บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมบริโภคทั่วโลก วัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการผลิตเครื่องดื่มกาแฟที่สำคัญคือ กากกาแฟ ประมาณการว่าการผลิตกาแฟผงสำเร็จรูป (instant coffee) 1 กิโลกรัม จะได้กากกาแฟเปียกปริมาณ 2 กิโลกรัม (Martinez-Saez et al., 2017) จากรายงานวิจัยก่อนหน้าพบว่ากากกาแฟยังคงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในปริมาณสูง ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟจึงเป็นประเด็นการวิจัยที่น่าสนใจ ในเนื้อหาส่วนนี้จะกล่าวถึง 4 หัวข้อ ได้แก่ (1) กาแฟและองค์ประกอบทางเคมี (2) สารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟและกากกาแฟ (3) อนุมูลอิสระ สารต้านออกซิเดชันและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (4) การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และ (5) แบบจำลองการย่อยของมนุษย์

1. กาแฟและองค์ประกอบทางเคมี

กาแฟ (coffee) เป็นสินค้าที่มีการซื้อขายมากอันดับที่สองของโลกรองจากปิโตรเลียม และเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่นิยมกันอย่างแพร่หลายทั่วโลกคิดเป็นร้อยละ 75 ของกลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทที่ไม่มีแอลกอฮอล์ (Rufián-Henares and Morales, 2007) ผลกาแฟ (coffee cherries) เป็นผลจากต้นกาแฟประกอบด้วยเมล็ดกาแฟ (coffee beans) 2 เมล็ด เมื่อแยกออกจากกันจะพบว่าด้านที่ประกบกันอยู่หรือด้านในของเมล็ดมีลักษณะแบน และมีร่องของรอยแยกตรงกลางของเมล็ด (center cut) (ภาพที่ 2.1) ส่วนอีกด้านหนึ่งของเมล็ดมีความโค้งนูนแบบหลังเต่า เมล็ดกาแฟจะถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกผล (skin or exocarp) บริเวณถัดไปจากเปลือกผลคือ พัพหรือเนื้อผลบางสีใสหรือสีเหลืองอ่อน (pulp or mesocarp) เปลือกบาง (parchment or endocarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (silver skin) และเนื้อเมล็ด (endosperm) ตามลำดับ (Mussatto et al., 2011)

ภาพที่ 2.1 ภาพครึ่งผลกาแฟ

ที่มา: www.pinterest.com/pin/42249400876 3726115/

ต้นกาแฟ (coffee tree) มีหลากหลายสายพันธุ์แต่มีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่นำมาใช้ผลิตกาแฟ ได้แก่ สายพันธุ์ *Coffea arabica* (ที่รู้จักในชื่อ กาแฟอะราบิก้า) ซึ่งผลิตกาแฟที่มีคุณภาพดีที่สุด มีสัดส่วนการผลิตคิดเป็นร้อยละ 75 ในการผลิตกาแฟของโลก และสายพันธุ์ *Coffea canephora* (ที่รู้จักในชื่อ กาแฟโรบัสต้า) จะมีรสชาติเปรี้ยวมากกว่ามีสัดส่วนการผลิตคิดเป็นร้อยละ 25 ของการผลิตในโลก (Mussatto et al., 2011) กาแฟอะราบิก้า (arabica) เป็นกาแฟที่นิยมบริโภคมากที่สุด การปลูกและดูแลรักษาค่อนข้างยากโดยต้องปลูกในที่สูงและอุณหภูมิเหมาะสมจึงจะได้กาแฟรสดีไม่เพี้ยนไปจากพันธุ์ดั้งเดิม โดยความสูงต้องประมาณ 1,000 เมตรขึ้นไปจากระดับน้ำทะเลและมีความลาดเอียงของพื้นที่ปลูกไม่เกิน 30% อุณหภูมิที่พอเหมาะจะอยู่ที่ 15–25 องศาเซลเซียสและมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60% (The Refresher Co., Ltd., 2009) กาแฟโรบัสต้า (robusta) กาแฟโรบัสต้าเติบโตได้ดีในที่ราบต่ำ เพาะปลูกได้ง่าย มีความทนทานต้านทานโรคสูง สามารถที่จะทนต่ออุณหภูมิและสภาพความชื้นสูง อีกทั้งพันธุ์โรบัสต้ายังให้ผลผลิตเมล็ดกาแฟต่อไร่สูงมากกว่า และผลยังสุกเร็วกว่าเมื่อเทียบกับพันธุ์อะราบิก้า อย่างไรก็ตามเมล็ดกาแฟพันธุ์โรบัสต้ามีคุณภาพต่ำและมีราคาถูกกว่าพันธุ์อะราบิก้า (The Refresher Co., Ltd., 2009)

เมล็ดกาแฟมีองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 2.1 คาแฟอีน (caffeine) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่คนส่วนใหญ่รู้จักมีปริมาณ 0.8-1.4 และ 1.7-4.0% ในกาแฟอะราบิก้าและโรบัสต้าตามลำดับ นอกจากนั้นเมล็ดกาแฟสดมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่หลากหลาย เช่น cellulose, minerals, sugar, lipids, tannin, และ polyphenols. แร่ธาตุ (minerals) ที่พบได้แก่ potassium, magnesium, calcium, sodium, iron, manganese, rubidium, zine, copper, strontinum, chromium, vanadium, barium, nickel, cobalt, lead, molybdenum, titanium, และ cadmium น้ำตาลที่ตรวจพบได้แก่ sucrose, glucose, fructose, arabinose, galactose, และ mannose ชนิดของกรดอะมิโนที่พบได้แก่ alanine, arginine, asparagine, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, lecine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threnonine, tyrosine, และ valine นอกจากนั้นเมล็ดกาแฟสดยังพบ vitamin B complex, niacin (vitamin B3) และกรดคลอโรเจนิก (chlorogenic acid : CGA) ประมาณ 3-5 เท่าของปริมาณคาแฟอีน องค์ประกอบเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงปริมาณได้ตามกระบวนการคั่ว เนื่องจากความร้อนสามารถทำลายหรือเปลี่ยนโครงสร้างสารเหล่านี้ได้ ยกเว้นคาแฟอีนที่เป็นสารที่เสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดกาแฟสดไม่ผ่านการคั่ว

องค์ประกอบ	อะราบิก้า	โรบัสต้า	สารประกอบสำคัญ
สารประกอบไนโตรเจน	11-15		
กรดอะมิโนอิสระ	0.2-0.8		Glu, Asp, Asp-NH_2
โปรตีน	8.5-12		
คาแฟอีน	0.8-1.4	1.7-4.0	Traces of theobromine และ theophylline
ไตรโกนีลีน (Trigonelline)	0.6-1.2	0.3-0.9	
ลิพิด	15-18	8-12	
แว๊กซ์	0.2-0.3		
น้ำมัน	7.7-17.7		
แร่ธาตุ	3-5.4		
กรดและฟีนอล			
กรดที่ระเหยได้	0.1		
กรดอะลิฟาติกที่ไม่ระเหย	2-2.9	1.3-2.2	citric acid, malic acid, quinic acid
กรดคลอโรเจนิก	6.7-9.2	7.1-12.1	mono-, dicaffeoyl-, and feruloylquinic acid
ลิกนิน	1-3		
คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้	9-12.5	6-11.5	
มอโนแซคคาไรด์	0.2-0.5		fructose, glucose, galactose, arabinose (traces)
โอลิโกแซคคาไรด์	6-9	3-7	sucrose, raffinose, stachyose
พอลีแซคคาไรด์	3-4		polymers of galactose, mannose, arabinose, glucose
คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ	46-53	34-44	
เฮลิเซลลูโลส	5-10	3-4	polymer of galactose, arabinose, mannose
เซลลูโลส, บีต้า (1-4) แมนแนน	41-43	32-40	

ที่มา: Mussatto et al. (2011)

ภายหลังการเก็บเกี่ยวผลกาแฟสด (green coffee bean) จะนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ โดยเริ่มต้นจากการกำจัดพัพ (pulp) และเปลือกหุ้มเมล็ด (hull) ออกด้วยวิธีแบบแห้ง (dry method) มักใช้กับเมล็ดกาแฟโรบัสต้า หรือแบบเปียก (wet method) ที่มักใช้กับเมล็ดกาแฟอะราบิก้า จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการคั่ว (roasting) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในกระบวนการผลิต

กาแฟเนื่องจากมีผลโดยตรงต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส (กลิ่น รส และสี) ในระหว่างการคั่ว (roasting) เมล็ดกาแฟ (coffee bean) จะเกิดการสร้างสารประกอบให้กลิ่นรสและสารสีจากปฏิกิริยาไพโรไลซิส (pyrolysis) และปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างคาร์โบไฮเดรตหรือโพลีแซคคาไรด์ที่ถูกย่อยสลายกับกรดอะมิโนหรือโปรตีน สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการคั่วเมล็ดกาแฟเป็นสารประกอบที่ขึ้นในขั้นสุดท้ายของปฏิกิริยาดังกล่าว เรียกสารกลุ่มนี้ว่าเมลานอยดิน (melanoidins) (Rufián-Henares and Morales, 2007)

2. สารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟและกากกาแฟ

เมล็ดกาแฟคั่ว (roasted coffee bean) เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ใช้เตรียมเครื่องดื่มกาแฟ (brewed coffee) มีรายงานว่าทั้งเมล็ดกาแฟคั่วและเครื่องดื่มกาแฟพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ปริมาณสูง กลุ่มสารชนิดหลักที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันคือ โพลีฟีนอล (polyphenol) และเมลานอยดิน (Cämmerer & Kroh, 2006) โดยกรดคลอโรเจนิกเป็นสารประกอบฟีนอลที่สำคัญในเมล็ดกาแฟ ซึ่งเป็นสารที่พบในธรรมชาติของเมล็ดกาแฟสด (Charupin, Ames, & Castillo, 2002) ส่วนสารกลุ่มเมลานอยดินจะเกิดขึ้นในระหว่างการคั่ว โดยมีความสัมพันธ์กับการเกิดสีน้ำตาลผ่านปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Delgado-Andrade & Morales, 2005)

2.1 สารประกอบฟีนอลในกาแฟ สารประกอบฟีนอลในกาแฟมีหลากหลายชนิด เช่น monocaffeoylquinic acids (3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid) และ dicaffeoylquinic acid (3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid) (Ludwing et al., 2012) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟแสดงดังตารางที่ 2.2 ระดับการคั่วเมล็ดการแฟมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (Richelle, Tavazzi, & Offord, 2001) ปริมาณสารกรดคลอโรเจนิกทั้งหมด (คำนวณปริมาณรวมจาก 9 ไอโซเมอร์ ประกอบด้วย 3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, 4-feruloylquinic acid, 5-feruloylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5- dicaffeoylquinic acid) ในเมล็ดกาแฟสด (green coffee bean) คือ 34-42 mg/g ลดเหลือเพียง 2-7 mg/g ในเมล็ดกาแฟคั่ว (roasted coffee beans) ซึ่งปริมาณสารกรดคลอโรเจนิกทั้งหมดในเมล็ดกาแฟคั่วจะลดลงไปตามระดับการคั่วและค่า pH ที่สูงขึ้น (Moon, Yoo, & Shibamoto, 2009) ดังรายงานของ Castillo, Ames, & Gordon (2002) พบว่าสารประกอบที่พบในเมล็ดกาแฟสด (green coffee bean) และเมล็ดกาแฟคั่วคือ กรดคลอโรเจนิก, ferulic acid, vanillic acid, caffeic acid และ catechol โดยกรดคลอโรเจนิกเป็นสารประกอบฟีนอลชนิดหลักในเมล็ดกาแฟสดและเมล็ดกาแฟคั่ว ซึ่งพบในเมล็ดกาแฟสดมากที่สุดและลดปริมาณลงตามระดับการคั่วที่มากขึ้น Delgado-Andrade & Morales

(2005) พบสารประกอบฟีนอลที่สำคัญในกาแฟ (coffee brew) ที่เตรียมจากผงกาแฟสำเร็จรูปคือ กรดคลอโรเจนิก, ferulic acid, และ vanillic acid โดยกรดคลอโรเจนิกเป็นสารที่พบมากที่สุด และพบว่าระดับการคั่วที่มากขึ้นมีผลลดปริมาณกรดคลอโรเจนิกลง ซึ่งระดับการคั่วแบบอ่อน (light) ปานกลาง (medium) และเข้ม (dark) มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเมล็ดกาแฟคั่ว Duarté et al. (2005) พบว่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และสาร caffeoylquinic acids (3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, และ 5-caffeoylquinic acid) ลดลงเมื่อระดับการคั่วเมล็ดกาแฟสูงขึ้น โดยเมล็ดกาแฟคั่วแบบอ่อนตรวจพบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด ขณะที่เมล็ดกาแฟคั่วแบบเข้มพบในปริมาณน้อยที่สุด เช่นเดียวกับรายงานของ Vignoli, Viegas, Bassoli, & Benassi (2014) พบว่าสาร 5-caffeoylquinic acid, trigonellline, furfural, และ hydroxymethylfurfural (HMF) ลดลงตามระดับการคั่วเมล็ดกาแฟ แต่สารเมลานอยดินจะพบปริมาณที่เพิ่มขึ้น ซึ่งฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

สารประกอบบริสุทธิ์ในกาแฟมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไม่เท่ากัน Gómez-Ruiz, Leake, & Ames (2007) เปรียบเทียบสารประกอบบริสุทธิ์จากกาแฟหรือสารเมทาบอไลซ์จากกาแฟในร่างกายมนุษย์จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ กรดคลอโรเจนิก, caffeic acid, ferulic acid, isoferulic acid, vanillic acid, dihydroferulic acid, *m*-coumaric acid, hippuric acid, 3-(hydroxyphenyl)propionic aicd, caffeine, 1,3,7-trimethyluric acid (1,3,7-TU), 1-methyluric acid (1-U), 1-methylxanthine (1-X), และ paraxanthine (PX) พบว่า ferulic acid ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS

สภาวะการเก็บเมล็ดกาแฟคั่วมีผลต่อปริมาณสารโพลีฟีนอลและเมลานอยดิน โดยอุณหภูมิการเก็บรักษาที่สูงจะพบปริมาณสารกรดคลอโรเจนิกสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ทั้งนี้อาจเพราะกรดคลอโรเจนิกถูกปลดปล่อยเป็นโมเลกุลอิสระจากโครงสร้างสารโมเลกุลใหญ่ (polymer structure) ส่วนปริมาณสารเมลานอยดินจะลดลงในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่มีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการบ่ม (6 ชั่วโมง) ในสภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน (Cämmerer & Kroh, 2006)

วิธีการชงกาแฟมีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลในน้ำกาแฟ (coffee brew) โดยวิธีการชงกาแฟมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอล ค่า FRAP และ ABTS เรียงลำดับตามปริมาณที่พบดังนี้คือ mocca coffee pot $\approx$ filter electric coffee > espresso coffee machine > freeze-dried (Sánchez-González, Jiménez-Escrig, & Saura-Calixto, 2005)

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟและกากกาแฟ

ตัวอย่าง	สารสกัด	สารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	การค้นพบที่สำคัญ	อ้างอิง
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	ระดับการคั่วปานกลาง (medium) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด	Nicoli, Anese, Manzocco, & Lerici (1997)
เมล็ดกาแฟคั่ว	สารละลายอินทรีย์	–	สารขนาดโมเลกุลใหญ่ (higher molecular mass) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง ขณะที่สารขนาดโมเลกุลเล็ก (lower molecular mass) มีฤทธิ์ปกป้อง (protective activity)	Daglia et al. (2000)
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	กาแฟฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับโกโก้และชา และการเติมนมลงในกาแฟไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	Richelle, Tavazzi, & Offord (2001).
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	-สาร low molecular mass (LMM) และ high molecular mass (HMM) ที่เกิดขึ้นระหว่างการคั่ว โดยสาร LMM พบมากในเมล็ดการแฟคั่วแบบปานกลางและแบบอ่อนเป็นส่วน (fraction) ที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูง -สีน้ำตาลที่สูงของเมล็ดการแฟคั่วแบบเข้ม ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	Castillo, Ames, & Gordon (2002)
ระบบโมเดล	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	การเกิดสีน้ำตาลไม่มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	Charupin, Ames, & Castillo (2002)

16

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟและกากกาแฟ

ตัวอย่าง	สารสกัด	สารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	การค้นพบที่สำคัญ	อ้างอิง
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	ระดับการคั่วแบบอ่อน (light) ปานกลาง (medium) และเข้ม (dark) มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำกาแฟที่ชงได้	Duarté et al. (2005)
เมล็ดกาแ ฟคั่ ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	วิธีการชงกาแฟมีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในน้ำและปริมาณสารประกอบฟีนอล	Sánchez-González, Jiménez-Escrig, & Saura-Calixto (2005)
กาแฟสำเร็จรูป	น้ำ	เมลานอยดิน (melanoidin) และเมลานอยดินบริสุทธิ์	สารเมลานอยดินมีออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	Delgado-Andrade & Morales (2005)
กาแฟสำเร็จรูป	น้ำ	เมลานอยดิน (melanoidin) เมลานอยดินบริสุทธิ์ และสารประกอบโมเลกุลขนาดเล็ก (low molecular weight compound)	สารประกอบโมเลกุลขนาดเล็กที่จับอยู่กับเมลานอยดินเป็นสารที่มีออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สำคัญ	Delgado-Andrade, Rufián-Henares & Morales (2005)
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	อุณหภูมิการเก็บรักษาเมล็ดกาแฟคั่วมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอล	Cämmerer & Kroh (2006)
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	เมลานอยดิน (melanoidins) และสารประกอบโมเลกุลขนาดเล็ก (low molecular weight compound)	สารประกอบโมเลกุลขนาดเล็กที่จับอยู่กับเมลานอยดินเป็นสารที่มีออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สำคัญ สามารถแยกตัวออกจากเมลานอยดินโดยเอนไซม์ในระบบการย่อยของมนุษย์	Rufián-Henares & Morales (2007)

17

ตารางที่ 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟและกากกาแฟ

ตัวอย่าง	สารสกัด	สารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	การค้นพบที่สำคัญ	อ้างอิง
-	น้ำ	สารบริสุทธ์ กรดคลอโรเจนิก, caffeic acid, ferulic acid, isoferulic acid, vanillic acid, dihydroferulic acid, *m*-coumaric acid, hippuric acid, 3-(hydroxyphenyl)propionic aicd, caffeine, 1,3,7-trimethyluric acid (1,3,7-TU), 1-methyluric acid (1-U), 1-methylxanthine (1-X), และ paraxanthine (PX)	สาร ferulic acid ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS	Gómez-Ruiz, Leake, & Ames (2007)
เมล็ดกาแฟสดและคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	- ปริมาณสาร กรดคลอโรเจนิก ทั้งหมดในเมล็ดกาแฟคั่วจะลดลงตามระดับการคั่ว - สาร 5-caffeoylquinic acid เป็นไอโซเมอร์ชนิดที่พบปริมาณสูงสุดในเมล็ดกาแฟสดและคั่ว	Moon, Yoo, & Shibamoto (2009)
เมล็ดกาแฟ	น้ำ	Caffeolyquinic acid, melanoidin, caffeine	ระยะเวลาการสกัดกาแฟเป็นปัจจัยสำคัญต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกาแฟ	Ludwing et al. (2012)
เมล็ดกาแฟคั่ว	น้ำ	สารประกอบฟีนอล และสารจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด	ระดับการคั่วแบบอ่อน (light) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด	Vignoli, Viegas, Bassoli, & Benassi (2014)

18

2.2 สารเมลานอยดินในกาแฟ สารเมลานอยดินจากกาแฟเป็นสารโพลีเมอร์มีประจุลบสีน้ำตาล (brown anionic polymeric material) ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ สันนิษฐานว่าสารเมลานอยดินจะอยู่ในผลกาแฟสด (green coffee bean) และสร้างขึ้นมาใหม่ในระหว่างการคั่ว โดยในธรรมชาติของสารเมลานอยดินในเมล็ดกาแฟจะต่อเชื่อมอยู่กับสารโมเลกุลขนาดเล็ก (low molecular weight substance : LMW) ด้วยพันธะนัน-โควาเลนซ์ ซึ่งสาร LMW นี้อาจเป็นสารประกอบฟีนอล เนื่องจากสารประกอบฟีนอลสามารถจับอยู่กับสารเมลานอยดินได้ (Delgado-Andrade & Morales, 2005) จึงมีข้อสันนิษฐานว่าฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารเมลานอยดินน่าจะมีส่วนหนึ่งมาจากสาร LMW ที่จับอยู่กับสารเมลานอยดิน

Rufián-Henares and Morales (2007) ได้นำน้ำกาแฟ (CB) แยกด้วยการแยกสารแบบ ultrafiltration ที่ molecular weight cut-off 10 kDa สารที่มีขนาดใหญ่ซึ่งไม่ผ่านเยื่อไดอะไลซิส เรียกว่า สารเมลานอยดิน (M) จากนั้นทำลายพันธะระหว่างสารเมลานอยดินและสาร LMW ด้วย 2 M NaCl เพื่อทำลายพันธะไอออนนิก และด้วยการย่อยของเอนไซม์เพื่อทำลายพันธะนัน-โควาเลนซ์ทั่วไป ได้เป็นสาร bound-melanoidin compound และสาร LMW ผลการวิจัยพบว่าน้ำกาแฟ (CB) สารเมลานอยดิน (M) และสาร bound-melanoidin compound มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ใกล้เคียงกัน แต่สาร LMW ที่ถูกปลดปล่อยออกจากสารเมลานอยดินมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่สูงมากประมาณ 8 เท่าของสารเมลานอยดิน (M) ที่เป็นสารเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่า LMW คือสารสำคัญที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

2.3 สารประกอบฟีนอลในกากกาแฟ จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเมล็ดกาแฟคั่ว (roasted coffee bean) และกาแฟ (brewed coffee) มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูง จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านั้นว่าคงเหลืออยู่ในกากกาแฟหรือไม่ เนื่องจากกากกาแฟเป็นส่วนเหลือใช้ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% จากอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มกาแฟ (coffee beverage) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกากกาแฟแสดงดังตารางที่ 2.3

กากกาแฟคงมีสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน Cruz et al. (2012) ได้นำกากกาแฟที่ได้จากการผลิตกาแฟทางการค้าตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร 5-caffeoylquinic acids และกรดคลอโรเจนิก พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 39.7-264.2 และ 212.1-765.6 mg/100g ตามลำดับ Bravo et al. (2012) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลและเมลานอยดินของกากกาแฟคั่วอะราบิก้าและโรบัสต้าที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธี filter coffeemaker, espresso coffeemaker, plunger coffeemaker, และ mocha coffeemaker พบสารฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ได้แก่ 3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5- dicaffeoylquinic acid, 4,5- dicaffeoylquinic acid, caffeine, และเมลานอยดิน Choi & Koh (2017) สกัดสารจาก

กากกาแฟด้วยเมทานอล ตรวจพบสารประกอบฟีนอล ได้แก่ gallic acid, protocatechuic acid, และกรดคลอโรเจนิก สารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ trigonelline และ caffeine โดยพบปริมาณสาร caffeine มากที่สุด Monnente et al. (2015) ศึกษาการสกัด bound-phenolic compound ออกจากเมลานอยดินพบว่าวิธี alkaline hydrolysis และ saline treatment เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด

จากการวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าคงพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกากกาแฟ จึงมีการศึกษาวิธีการสกัดสารประกอบฟีนอลจากกากกาแฟ วิธีการใช้เมทานอลสกัดสารจากกากกาแฟทดสอบโดยการสกัดสารแบบ solid-liquid method และออกแบบการทดสอบแบบ 2^3 full factorial design สภาวะที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นสารละลายเมทานอล (20-100%) สัดส่วนสารสกัดกับกากกาแฟ (10-40 ml/g) และระยะเวลาการสกัด (30-90 นาที) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น 60% สัดส่วน 40 ml/g และระยะเวลาการสกัด 90 นาที ซึ่งสารที่พบในสารสกัดคือ flavonoid, กรดคลอโรเจนิก, และ protocatechuric acid (Musatto et al., 2011) วิธีการใช้ไมโครเวฟสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลจากกากกากแฟได้เช่นกัน โดยสภาวะที่เหมาะสมจากการออกแบบการทดสอบแบบ 2^3 full factorial design และใช้สารละลายเอทานอลเข้มเข้น 20% เป็นสารสกัด คือ กำลังไมโครเวฟ 240W, อัตราส่วนกากกาแฟต่อสารสกัด 1 ต่อ 6, และระยะเวลา 40 วินาที (Ranic et al., 2014) Al-Dhabi, Ponnurugan, & Jeganathan (2017) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารกรดคลอโรเจนิกและ protocatechuic acid จากกากกาแฟโดยใช้ Box-Benhken response surface design คือ ultrasonic power 244W อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสกัด 34 นาที และสัดส่วนของกากกาแฟ:สารสกัด คือ 1 : 7 Bravo et al. (2013) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจากกากกาแฟ ทั้งวิธีการสกัด สารสกัด จำนวนครั้งการสกัด ค่า pH ของสารสกัด การกำจัดไขมัน และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมคือ การสกัดด้วยเครื่อง filter coffeemaker ใช้น้ำเป็นสารสกัด สกัดเพียงครั้งเดียวก็เพียงพอต่อการได้สารออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ค่า pH คือ 7.0 และการกำจัดไขมันและการระเหิดแห้งไม่มีผลต่อสารออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน สำหรับการใช้ subcritical water หรือน้ำร้อนสูงภายในความดันในการสกัดสารประกอบฟีนอลจากกาแฟมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้สกัดสารออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพสภาวะที่เหมาะสมคือ 179 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 นาที อัตราส่วน solid-to-liquid ratio เป็น 14.1 g/L ได้สารประกอบฟีนอลที่สำคัญคือ 3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, และ 5-caffeoylquinic acid (Xu et al., 2015)

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

ตัวอย่าง	สารสกัด	สารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	การค้นพบที่สำคัญ	อ้างอิง
กากกาแฟ	เมทานอล	สารประกอบฟีนอล และเมลานอยดิน	- พบสารประกอบฟีนอลคงเหลือในกากกาแฟ - พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน - พบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-tumor activity)	Ramalakshmi, Rao, Takano-Ishikawa, & Goto (2009)
กากกาแฟ	เมทานอล	สารประกอบฟีนอล	สภาวะการสกัดที่เหมาะสมแบบ solid-liquid extraction ด้วยเมทานอลคือ สารละลายเมทานอลเข้มข้น 60% สัดส่วน 40 ml/g และ ระยะเวลาการสกัด 90 นาที	Musatto et al. (2011)
กากกาแฟ	น้ำ	caffeine, 5-caffeoylquinic acid, กรดคลอโรเจนิก	พบสารประกอบฟีนอลคงเหลือในกากกาแฟ	Cruz et al. (2012)
กากกาแฟ	น้ำ	สารประกอบฟีนอล และเมลานอยดิน	- พบสารประกอบฟีนอลคงเหลือในกากกาแฟ - พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	Bravo et al. (2012)
กากกาแฟ	น้ำ	–	สารสกัดจากกากกาแฟมีฤทธิ์ปกป้อง (protective activity) เซลล์ HeLa cell จากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำโดย H_2O_2 และป้องกันสาย DNA เสียหาย	Bravo, Arbillage, Peña, & Cid (2013).
กากกาแฟ	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารคือ การสกัดด้วยเครื่อง filter coffeemaker โดยใช้น้ำ (pH 7.0) เป็นสารสกัด สกัดเพียงหนึ่งครั้ง และ การกำจัดไขมันและการระเหิดแห้งไม่มีผลต่อสารออกฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน	Bravo et al. (2013)
กากกาแฟ	เอทานอล	สารประกอบฟีนอล	สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารด้วยสารละลายเอทานอลเข้มเข้น 20% และไมโครเวฟคือ กำลังไมโครเวฟ 240W, อัตราส่วนกากกาแฟต่อสารสกัด 1 ต่อ 6, และระยะเวลา 40 วินาที	Ranic et al. (2014)

21

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในกากกาแฟ

ตัวอย่าง	สารสกัด	สารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	การค้นพบที่สำคัญ	อ้างอิง
กากกาแฟ	Alkaline hydrolysis, saline treatment	สารประกอบฟีนอล	- bound-phenolic compound มีปริมาณ 54% ของ total phenolic compounds - bound-phenolic compound จับอยู่กับเมลานอยดินด้วยพันธะนัน-โควาเลนซ์ ส่วนมีที่เหลือจะกับสารอื่นด้วยพันธะโควาเลนซ์	Monnente et al. (2015)
กากกาแฟ	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลโดยใช้ subcritical water extraction	Xu, Wang, Liu, Yuan, & Gao (2015)
กากกาแฟ	–	สารประกอบฟีนอล	กากกาแฟมีผลยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูบดปรุงสุกแช่เยือกแข็ง	Jully, Tota, & Were (2016)
กากกาแฟ	น้ำ	Antioxidant polysaccharide	พบสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและทนต่ออุณหภูมิสูง	Ballesteros, Teixeira, & Mussatto (2017)
กากกาแฟ	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลโดยใช้เครื่อง ultrasound	Al-Dhabi, Ponnurugan, & Jeganathan (2017)
กากกาแฟ	เมทานอล	gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic trigonelline และ caffeine	- พบสารประกอบฟีนอลคงเหลือในกากกาแฟ - พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	Choi & Koh (2017)
กากกาแฟ	–	–	ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารประเภทเบเกอรีโดยตรงได้	Martinez-Saez et al. (2017)

22

กากกาแฟสามารถใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารได้ Jully, Tota, & Were (2016) ได้ทดลองใช้กากกาแฟ (ปริมาณ 1 g/kg) เพื่อยับยั้งการเกิดกลิ่นหืนของไขมันและโปรตีนในเนื้อหมูบดปรุงสุกแช่เยือกแข็ง (frozen cooked pork patties) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ากากกาแฟไม่มีผลต่อการออกซิเดชันของโปรตีนแต่ผลยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน Martinez-Saez et al. (2017) ได้ทดสอบนำกากกาแฟใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตบิสกิต (biscuit) โดยได้รับการยอมรับจากผู้ชิม

นอกจากนี้มีรายงานว่าสารสกัดจากกากกาแฟด้วยน้ำมีฤทธิ์ปกป้อง (protective activity) เซลล์ HeLa cell จากอนุมูลอิสระและความเสียหายของสาย DNA ได้ (Bravo, Arbillage, Peña, & Cid, 2013) Ramalakshmi, Rao, Takano-Ishikawa, & Goto (2009) รายงานการพบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-tumor activity) ของสารสกัดจากกากกาแฟโรบัสต้าและอะราบิก้าที่สกัดโดยใช้สารละลายเมทานอล

3. อนุมูลอิสระ สารต้านออกซิเดชัน และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

3.1 อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ชั้นนอกสุดของระดับพลังงานนอกสุด (valence electron) เกิดขึ้นเมื่อพันธะของโมเลกุลแตกออกหรืออะตอมสูญเสียอิเล็กตรอน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมานี้จะไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี โดยสามารถดึงหรือให้อิเล็กตรอนกับอะตอมหรือโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียร อะตอมหรือโมเลกุลที่อนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นต่อไปเรื่อย ๆ เรียกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ตัวอย่างอนุมูลอิสระ เช่น superoxide anion radical ($O_2^{\bullet}$) hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) peroxide radical ($ROO^{\bullet}$) alkoxyl radical ($RO^{\bullet}$) hydroperoxyl radical ($HOO^{\bullet}$) เป็นต้น

อนุมูลอิสระสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่ายการได้ทำให้เกิดความเสียหายต่อสารชีวโมเลกุลเหล่านั้น เช่น การทำลายโครงสร้าง DNA การทำลายโครงสร้างโปรตีนและไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ของสิ่งมีชีวิตจึงมีระบบเพื่อป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เรียกว่า สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบหรือเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ สารประกอบหรือโปรตีนที่ควบคุมอนุมูลอิสระในร่างกาย เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน สารประกอบฟีนอล ส่วนเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล เช่น catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase โดยมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง การเข้าจับ (chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ ถ้าการเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ในปริมาณต่ำ ระบบต้านอนุมูลอิสระของเซลล์จะสามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจาก

อนุมูลอิสระได้ แต่หากมีปริมาณอนุมูลอิสระที่สูงมากเกินกว่าความสามารถของระบบต้านอนุมูลอิสระจะเกิดสภาวะภายในเซลล์ที่เรียกว่า สภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายสามารถแบบออกได้เป็น 2 ประเภทคือ 1) อนุมูลอิระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายที่เกิดจากปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น autooxidaion กระบวนการเมทาบอลิซึม (เช่น การทำงานของเอนไซม์ xanthine oxidase ในกระบวนการ purine metabolism) เอนไซม์ lipoxygenease (LOX) การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการต่อต้านเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ปฏิกิริยาเฟนทอน (Fenton reaction) เป็นต้น 2) อนุมูลอิระที่มาจากปัจจัยภายนอกหรือสิ่งแวดล้อม เช่น สารเคมี มลพิษจากอากาศ วัตถุเจือปนอาหาร รังสี ควันบุหรี่ เป็นต้น

3.2 สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารที่สามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระได้ โดยอาจเป็นการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระโดยตรงทำให้อะตอมหรือโมเลกุลอนุมูลอิสระนั้นกลายเป็นสารที่เสถียร เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary antioxidant) หรือไม่ได้ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงแต่ช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น การดักจับโลหะ (metal chelating) การดักจับออกซิเจน (oxygen scavenging) หรือการดูดซับแสงอุตราไวโอเลตไว้ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิ (secondary antioxidant)

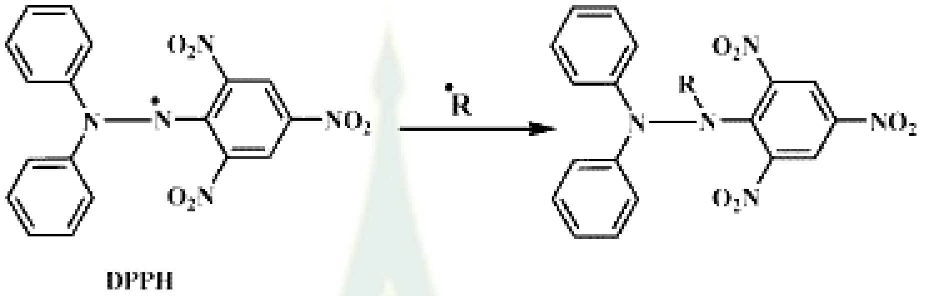
กลไกการทำงานของสารต้านออกซิเดชันสำคัญ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) โดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ การดักจับออกซิเจน (oxygen scavenging) การดักจับโลหะ (metal chelating)

3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน วิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์ความสามารถต้านออกซิเดชันของสารประกอบ เช่น 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy radical scavenging capacitiy assay (DPPH assay), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) cation scavenging assay (ABTS assay), ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, metal chelating activity, oxygen radical absorption capacity assay (ORAC assay)

3.3.1 DPPH assay สาร DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร (stable free radical) สามารถรับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน (hydrogen radical) ทำให้กลายเป็นสารที่เสถียรได้ ในสภาวะที่ DPPH มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวและละลายในสารละลายเมทานอลจะดูดกลืนคลื่นแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโมเมตร (ภาพที่ 2.2) เมื่อ DPPH radical ทำปฏิกิริยากับสารริดิวซ์ (reducing agent) จะเกิดพันธะขึ้นและสารละลาย DPPH radical ที่มีสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นไม่มีสีโดยระดับการเปลี่ยนสีจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน (Nimse & Pal, 2015)

3.3.2 ABTS assay เป็นวิธีการที่พัฒนามาจากการกระตุ้นของเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ในสภาวะที่มี hydrodogen peroxide และ $ABTS^{\bullet+}$ เพื่อให้เกิด radical cation จากนั้นจึงมีการปรับปรุงวิธีการสร้าง radical cation จากการใช้เมทไมโอโกลบินเป็นปฏิกิริยาระหว่าง

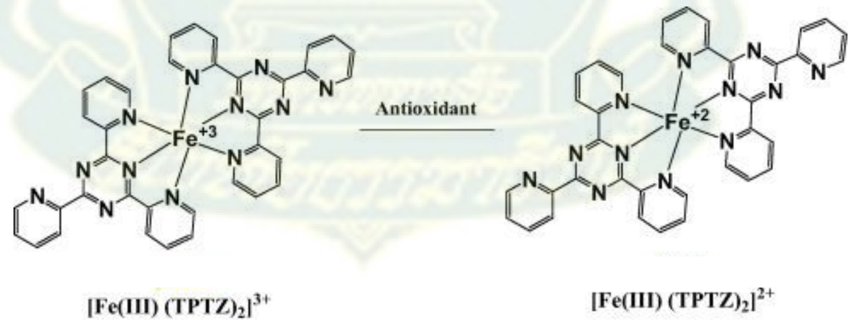
ABTS และ potassiuim persulfate เพื่อให้เกิด blue/green $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ 734 นาโนเมตร ค่าความสามารถต้านออกซิเดชัน (total antioxidant capacity) จากวิธีการนี้จะวัดได้ทั้งสารที่ชอบละลายในไขมัน (lipophilic) และสารที่ละลายในน้ำ (hydrophilic) (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาของ DPPH radical

ที่มา: Nimse & Pal, (2015)

3.3.3 FRAP assay เป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการรีดิวซ์เฟอริค (ferric iron, Fe^{3+}) โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอริคและ 2,3,5-Triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene chloride (TPTZ) ได้เป็นเฟอรัส (ferrous, Fe^{2+}) ที่สภาวะกรด (ภาพที่ 2.3) ซึ่งสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013)



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาของวิธีวิเคราะห์ FRAP assay

ที่มา: Pérez-Cruz et al. (2018)

3.3.4 metal chelating activity สาร ferrozine ในสภาวะที่มีเฟอรัส (ferrous, Fe^{2+}) จะสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง หากในระบบการทดสอบมีสารดักจับโลหะ (chelating agent) จะทำให้การสร้างสารประกอบเชิงซ้อน ferrozine-Fe^{2+} ลดลง ดังนั้นการวิเคราะห์จึงเป็นการตรวจวัดความสามารถในการจับเฟอรัสระหว่างสารดักจับโลหะกับ ferrozine (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013)

3.3.5 ORAC assay เป็นวิธีการใช้สาร β-phycoerythrin (PE) เป็นโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ได้และสารที่ให้อนมูลอิสระอาจเป็นสาร 2,2’-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) เป็นสารให้ perroxyl radical หรือ Cu^{2+}-H_2O_2 system เพื่อให้ hydroxyl radical โดยเมื่อ β-phycoerythrin ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจะทำให้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลงแต่หากมีสารต้านอนุมูลอิสระจะลดการลดลงของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงได้ โดยการวิเคราะห์จะใช้เทคนิค area-under-the-curve (AUC) สำหรับการคำนวณค่าผลต่างระหว่างตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างวิเคราะห์ (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011)

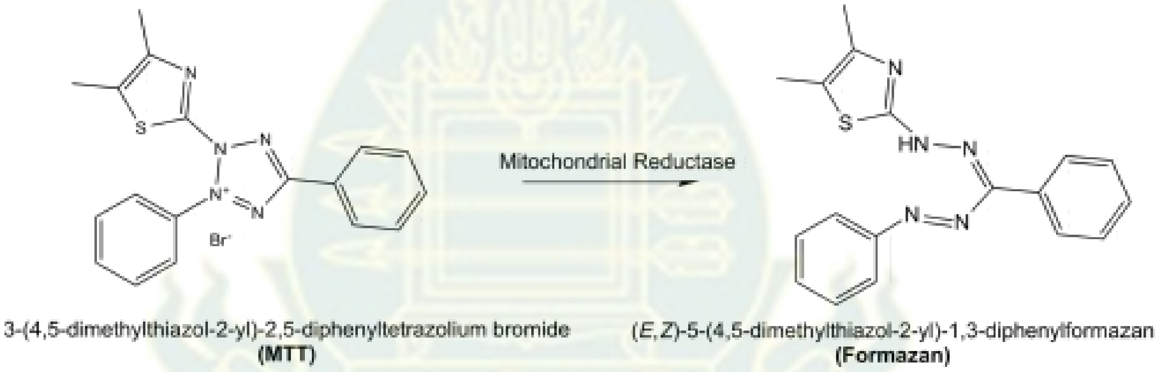
4. การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture หรือ cell culture) คือ การรักษาสภาพมีชีวิต การเจริญและพัฒนาการของเซลล์สัตว์ภายใต้สภาวะนอกร่างกายหรือในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมต่อเซลล์ เป็นวิธีการที่สามารถใช้ศึกษากระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ที่ไม่มีการรบกวนจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากตัวสัตว์ อาจใช้เซลล์ไลน์ประเภท primary cell line เป็นเซลล์ที่แยกจากสิ่งมีชีวิตหรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยตรง เช่น เซลล์ตัวอ่อนไก่ (chicken embryo cell) เซลล์ไตสุนัข (dog kidney cell) หรือเซลล์ไลน์ประเภท continuous cell line คือ เซลล์ที่มีคุณสมบัติแบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุด จึงสามารถเลี้ยงต่อไปได้เรื่อย ๆ ไม่มีวันตาย เช่น เซลล์มะเร็ง เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสบางชนิด ตัวอย่างเซลล์ไลน์ที่ใช้ศึกษาวิจัย เช่น HaLa cells การศึกษาวิธีการนี้จัดเป็นการทดสอบระดับหลอดทดลอง (*in vitro* test) (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, 2554)

การทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation assay) มีได้หลายลักษณะ เช่น การทดสอบหลังจากเหนี่ยวนำให้ภายในเซลล์เกิดอนุมูลอิสระ หากเซลล์มีสารต้านออกซิเดชันก็จะลดการตายของเซลล์เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ หรือทดสอบผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อสารทดสอบ อาจเป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ก็ได้ เมื่อเซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำหรือรับสารทดสอบจึงตรวจนับค่าที่แสดงการมีหรือไม่มีกิจกรรมของเซลล์ เช่น การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) การนับจำนวนเซลล์ที่ตาย (dead cell) ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น การวัดกิจกรรมของการเมทาบอลิก (metabolic activity) ของเซลล์

ซึ่งการวัด metabolic activity เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและเป็นที่นิยมมากที่สุด (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, 2554; บริษัท กิบไทย จำกัด, 2015)

วิธีการวัด metabolic activity ที่นิยมคือ 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay เป็นวิธีการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ทำให้สามารถโดยคำนวณและรายงานค่าเป็นร้อยละความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ได้ โดยเอนไซม์ succinic dehydrogenase (SDH) จะเปลี่ยน succinate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์คือ fumarate ที่มี flavin adenine dinucleotide (FAD) ทำหน้าที่เป็น redoc cofactor ซึ่งสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงิน (ภาพที่ 2.4) ส่วนวิธีการอื่น ๆ ที่ใช้วัด metabolic activity เช่น 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay เป็นการวัด mitochondrial reductase โดยเมื่อ MTT หรือ XTT ถูกริดิวซ์ด้วย mitochondrial reductase จะทำให้สีของสารเปลี่ยนเป็นสีม่วงของสีม่วงของ formazan ความเข้มของสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้น (บริษัท กิบไทย จำกัด, 2015)



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาของ MTT

ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

5. แบบจำลองการย่อยของมนุษย์

เป็นการเลียนแบบระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (simulated gastro-intestinal digestion) ที่เกี่ยวของกับการยอยและการดูดซึมสารอาหาร อวัยวะที่ถูกเลียนแบบในแบบจำลองนี้ คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไสเล็ก โดยจะเลียนแบบสวนของเหลวตาง ๆ เชน น้ำลาย น้ำยอย คา pH และระยะเวลาที่อาหารอยูในแตละอวัยวะ นิยมใช้เพื่อศึกษาปริมาณสารชีวภาพความพรอม

นำไปใช (bioaccessibility) และชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ที่แสดงถึงความสามารถในการปลดปลอยของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (bioactive compound) ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

ปริมาณสารชีวภาพความพรอมนำไปใช (bioaccessibility) หมายถึง ปริมาณของสวนประกอบของอาหารที่มีอยูในระบบทางเดินอาหาร เปนผลที่ไดจากการปลดปลอยออกมาจากระบบเมทริกซ์ของอาหาร (food matrix) และอาจจะถูกดูดซึมผานทางผนังสำไส้ (intestinal barrier) ได้ ส่วนชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) หมายถึง สวนของสารประกอบที่ถูกยอยและพรอมที่จะถูกนำไปใช โดยนำเข้าสู่ร่างกายและสามารถเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตได้

การประยุกต์ใช้แบบจำลองการย่อยของมนุษย์ นอกเหนือจากสารอาหารชนิดต่าง ๆ ในระบบเมทริกซ์ของอาหารแล้วยังสามารถใชในการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อศึกษาถึงความเสถียรของสารเมื่อผานการระบบยอยอาหาร (digestion stability) การขนสงสารไปยังลำไส (transport) และกระบวนการดูกซึมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น ๆ ได้แตอยางไรก็ตาม แบบจำลองการย่อยของมนุษย์จัดเปนสภาวะที่คงที่ (static) ซึ่งในสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในกระบวนการยอยอาหารในมนุษยนั้นเปนระบบที่มีการเคลื่อนที่ (dynamic) เช่น การบีบรัดของสำไส การผสม ซึ่งแบบจำลองการย่อยของมนุษย์ไมสามารถที่จะสะท้อนถึงปัจจัยเหล่านั้นได้ ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษากากกาแฟและกากกาแฟด้วยแบบจำลองการย่อยของมนุษย์มากขึ้น ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการประยุกต์ใช้แบบจำลองการย่อยของมนุษย์กับกาแฟและกากกาแฟ

ตัวอย่าง	สารสกัด	สารที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	การค้นพบที่สำคัญ	อ้างอิง
กาแฟ	น้ำ	สารประกอบฟีนอล	พบฤทธิ์การยับยั้งการย่อยสลายไขมันในแบบจำลองการย่อยของมนุษย์ของสารสกัดจากกาแฟ	Cha et al. (2012)
กากกาแฟ	เอทานอล	-	พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในแบบจำลองการย่อยของมนุษย์ของสารสกัดจากกากกาแฟ	Compos-Vega et al. (2015)
กากกาแฟ	-	สารประกอบฟีนอล	-พบฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ (anti-Inflammatory activity) ในแบบจำลองการย่อยของมนุษย์ของกากกาแฟ	López-Barrera et al. (2016)

29