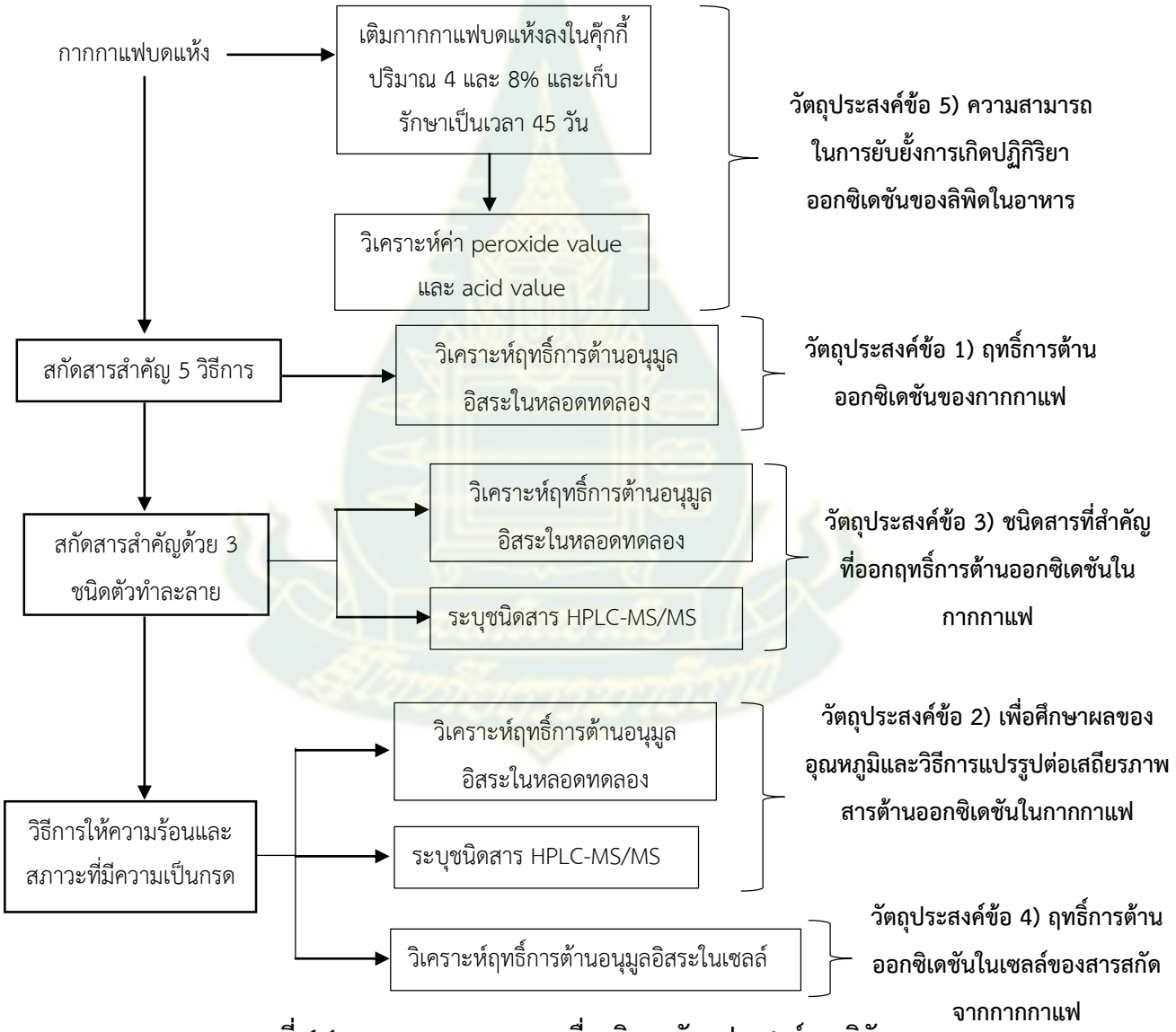
บทที่ 4
ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษา 1) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ 2) เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ 3) ชนิดสารที่สำคัญที่ออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ 4) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟ และ 5) ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในอาหาร ดังนั้นจึงได้ออกแบบการทดลองเพื่ออธิบายผลให้ตรงตามวัตถุประสงค์ สรุปงานวิจัยได้ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การออกแบบทดลองเพื่ออธิบายวัตถุประสงค์งานวิจัย

การวิจัยได้เริ่มจากการสกัดสารประกอบฟีนอลลิกด้วยวิธีการต่างๆ จำนวน 5 วิธีการ จากนั้นจึงนำสารที่สกัดได้ตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง เพื่ออธิบายวัตถุประสงค์ข้อ 1) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ

จากผลการทดลองสามารถระบุวิธีการที่เหมาะสมต่อการสกัดสารจากกากกาแฟ แต่ด้วยวิธีการใช้ระยะเวลาที่ยาวนาน (12 ชั่วโมง) ประกอบกับผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดสารสกัดอาจมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน จึงได้ทดสอบสารสกัดจำนวน 3 ชนิด และนำสารสกัดที่ได้ตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง พร้อมกับระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีการ high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) เพื่ออธิบายวัตถุประสงค์ข้อ 3) ชนิดสารที่สำคัญที่ออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

จากนั้นได้นำสารสกัดที่ได้จากสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ทดสอบวิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองและระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีการ HPLC-MS/MS เพื่ออธิบายวัตถุประสงค์ข้อ 2) เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ และได้นำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ HepG2 เพื่ออธิบายวัตถุประสงค์ข้อ 4) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟ

สุดท้ายงานวิจัยได้นำกากกาแฟบดแห้งเติมลงในคุ๊กกี้ พร้อมเก็บรักษาคุ๊กกี้ในสภาวะเร่งกระบวนการออกซิเดชันของลิพิด คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน นำตัวอย่างที่ได้ตรวจวัดค่า peroxide value และ acid value เพื่ออธิบายวัตถุประสงค์ข้อ 5) ความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในอาหาร ผลการวิจัยมีรายละเอียด ดังนี้

4.1 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของกากกาแฟบดแห้ง

กากกาแฟบดอบแห้งมีปริมาณใยอาหารทั้งหมดสูงที่สุด (72.60 %dm) โดยส่วนใหญ่เป็นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (67.56 %dm) และใยอาหารที่ละลายน้ำพบเป็นส่วนน้อย (4.93 %dm) แสดงให้เห็นว่ากากกาแฟบดอบแห้งเป็นแหล่งของใยอาหาร เมื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลพบว่าไม่พบในระดับที่ตรวจวัดได้ นอกจากนี้กากกาแฟบดอบแห้งยังพบโปรตีนและไขมันทั้งหมดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 13.60 และ 14.49 %dm ตามลำดับ จึงมีรายงานการศึกษาวิจัยที่พยายามสกัดไขมันจากกากกาแฟมาใช้ประโยชน์ ปริมาณแร่ธาตุหรือค่าเถ้า คือ 1.40 %dm และพบปริมาณคาเฟอีนหลงเหลือในกากกาแฟปริมาณ 0.16 %dm (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของกากกาแฟบดแห้ง

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง (%dry matter : %dm)
วอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w)	0.21±0.01
ไนโตรเจนทั้งหมด	2.18±0.02
โปรตีนทั้งหมด	13.60±0.12
ไขมันทั้งหมด	14.49±0.19
เส้นใยอาหาร	
เส้นใยอาหารทั้งหมด	72.50±1.25
เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ	4.93±2.05
เส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ	67.56±3.31
น้ำตาลทั้งหมด	n.d.
กลูโคส	n.d.
ฟรุกโทส	n.d.
ซูโครส	n.d.
มอลโทส	n.d.
แลกโทส	n.d.
เถ้า	1.40
คาแฟอีน	0.16±0.00

n.d., ตรวจไม่พบ

4.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟ

การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของกากกาแฟในงานวิจัยนี้ได้เลือกสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันออกจากกากกาแฟอบบดแห้งให้อยู่ในรูปสารสกัดหรือสารละลาย แต่เนื่องจากมีรายงานวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟที่หลากหลาย งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดต่างๆ ที่รายงานในงานวิจัยที่มีก่อนหน้าเพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด วิเคราะห์ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตร แสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4.2 พบว่าการสกัดด้วยสารละลายเอทานอล (20%) ร่วมกับการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟให้ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดต่ำที่สุดทั้งการเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและกรดคลอโรจีนิก ($p<0.05$) เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ความเข้มข้นสูง (เอทานอลและเมทานอล) มีแนวโน้มเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดที่

สูงกว่าการสกัดสารด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยพบว่าสารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% สกัดนาน 12 ชั่วโมงพบปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดสูงที่สุด ($p<0.05$) และการใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดมีแนวโน้มเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารเช่นกันโดยพิจารณาจากสารละลายเมทานอล (60%) ที่ 60 องศาเซลเซียสพบปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลายเอทานอล (60%) ที่ 35 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) และการสกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ 100 องศาเซลเซียสได้ผลกว่าการใช้ไมโครเวฟในสารละลายเอทานอล ($p<0.05$)

ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดที่สกัดออกมาได้ (ตารางที่ 4.2) โดยเมื่อปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดสูงจะตรวจพบค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน โดยสารสกัดจากกากกาแฟพบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ABTS, DPPH, FRAP และ metal chelating ability แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกากกาแฟมีความสามารถจับกับอนุมูลอิสระโดยสามารถจับกับ $DPPH^{\bullet}$ และ ABTS cation radical ได้ มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยมีความสามารถรีดิวซ์เฟอร์ริก และสามารถจับกับโลหะได้ ซึ่งเป็นสารเร่งการเกิดออกซิเดชันผ่านปฏิกิริยาเฟนทอน (Fenton reaction) ได้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าสารที่มีความสามารถจับกับโลหะจะถูกสกัดได้จากสารที่มีความชอบน้ำสูง (hydrophilic) เนื่องจากตรวจพบความสามารถดังกล่าวในการสกัดด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและสารละลายเอทานอล (20%) ($p<0.05$) ดังนั้นผลการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกากกาแฟมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant) และทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแล้ว (scavenging antioxidant) ได้

นอกจากนี้เป็นข้อสังเกตจากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่มีสีน้ำตาลเข้มกว่าจะพบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่า งานวิจัยจึงได้ตรวจวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 และ 420 นาโนเมตรซึ่งสะท้อนปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกและเมลานอยดิน (melanoidin) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพบสารประกอบเมลานอยดินในปริมาณที่น้อยกว่าสารประกอบฟีนอลลิก (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารประกอบฟีนอลลิกเป็นสารประกอบหลักที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากกากกาแฟ

ด้วยวิธีการสารสกัดชนิดต่างๆ ที่แสดงดังตารางที่ 4.2 สามารถระบุวิธีการที่ดีที่สุดในการสกัดสารจากกากกาแฟได้ แต่ผลการทดลองไม่สามารถสรุปความสามารถของตัวทำละลายแต่ละชนิด (น้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอล และสารละลายเมทานอล) ในการสกัดได้ เนื่องจากอัตราส่วนกากแฟต่อสารสกัด ความเข้มข้น และอุณหภูมิมีความแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบผลการสกัดสารจากกากกาแฟด้วยสารสกัดทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอล (70%) และสารละลายเมทานอล (70%) ณ สภาวะการสกัดที่เหมือนกัน (ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที) พบว่าน้ำกลั่นปราศจากไอออนมีประสิทธิภาพการสกัดต่ำที่สุด ($p<0.05$) ในขณะที่เอทานอลและเมทานอลสามารถสกัดปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดได้ใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าทั้งเอทานอลและเมทานอลมีความสามารถในการสกัดสารฟีนอลลิกได้ไม่แตกต่างกัน แสดงผลดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมดสอดคล้องกับค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ทั้งสารละลายเอทานอลและสารละลายเมทานอลสามารถสกัดสารจากกากกาแฟที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และสูงกว่าตัวอย่างจากน้ำกลั่นปราศจากไอออน ($p<0.05$) ในการสกัดสารด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนจะพบความสามารถจับกับโลหะที่สูงกว่าการใช้เอทานอลและเมทานอล ($p<0.05$) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลของวิธีการสกัดสารจากกากกาแฟบดแห้งด้วยวิธีการต่างๆ ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

วิธีการสกัด		ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ (mg/g dm)		ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน				ค่าดูดกลืนแสงทั้งหมด (unit/g dm)	
สภาวะ	วิธีการดัดแปลงจาก [1]	กรดแกลลิก	กรดคลอโรจีนิก	ABTS (μmol Trolox/g dm)	DPPH (μmol Trolox/g dm)	FRAP (μmol Fe(II)/g dm)	Metal chelating ability (μmol EDTA/g dm)	A280	A420
1. น้ำกลั่นปราศจากไอออน ต้มที่ 100°C, 10 min (1 : 20)	Martinez-Saez et al. (2017)	38.2±2.6 ^{d}	15.2±0.6^{d}	4.17±0.24^{d}	27.90±1.68^{b,c}	139.00±4.58^{d}	7.45±0.09^{a}	480±14^{d}	50±3^{d}
2. สารละลายเอทานอลเข้มข้น 20%, Microwave 300W, 45s (1 : 6)	Ranic et al. (2014)	27.6±1.7^{e}	11.6±0.5^{e}	3.34±0.41^{d}	19.22±7.41^{c}	105.28±6.75^{e}	0.10±0.08^{b}	343±4.6^{e}	39±4.1^{e}
3. สารละลายเอทานอลเข้มข้น 60% ให้ความร้อนที่ 35°C, 180 รอบต่อนาที, 30min (1 : 10)	Belviso et al. (2014)	54.1±1.0^{c}	22.7±0.3^{c}	6.42±0.87^{c}	39.57±15.05^{b}	194.70±8.45^{c}	n.d.	584±67^{c}	85±3^{c}
4. สารละลายเมทานอลเข้มข้น 60% ให้ความร้อนที่ 60°C, 180 รอบต่อนาที, 90min (1 : 40)	Mussatto et al.(2011)	72.1±1.5^{b}	27.0±1.8^{b}	8.70±0.31^{b}	61.77±4.12^{a}	240.42±4.83^{b}	n.d.	881±50^{b}	113±1^{b}
5. สารละลายเมทานอลเข้มข้น 70% ให้ความร้อนที่ 35°C, 180 รอบต่อนาที, 12h (1 : 50)	Moon et al. (2009)	93.4±5.4^{a}	38.5±1.3^{a}	11.82±2.65^{a}	71.24±2.29^{a}	268.94±1.45^{a}	n.d.	1028±45^{a}	134±2^{a}

[1] เปรียบเทียบวิธีการดั้งเดิมกับวิธีดัดแปลงแสดงดังภาคผนวก

n.d., ตรวจไม่พบ

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีอักษรยกขึ้น ($^{a, b, c, ..}$) และมีอักษรแตกต่างกันในแนวสดมภ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้ (mg/g dm)		ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน				ค่าดูดกลืนแสงทั้งหมด (unit/g dm)	
	กรดแกลลิก	กรดคลอโรจีนิก	ABTS (μmol Trolox/g dm)	DPPH (μmol Trolox/g dm)	FRAP (μmol Fe(II)/g dm)	Metal chelating ability (μmol EDTA/g dm)	A280	A420
น้ำกลั่นปราศจากไอออน	39.4±3.1[b]	14.7±1.0[b]	6.13±0.28[b]	29.30±3.56[b]	199.62±14.05[b]	11.23±0.45[a]	725±47[b]	151±28[a,b]
สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70%	67.4±3.3[a]	24.6±1.9[a]	11.08±0.24[a]	55.59±5.24[a]	296.24±22.51[a]	1.11±0.86[b]	1183±222[a]	196±18[a]
สารละลายเมทานอลเข้มข้น 70%	68.3±4.9[a]	24.4±1.2[a]	10.95±0.95[a]	52.11±3.48[a]	302.39±38.23[a]	0.68±0.34[b]	849±43[b]	115±30[b]

n.d., ตรวจไม่พบ

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีอักษรยกขึ้น ([a, b, c, ..]) และมีอักษรแตกต่างกันในแนวสดมภ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

4.3 การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญ และการศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

4.3.1 การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญ ตารางที่ 4.4 การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญของสารสกัดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที พบว่าเมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากน้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอล (70%) และสารละลายเมทานอล (70%) พบว่าสารกลุ่ม monocaffeoylquinic acid ประกอบด้วย 3-caffeoylqunic acid (3-CQA), 4-caffeoylqunic acid (4-CQA) และ 5-caffeoylqunic acid (5-CQA) เป็นชนิดสารที่พบมากที่สุด โดยพบปริมาณในช่วง 10-31, 5-15, และ 6-16 mg/g gallic acid equivalent ตามลำดับ ขณะที่สารอื่นๆ ได้แก่ dicaffeoylquinic acid (3, 4-dicaffeoylqunic acid , 3, 4-diCQA; 3,5-dicaffeoylqunic acid : 3, 5-diCQA; 4,5-dicaffeoylqunic acid : 4, 5-diCQA), 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid และ p-coumaric acid พบปริมาณเล็กน้อย และไม่พบสาร sinapic acid และ ferulic acid ในทุกตัวอย่างที่สกัดจากน้ำกลั่นปราศจากไอออน สารละลายเอทานอล และสารละลายเมทานอล (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญของสารสกัดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที

สารสกัด	mg/g gallic acid equivalent						μg/g gallic acid equivalent				
	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA	4-hydroxybenzoic acid	caffeic acid	p-coumaric acid	sinapic acid	ferulic acid
น้ำกลั่น	10.88	30.81	27.04	6.58	2.41	4.54	89.32	814.70	64.63	n.d.	n.d.
ปราศจากไอออน											
สารละลายเอทานอลเข้มข้น 60%	5.52	14.72	11.52	4.32	1.75	3.31	47.49	472.13	36.72	n.d.	n.d.
สารละลายเมทานอลเข้มข้น 70%	6.13	15.92	12.64	4.48	1.78	3.49	45.64	532.08±	48.59	n.d.	n.d.

n.d., ตรวจไม่พบ

4.3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและวิธีการแปรรูปต่อเสถียรภาพสารต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

ผลของอุณหภูมิหรือวิธีการให้ความร้อนแบบต่างๆ (อบลมร้อน นึ่ง ต้ม ไมโครเวฟ และหม้อนึ่งแรงดันสูง) และสภาวะที่มีความเป็นกรด (pH 4.0) ต่อเสถียรภาพของสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากกากกาแฟด้วยวิธีการใช้สารละลายเอทานอล แสดงดังตารางที่ตารางที่ 4.5 พบว่าการอบลมร้อนและไมโครเวฟมีผลต่อเสถียรภาพของสารประกอบฟีนอลเพียงเล็กน้อย ($p>0.05$) ขณะที่การนึ่งและการต้มให้ผลใกล้เคียงกันโดยพบปริมาณสารประกอบฟีนอลคงเหลือประมาณร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ส่วนการใช้หม้อนึ่งแรงดันสูงและสภาวะที่มีความเป็นกรด (pH 4.0) มีผลลดปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลที่สกัดจากกากกาแฟมีความเสถียรต่ออุณหภูมิการปรุงอาหารในรูปแบบต่างๆ โดยการใช้หม้อนึ่งแรงดันสูงเป็นรูปแบบการให้ความร้อนที่มีผลต่อการลดปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด ($p<0.05$)

ผลของวิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรด (pH 4.0) ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ แสดงดังตารางที่ตารางที่ 4.5 พบว่าให้ผลสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลคงเหลือโดยสารสกัดจากกากกาแฟคงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้งค่า ABTS DPPH FRAB และ metal chelating ability ในปริมาณสูงมากกว่าร้อยละ 70 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าหม้อนึ่งแรงดันสูงและสภาวะที่มีความเป็นกรดมีผลต่อการลดลงของค่า metal chelating ability มากที่สุด ($p<0.05$)

เมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากสารละลายเอทานอลที่ผ่านการให้ความร้อนแบบอบลมร้อนและหม้อนึ่งแรงดันสูง แสดงดังตารางที่ตารางที่ 4.6 พบว่าตัวอย่างสารสกัดที่ผ่านการอบลมร้อนมีค่า caffeic acid ลดลงมากที่สุด แต่สารอื่นบางชนิด เช่น 3-CQA และ 4-hydroxybenzoic acid เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนตัวอย่างสารสกัดที่ผ่านหม้อนึ่งแรงดันสูงมีค่า 5-CQA และ caffeic acid เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนแบบอบลมร้อนและหม้อนึ่งแรงดันสูงมีผลต่อชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟ

ตารางที่ 4.5 ผลของวิธีการให้ความร้อนและสภาวะที่มีความเป็นกรดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

ตัวอย่าง	สารประกอบฟีนอลลิกที่สกัดได้				ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน							
	กรดแกลลิก		กรดคลอโรจีนิก		ABTS		DPPH		FRAP		Metal chelating ability	
	mg/g	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)	mg/g	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)	μmol Trolox/g	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)	μmol Trolox/g	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)	μmol Fe(II)/g	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)	μmol EDTA/g	ปริมาณสัมพัทธ์ (%)
ตัวอย่างควบคุม	573.3±18.8^{a}	100	300.4±22.4^{a}	100	94.05±4.9^{a,b}	100	235.73±57.1^{a}	100	987.72±68.2^{a}	100	603.88±13.9^{a}	100
การอบลมร้อน (hot air oven)	545.1±31.7^{a,b}	95	283.4±17.7^{a,b}	94	83.74±3.7^{b}	89	177.26±68.1^{a,b}	75	823.94±61.7^{b,c}	83	626.99±31.8^{a}	104
การนึ่ง (steam)	490.7±12.2^{c}	86	261.7±8.3^{b}	87	88.11±7.9^{a,b}	94	184.01±35.2^{a,b}	78	889.87±66.8^{a,b}	90	358.68±5.6^{c}	68
การต้ม (boiling)	512.6±9.5^{b,c}	89	269.7±10.8^{b}	90	89.69±8.0^{a,b}	95	187.75±43.3^{a,b}	80	862.56±57.5^{a,b}	87	479.47±0.2^{b}	85
การนึ่งภายใต้แรงดันสูง (autoclave)	389.2±48.8^{d}	68	208.3±24.9^{c}	69	71.59±13.5^{c}	76	147.49±37.7^{b}	63	721.88±128.6^{c}	73	252.98±3.7^{d}	51
ไมโครเวฟ (microwave)	530.7±26.9^{a,b,c}	93	280.0±16.2^{a,b}	93	98.79±9.9^{a}	105	198.12±20.7^{a,b}	84	966.58±104.8^{a}	98	456.88±18.1^{b}	85
สภาวะที่มีความเป็นกรด (pH 4.0)	310.3±35.8^{e}	54	136.0±19.1^{d}	45	53.42±4.5^{d}	57	205.44±40.0^{a,b}	87	807.37±84.1^{b,c}	82	n.d	n.d.

n.d., ตรวจไม่พบ

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีอักษรยกขึ้น ($^{a, b, c, ..}$) และมีอักษรแตกต่างกันในแนวสดมภ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

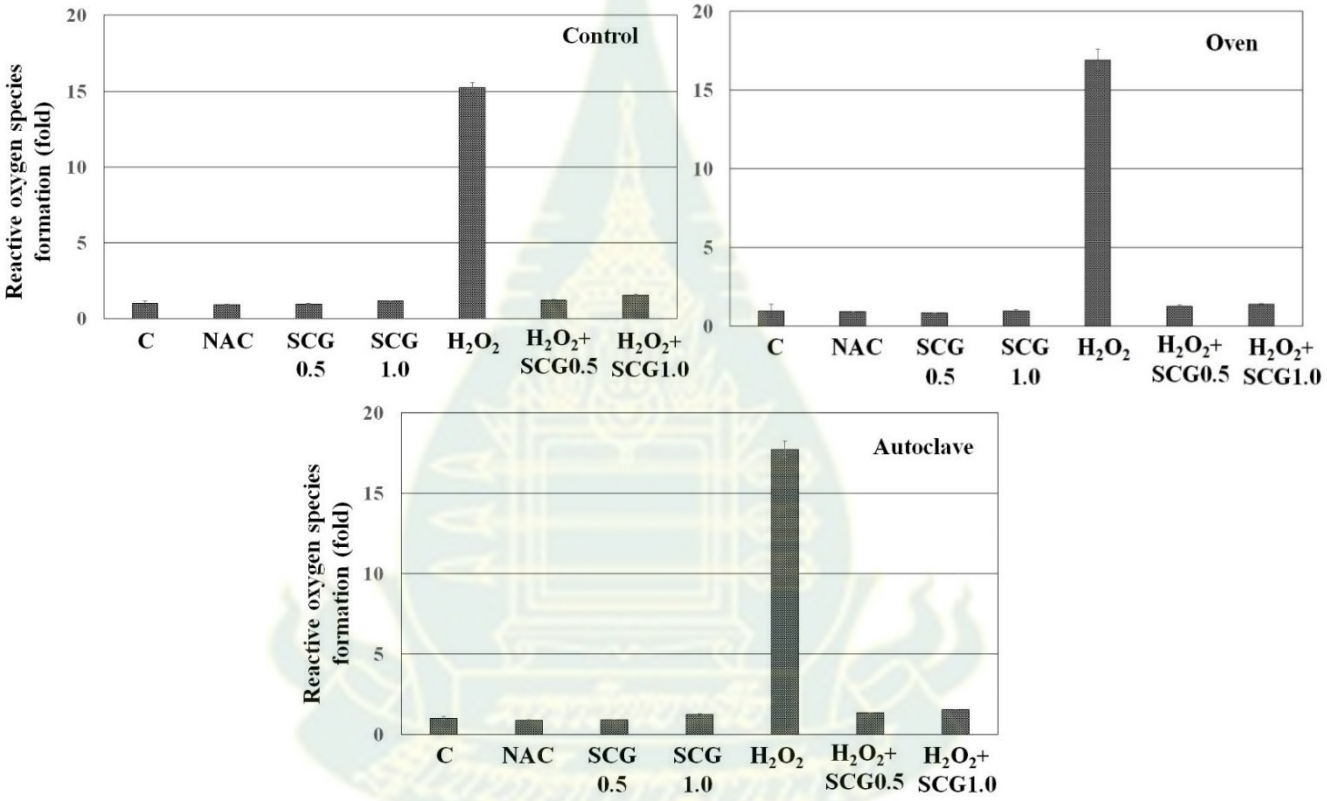
ตารางที่ 4.6 การระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญของสารสกัดจากกากกาแฟบดแห้งที่ผ่านวิธีการอบลมร้อนและหม้อนึ่งแรงดันสูง

ตัวอย่าง	mg/g gallic acid equivalent						μg/g gallic acid equivalent				
	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA	4-hydroxybenzoic acid	caffeic acid	p-coumaric acid	sinapic acid	ferulic acid
ตัวอย่างควบคุม	7.17	20.35	17.09	4.11	1.35	2.45	49.17	223.25	13.28	n.d.	n.d.
การอบลมร้อน (hot air oven)	9.38	18.89	13.66	2.94	1.07	1.85	64.85	42.23	8.38	n.d.	n.d.
การนึ่งภายใต้แรงดันสูง (autoclave)	2.80	21.97	23.56	4.81	1.78	2.37	42.16	434.97	16.17	n.d.	n.d.

n.d., ตรวจไม่พบ

4.4 การศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟ

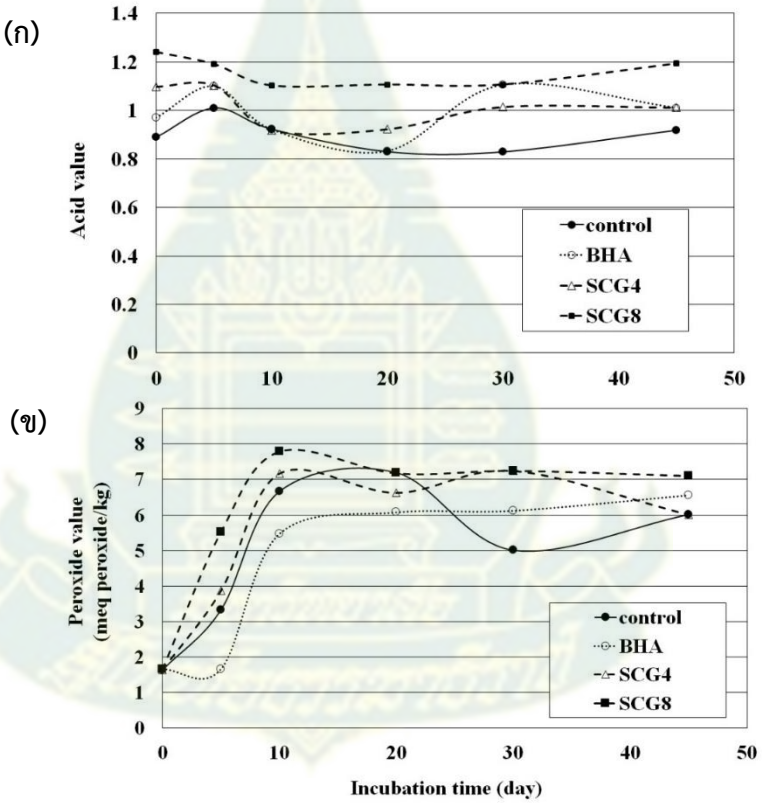
ภาพที่ 4.2 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟบดแห้งที่ผ่านวิธีการอบลมร้อนและหม้อนึ่งแรงดันสูงต่อเซลล์ HepG2 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วย H_2O_2 ได้นำเซลล์ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วย H_2O_2 พบว่าปริมาณ reactive oxygen species (ROS) สูงขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวอาจมีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ได้ (ภาพที่ 4.2, ตัวอย่าง H_2O_2) จากนั้นเมื่อเติมสารสกัดจากกากกาแฟลงไปจะพบว่า ROS ภายในเซลล์จะลดลงจนเท่ากับตัวอย่างควบคุม (ภาพที่ 4.2, ตัวอย่าง H_2O_2+SCG) ในขณะที่ตัวอย่างที่เหนี่ยวนำให้เกิด ROS ยังคงพบ ROS ในปริมาณสูง



ภาพที่ 4.2 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในเซลล์ของสารสกัดจากกากกาแฟบดแห้งที่ผ่านวิธีการอบลมร้อนและหม้อนึ่งแรงดันสูงต่อเซลล์มะเร็งตับที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ C, control; NAC, 10mM N-acetyl-L-cysteine; SCG0.5, 0.5 mg gallic acid equivalent/ml; SCG1.0, 1 mg gallic acid equivalent/ml; H_2O_2, 100mM hydrogen peroxide; H_2O_2+SCG, cells incubated with 100mM H_2O_2 and subsequently treated with freeze-dried ethanolic extracts at 0.5 or 1 mg gallic acid equivalent/ml.

4.5 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในอาหาร

งานวิจัยได้นำกากกาแฟบดแห้งเติมลงในคุ๊กกี้เพื่อตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดภายใต้สภาวะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการติดตามค่า acid value และ peroxide value แสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่าค่า acid value ของทุกตัวอย่าง (ตัวอย่างควบคุม, BHA, SCG 4% และ SCG 8%) มีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่ม (45 วัน) โดยตัวอย่างที่เติมกากกาแฟบดแห้งมีแนวโน้มให้ค่า acid value ที่สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมกากกาแฟบดแห้ง ขณะที่ค่า peroxide value มีค่าค่อยๆ เพิ่มขึ้นตลอดช่วงเวลาการบ่ม โดยตัวอย่างควบคุมและ BHA มีแนวโน้มให้ค่า peroxide value ต่ำกว่าตัวอย่างคุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้ง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการบ่มเป็นเวลา 45 วัน พบว่ามีค่า peroxide value ของทุกตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 4.3 การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดในผลิตภัณฑ์คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้งที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ณ สภาวะการเก็บรักษาที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน โดย (ก) ตรวจวิเคราะห์ค่า acid value และ (ข) ค่า peroxide value. Control, คุ๊กกี้ที่ไม่เติม butylated hydroxyanisole (BHA) และกากกาแฟบดแห้ง (SCG); BHA, คุ๊กกี้ที่เติม 0.02% BHA; SCG4, คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้งที่ความเข้มข้น 4%; SCG8, คุ๊กกี้ที่เติมกากกาแฟบดแห้งที่ความเข้มข้น 8%