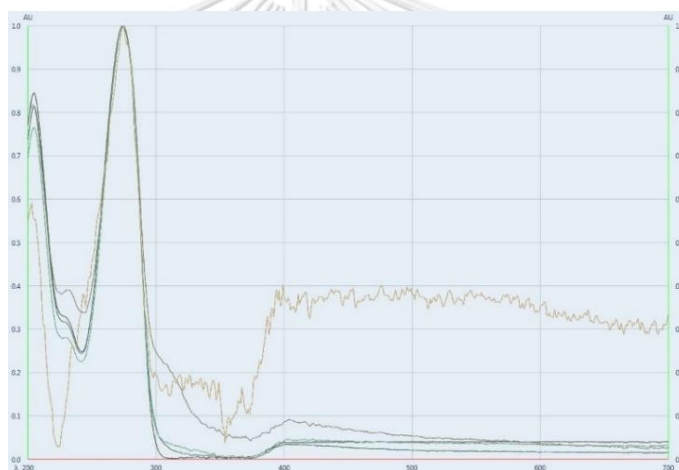
สารสกัดแห้ง (Extraction yield) ที่ได้จากการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาด ที่สกัดด้วยน้ำถูกนำมาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC โดยระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารสกัดถูกพัฒนามาจากงานวิจัยของ Jesionek w. และคณะ (34) จนได้ระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ โดยระบบตัวทำละลายนี้ ประกอบด้วย Chloroform:Ethyl acetate:Acetone:Formic acid (25:6:4:0.5 v/v) ตำแหน่งของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ทำการพัฒนาบนแผ่น TLC ถูกแสดงดังตารางที่ 8 หลังจากทำการพัฒนาแผ่น TLC แล้วนั้นจึงทำการบันทึกภาพภายใต้แสงขาว UV 254 nm และ UV 366 nm ถูกแสดงในรูปที่ 12

ตารางที่ 8: แสดงตำแหน่งของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟบนแผ่น TLC ในรูปที่ 12 และ 14

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	สารมาตรฐานคาเฟอีน	1 mg/ml
2	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	200 mg/ml
3	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	200 mg/ml
4	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	50 mg/ml
5	เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	200 mg/ml



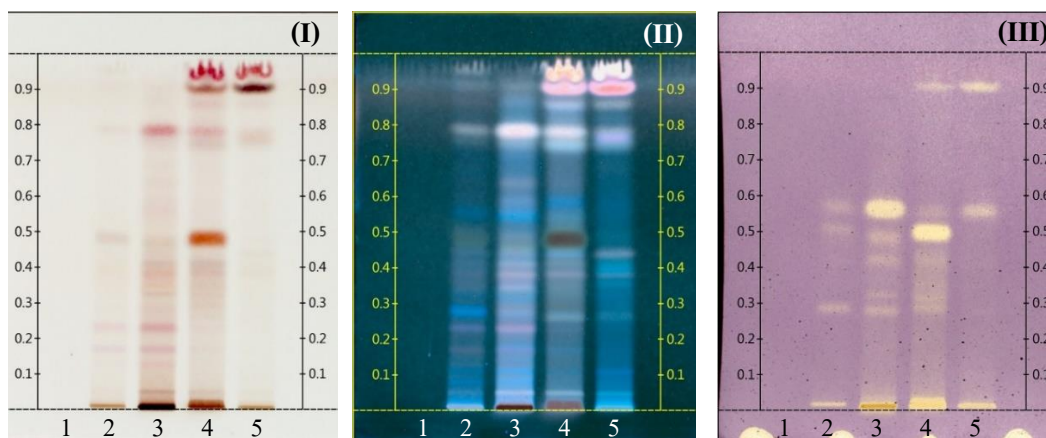
รูปที่ 12: ภาพโครมาโตแกรมแผ่น TLC ภายใต้แสง (I) UV 254 nm และ (II) UV 366 nm



รูปที่ 13: ภาพสเปกตรัมของสารมาตรฐานคาเฟอีนเทียบกับสารตัวอย่าง

ในรูปที่ 12 ภาพโครมาโตแกรมบนแผ่น TLC แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ (Track 2-4) และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ (Track 5) โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคาเฟอีน (Track 1) พบว่า ภายใต้แสง (I) UV 254 nm มีแถบแบนสีดำ (quenching zone) บนแผ่น TLC ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวเกิดขึ้นตรงกับสารมาตรฐานคาเฟอีนที่บริเวณค่า  $R_f = 0.32$  อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่น TLC ภายใต้แสง (II) UV 366 nm พบว่า ไม่สามารถมองเห็นสารมาตรฐานคาเฟอีนที่ค่า  $R_f = 0.32$  จึงได้ทำการสแกนสเปกตรัมที่ความยาวคลื่น 272 nm บริเวณค่า  $R_f = 0.32$  เพื่อตรวจสอบหาสารคาเฟอีน ดังแสดงในรูปที่ 13 โดยพบว่า สารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟทั้งหมดมีคาเฟอีนเป็นองค์ประกอบทางเคมี

#### 4.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ



รูปที่ 14: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC หลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้อุณหภูมิห้อง (I) แสงขาว และ (II) UV 366 nm (III) พ่นด้วย 0.2% DPPH ภายใต้อุณหภูมิห้อง

นอกจากนี้การพ่นแผ่น TLC ด้วย Anisaldehyde - sulfuric acid ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (Natural products) ทำให้เกิดแถบสีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนซึ่งลักษณะของสีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีเช่น monoterpenes triterpenes และ steroids ปรากฏแถบสีน้ำเงิน สีม่วง และสีเทา ตามลำดับ (41) นอกจากนี้การพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid จะทำให้เกิดแถบแบนสีน้ำตาลคือ diterpenes ในขณะที่ triterpenes จะปรากฏสีม่วงน้ำเงินภายใต้แสงขาว และปรากฏสีออกแดงหรือสีน้ำเงินภายใต้ UV 366 nm (42)

รูปที่ 14 (I และ II) แสดงภาพโครมาโตแกรมหลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟพบว่า สารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟทั้ง 3 ประเภท (Track 2-4) ปรากฏแถบแบนสีม่วงเป็นส่วนใหญ่ มีรูปร่างการเกิดแถบแบนที่ใกล้เคียงกัน แต่มีจำนวนแถบแบนที่ไม่เท่ากัน เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ ส่งผลต่อจำนวนการเกิดแบนที่แตกต่างกันบนแผ่น TLC สังเกตได้จากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล (Track 3) ในช่วงค่า  $R_f = 0.15-0.65$  มีจำนวนแถบแบนที่เกิดขึ้นมากกว่าเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ

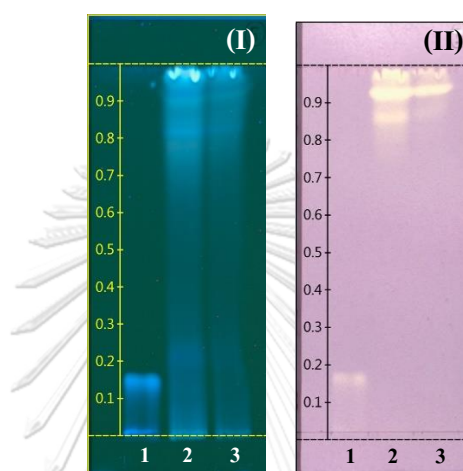
#### 4.5 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค TLC-Bioautography

จากรูปที่ 14 (I) เชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอลที่ค่า  $R_f = 0.50$  ปรากฏแถบแบนสีน้ำตาลที่มีความเข้มสูงบนแผ่น TLC ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ ที่ค่า  $R_f$  เดียวกัน เมื่อทำการพ่นด้วยสารละลาย DPPH ดังแสดงในรูปที่ 14 (III) เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่า เชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอลที่ตำแหน่ง  $R_f = 0.50$  พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนเป็นแถบแบนสีเหลืองบนแผ่น TLC ที่มีสีม่วง ซึ่งความหนาของแถบแบนแสดงให้เห็นถึงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่สูง นอกจากนี้เชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล พบแถบแบนสีเหลืองหนาใกล้เคียงกันเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาระบบตัวทำละลายจากงานวิจัยของ Jesionek และคณะ (34) เพื่อใช้ตรวจสอบการคัดลอโรจีนิกในสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟบนแผ่น TLC ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยระบบตัวทำละลายประกอบด้วย Chloroform : Ethyl acetate : Acetone : Formic acid (40:30:20:10, v/v) จากผลการทดลองในการแยกสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟแสดงในรูปที่ 15 พบว่า สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกมีค่า  $R_f = 0.15$  อย่างไรก็ตามเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล มีปริมาณของกรดคลอโรจีนิกที่ต่ำเกินกว่าที่จะตรวจพบบนแผ่น TLC ได้ ฉะนั้นจึงได้ทำการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่อยู่บริเวณค่า  $R_f = 0.95$  โดยการเพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายที่มีความขี้ข้นต่ำ จนได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC ประกอบด้วย Chloroform : Ethyl acetate : Acetone : Formic acid (25:6:4:0.5, v/v) ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟนั้นมีปริมาณสูง แต่มาจากสารประกอบอื่น ๆ นอกเหนือจากกรดคลอโรจีนิกซึ่งอาจเกิดจากสารประกอบกลุ่มเมลานอยดินซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในกระบวนการคั่วเมล็ดคาแฟ (31) โดยจากการผลการทดลองความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดคาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล ไม่สามารถตรวจพบกรดคลอโรจีนิกบนแผ่น TLC หากต้องการที่จะตรวจพบสารกรดคลอโรจีนิกจะต้องทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of detection; LOD) บนแผ่น TLC จากกราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก

ตารางที่ 9: แสดงตำแหน่งของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟบนแผ่น TLC ในรูปที่ 15

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก	1 mg/ml
2	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	25 mg/ml
3	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	50 mg/ml



รูปที่ 15: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC หลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้อุณหภูมิ  
(I) UV 366 nm และ (II) พ่นด้วย 0.2% DPPH ภายใต้อุณหภูมิแสงขาว

#### 4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ

##### 4.6.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน

เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาดที่สกัดด้วยน้ำถูกนำมาทดสอบหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน 2 ตัว คือ โทรลอคซ์ ซึ่งหลายงานวิจัยนิยมใช้โทรลอคซ์เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (2, 18, 31) และกรดคลอโรจีนิก เนื่องจากมีรายงานพบว่า เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมีกรดคลอโรจีนิกเป็นส่วนประกอบทางเคมี (2, 43) จึงนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

จากการทดสอบด้วยเทคนิค DPPH assay พบว่า เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอลมีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน โทรลอคซ์สูงสุด



(86.90±11.31 mg Trolox/g สารสกัดแห้ง) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ รองลงไปจะเป็นเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล (22.82±1.17 mg Trolox/g สารสกัดแห้ง) เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ (11.30±2.58 mg Trolox/g สารสกัดแห้ง) และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ (10.80±2.05 mg Trolox/g สารสกัดแห้ง) ดังแสดงในตารางที่ 9 ตารางที่ 10: แสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าโทรลอกซ์ และกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่าง

ตัวอย่าง	โทรลอกซ์ (mg Trolox/g สารสกัดแห้ง)	กรดคลอโรจีนิก (mg CGA/g สารสกัดแห้ง)
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	10.80±2.05 <sup>a</sup>	11.80±2.57 <sup>a</sup>
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	22.82±1.17 <sup>a</sup>	26.87±1.46 <sup>a</sup>
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	86.90±11.31 <sup>b</sup>	107.25±14.19 <sup>b</sup>
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	11.30±2.58 <sup>a</sup>	12.42±3.24 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

2. CGA หมายถึง กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid; CGA)

3. ตัวอักษร a b และ c ในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

นอกจากนี้เมื่อนำปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกดังแสดงในตารางที่ 9 จะพบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอลมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกสูงสุด (107.25±14.19 mg CGA/ g สารสกัดแห้ง) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รองลงไปเป็นเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล (26.87±1.46 mg CGA/ g สารสกัดแห้ง) เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ (12.42±3.24 mg CGA/ g สารสกัดแห้ง) และเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ (11.80±2.57 mg CGA/ g สารสกัดแห้ง) ตามลำดับ

จากผลการทดลองการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าโทรลอกซ์ และกรดคลอโรจีนิกพบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล มีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เมื่อนำสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟมาเทียบกับโทรลอกซ์ และกรดคลอโรจีนิก พบว่ามีปริมาณเทียบเท่าโทรลอกซ์น้อยกว่ากรดคลอโรจีนิก

#### 4.6.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 11: แสดงการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC<sub>50</sub>)

ตัวอย่าง	ค่า IC <sub>50</sub> (mg/ml)
สารมาตรฐานโทรลอกซ์	0.0287
สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก	0.0354
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	2.19±0.26
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	1.03±0.02
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	0.28±0.01
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	1.67±0.28
บลูเบอร์รี่ (Blueberry)*	0.7
ราสเบอร์รี่ (Raspberry)*	0.8
แบล็กเบอร์รี่ (Blackberry)*	1.4
สตรอว์เบอร์รี่ (Strawberry)*	5.6
เรสเวอราทรอล (Resveratrol)*	4.7
เมล็ดส้มเขียว**	0.18
เปลือกส้มเขียว**	0.22

- หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)  
 2. IC<sub>50</sub> หมายถึง ความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง 50% (Inhibition concentration)  
 3. \* ข้อมูลจากงานวิจัยของ Hangun-Balkir และคณะ (44)  
 4. \*\* ข้อมูลจากงานวิจัยของ Oikeh และคณะ (45)

ตารางที่ 10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาดที่สกัดด้วยน้ำ ถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบ DPPH assay โดยจากการทดลองพบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• สูงที่สุด (IC<sub>50</sub> = 0.28±0.01 mg/ml) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูงกว่าผลไม้อื่นๆ (44)

จากผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• พบว่า ฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมาจากสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟเกิดขึ้นเมื่อได้รับความร้อนในกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟทำให้เกิดสารเมลานอยดิน (Melanoidins) ซึ่งเกิดขึ้นจากปฏิกิริยามิลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน (31) จึงมีความเป็นไปได้ที่สารต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมาจากสารประกอบเมลานอยดิน

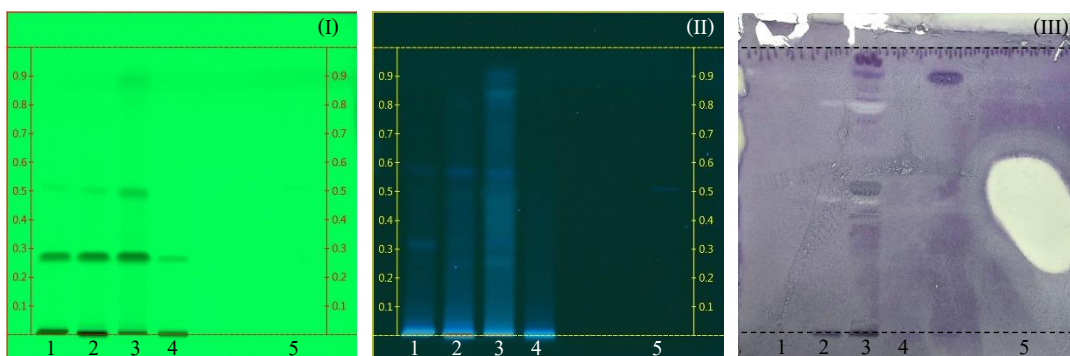
ในการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ทำละลายเป็นเอทานอล ทำให้ได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่น ๆ ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และอาจเกิดจากสารประกอบเมลานอยดิน เนื่องจากสารเมลานอยดินส่วนใหญ่ละลายในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง (46)

#### 4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

##### 4.7.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยเทคนิค TLC-Bioautography

ตารางที่ 12: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างสำหรับตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบนแผ่น TLC

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	50 mg/ml
2	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	50 mg/ml
3	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	50 mg/ml
4	เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	50 mg/ml
5	คลินดามัยซินละลายด้วยน้ำ	1%



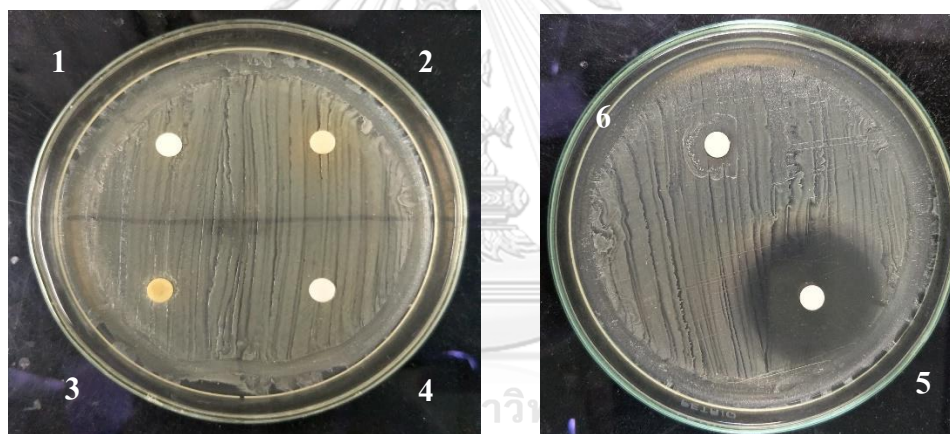
รูปที่ 16: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้ (I) UV 254 nm (II) UV 366 nm (III) ฟันด้วย 0.2% MTT ใน DMSO ภายใต้แสงขาว

สารสกัดแห้ง (Extraction yield) ที่ได้จากการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาด ที่สกัดด้วยน้ำถูกนำมาทดสอบหาสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ด้วยเทคนิค TLC-bioautography ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์อัตลักษณ์ของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟในการตรวจสอบการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งประกอบด้วย Chloroform:Ethyl acetate:Acetone:Formic acid (25:6:4:0.5 v/v) โดยใช้ 1% คลินดามัยซินซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* (Track 5) นำมา spot บนกึ่งกลางแผ่น TLC บริเวณค่า  $R_f = 0.50$  เป็น positive control จากผลการทดลองแผ่น TLC ที่ถูกฟันด้วยสารละลาย 0.2% MTT ใน DMSO ดังแสดงในรูปที่ 15 (III) เกิดการเปลี่ยนเป็นสีม่วงซึ่งแสดงถึงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามสามารถสังเกตได้ว่า เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล บริเวณค่า  $R_f = 0.78$  พบแถบสีขาวเกิดขึ้น (clear zone) บ่งบอกถึงสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* นอกจากนี้ บริเวณที่ทำการ spot คลินดามัยซิน (Track 5) พบว่า เกิดการกระจายตัวของคลินดามัยซินเป็นวงกว้าง ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนการจุ่มแผ่น TLC ในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่ผสมแบคทีเรีย *S. aureus* ไว้ หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion ในหัวข้อที่ 4.7.2

#### 4.7.2 ผลของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion

ตารางที่ 13: แสดงตำแหน่งของสารสกัดบนจานเพาะเชื้อ

หมายเลข	คำอธิบาย
1	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ
2	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล
3	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล
4	เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ
5	1% คลินดามัยซินละลายด้วยน้ำ
6	เอทานอล



รูปที่ 17: ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion

ตารางที่ 14: แสดงบริเวณในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น	บริเวณยับยั้ง (mm)
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	100 mg/ml	0.0±0.0
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	100 mg/ml	0.0±0.0
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	100 mg/ml	0.0±0.0
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	100 mg/ml	0.0±0.0
คลินดามัยซินละลายด้วยน้ำ	1%	19
เอทานอล	100%	0.0±0.0

สารสกัดแห้ง (Extraction yield) ที่ได้จากการสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาด ที่สกัดด้วยน้ำดังแสดงในตารางที่ 12 ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคมะเร็งผิวหนัง และ โรคมะเร็งในอาหาร ความอันตรายอยู่ในระดับที่ 2 ด้วยวิธี Agar disc diffusion ดังแสดงในรูปที่ 16 สารคลินดามัยซินที่ละลายด้วยน้ำถูกใช้เป็น Positive control มีบริเวณยับยั้งกว้าง 19 mm ส่วนสารเอทานอลซึ่งถูกใช้เป็น Negative control เนื่องจากสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟถูกละลายด้วย 100% เอทานอล ไม่พบบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งอาจเกิดการจากระเหยของสารละลายเอทานอล ทำให้ไม่สามารถแพร่ไปบริเวณข้างเคียงได้ จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่ได้จากการสกัดด้วย น้ำ 50% เอทานอล 100% เอทานอล และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* จึงไม่พบบริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (clear zone) เกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 13 ทั้งนี้เห็นได้ว่า สารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำความเข้มข้น 100 mg/ml ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* เนื่องจากสารที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอาจมีปริมาณที่น้อยหรือไม่สามารถเกิดการแพร่ออกจากกระดวยกรองไปยังบริเวณข้างเคียงได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

#### 5.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการทดลองเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 35 40 50 และ 60°C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ พบว่าการสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ตัวทำละลาย 100% เอทานอล ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตารางที่ 15: สรุปองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

สารตัวอย่าง	ปริมาณสารสกัดแห้ง (%)	ปริมาณสารฟีนอลิก (mg GAE/g สารสกัดแห้ง)	ปริมาณกรดคลอโรจีนิก (mg/g สารสกัดแห้ง)	ปริมาณคาเฟอีน (mg/g สารสกัดแห้ง)
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	10-11%	24.87±1.24 <sup>a</sup>	0.0±0.0	50.52±9.13 <sup>b</sup>
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	7-8%	38.92±2.42 <sup>b</sup>	1.92±0.12 <sup>c</sup>	62.47±5.01 <sup>b</sup>
เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	5-6%	29.93±4.01 <sup>a</sup>	1.07±0.03 <sup>a</sup>	59.38±0.65 <sup>b</sup>
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	-	23.68±2.36 <sup>a</sup>	1.36±0.02 <sup>b</sup>	7.46±0.29 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

2. ตัวอักษร a b และ c ในแถวแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

3. การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกใช้วิธี Folin-Ciocalteu

4. การศึกษาปริมาณกรดคลอโรจีนิก และคาเฟอีนใช้เทคนิค HPLC

## 5.2 การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี

ผลของการวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาดที่สกัดด้วยน้ำ แสดงดังตารางที่ 14 พบว่า สารสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณสารสกัดแห้งสูงสุด 10-11% นอกจากนี้เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีสารประกอบฟีนอลิก ( $38.92 \pm 2.42$  mg GAE/g สารสกัดแห้ง) ปริมาณกรดคลอโรจีนิก ( $1.92 \pm 0.12$  mg/g สารสกัดแห้ง) และปริมาณคาเฟอีน ( $62.47 \pm 5.01$  mg/g สารสกัดแห้ง) สูงสุดเมื่อเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำอย่างเห็นได้ชัดเจน

## 5.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล เปรียบเทียบกับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าตามท้องตลาดที่สกัดด้วยน้ำ โดยทดสอบฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงดังตารางที่ 16 โดยการทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH assay โดยใช้โทรลอกซ์ และกรดคลอโรจีนิกเป็นสารมาตรฐาน ผลการทดสอบพบว่า เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล มีปริมาณ และฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยที่สารต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟอาจเกิดจากสารประกอบกลุ่มเมลานอยดินที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระซึ่งเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ โดยมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าโทรลอกซ์อยู่ที่  $86.90 \pm 11.31$  mg โทรลอกซ์/g สารสกัดแห้ง มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดคลอโรจีนิกอยู่ที่  $107.25 \pm 14.19$  mg กรดคลอโรจีนิก/g สารสกัดแห้ง และมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง 50% ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ  $0.28$  mg/ml สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค TLC-bioautography พบว่า เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล และ 100% เอทานอล มีสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* อย่างไรก็ตามหลังทำการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ ซึ่งคาดว่าวิธีในการทดสอบอาจไม่เหมาะสมในการทดสอบสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ



ตารางที่ 16: สรุปลักษณะทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

สารตัวอย่าง	DPPH (mg Trolox/g สารสกัดแห้ง)	DPPH (mg CGA/g สารสกัดแห้ง)	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Agar disc diffusion (mm)
เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	10.80±2.05 <sup>a</sup>	11.80±2.57 <sup>a</sup>	2.19±0.26	0.0±0.0
เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล	22.82±1.17 <sup>a</sup>	26.87±1.46 <sup>a</sup>	1.03±0.02	0.0±0.0
เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	86.90±11.31 <sup>b</sup>	107.25±14.19 <sup>b</sup>	0.28±0.01	0.0±0.0
เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์ อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ	11.30±2.58 <sup>a</sup>	12.42±3.24 <sup>a</sup>	1.67±0.28	0.0±0.0

หมายเหตุ: 1. ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

2. ตัวอักษร a b และ c ในแถวแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

- สารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมีศักยภาพสูงในการยับยั้งอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติหลายชนิด ซึ่งสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้อาจเกิดจากสารประกอบกลุ่มเมลานอยดินในกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟ

- ในอนาคตควรทำการศึกษาบทบาท และการมีอยู่ของสารประกอบเมลานอยดินที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ

- สารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟมีปริมาณสารคาเฟอีนที่สูงกว่าเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำอย่างเห็นได้ชัด และมีปริมาณกรดคลอโรจีนิกซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่ากับเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้า

- การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียควรทำการเปลี่ยนวิธีในการทดสอบเป็นการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC) เนื่องจากสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟอาจจะไม่มีความสามารถในการแพร่ออกจากกระดวยกรองไปยังบริเวณข้างเคียง

## ภาคผนวก



## ส่วนที่ 1 การสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

### 1.1 การสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ตัวทำละลายน้ำ

ตารางที่ 17: แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดแห้งของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ

สภาวะ	ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักงานเพาะเชื้อ (ก่อน)	น้ำหนักงานเพาะเชื้อ (หลัง)	น้ำหนักสารหลงอบ	สารสกัดแห้ง (%)	ค่าเฉลี่ยสารสกัดแห้ง±SD
30°C 30 นาที	1	10.02	44.1021	45.1094	1.0073	10.05	10.16±0.09
	2	10.02	46.2406	47.2614	1.0208	10.19	
	3	10.01	44.7979	45.8218	1.0239	10.23	
30°C 60 นาที	1	10.01	40.7203	41.7832	1.0629	10.62	10.51±0.28
	2	10.03	43.088	44.1618	1.0738	10.71	
	3	10.04	43.6539	44.6771	1.0232	10.19	
40°C 30 นาที	1	10.04	46.5155	47.6138	1.0983	10.94	10.52±0.57
	2	10.03	46.9025	47.9804	1.0779	10.75	
	3	10.02	41.7809	42.7704	0.9895	9.88	
40°C 60 นาที	1	10.01	46.2412	47.2956	1.0544	10.53	10.60±0.07
	2	10.03	43.5236	44.5855	1.0619	10.59	
	3	10.03	43.5246	44.5945	1.0699	10.67	
50°C 30 นาที	1	10.01	42.4377	43.4713	1.0336	10.33	10.96±0.56
	2	10.02	43.5244	44.6442	1.1198	11.18	
	3	10.03	46.9019	48.0437	1.1418	11.38	
50°C 60 นาที	1	10.03	47.3591	48.309	0.9499	9.47	10.33±0.76
	2	10.03	41.4163	42.4783	1.062	10.59	
	3	10.03	44.0847	45.1814	1.0967	10.93	
60°C 30 นาที	1	10.06	43.7054	44.7748	1.0694	10.63	10.75±0.11
	2	10.03	46.2685	47.3503	1.0818	10.79	
	3	10.04	41.7609	42.8487	1.0878	10.83	
60°C 60 นาที	1	10.04	43.7048	44.7893	1.0845	10.80	10.97±0.22
	2	10.05	46.2677	47.3623	1.0946	10.89	
	3	10.03	44.4809	45.6061	1.1252	11.22	

## 1.2 การสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ตัวทำละลาย 50% เอทานอล

ตารางที่ 18: แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดแห้งของเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล

สภาวะ	ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักงานเพาะเชื้อ (ก่อน)	น้ำหนักงานเพาะเชื้อ (หลัง)	น้ำหนักสารหลงอบ	สารสกัดแห้ง (%)	ค่าเฉลี่ยสารสกัดแห้ง±SD
30°C 30 นาที	1	10.02	45.9177	46.7046	0.7869	7.85	7.59±0.23
	2	10.05	43.9686	44.7169	0.7483	7.45	
	3	10.04	38.9893	39.7394	0.7501	7.47	
30°C 60 นาที	1	10.04	44.4973	45.2622	0.7649	7.62	7.79±0.21
	2	10.05	43.571	44.3472	0.7762	7.72	
	3	10.05	43.5483	44.3543	0.806	8.02	
40°C 30 นาที	1	10.02	40.7202	41.5482	0.828	8.26	8.10±0.19
	2	10.02	45.7061	46.4961	0.79	7.88	
	3	10.04	56.3619	57.1797	0.8178	8.15	
40°C 60 นาที	1	10.05	43.5235	44.3632	0.8397	8.36	8.12±0.20
	2	10.03	46.267	47.0687	0.8017	7.99	
	3	10.03	43.0876	43.8914	0.8038	8.01	
50°C 30 นาที	1	10.02	41.8333	42.7021	0.8688	8.67	8.60±0.14
	2	10.06	37.5406	38.4152	0.8746	8.69	
	3	10.05	47.3586	48.2072	0.8486	8.44	
50°C 60 นาที	1	10.02	40.3115	41.1666	0.8551	8.53	8.50±0.13
	2	10.01	43.6535	44.5158	0.8623	8.61	
	3	10	41.7805	42.617	0.8365	8.36	
60°C 30 นาที	1	10.04	38.9897	39.8494	0.8597	8.56	8.55±0.01
	2	10.02	43.9679	44.8237	0.8558	8.54	
	3	10.03	44.7469	45.604	0.8571	8.55	
60°C 60 นาที	1	10.01	41.4164	42.2892	0.8728	8.72	8.74±0.03
	2	10.04	42.9714	43.8469	0.8755	8.72	
	3	10.02	47.5027	48.3824	0.8797	8.78	

### 1.3 การสกัดเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟโดยใช้ตัวทำละลาย 100% เอทานอล

ตารางที่ 19: แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดแห้งของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล

สภาวะ	ครั้งที่	น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักงานเพาะเชื้อ (ก่อน)	น้ำหนักงานเพาะเชื้อ (หลัง)	น้ำหนักสารหลงอบ	สารสกัดแห้ง (%)	ค่าเฉลี่ยสารสกัดแห้ง±SD
30°C 30 นาที	1	10.02	43.3697	43.9576	0.5879	5.87	5.89±0.03
	2	10.03	43.5236	44.1173	0.5937	5.92	
	3	10.03	46.5142	47.1039	0.5897	5.88	
30°C 60 นาที	1	10.02	43.6637	44.2964	0.6327	6.31	6.11±0.19
	2	10.03	44.1020	44.6983	0.5963	5.95	
	3	10.04	44.0838	44.6924	0.6086	6.06	
40°C 30 นาที	1	10.06	46.9019	47.5512	0.6493	6.45	6.60±0.24
	2	10.04	43.6646	44.3137	0.6491	6.47	
	3	10.06	46.9011	47.5925	0.6914	6.87	
40°C 60 นาที	1	10.04	43.7042	44.3717	0.6675	6.65	6.60±0.07
	2	10.04	43.5235	44.1787	0.6552	6.53	
	3	10.04	43.7416	44.4073	0.6657	6.63	
50°C 30 นาที	1	10.04	44.7043	45.3942	0.6899	6.87	6.68±0.18
	2	10.02	44.4500	45.1174	0.6674	6.66	
	3	10.04	46.2671	46.9206	0.6535	6.51	
50°C 60 นาที	1	10.03	46.9012	47.5787	0.6775	6.75	6.75±0.16
	2	10.05	43.7403	44.4345	0.6942	6.91	
	3	10.03	43.7041	44.3643	0.6602	6.58	
60°C 30 นาที	1	10.03	43.7048	44.3796	0.6748	6.73	6.78±0.26
	2	10.05	43.5240	44.2337	0.7097	7.06	
	3	10.02	44.4504	45.1069	0.6565	6.55	
60°C 60 นาที	1	10.05	43.7413	44.4590	0.7177	7.14	7.05±0.08
	2	10.05	43.3697	44.0708	0.7011	6.98	
	3	10.02	46.2676	46.9717	0.7041	7.03	

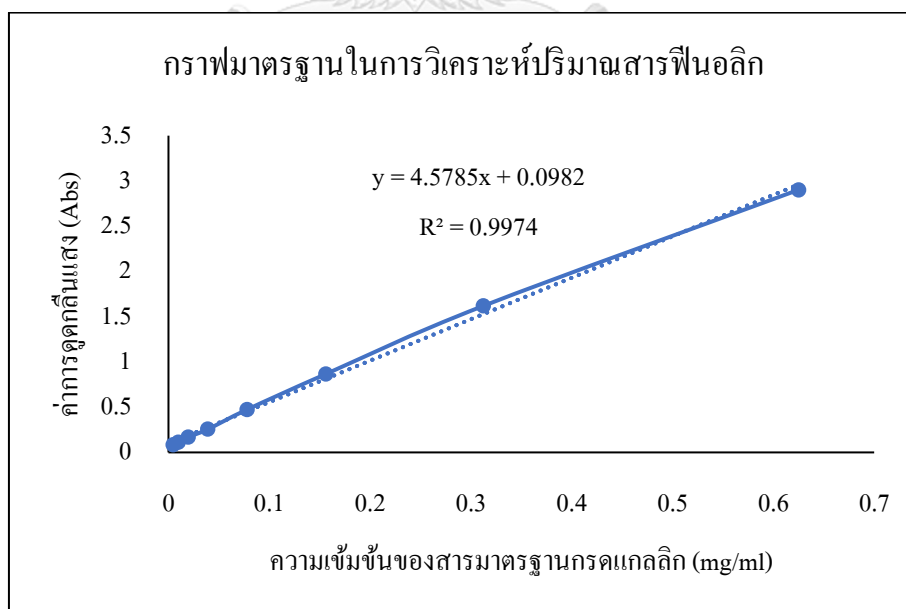
## ส่วนที่ 2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

### 2.1 การหาปริมาณสารฟีนอลิก

#### 2.1.1 การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

โดยขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกอยู่ในหัวข้อที่ 3.6.1 การเตรียมสารมาตรฐาน ตารางที่ 20: ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

ความเข้มข้น (mg/ml).	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm					ค่าเฉลี่ย Abs.
	1	2	3	4	5	
0.625	2.8980	2.8440	3.0030	2.9290	2.8330	2.9014
0.3125	1.5870	1.6250	1.6070	1.6430	1.6360	1.6196
0.15625	0.8670	0.8830	0.8590	0.8620	0.8620	0.8666
0.078125	0.4690	0.4880	0.4640	0.4800	0.4710	0.4744
0.039063	0.2540	0.2520	0.2570	0.2590	0.2610	0.2566
0.019531	0.1700	0.1640	0.1700	0.1720	0.1650	0.1682
0.009766	0.1170	0.1160	0.1160	0.1110	0.1060	0.1132
0.004883	0.0840	0.0860	0.0890	0.0880	0.0830	0.0860



รูปที่ 18: กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก

### 2.1.2 การคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐาน

จากตารางที่ 20 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และรูปที่ 18 คือกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

สำหรับสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์ราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำที่ไม่ทราบปริมาณสารฟีนอลิกสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm และคำนวณผ่านสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นสารมาตรฐานกรดแกลลิก เพื่อคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของสารฟีนอลิกเทียบเท่ากับกรดแกลลิก แล้วจึงทำการเฉลี่ยค่าความเข้มข้นของสารฟีนอลิกเทียบเท่ากับกรดแกลลิกดังแสดงในตารางที่ 21-23

สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน:  $y = 4.5785x + 0.0982$

หลังจากนั้นนำค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารฟีนอลิกเทียบเท่ากับกรดแกลลิก มาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกเทียบเท่ากับกรดแกลลิก โดยการหารด้วยน้ำหนักสารตัวอย่างเริ่มต้นคือ 0.01 g จะได้ปริมาณของสารฟีนอลิกเทียบเท่ากับกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมสารสกัดแห้งดังแสดงในตารางที่ 24





ตารางที่ 22: ผลความยาวคลื่นของสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกครั้งที่ 2

สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm					ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย-control	ความเข้มข้นกรดแกลลิก (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยตามเข้มข้นกรดแกลลิก (mg/ml)
	1	2	3	4	5				
control (น้ำ)	0.053	0.046	0.045	0.051	0.047	0.048	-	-	-
Water	1.271	1.340	1.381	1.374	1.417	1.357	1.308	0.2643	
Water	1.304	1.361	1.352	1.392	1.417	1.365	1.317	0.2662	0.2615
Water	1.257	1.298	1.329	1.332	1.332	1.310	1.261	0.2540	
Control (50% เอทานอล)	0.046	0.048	0.049	0.045	0.042	0.046	-	-	-
50% เอทานอล	1.909	2.016	2.099	2.140	2.139	2.061	2.015	0.4186	
50% เอทานอล	1.904	2.061	2.079	2.093	2.032	2.034	1.988	0.4127	0.4084
50% เอทานอล	1.841	1.958	1.997	1.917	2.023	1.947	1.901	0.3938	
control (100% เอทานอล)	0.044	0.044	0.043	0.057	0.048	0.047	-	-	-
100% เอทานอล	1.480	1.722	1.659	1.528	1.794	1.637	1.589	0.3257	
100% เอทานอล	1.481	1.627	1.713	1.681	1.623	1.625	1.578	0.3232	0.3330
100% เอทานอล	1.707	1.890	1.727	1.621	1.801	1.749	1.702	0.3503	
Roasted coffee	1.364	1.392	1.366	1.363	1.392	1.375	1.327	0.2684	
Roasted coffee	1.230	1.279	1.260	1.235	1.250	1.251	1.202	0.2412	0.2609
Roasted coffee	1.346	1.423	1.380	1.419	1.417	1.397	1.349	0.2731	

ตารางที่ 23: ผลความยาวคลื่นของสารตัวอย่างในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกครั้งที่ 3

สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm					ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย-control	ความเข้มข้นกรดแกลลิก (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นกรดแกลลิก (mg/ml)
	1	2	3	4	5				
control (น้ำ)	0.056	0.054	0.052	0.051	0.051	0.053	-	-	-
Water	1.291	1.286	1.303	1.345	1.309	1.307	1.254	0.2524	
Water	1.238	1.264	1.232	1.227	1.277	1.248	1.195	0.2395	0.2367
Water	1.126	1.159	1.140	1.159	1.163	1.149	1.097	0.2181	
Control (50% เอทานอล)	0.048	0.042	0.034	0.069	0.049	0.048	-	-	-
50% เอทานอล	1.510	1.469	1.471	1.618	1.529	1.519	1.471	0.2998	
50% เอทานอล	1.731	1.813	1.764	1.819	1.652	1.756	1.707	0.3515	0.3620
50% เอทานอล	2.069	2.125	2.196	2.139	2.154	2.137	2.088	0.4346	
control (100% เอทานอล)	0.052	0.058	0.057	0.054	0.051	0.054	-	-	-
100% เอทานอล	1.375	1.528	1.584	1.614	1.290	1.478	1.424	0.2895	
100% เอทานอล	1.299	1.492	1.648	1.598	1.317	1.471	1.416	0.2879	0.3101
100% เอทานอล	1.622	1.877	1.797	1.764	1.784	1.769	1.714	0.3530	
Roasted coffee	1.184	1.161	1.221	1.189	1.232	1.197	1.145	0.2285	
Roasted coffee	1.025	1.067	1.080	1.080	1.082	1.067	1.014	0.2000	0.2137
Roasted coffee	1.089	1.120	1.137	1.136	1.141	1.125	1.072	0.2126	

ตารางที่ 24: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารที่สกัดจากทั้ง 3 ครั้ง

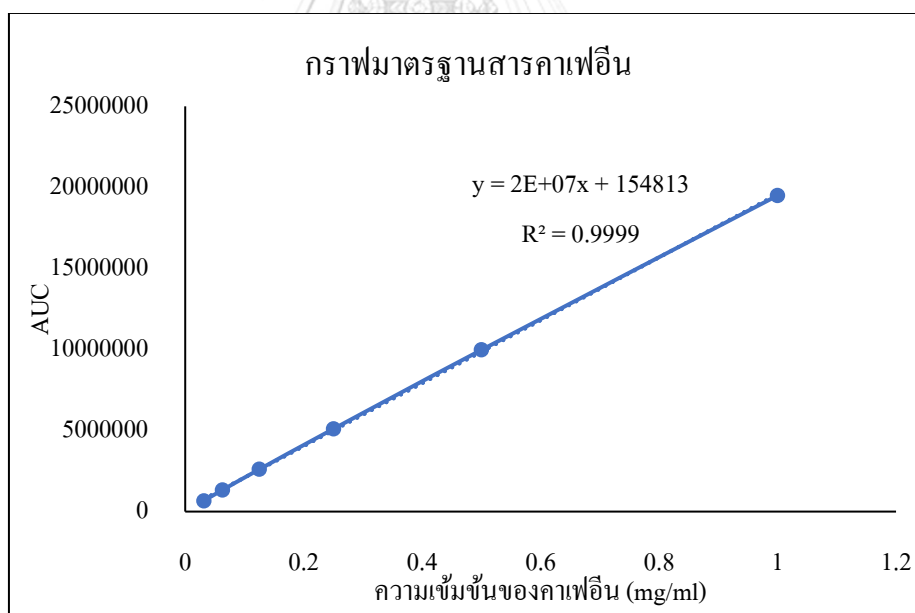
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นกรดแกดลิก (mg/ml)	ปริมาณกรดแกดลิก (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแกดลิก (mg/g extract)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Water (ครั้งที่ 1)	0.2478	24.78	24.87	1.24
Water (ครั้งที่ 2)	0.2615	26.15		
Water (ครั้งที่ 3)	0.2367	23.67		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	0.3971	39.71	38.92	2.42
50% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	0.4084	40.84		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	0.362	36.20		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	0.2549	25.49	29.93	4.01
100% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	0.333	33.30		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	0.3101	31.01		
Roasted coffee (ครั้งที่ 1)	0.2358	23.58	23.68	2.36
Roasted coffee (ครั้งที่ 2)	0.2609	26.09		
Roasted coffee (ครั้งที่ 3)	0.2137	21.37		

## 2.2 การหาปริมาณสารคาเฟอีนด้วยเทคนิค HPLC

### 2.2.1 การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารคาเฟอีนเป็นสารมาตรฐาน

โดยขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานคาเฟอีนอยู่ในหัวข้อที่ 3.11.1 การเตรียมสารมาตรฐาน ตารางที่ 25: แสดงค่ากราฟมาตรฐานของคาเฟอีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ	Retention time
1	19497656	21.292
0.5	9968791	21.348
0.25	5095014	21.394
0.125	2603185	21.435
0.0625	1322572	21.467
0.03125	664180	21.478
0.015625	349311	21.467



รูปที่ 19: กราฟมาตรฐานคาเฟอีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

## 2.2.2 การคำนวณปริมาณสารคาเฟอีนจากกราฟมาตรฐาน

จากตารางที่ 25 แสดงค่ากราฟมาตรฐานของคาเฟอีนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และรูปที่ 19 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาเฟอีน

สำหรับสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟ และเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำที่ไม่ทราบปริมาณสารคาเฟอีนสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนโดยการฉีดสารละลายเข้าสู่เครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 272 nm และคำนวณผ่านสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นสารมาตรฐานคาเฟอีน เพื่อคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของสารคาเฟอีน คำนวณหาปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างโดยการหารด้วยน้ำหนักสารตัวอย่างเริ่มต้นคือ 0.01 g จะได้ปริมาณของสารคาเฟอีนต่อ 1 กรัมสารสกัดแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 26-28 และในส่วนของตารางที่ 29 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารคาเฟอีนของสารตัวอย่างจากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง

สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน:  $y = 2 \times 10^7 x + 154813$

ตารางที่ 26: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างครั้งที่ 1

สารตัวอย่าง	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ	น้ำหนักสาร(g/ml)	ความเข้มข้นคาเฟอีน (mg/ml)	ปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)
water	21.364	9420418	0.0105	0.4772	45.4523	42.5298
water	21.343	7920607	0.0108	0.4000	37.0368	
water	21.321	9523813	0.0107	0.4826	45.1004	
50% เอทานอล	21.315	10928379	0.0104	0.5549	53.3577	58.7049
50% เอทานอล	21.297	9470363	0.0107	0.4798	44.8431	
50% เอทานอล	21.242	15735267	0.0103	0.8025	77.9138	
100% เอทานอล	21.255	12172725	0.0109	0.6190	56.7902	59.1091
100% เอทานอล	21.250	12046013	0.0102	0.6125	60.0478	
100% เอทานอล	21.249	12250892	0.0103	0.6230	60.4893	
Roasted coffee	21.299	1527037	0.0105	0.0707	6.7314	7.1530
Roasted coffee	21.289	1703070	0.0102	0.0797	7.8183	
Roasted coffee	21.282	1603497	0.0108	0.0746	6.9091	

ตารางที่ 27: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างครั้งที่ 2

สารตัวอย่าง	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ	น้ำหนักสาร (g/ml)	ความเข้มข้นคาเฟอีน (mg/ml)	ปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)
water	21.185	9892535	0.0101	0.5016	0.5016	48.5491
water	21.211	9034791	0.0102	0.4574	0.4574	
water	21.189	10580974	0.0105	0.5370	0.5370	
50% เอทานอล	21.185	15015765	0.0106	0.7655	0.7655	68.1481
50% เอทานอล	21.146	12063890	0.0101	0.6134	0.6134	
50% เอทานอล	21.157	14730036	0.0105	0.7507	0.7507	
100% เอทานอล	21.152	12413587	0.0103	0.6314	0.6314	58.9167
100% เอทานอล	21.151	11930578	0.0105	0.6065	0.6065	
100% เอทานอล	21.164	11577413	0.0102	0.5884	0.5884	
Roasted coffee	21.234	1730886	0.0108	0.0812	0.0812	7.5054
Roasted coffee	21.226	1751191	0.0107	0.0822	0.0822	
Roasted coffee	21.225	1688575	0.0108	0.0790	0.0790	

ตารางที่ 28: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนในสารตัวอย่างครั้งที่ 3

สารตัวอย่าง	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ	น้ำหนักสาร (g/ml)	ความเข้มข้นคาเฟอีน (mg/ml)	ปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)
water	21.164	8766969	0.0106	0.4436	0.4436	60.4749
water	21.226	13481082	0.0105	0.6864	0.6864	
water	21.23	15137629	0.0104	0.7717	0.7717	
50% เอทานอล	21.21	12098491	0.0109	0.6152	0.6152	60.5438
50% เอทานอล	21.21	11748241	0.0101	0.5971	0.5971	
50% เอทานอล	21.215	13623058	0.0105	0.6937	0.6937	
100% เอทานอล	21.238	11910432	0.0102	0.6055	0.6055	60.1200
100% เอทานอล	21.243	14742653	0.0103	0.7514	0.7514	
100% เอทานอล	21.256	9949333	0.0105	0.5045	0.5045	
Roasted coffee	21.312	1666238	0.0109	0.0778	0.0778	7.7205
Roasted coffee	21.297	1714934	0.0104	0.0804	0.0804	
Roasted coffee	21.302	1813096	0.0103	0.0854	0.0854	

ตารางที่ 29: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารคาเฟอีนของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง

สารตัวอย่าง	ปริมาณคาเฟอีน (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณ คาเฟอีน (mg/g extract)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
Water (ครั้งที่ 1)	42.5298	50.52	9.13
Water (ครั้งที่ 2)	48.5491		
Water (ครั้งที่ 3)	60.4749		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	58.7049	62.47	5.01
50% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	68.1481		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	60.5438		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	59.1091	59.38	0.65
100% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	58.9167		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	60.1200		
Roasted coffee (ครั้งที่ 1)	7.1530	7.46	0.29
Roasted coffee (ครั้งที่ 2)	7.5054		
Roasted coffee (ครั้งที่ 3)	7.7205		

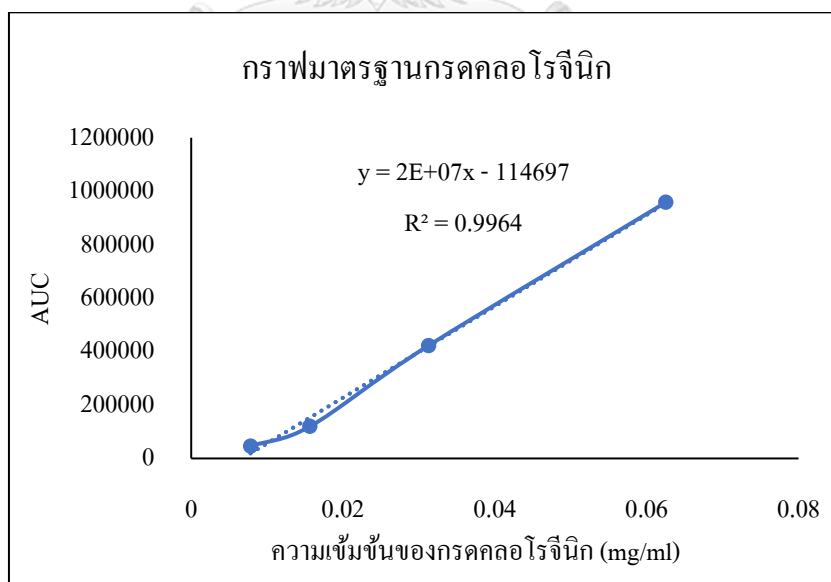
## 2.3 การหาปริมาณกรดคลอโรจีนิกด้วยเทคนิค HPLC

### 2.3.1 การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดคลอโรจีนิกเป็นสารมาตรฐาน

โดยขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก (CGA) อยู่ในหัวข้อที่ 3.11.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

ตารางที่ 30: แสดงค่ากราฟมาตรฐานของกรดคลอโรจีนิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ	Retention time
1	51327455	21.909
0.5	14770219	23.681
0.25	5491192	21.095
0.125	2619154	20.223
0.0625	957939	20.248
0.03125	422053	20.406
0.015625	119426	20.184
0.007813	45971	20.187



รูปที่ 20: กราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



## 2.2.2 การคำนวณปริมาณกรดคลอโรจีนิกจากกราฟมาตรฐาน

จากตารางที่ 30 แสดงค่ากราฟมาตรฐานของกรดคลอโรจีนิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และรูปที่ 20 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก (CGA) สำหรับสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟและเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์ราบิเก่าที่สกัดด้วยน้ำที่ไม่ทราบปริมาณกรดคลอโรจีนิกสามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกโดยการฉีดสารละลายเข้าสู่เครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 330 nm และคำนวณผ่านสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก เพื่อคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของกรดคลอโรจีนิก คำนวณหาปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างโดยการหารด้วยน้ำหนักสารตัวอย่างเริ่มต้นคือ 0.01 g จะได้ปริมาณของกรดคลอโรจีนิกต่อ 1 กรัมสารสกัดแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 31-33 และในส่วนของตารางที่ 34 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดคลอโรจีนิกของสารตัวอย่างจากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง

สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน:  $y = 2 \times 10^7 x + 114697$

## 2.2.3 การคำนวณปริมาณกรดคลอโรจีนิกจากสารตัวอย่าง

โดยขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกอยู่ในหัวข้อที่ 3.11.3

ตารางที่ 31: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างครั้งที่ 1

สารตัวอย่าง	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ	น้ำหนักสาร (g/ml)	ความเข้มข้น CGA (mg/ml)	ปริมาณ CGA (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณ CGA (mg/g extract)
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
50% เอทานอล	20.570	186563	0.0104	0.0176	1.6938	1.8166
50% เอทานอล	20.536	158585	0.0107	0.0160	1.4934	
50% เอทานอล	20.498	283872	0.0103	0.0233	2.2626	
100% เอทานอล	20.493	68898	0.0109	0.0107	0.9849	1.0444
100% เอทานอล	20.484	73565	0.0102	0.0110	1.0792	
100% เอทานอล	20.475	73625	0.0103	0.0110	1.0691	
Roasted coffee	20.452	125543	0.0105	0.0140	1.3378	1.3346
Roasted coffee	20.438	126492	0.0102	0.0141	1.3826	
Roasted coffee	20.431	122323	0.0108	0.0139	1.2832	

หมายเหตุ N.D. = ไม่สามารถตรวจพบได้

CGA = กรดคลอโรจีนิก

ตารางที่ 32: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างครั้งที่ 2

สารตัวอย่าง	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ	น้ำหนักสาร (g/ml)	ความเข้มข้น CGA (mg/ml)	ปริมาณ CGA (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณ CGA (mg/g extract)
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
50% เอทานอล	20.429	276782	0.0106	0.0229	2.1595	2.0565
50% เอทานอล	20.355	211262	0.0101	0.0191	1.8871	
50% เอทานอล	20.396	266506	0.0105	0.0223	2.1228	
100% เอทานอล	20.381	95836	0.0103	0.0123	1.1952	1.1084
100% เอทานอล	20.382	73008	0.0105	0.0110	1.0453	
100% เอทานอล	20.391	74535	0.0102	0.0111	1.0848	
Roasted coffee	20.410	138574	0.0108	0.0148	1.3712	1.3716
Roasted coffee	20.400	139415	0.0107	0.0149	1.3886	
Roasted coffee	20.401	135585	0.0108	0.0146	1.3550	

หมายเหตุ N.D. = ไม่สามารถตรวจพบได้

CGA = กรดคลอโรจีนิก

ตารางที่ 33: แสดงการวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิกในสารตัวอย่างครั้งที่ 3

สารตัวอย่าง	Retention time	พื้นที่ใต้กราฟ	น้ำหนักสาร (g/ml)	ความเข้มข้น CGA (mg/ml)	ปริมาณ CGA (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณ CGA (mg/g extract)
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
water	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
50% เอทานอล	20.440	212873	0.0109	0.0192	1.7572	1.8797
50% เอทานอล	20.444	206178	0.0101	0.0188	1.8576	
50% เอทานอล	20.461	248802	0.0105	0.0213	2.0242	
100% เอทานอล	20.477	77958	0.0102	0.0113	1.1044	1.0690
100% เอทานอล	20.489	79237	0.0103	0.0113	1.1009	
100% เอทานอล	20.501	65163	0.0105	0.0105	1.0016	
Roasted coffee	20.493	132440	0.0109	0.0145	1.3257	1.3717
Roasted coffee	20.475	133092	0.0104	0.0145	1.3931	
Roasted coffee	20.490	131248	0.0103	0.0144	1.3962	

หมายเหตุ N.D. = ไม่สามารถตรวจพบได้

CGA = กรดคลอโรจีนิก

ตาราง 34: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณกรดคลอโรจีนิกของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง

สารตัวอย่าง	ปริมาณกรด คลอโรจีนิก (mg/g extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณกรด คลอโรจีนิก (mg/g extract)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
Water (ครั้งที่ 1)	N.D.	N.D.	N.D.
Water (ครั้งที่ 2)	N.D.		
Water (ครั้งที่ 3)	N.D.		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	1.8166	1.92	0.12
50% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	2.0565		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	1.8797		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	1.0444	1.07	0.03
100% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	1.1084		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	1.0690		
Roasted coffee (ครั้งที่ 1)	1.3346	1.36	0.02
Roasted coffee (ครั้งที่ 2)	1.3716		
Roasted coffee (ครั้งที่ 3)	1.3717		

หมายเหตุ N.D. = ไม่สามารถตรวจพบได้

CGA = กรดคลอโรจีนิก

### ส่วนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟ

#### 3.1 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าโทรลอกซ์ และกรดคลอโรจีนิก

##### 3.1.1 การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน

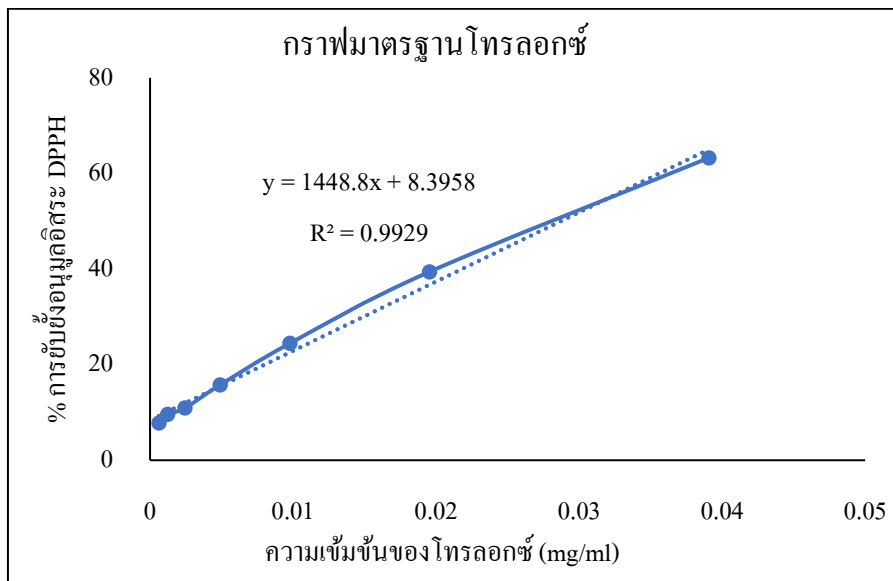
ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานโทรลอกซ์ อยู่ในหัวข้อที่ 3.4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน หลังจากนั้นทำกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ดังแสดงในตารางที่ 35 และรูปที่ 21

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระคือ

$$\% \text{ การยับยั้งอนุมูลอิสระ} = \frac{\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}}{\text{Abs.control}} \times 100$$

ตารางที่ 35: แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

โทรลอกซ์ (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm					ค่าเฉลี่ย Abs.	% การยับยั้ง อนุมูลอิสระ
	1	2	3	4	5		
Control	0.43	0.431	0.436	0.452	0.446	0.4390	-
2.5	0.06	0.064	0.06	0.064	0.069	0.0634	85.56
1.25	0.075	0.061	0.064	0.063	0.063	0.0652	85.15
0.625	0.063	0.065	0.064	0.064	0.066	0.0644	85.33
0.3125	0.068	0.071	0.066	0.069	0.068	0.0684	84.42
0.15625	0.067	0.068	0.069	0.066	0.07	0.0680	84.51
0.078125	0.07	0.069	0.067	0.067	0.077	0.0700	84.05
0.0390625	0.176	0.156	0.145	0.167	0.163	0.1614	63.23
0.01953125	0.274	0.268	0.268	0.261	0.259	0.2660	39.41
0.009765625	0.319	0.333	0.334	0.334	0.339	0.3318	24.42
0.004882813	0.373	0.367	0.372	0.364	0.374	0.3700	15.72
0.002441406	0.407	0.389	0.387	0.385	0.387	0.3910	10.93
0.001220703	0.393	0.407	0.401	0.393	0.391	0.3970	9.57
0.000610352	0.4	0.409	0.407	0.404	0.404	0.4048	7.79



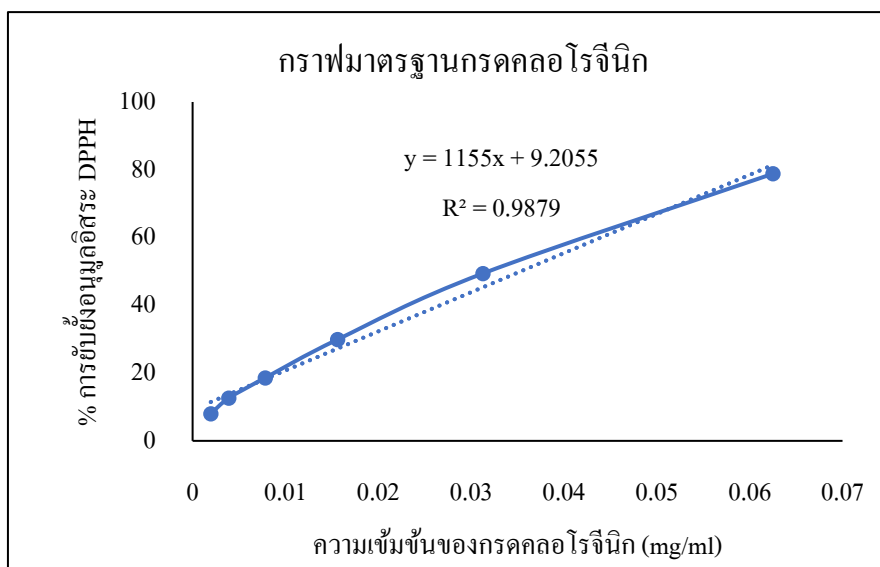
รูปที่ 21: กราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

### 3.1.2 การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดคลอโรจีนิกเป็นสารมาตรฐาน

ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก อยู่ในหัวข้อที่ 3.4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน หลังจากนั้นทำกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก ดังแสดงในตารางที่ 36 และรูปที่ 22

ตารางที่ 36: แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก

กรดคลอโรจีนิก (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm					ค่าเฉลี่ย Abs.	% การยับยั้งอนุมูลอิสระ
	1	2	3	4	5		
Control	0.382	0.426	0.433	0.429	0.433	0.4206	-
0.1250	0.0760	0.0770	0.0810	0.0800	0.0860	0.0800	81.78
0.0625	0.0980	0.0950	0.0980	0.0900	0.0840	0.0930	78.82
0.0313	0.2310	0.2180	0.2370	0.2070	0.2180	0.2222	49.38
0.0156	0.3120	0.3070	0.2990	0.3140	0.3060	0.3076	29.93
0.0078	0.3570	0.3590	0.3620	0.3570	0.3520	0.3574	18.59
0.0039	0.3660	0.3960	0.3920	0.3920	0.3720	0.3836	12.62
0.0020	0.3990	0.4060	0.3930	0.4090	0.4120	0.4038	8.02



รูปที่ 22: กราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก

### 3.1.3 การคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากกราฟมาตรฐาน โทรลอกซ์

จากรูปที่ 21 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โทรลอกซ์ สำหรับสารสกัดจากเห็ดห่มเมื่อดกกาแฟ และ เมื่อดกกาแฟคั่วสายพันธุ์ราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำที่ไม่ทราบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ดังแสดงในตารางที่ 37-39 และคำนวณผ่านสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นสารมาตรฐาน โทรลอกซ์เพื่อคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน โทรลอกซ์ หลังจากนั้นคำนวณความเข้มข้นย้อนกลับคือ คูณด้วยค่าอัตราส่วนเจือจาง (Dilution factor; DF) เท่ากับ 50 แล้วหารด้วยน้ำหนักสารตัวอย่างเริ่มต้นคือ 0.02 g เพื่อแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัม โทรลอกซ์ต่อ 1 กรัมสารสกัดแห้งดังแสดงในตารางที่ 40 สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน โทรลอกซ์:  $y = 1448.8x + 8.3958$

### 3.1.4 การคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากกราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก

จากรูปที่ 22 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก สำหรับสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟและเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำที่ไม่ทราบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ดังแสดงในตารางที่ 37-39 และคำนวณผ่านสมการเชิงเส้นของกราฟความเข้มข้นสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิกเพื่อคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นของต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก หลังจากนั้นคำนวณความเข้มข้นย้อนกลับคือ คูณด้วยค่าอัตราส่วนเจือจาง (Dilution factor; DF) เท่ากับ 50 แล้วหารด้วยน้ำหนักสารตัวอย่างเริ่มต้นคือ 0.02 g เพื่อแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมกรดคลอโรจีนิกต่อ 1 กรัมสารสกัดแห้งดังแสดงในตารางที่ 41

สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก:  $y = 1155x + 9.2055$

ตารางที่ 37: ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm ครั้งที่ 1

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm					ค่าเฉลี่ย Abs.	% การ ยับยั้ง	ค่าเฉลี่ย % การยับยั้ง
	1	2	3	4	5			
Control (H <sub>2</sub> O)	0.4370	0.4080	0.4250	0.4260	0.4340	0.4260		
Water	0.3340	0.3700	0.3520	0.3540	0.3420	0.3504	17.75	15.23
Water	0.3630	0.3590	0.3610	0.3660	0.3620	0.3622	14.98	
Water	0.3790	0.3720	0.3770	0.3620	0.3640	0.3708	12.96	
Control (50% เอทานอล)	0.4190	0.4160	0.4180	0.4260	0.4160	0.4190		
50% เอทานอล	0.3470	0.3370	0.3260	0.3350	0.3140	0.3318	20.81	22.32
50% เอทานอล	0.3280	0.3280	0.3170	0.3100	0.3170	0.3200	23.63	
50% เอทานอล	0.3310	0.3300	0.3130	0.3310	0.3180	0.3246	22.53	
Control (100%เอทานอล)	0.4140	0.3960	0.4220	0.4130	0.4140	0.4118		
100% เอทานอล	0.1940	0.1870	0.1670	0.1700	0.1720	0.1780	56.78	57.03
100% เอทานอล	0.1870	0.1760	0.1650	0.1700	0.1730	0.1742	57.70	
100% เอทานอล	0.1980	0.1820	0.1710	0.1590	0.1830	0.1786	56.63	
Roasted coffee	0.3610	0.3600	0.3640	0.3530	0.3570	0.3590	15.73	13.69
Roasted coffee	0.3740	0.3670	0.3780	0.3790	0.3630	0.3722	12.63	
Roasted coffee	0.3790	0.3730	0.3730	0.3710	0.3630	0.3718	12.72	

ตารางที่ 38: ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm ครั้งที่ 2

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm					ค่าเฉลี่ย Abs.	% การ ยับยั้ง	ค่าเฉลี่ย % การยับยั้ง
	1	2	3	4	5			
Control (H <sub>2</sub> O)	0.4310	0.4280	0.4210	0.4280	0.4220	0.4260		
Water	0.3610	0.3530	0.3540	0.3490	0.3450	0.3524	17.28	15.45
Water	0.3690	0.3670	0.3700	0.3560	0.3600	0.3644	14.46	
Water	0.3670	0.3610	0.3630	0.3640	0.3640	0.3638	14.60	
Control (50% เอทานอล)	0.4280	0.4210	0.4300	0.4290	0.4250	0.4266		
50% เอทานอล	0.3550	0.3300	0.3350	0.3310	0.3320	0.3366	21.10	21.57
50% เอทานอล	0.3370	0.3420	0.3380	0.3420	0.3380	0.3394	20.44	
50% เอทานอล	0.3330	0.3270	0.3270	0.3200	0.3320	0.3278	23.16	
Control (100%เอทานอล)	0.4190	0.4260	0.4100	0.4230	0.4150	0.4186		
100% เอทานอล	0.1970	0.2020	0.1890	0.1870	0.1880	0.1926	53.23	52.45
100% เอทานอล	0.2190	0.1860	0.1860	0.1840	0.1870	0.1924	53.28	
100% เอทานอล	0.2240	0.1960	0.1970	0.2050	0.1900	0.2024	50.85	
Roasted coffee	0.3620	0.3530	0.3590	0.3590	0.3420	0.3550	16.67	16.60
Roasted coffee	0.3510	0.3520	0.3610	0.3480	0.3510	0.3526	17.23	
Roasted coffee	0.3690	0.3570	0.3680	0.3510	0.3460	0.3582	15.92	



ตารางที่ 39: ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm ครั้งที่ 3

	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm					ค่าเฉลี่ย Abs.	% การ ยับยั้ง	ค่าเฉลี่ย % การยับยั้ง
	1	2	3	4	5			
Control (H <sub>2</sub> O)	0.4190	0.4180	0.4200	0.4180	0.4200	0.4190		
Water	0.3410	0.3660	0.3680	0.3810	0.3710	0.3654	14.23	14.71
Water	0.3650	0.3690	0.3710	0.3740	0.3630	0.3684	13.52	
Water	0.3650	0.3500	0.3550	0.3530	0.3580	0.3562	16.38	
Control (50% เอทานอล)	0.4320	0.4180	0.4230	0.4280	0.4260	0.4254		
50% เอทานอล	0.3440	0.3370	0.3400	0.3280	0.3340	0.3366	21.10	21.19
50% เอทานอล	0.3350	0.3330	0.3240	0.3260	0.3290	0.3294	22.78	
50% เอทานอล	0.3430	0.3450	0.3360	0.3410	0.3480	0.3426	19.69	
Control (100%เอทานอล)	0.4220	0.4330	0.4300	0.4390	0.4130	0.4274		
100% เอทานอล	0.1540	0.1610	0.1320	0.1350	0.1680	0.1500	63.57	64.71
100% เอทานอล	0.1520	0.1350	0.1350	0.1360	0.1400	0.1396	66.10	
100% เอทานอล	0.1570	0.1390	0.1470	0.1450	0.1440	0.1464	64.45	
Roasted coffee	0.3610	0.3390	0.3560	0.3600	0.3570	0.3546	16.76	15.95
Roasted coffee	0.3700	0.3700	0.3540	0.3620	0.3470	0.3606	15.35	
Roasted coffee	0.3690	0.3580	0.3590	0.3490	0.3600	0.3590	15.73	

ตารางที่ 40: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่า Trolox ของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง

สารตัวอย่าง	% การยับยั้ง	ความเข้มข้น Trolox (mg/ml)	ปริมาณสาร Trolox (mg TE/g สารสกัดแห้ง)	ปริมาณสาร Trolox (mg TE/g สารสกัดแห้ง)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Water (ครั้งที่ 1)	15.23	0.0047	11.7929	10.80	2.05
Water (ครั้งที่ 2)	15.45	0.0049	12.1725		
Water (ครั้งที่ 3)	13.29	0.0034	8.4453		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	22.32	0.0096	24.0271	22.82	1.17
50% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	21.57	0.0091	22.7330		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	20.97	0.0087	21.6976		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	57.03	0.0336	83.9215	86.90	11.31
100% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	53.23	0.0309	77.3644		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	66.00	0.0398	99.3998		
Roasted coffee (ครั้งที่ 1)	13.69	0.0037	9.1355	11.30	2.58
Roasted coffee (ครั้งที่ 2)	16.60	0.0057	14.1569		
Roasted coffee (ครั้งที่ 3)	14.54	0.0042	10.6022		

หมายเหตุ: TE = Trolox equivalent



ตารางที่ 41: แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากรดคลอโรจีนิกของสารตัวอย่างทั้ง 3 ครั้ง

สารตัวอย่าง	% การยับยั้ง	ความเข้มข้นกรดคลอโรจีนิก (mg/ml)	ปริมาณสารกรดคลอโรจีนิก (mg CGA/g สารสกัดแห้ง)	ปริมาณสารกรดคลอโรจีนิก (mg CGA/g สารสกัดแห้ง)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Water (ครั้งที่ 1)	15.23	0.0052	13.0400	11.80	2.57
Water (ครั้งที่ 2)	15.45	0.0054	13.5162		
Water (ครั้งที่ 3)	13.29	0.0035	8.8409		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	22.32	0.0114	28.3864	26.87	1.46
50% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	21.57	0.0107	26.7630		
50% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	20.97	0.0102	25.4643		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 1)	57.03	0.0414	103.5162	107.25	14.19
100% เอทานอล (ครั้งที่ 2)	53.23	0.0381	95.2911		
100% เอทานอล (ครั้งที่ 3)	66.00	0.0492	122.9318		
Roasted coffee (ครั้งที่ 1)	13.69	0.0039	9.7067	12.42	3.24
Roasted coffee (ครั้งที่ 2)	16.60	0.0064	16.0054		
Roasted coffee (ครั้งที่ 3)	14.54	0.0046	11.5465		

หมายเหตุ: CGA = กรดคลอโรจีนิก

### 3.2 การหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างในการยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงครึ่ง (IC<sub>50</sub>)

#### 3.2.1 การทำกราฟแสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง

ขั้นตอนการทดลอง อยู่ในหัวข้อที่ 3.4.2 การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ หลังจากนั้นทำกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระคือ

$$\% \text{ การยับยั้งอนุมูลอิสระ} = \frac{\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}}{\text{Abs.control}} \times 100$$

#### 3.2.2 การหาค่า IC<sub>50</sub> ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำแสดงด้วยตารางที่ 42 และรูปที่ 23

สมการเส้นตรงของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ:  $y = 18.698x + 9.9343$

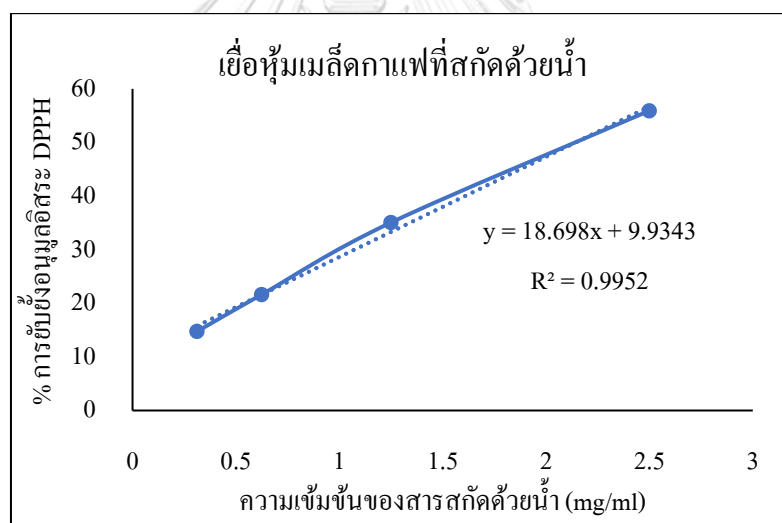
คำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% โดยการแทนค่า  $y = 50$  ในสมการเส้นตรงของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ (x) โดยที่ x แสดงความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่ง

$$50 = 18.698x + 9.9343$$

$$x = 2.15 \text{ mg/ml}$$

ตารางที่ 42: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	% การยับยั้งอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
5	71.4894	63.4043	70.0426	68.3121
2.5	58.9787	59.2553	49.5319	55.9220
1.25	37.7872	37.2766	30.1277	35.0638
0.625	23.5745	24.5106	16.8511	21.6454
0.3125	17.0213	17.4468	9.7872	14.7518
0.15625	9.7872	7.8298	3.8298	7.1489
0.078125	4.3404	4.0851	2.2128	3.5461



รูปที่ 23: กราฟ  $IC_{50}$  ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ

### 3.2.3 การหาค่า $IC_{50}$ ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอลแสดงด้วยตารางที่ 43 และรูปที่ 24

สมการเส้นตรงของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล:  $y = 39.912x + 8.8153$

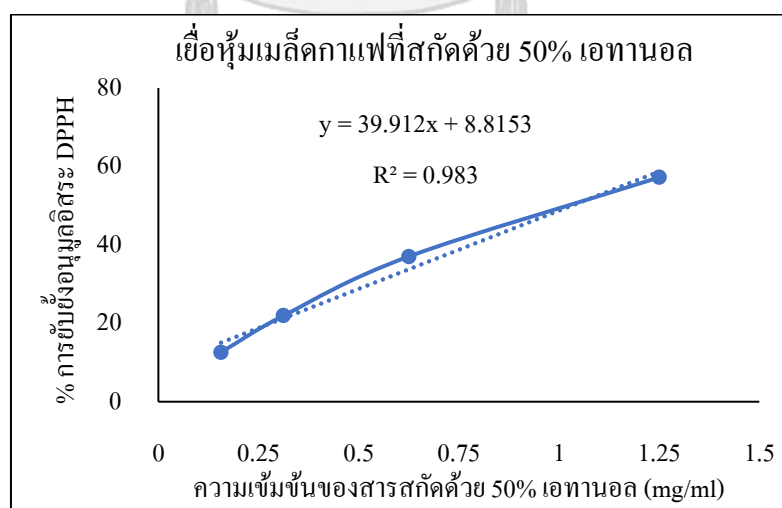
คำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% โดยการแทนค่า  $y = 50$  ในสมการเส้นตรงของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล (x) โดยที่ x แสดงความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอลที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่ง

$$50 = 39.912x + 8.8153$$

$$x = 1.03 \text{ mg/ml}$$

ตารางที่ 43: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	% การยับยั้งอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
5	57.8676	49.1831	64.1445	57.0651
2.5	71.2812	69.9914	69.0456	70.1060
1.25	56.4059	57.2657	57.9536	57.2084
0.625	36.2855	38.9510	35.8556	37.0307
0.3125	23.8177	22.6999	19.3465	21.9547
0.15625	13.4136	10.7481	13.6715	12.6111
0.078125	2.5795	9.2003	4.3852	5.3884



รูปที่ 24: กราฟ  $IC_{50}$  ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 50% เอทานอล

### 3.2.4 การหาค่า $IC_{50}$ ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอลแสดงด้วยตารางที่ 44 และรูปที่ 25

สมการเส้นตรงของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล:  $y = 164.62x + 3.8921$

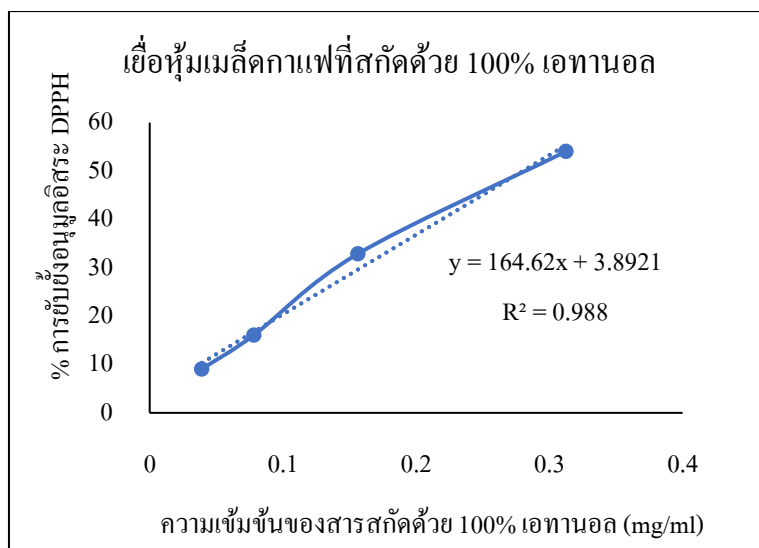
คำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% โดยการแทนค่า  $y = 50$  ในสมการเส้นตรงของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล (x) โดยที่ x แสดงความเข้มข้นของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่ง

$$50 = 164.62x + 3.8921$$

$$x = 0.28 \text{ mg/ml}$$

ตารางที่ 44: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	% การยับยั้งอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
2.5	78.9519	79.1237	79.4674	79.1810
1.25	79.3814	80.0687	79.7251	79.7251
0.625	74.1409	75.0000	74.0550	74.3986
0.3125	55.6701	52.9210	53.5223	54.0378
0.15625	31.5292	36.9416	30.1546	32.8751
0.078125	16.6667	16.3230	15.2062	16.0653
0.039063	7.6460	10.7388	8.7629	9.0493



รูปที่ 25: กราฟ IC<sub>50</sub> ของเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล

### 3.2.5 การหาค่า IC<sub>50</sub> ของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำแสดงด้วยตารางที่ 45 และรูปที่ 26

สมการเส้นตรงของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ:  $y = 25.131x + 5.5566$

คำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระให้ลดลงได้ 50% โดยการแทนค่า  $y = 50$  ในสมการเส้นตรงของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ เพื่อหาความเข้มข้นของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ (x) โดยที่ x แสดงความเข้มข้นของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่ง

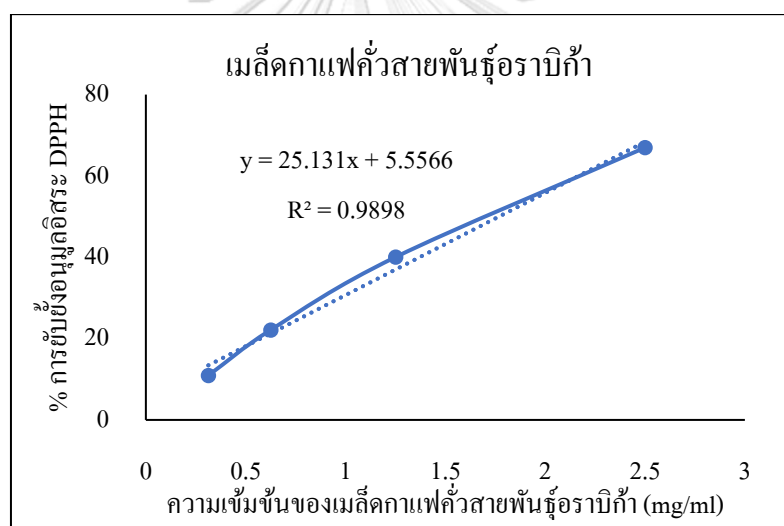
$$50 = 25.131x + 5.5566$$

$$x = 1.77 \text{ mg/ml}$$



ตารางที่ 45: แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	% การยับยั้งอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
10	73.1064	75.6596	74.3830	74.3830
5	75.7447	76.8511	75.3192	75.9716
2.5	64.3404	68.5957	67.9149	66.9504
1.25	36.6809	45.8723	37.5319	40.0284
0.625	21.1915	24.1702	21.0213	22.1277
0.3125	11.6596	10.4681	10.6383	10.9220
0.15625	3.8298	6.1277	3.2340	4.3972



รูปที่ 26: กราฟ  $IC_{50}$  ของเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าที่สกัดด้วยน้ำสกัดด้วยน้ำ

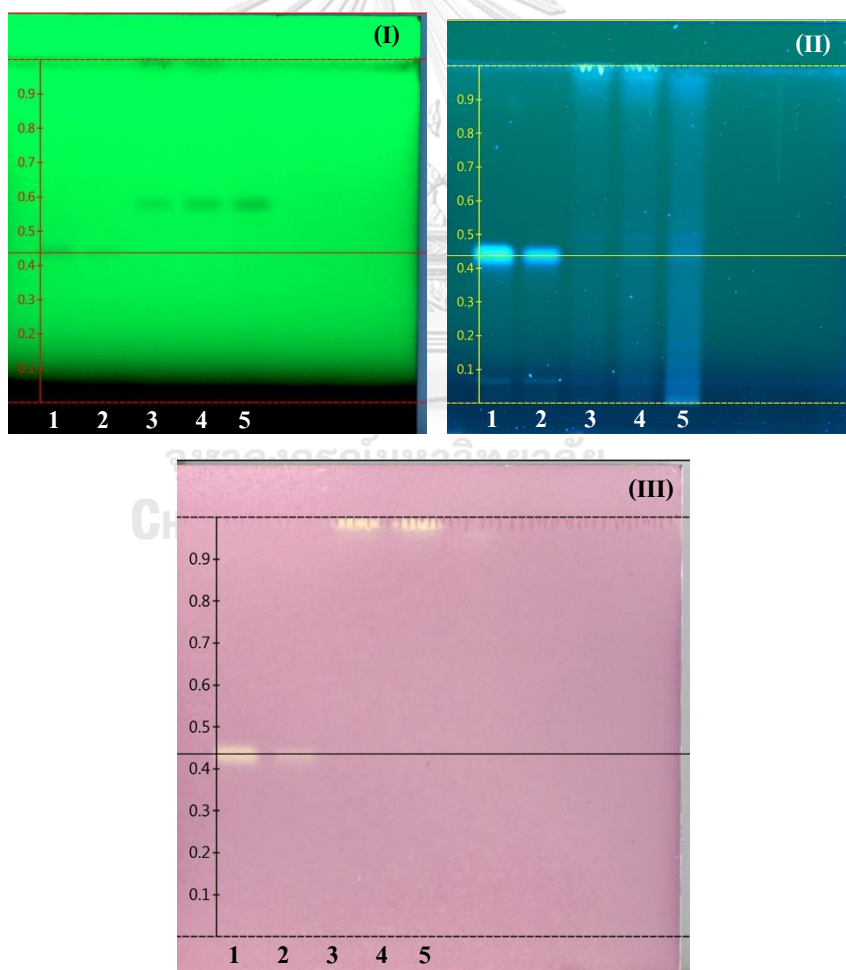
### 3.3 ผลการทดลองสภาวะในการแยกสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟบนแผ่น TLC

#### 3.3.1 ระบบตัวทำละลาย Ethyl acetate : Formic acid : Water (17:3:2)

เพื่อตรวจหากรดคลอโรจีนิกบนแผ่น TLC

ตารางที่ 46: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 27

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก	0.5 mg/ml
2	สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก	0.2 mg/ml
3	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	50 mg/ml
4	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	50 mg/ml
5	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	50 mg/ml



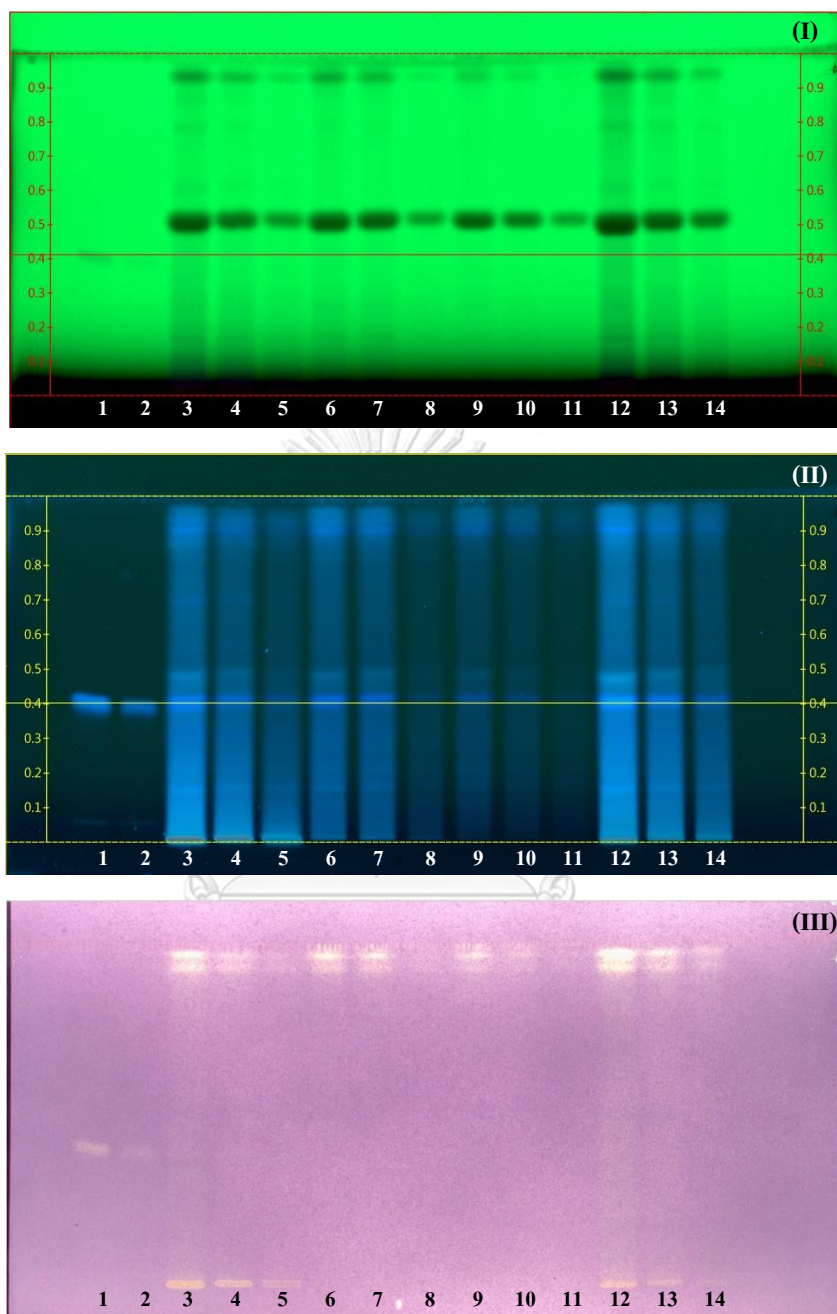
รูปที่ 27: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้ (I) UV 254 nm (II) UV 366 nm หลังทำการพ่นด้วย 0.2% DPPH (III) ภายใต้แสงขาว

## 3.3.2 ระบบตัวทำละลาย Ethyl acetate : Formic acid : Water (17:3:2)

เพื่อตรวจหากรดกลูโคโรจีนิกบนแผ่น TLC โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 47: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 28

Track	คำอธิบาย	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น
1	สารมาตรฐานกรดกลูโคโรจีนิก	เอทานอล	0.5 mg/ml
2	สารมาตรฐานกรดกลูโคโรจีนิก	เอทานอล	0.2 mg/ml
3	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	น้ำ	25 mg/ml
4	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	น้ำ	12.5 mg/ml
5	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	น้ำ	6.25 mg/ml
6	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	เมทานอล	25 mg/ml
7	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	เมทานอล	12.5 mg/ml
8	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	เมทานอล	6.25 mg/ml
9	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	เอทานอล	25 mg/ml
10	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	เอทานอล	12.5 mg/ml
11	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	เอทานอล	6.25 mg/ml
12	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	70% เมทานอล	25 mg/ml
13	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	70% เมทานอล	12.5 mg/ml
14	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	70% เมทานอล	6.25 mg/ml



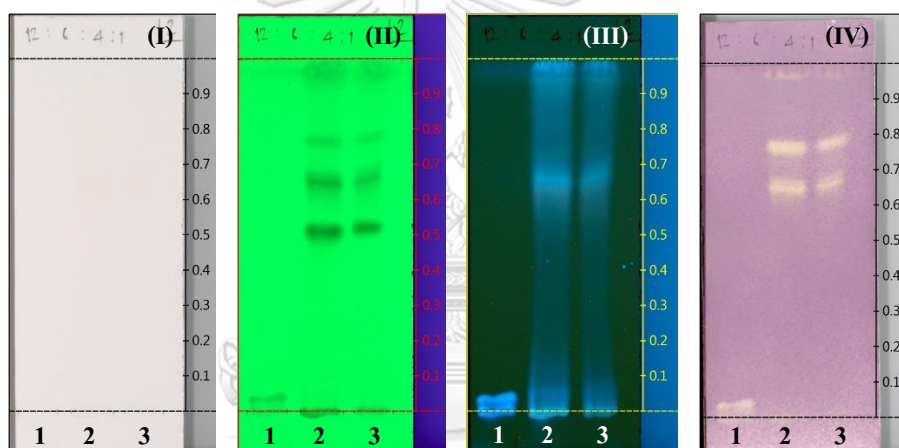
รูปที่ 28: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้ (I) UV 254 nm (II) UV 366 nm หลังทำการพ่นด้วย 0.2% DPPH (III) ภายใต้แสงขาว

### 3.3.3 ระบบตัวทำละลาย Chloroform : Ethyl acetate : Acetone : Formic acid (12:6:4:1)

เพื่อทำการดึงสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ลงมาบริเวณกึ่งกลางแผ่น TLC โดยการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย

ตารางที่ 48: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 29

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	สารมาตรฐานกรดคลอโรจีนิก	0.5 mg/ml
2	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	25 mg/ml
3	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	10 mg/ml



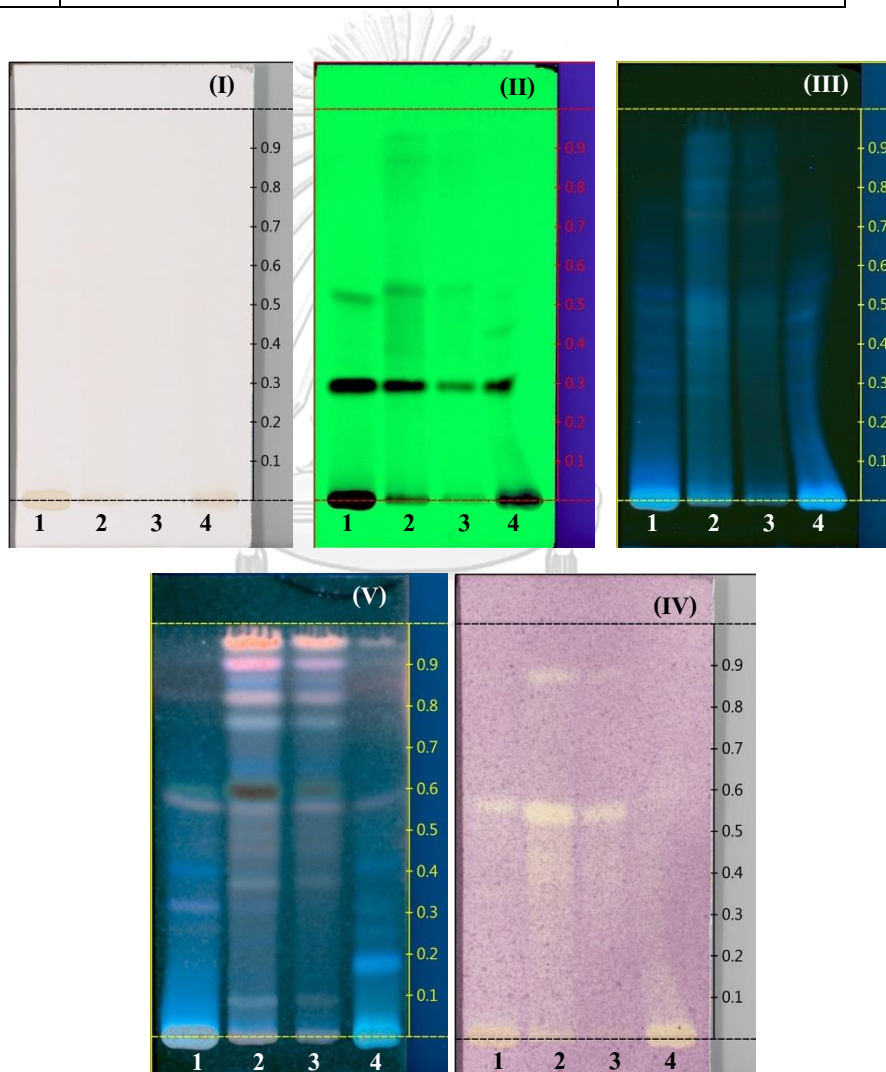
รูปที่ 29: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้ (I) แสงขาว (II) UV 254 nm (III) UV 366 nm (IV) ฟันด้วย 0.2% DPPH ภายใต้แสงขาว

3.3.4 ระบบตัวทำละลาย Chloroform : Ethyl acetate : Acetone : Formic acid (20:6:4:1)

เพื่อหาอัตลักษณ์ของสารสกัดจากเชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟบนแผ่น TLC

ตารางที่ 49: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 30

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	25 mg/ml
2	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	25 mg/ml
3	เชื้อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	10 mg/ml
4	เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าสกัดด้วยน้ำ	25 mg/ml



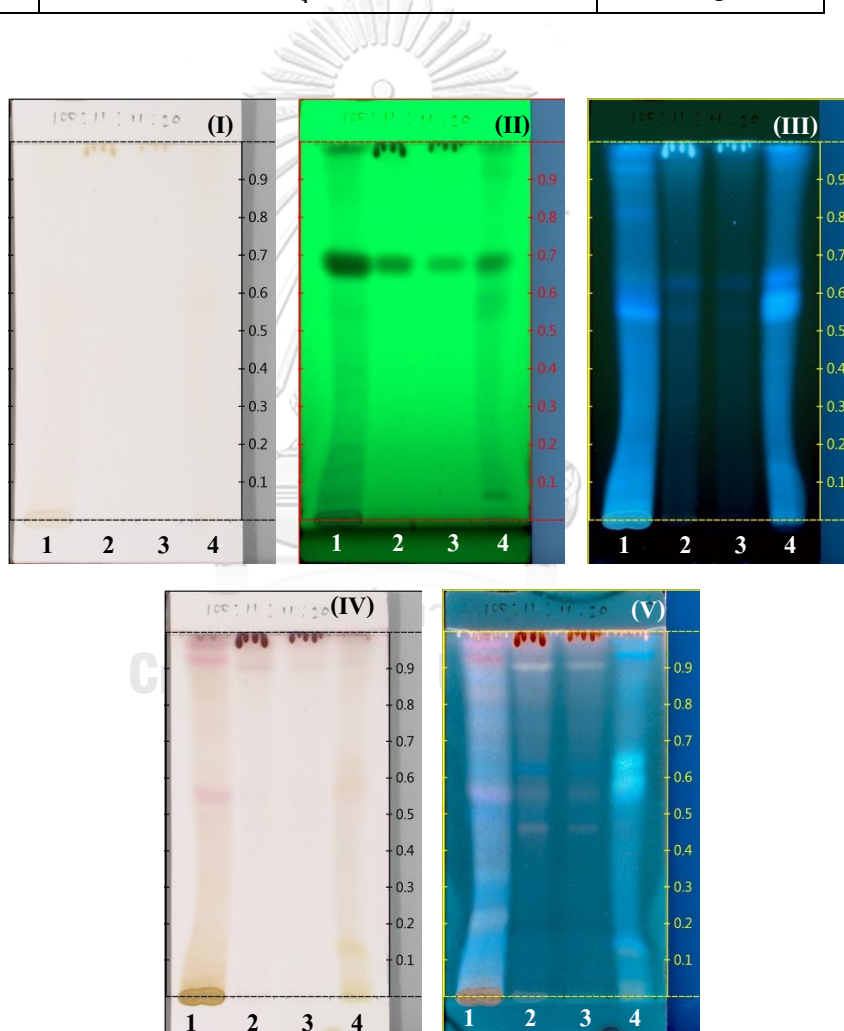
รูปที่ 30: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้ (I) แสงขาว (II) UV 254 nm (III) UV 366 nm หลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้ (IV) UV 366 nm และ หลังทำการพ่นด้วย 0.2% DPPH (V) ภายใต้แสงขาว

3.3.4 ระบบตัวทำละลาย Ethyl acetate : Acetic acid : Formic acid : Water (100:11:11:20)

เพื่อตรวจสอบหาสารกลุ่ม Flavonoid glycosides

ตารางที่ 50: แสดงตำแหน่งของสารตัวอย่างบนแผ่น TLC ในรูปที่ 31

Track	คำอธิบาย	ความเข้มข้น
1	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วยน้ำ	25 mg/ml
2	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	25 mg/ml
3	เยื่อหุ้มเมล็ดกาแฟที่สกัดด้วย 100% เอทานอล	10 mg/ml
4	เมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อราบิก้าสกัดด้วยน้ำ	25 mg/ml



รูปที่ 31: ภาพโครมาโตแกรมของแผ่น TLC ภายใต้อินฟราเรด (I) แสงขาว (II) UV 254 nm (III) UV 366 nm และหลังทำการพ่นด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid ภายใต้อินฟราเรด (IV) แสงขาว และ (V) UV 366 nm

### บรรณานุกรม

1. Organization IC. World coffee consumption. 2020 January.
2. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Costa E, Costa CSG, Nunes MA, et al. Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chem.* 2018;267:28-35.
3. Rodrigues F, Nunes MA, Alves RC, Oliveira MBPP. Chapter 7 - Applications of recovered bioactive compounds in cosmetics and other products. In: Galanakis CM, editor. *Handbook of Coffee Processing By-Products: Academic Press; 2017.* p. 195-220.
4. de la Cruz S, Iriondo-DeHond A, Herrera T, Lopez-Tofiño Y, Galvez-Robleño C, Prodanov M, et al. An assessment of the bioactivity of coffee silverskin melanoidins. *Foods.* 2019;8:68.
5. Iriondo-DeHond A, Fernandez-Gomez B, Martinez-Saez N, Martirosyan D, Mesa M, Castillo M. Coffee silverskin: a low-cost substrate for bioproduction of high-value health promoting products. *Ann Nutr Food Sci.* 2017.
6. Narita Y, Inouye K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Res Int.* 2014;61:16-22.
7. Indranupakorn R. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรร. Bangkok: CU book; 2550. 251 p.
8. Indranupakorn R. พื้นฐานการสกัดในอุตสาหกรรม. Chiang Mai 2556. 249 p.
9. Berk Z. *Food process engineering and technology 2009.*
10. Phunsawan B. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *TJST.* 2556;3:275-86.
11. Wang Y, Miao X, Sun J, Cai L. Chapter 6 - Oxidative stress in diabetes: molecular basis for diet supplementation. *Molecular Nutrition and Diabetes.* San Diego: Academic Press; 2016. p. 65-72.
12. Bessada SMF, Alves R, Oliveira M. Coffee Silverskin: a review on potential cosmetic applications. *Cosmetics.* 2018;5.
13. Clifford M, Zheng W, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC-MSn. *Phytochem analysis.* 2006;17:384-93.
14. Gallina Toschi T, Cardenia V, Bonaga G, Mandrioli M, Rodriguez-Estrada M. Coffee



- silverskin: characterization, possible uses, and safety aspects. *J Agr Food Chem.* 2014;62.
15. Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of northeast portugual honey. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(12):3774-9.
  16. Furusawa M, Narita Y, Iwai K, Fukunaga T, Nakagiri O. Inhibitory effect of a hot water extract of coffee “silverskin” on hyaluronidase. *Biosci Biotech Bioch.* 2011;75:1205-7.
  17. Rodrigues F, Pereira C, Pimentel F, Alves R, Ferreira M, Sarmento B, et al. Are coffee silverskin extracts safe for topical use? An in vitro and in vivo approach. *Ind Crops Prod.* 2015;63:167-74.
  18. Rodrigues F, Palmeira-de-Oliveira A, das Neves J, Sarmento B, Amaral MH, Oliveira MBPP. Coffee silverskin: a possible valuable cosmetic ingredient. *Pharm Biol.* 2015;53(3):386-94.
  19. Cämmerer B, Jalyschkov V, Kroh LW. Carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Int Congr Ser.* 2002;1245:269-73.
  20. Moreira A, Nunes FM, Domingues MR, Coimbra M. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food Funct.* 2012;3:903-15.
  21. Ho C-T. Phenolic compounds in food. *Phenolic compounds in food and their effects on health ACS Symposium Series.* 506: American Chemical Society; 1992. p. 2-7.
  22. Santiago M, Strobel S. Thin layer chromatography. *Methods Enzymol.* 2013;533:303-24.
  23. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
  24. Choma I, Grzelak E. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J Chromatogr A.* 2010;1218:2684-91.
  25. Akin M, Saki N. Antimicrobial, DPPH scavenging and tyrosinase inhibitory activities of *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium* and *Rosa damascena* mill. ethanol extracts by using TLC bioautography and chemical screening methods. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2019.
  26. Mohammed M, Al-Bayati F. Isolation, identification and purification of caffeine from *Coffea arabica* L. and *Camellia sinensis* L.: a combination antibacterial study. *Int J Green Pharm.* 2009;3.
  27. Rahalison L, Hamburger M, Ka H, Monod M, Frenk EA. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem analysis.*

1991;2:199-203.

28. Sharif SN, Kitaz A, Al-kayali R. TLC screening and evaluation of antioxidant, antibacterial activity of *Onopordon macrocephalum* by bioautography method. Iran J Pharm. 2016;12(2):1-8.

29. Jesionek W, Choma I, Majer-Dziedzic B, Irena M. Screening bacterial and radical scavenging properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2014;37.

30. Dewanjee S, Gangopadhyay M, Bhattacharya N, Khanra R, Dua TK. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. J Pharm Anal. 2015;5(2):75-84.

31. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Barreira SVP, Nunes MA, Cunha LM, et al. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. Ind Crops Prod. 2014;53:350-7.

32. Ilyia Arina MZ, Harisun Y. Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani). ISBAB. 2019;19:101104.

33. Choma I, Olszowy M, Studziński M, Gnat S. Determination of chlorogenic acid, polyphenols and antioxidants in green coffee by thin-layer chromatography, effect-directed analysis and dot blot - comparison to HPLC and spectrophotometry methods. J Sep Sci. 2019.

34. Jesionek W, Majer-Dziedzic B, Choma I. Separation, identification, and investigation of antioxidant ability of plant extract components using TLC, LC-MS, and TLC-DPPH•. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2015;38.

35. Xue M, Shi H, Zhang J, Liu Q-Q, Guan J, Zhang J-Y, et al. Stability and degradation of caffeoylquinic acids under different storage conditions studied by high-performance liquid chromatography with photo diode array detection and high-performance liquid chromatography with electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. Molecules. 2016;21:948.

36. Navarra G, Moschetti M, Guarrasi V, Mangione M, Militello V, Leone M. Simultaneous determination of caffeine and chlorogenic acids in green coffee by uv/vis spectroscopy. J Chem. 2017;2017:1-8.

37. Ballesteros L, Teixeira J, Mussatto S. Selection of the solvent and extraction conditions for maximum recovery of antioxidant phenolic compounds from coffee silverskin. Food and Bioprocess Technology. 2014;7.

38. Narita Y, Inouye K. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry*. 2012;135(3):943-9.
39. Affonso RCL, Voytena APL, Fanan S, Pitz H, Coelho DS, Horstmann AL, et al. Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1923754.
40. Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, Tsitsimpikou C, Spandidos DA, Tsatsakis AM, et al. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Mol Med Rep*. 2015;12(5):7293-302.
41. Gerlach A, Gadea A, Silveira RMB, Clerc P, Dévéhat FL-L, editors. The Use of Anisaldehyde Sulfuric Acid as an Alternative Spray Reagent in TLC Analysis Reveals Three Classes of Compounds in the Genus *Usnea* Adans. (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota) 2018.
42. Kustrin S, Kustrin E, Gegechkori V, Morton D. High-Performance Thin-Layer Chromatography Hyphenated with Microchemical and Biochemical Derivatizations in Bioactivity Profiling of Marine Species. *Marine Drugs*. 2019;17:148.
43. Murthy PS, Naidu MM. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(3):897-903.
44. Hangun-Balkir Y, McKenney ML. Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2012;5(2):147-53.
45. Oikeh E, Oriakhi K, Omoregie E. Phenolic Content and in vitro Antioxidant Activities of Sweet Orange (*Citrus sinensis* L.) Fruit Wastes. *Archives of Basic and Applied Medicine*. 2014;2:119-26.
46. Bekedam E, Schols HA, Boekel M, Smit G. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54:7658-66.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายชินันต์ สิริวุฒิพันธ์
วัน เดือน ปี เกิด	12 ธันวาคม 2538
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY