ผลของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่วต่อกระบวนการหายของแผล; ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การสร้างคอลลาเจนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

Effects of Roasted Coffee Bean Extract on Wound Healing Process; Antioxidant Activities, Collagen Synthesis and Migration of Fibroblasts

ชญานิศ สัญญารักษ์ (Chayanit Sanyarak)* สุพัตรา ปรศุพัฒนา (Supatra Porasuphatana)**

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่วต่อการหายของแผล โดยการศึกษาการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP และ ORAC รวมถึงศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังด้วยวิธี Scratch test ตัวอย่างสารสกัดเตรียมจากเมล็ดกาแฟคั่วสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้า ชนิดคั่วระดับเข้มและอ่อน สกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น จำนวน 8 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดในสารสกัด A-L-M (208.94±4.36 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันก็พบว่าสารสกัด A-L-M มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตัวอย่างอื่น ทั้งโดยวิธี FRAP และ ORAC (10.13±0.19 และ 27.75±3.14 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด ตามลำดับ) การทดสอบการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่าสารสกัด A-L-M มีร้อยละการสร้างคอลลาเจนของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 11.35±2.97 และการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง แสดงให้เห็นร้อยละที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การศึกษายังแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างคอลลาเจนกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งคาดว่ามีส่วนช่วยให้กระบวนการหายของแผลเกิดได้เร็วขึ้น

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of roasted coffee bean extract on wound healing are collagen synthesis, total phenol content (TPC) by Folin-Ciocalteu method, antioxidant activities by FRAP and ORAC assay including ability of fibroblast cell migration by scratch test. Tested samples were prepared from Arabica and Robusta roasted coffee bean (A & R) with different degrees of roasting; dark and light (D & L) and extracted by methanol and distilled water (M & DW) to obtain eight extracts. The result showed total phenol content was found to be the highest in A-L-M (208.94±4.36 µg gallic acid/mg extract) in relation to the highest antioxidant activities in A-L-M as determined by FRAP and ORAC assays (10.13±0.19 and 27.75±3.14 µg Trolox/ mg extract, respectively). A-L-M also exhibited the highest ability of collagen synthesis in fibroblast at 11.35±2.97%. Scratch test assay showed that A-L-M was capable of increasing cell migration. In addition, the study showed correlation between collagen synthesis with antioxidant activities (r^2 = 0.9301 (FRAP), 0.8917 (ORAC), $p<0.05$) and migration of fibroblasts (r^2 = 0.8492, $p<0.05$). It possibly increases epithelial proliferation and promoting the wound healing process.

คำสำคัญ: สารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว การหายของแผล การสร้างคอลลาเจน

Keywords: Coffee bean extract, Wound healing, Collagen synthesis

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ความงามและสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

โดยทั่วไปเมื่อเกิดบาดแผลที่บริเวณผิวหนัง ร่างกายจะมีกลไกการซ่อมแซมบาดแผลหรือกระบวนการหายของแผล (wound healing) เกิดขึ้นเอง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงและพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องแตกต่างกันไป แบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ได้แก่ กระบวนการห้ามเลือด (hemostasis) การอักเสบ (inflammatory) การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (proliferation) และระยะการปรับรูปร่าง (remodeling) (Guo, DiPietro, 2010) ปัจจัยหนึ่งซึ่งมีผลต่อการหายของแผลนั่นคือ อนุมูลอิสระ (free radical) ที่อาจได้รับจากภายนอกร่างกาย เช่น การสูบบุหรี่ การสัมผัสแสงแดด หรืออนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายจากกระบวนการต่างๆ อาทิ กระบวนการเมตาบอลิซึมที่มีการเผาผลาญอาหารเพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน เช่น กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน การเคลื่อนตัวของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบมายังบริเวณบาดแผล เป็นต้น อย่างไรก็ตามร่างกายเองจะมีระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งเป็นกลไกที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการถูกทำลายของของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ จากสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายและช่วยให้กระบวนการหายของแผลสามารถดำเนินไปได้อย่างปกติ

ปัจจุบันมีพืชและสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกศึกษาเกี่ยวกับผลต่อการหายของแผล ในขณะที่กาแฟ ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีการรายงาน แต่ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องไม่มากนักเมื่อเทียบกับชนิดอื่น สำหรับสายพันธุ์กาแฟที่นิยมปลูกและมีความสำคัญทางการค้ามีด้วยกัน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ อาราบิก้า (*Coffea Arabica*) และโรบัสต้า (*Coffea canephora*) ในปัจจุบันนอกจากกาแฟจะเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายแล้ว ยังถูกนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ด้านความงามและใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เพื่อความงามหลากหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์สำหรับขัดผิว มาร์คผิว สบู่ เนื่องจากคุณสมบัติของกาแฟที่มีสีและกลิ่นหอมเฉพาะตัว ทั้งยังมีสารองค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) ได้แก่ กรดคลอโรเจนิก (chlorogenic acid) และสารอนุพันธ์ ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) และกรดคูมาริก (coumaric acid) เป็นต้น (Hecimovic et al., 2011; Vignoli et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญอื่นๆ ได้แก่ คาเฟอีน (Caffeine) ไตรโกเนลลีน (trigonelline) เป็นต้น (Ky et al., 2001) จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวกับการรักษาบาดแผลโดยใช้กาแฟ พบมีการใช้ผงกาแฟคั่วในการรักษาบาดแผลจากงานวิจัยของ Yuwono (2014) ซึ่งมีการศึกษาวิธีการรักษาบาดแผลรูปแบบใหม่ โดยใช้โรยผงกาแฟปิดที่บริเวณบาดแผลกับผู้ป่วยเบาหวาน ข้ออักเสบในเด็ก และผู้ที่มีภาวะผิดปกติของเส้นเลือด เป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ พบว่า กาแฟช่วยให้แผลหายได้เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Hailemeskel (2016) ซึ่งรายงานกรณีศึกษา การใช้ผงกาแฟคั่วที่เสร็จใหม่บดละเอียดในการรักษาบาดแผลของผู้ที่ได้รับบาดเจ็บเป็นแผลไหม้อย่างรุนแรงจากการถูกน้ำร้อนลวก ก็พบว่าบาดแผลดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและประมาณ 3 สัปดาห์ แผลก็สามารถหายได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Kenisa et al. (2012) ซึ่งพบว่ากาแฟมีผลช่วยส่งเสริมกระบวนการหายของแผลได้ โดยมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนเซลล์ต่างๆ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ พลาสมาเซลล์ จำนวนหลอดเลือดฝอย รวมทั้งเซลล์ไฟโบร บลาสต์ จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำกาแฟมาใช้ในการรักษาบาดแผล อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับกาแฟและการหายของแผล โดยเฉพาะกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผลในระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่นั้น ยังไม่มีการอธิบายที่ชัดเจนและยังไม่พบว่ามีการศึกษา ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่วต่อคอลลาเจน ตลอดจนศึกษาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง รวมไปถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเมล็ดกาแฟ ที่อาจมีความสัมพันธ์ต่อการหายของแผล

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การสร้างคอลลาเจนและความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดเมล็ดกาแฟ

ชั่งตัวอย่างผงกาแฟทั้งสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้า 60 กรัม ต่อสารละลายที่ใช้สกัด ได้แก่ น้ำกลั่นและ 80% เมทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร โดยกวนผสมด้วยเครื่องผสมสารแบบแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางและกรองผ่านกระดาษกรอง สำหรับตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) ส่วนตัวอย่างที่สกัดด้วย 80% เมทานอล จะถูกนำไประเหยแยกตัวทำละลายก่อน ด้วยเครื่องเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมล็ดกาแฟ

2.1 การทดสอบด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจาก Jeong et al. (2013) ซึ่งใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

การเตรียมสาร

1. เตรียม FRAP reagent โดยผสมสารละลาย 300 mM acetate buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ 10 mM TPTZ (2, 4, 6-Tripyridyl-s-Triazine) ที่ละลายด้วย 40 mM HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของ buffer: $FeCl_3$: TPTZ = 10: 1: 1) จะได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน นำไปทดสอบปฏิกิริยาทันที

2. เตรียมสารตัวอย่าง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัด 0.05 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

ปิเปต FRAP reagent ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและตัวอย่างควบคุม (น้ำกลั่น) ปริมาตรตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader แทนค่าในสมการความสัมพันธ์ของสารมาตรฐาน แสดงผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ Trolox equivalence เปรียบเทียบกับ 1 มิลลิกรัมของสารสกัด

2.2 การทดสอบด้วยวิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay ดัดแปลงจาก Davalos et al. (2004) ซึ่งใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

การเตรียมสาร

1. เตรียม 75 mM Phosphate buffer pH 7.4 จาก Na_2HPO_4 และ KH_2PO_4

2. เตรียม 25 nM Fluorescein จากความเข้มข้น 0.5 mM แล้วเจือจางเป็น 10 μM และ 25 nM ตามลำดับ ละลายใน 75 mM phosphate buffer

3. ชั่ง 2, 2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 0.423 กรัม ละลายด้วย 75 mM Phosphate buffer จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

4. เตรียมสารตัวอย่าง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัด 0.05 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

ปิเปต fluorescein ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมตัวอย่างทดสอบ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและตัวอย่างควบคุม (phosphate buffer) ปริมาตรตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย AAPH ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 และ 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrofluorometer (รุ่น SPECTRA MAX GEMINI EM) ซึ่งจะอ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) แทนค่าในสมการความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน Trolox แล้วแสดงในรูปของ Trolox equivalence เปรียบเทียบกับ 1 มิลลิกรัมของสารสกัด

3. การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ใช้วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งดัดแปลงจาก Cindric et al. (2011) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน

การเตรียมสาร

1. เตรียม 10% Folin-Ciocalteu reagent โดยปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

2. เตรียม 20% sodium carbonate โดย ชั่ง Na_2CO_3 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารตัวอย่าง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัด 0.25 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

ปิเปตสารสกัดความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยทำการทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นฟีนอลิกจากสมการความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน gallic acid และแสดงค่าความเข้มข้นของฟีนอลิกในรูปของ gallic acid equivalence เปรียบเทียบกับ 1 มิลลิกรัมของสารสกัด

4. การศึกษาการสร้างคอลลาเจนของสารสกัดเมล็ดกาแฟ

ทดสอบหาปริมาณคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (human dermal fibroblasts adult; HDFa) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Sirius red/fast green collagen staining kit (Chondrex, USA) ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Limtrakul et al. (2016)

การเตรียมสาร

1. เตรียมชุดน้ำยาสำเร็จรูป ซึ่งประกอบไปด้วย dye solution และ dye extraction buffer

2. เตรียมน้ำยา Kahle fixative ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากส่วนผสมของ น้ำกลั่น ปริมาตร 60 มิลลิลิตร 98% ethanol ปริมาตร 28 มิลลิลิตร 37% formaldehyde ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารตัวอย่าง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัด 0.25 มิลลิกรัม ละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่ปราศจากซีรัม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน 24-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ปราศจากซีรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมผลบวกใช้วิตามินซี (Ascorbic acid) ส่วนกลุ่มควบคุมจะเติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มต่ออีกประมาณ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นเติม Kahle fixative ลงให้ท่วมเซลล์เล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วย PBS อีกครั้ง เติม dye solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงดูด dye solution ออก แล้วล้างเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำใส จากนั้นเติม dye extraction buffer ลงในแต่ละหลุม โดยทำการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 และ 605 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณปริมาณของคอลลาเจนดังสมการ

$$\text{Collagen } (\mu g/\text{section}) = \text{OD 540 value} - \frac{(\text{OD 605 value} \times 0.291)}{0.0378}$$

5. การศึกษาความสามารถของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่วต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง

การทดสอบสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง ใช้วิธีที่เรียกว่า scratch assay เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการสมานแผลของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว ซึ่งดัดแปลงวิธีจาก Ascione et al. (2016) โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน 24-well plate หลุมละประมาณ 10,000-50,000 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเป็นชั้นเดียว (monolayer) จนเต็มพื้นที่ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วใช้ปิเปตทิปปริมาตร 200 ไมโครลิตร (p200 pipette tip) ขูดเซลล์โดยลากแบ่งครึ่งวงกลมตั้งแต่ขอบบนสุดจนถึงขอบล่างสุดของหลุม เพื่อให้เกิดเป็นช่องว่างตรงกลาง ล้างด้วย PBS เพื่อนำเศษเซลล์ที่ถูกขูดออก จากนั้นเติมสารทดสอบความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กรองผ่าน sterile syringe filter (No.0.2 μm) และผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) สำหรับกลุ่มควบคุมผลบวก คือ วิตามินซี (ascorbic acid) และกลุ่มควบคุมจะเติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตรวจวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ ณ เวลา 0, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง โดยถ่ายภาพด้วยกล้อง EVOS^{TM} FL Auto 2 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA) แล้วประเมินความสามารถในการเคลื่อนที่เข้ามาชิดกันของเซลล์ โดยการวัดระยะห่างหรือช่องว่าง (gap) ที่ลดลงของเซลล์ทั้งสองด้าน ด้วยโปรแกรม ImageJ จากนั้นคำนวณออกมาในรูปของร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ (%cell migration) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยให้ค่าระยะห่าง ณ ชั่วโมงที่ 0 เท่ากับร้อยละ 100

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติพรรณนา (descriptive statistic) อธิบายผลการทดลอง โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean + SD) ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสารสกัดแต่ละกลุ่มทั้ง 8 กลุ่ม จะใช้สถิติ One-way ANOVA และใช้ Pearson correlation ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปร โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (p-value < 0.05)

ผลการวิจัย

1. ผลการเตรียมสารสกัดกาแฟ

เมื่อนำเมล็ดกาแฟอาราบิก้าและโรบัสต้าคั่วที่บดแบบละเอียด ผ่านขั้นตอนของการสกัดสาร จะได้สารสกัดจำนวน 8 ตัวอย่าง ดังนี้

1. กาแฟอาราบิก้า คั่วอ่อน ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (A-L-DW)
2. กาแฟอาราบิก้า คั่วอ่อน ที่สกัดด้วยเมทานอล (A-L-M)
3. กาแฟอาราบิก้า คั่วแก่ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (A-D-DW)
4. กาแฟอาราบิก้า คั่วแก่ ที่สกัดด้วยเมทานอล (A-D-M)
5. กาแฟโรบัสต้า คั่วอ่อน ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (R-L-DW)
6. กาแฟโรบัสต้า คั่วอ่อน ที่สกัดด้วยเมทานอล (R-L-M)
7. กาแฟโรบัสต้า คั่วแก่ ที่สกัดด้วยน้ำกลั่น (R-D-DW)
8. กาแฟโรบัสต้า คั่วแก่ ที่สกัดด้วยเมทานอล (R-D-M)

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดที่ได้จากตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล ทั้งกาแฟอาราบิก้าและโรบัสต้าจะมีสีน้ำตาลใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดที่ได้จากตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น จะมีลักษณะเป็นผงแห้งละเอียดกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดแห้ง ในส่วนน้ำหนักของสารที่สกัดที่ได้ และค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดเมื่อเทียบกับน้ำหนักสารสกัดแห้ง (%yield) พบว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมากกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล โดยสารสกัด A-L-DW ได้ร้อยละผลผลิต เท่ากับ 13.88 (8.33 กรัม) มากกว่าสารสกัด A-L-M ซึ่งได้ผลผลิตร้อยละ 6.67 (4.00 กรัม) และสารสกัด A-D-DW ได้ร้อยละผลผลิต เท่ากับ 15.53 (9.32 กรัม) ซึ่งมากกว่าสารสกัด A-D-M ที่ได้ร้อยละผลผลิต เท่ากับ 7.50 (4.50 กรัม) เช่นเดียวกันในกลุ่มกาแฟโรบัสต้า ก็พบว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตมากกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล แสดงดังตารางที่ 1

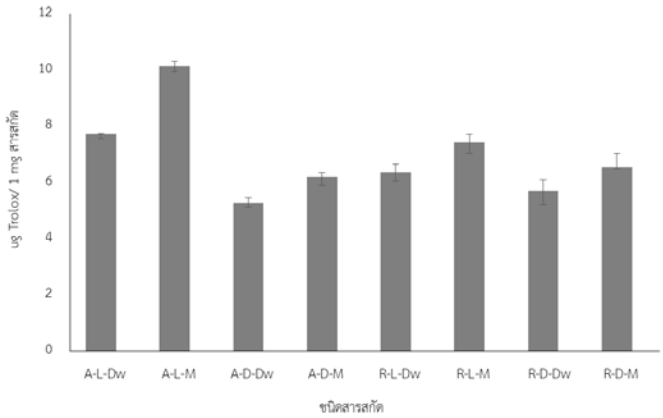
ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละผลผลิตของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว (%yield)

ชนิดสารสกัด	A-L-DW	A-L-M	A-D-DW	A-D-M	R-L-DW	R-L-M	R-D-DW	R-D-M
น้ำหนัก (กรัม)	8.33	4.00	9.32	4.50	9.25	4.10	9.79	5.26
%yield	13.88	6.67	15.53	7.50	15.42	6.83	16.32	8.77

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

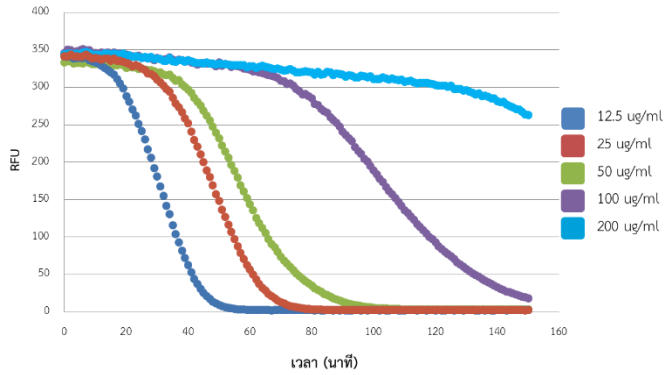
สารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ โดยมีค่าสูงสุดในตัวอย่างสารสกัด A-L-M ซึ่งมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox เท่ากับ 10.13 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด ส่วนสารสกัดอื่น ได้แก่ A-L-DW, R-L-M, R-D-M, R-L-DW, A-D-M, R-D-DW และ R-L-DW พบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 7.73, 7.42, 6.55, 6.35, 6.19, 5.69 และ 5.26 ไมโครกรัมของ Trolox ต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 1

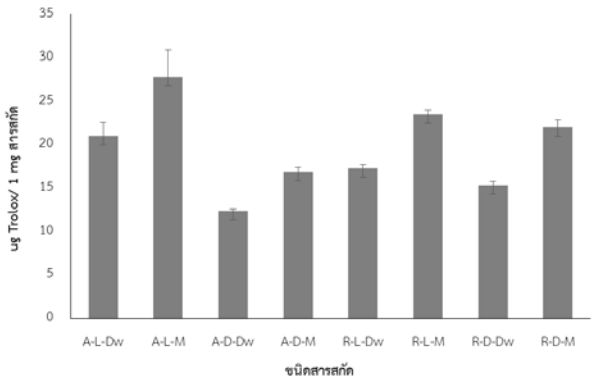


ภาพที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี FRAP (n = 5)

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

เป็นวิธีการทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล จากภาพที่ 2ก ในที่นี้ยกตัวอย่างสารสกัด A-L-DW ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น ทำให้การเรืองแสงของฟลูออเรสเซนท์สามารถคงอยู่ได้นานขึ้น แสดงถึงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลหรือมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน





(ข)

ภาพที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ORAC (n = 5)

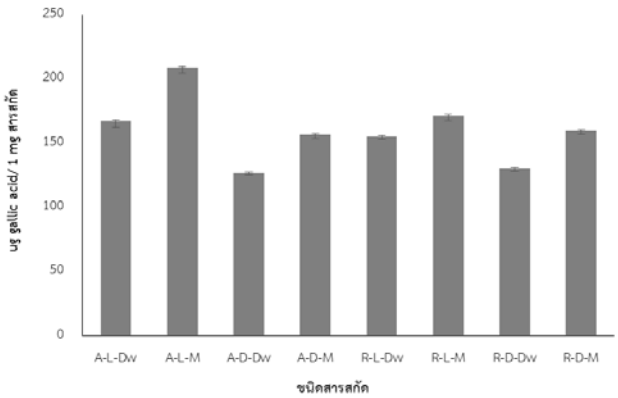
(ก) การทดสอบความสามารถของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิล

(ข) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี ORAC ของสารสกัดทดสอบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของสารสกัดทั้ง 8 ตัวอย่าง โดยเลือกที่ความเข้มข้นสาร 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แทนค่าในสมการความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐาน Trolox แล้วแสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรูปของ Trolox equivalence เปรียบเทียบกับ 1 มิลลิกรัมของสารสกัด แสดงดังภาพที่ 2ข พบว่า สารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัด A-L-M มีค่าสูงสุด เท่ากับ 27.75 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด รองลงมาคือ R-L-M, R-D-M, A-L-DW, R-L-DW, A-D-M, R-D-DW และ A-D-DW ซึ่งมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 23.50, 21.98, 21.01, 17.28, 16.89, 15.30 และ 12.36 ไมโครกรัม Trolox ต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด ตามลำดับ

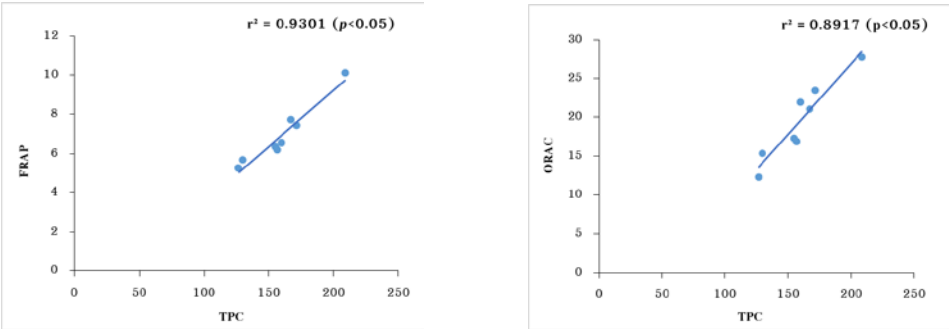
3. ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยมีค่าสูงสุดในตัวอย่างสารสกัด A-L-M ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 208.94 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด รองลงมาคือ สารสกัด R-L-M, A-L-DW, R-D-M, A-D-M, R-L-DW, R-L-DW และ R-D-DW พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 171.45, 166.98, 159.76, 156.63, 154.82 และ 126.51 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด ตามลำดับ ($y = 0.0102x + 0.0058$, $r^2 = 0.9981$) แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (n = 5)

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสารประกอบฟีนอลลิกรวม แสดงดังภาพที่ 4 พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทั้งโดยวิธี FRAP และ ORAC

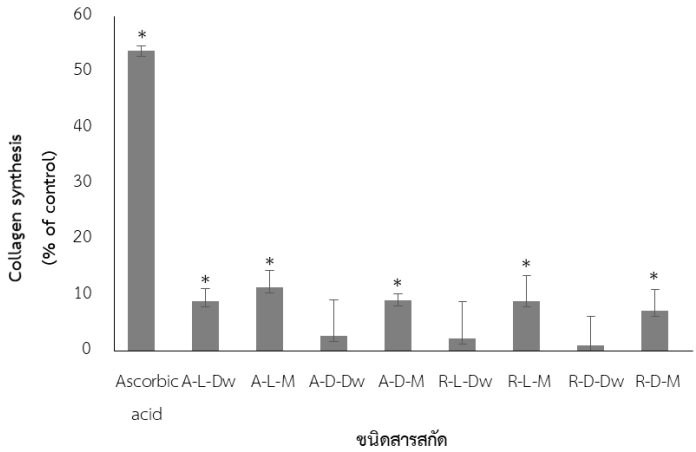


(ก) (ข)

ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบปริมาณฟีนอลลิกรวมและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี (ก) FRAP และ (ข) ORAC

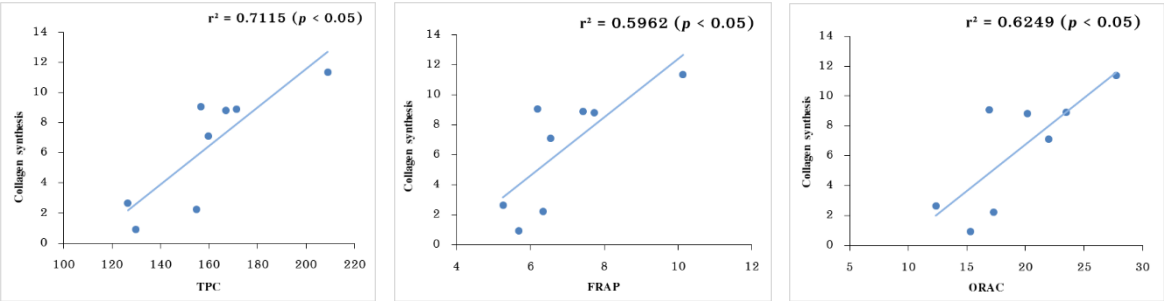
4. ผลการทดสอบการสร้างคอลลาเจน

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่บ่มกับวิตามินซีมีการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และในกลุ่มสารตัวอย่างเพิ่มการสร้างคอลลาเจนที่แตกต่างกัน โดยสารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ให้สร้างคอลลาเจนได้ดีกว่าสารตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำ โดยในกลุ่มสารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งได้แก่ A-L-M พบว่ามีค่าร้อยละสร้างคอลลาเจน (% collagen synthesis) สูงสุดเมื่อเทียบกับตัวควบคุม เท่ากับ 11.35 รองลงมาคือ A-D-M, R-L-M และ R-D-M ที่มีค่าร้อยละสร้างคอลลาเจนของเซลล์ เท่ากับ 9.08, 8.91 และ 7.10 ตามลำดับ โดยพบว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) นอกจากนี้ เซลล์ที่ทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น นั่นคือ A-L-DW ซึ่งมีค่าร้อยละการสร้างคอลลาเจน เท่ากับ 8.83 ก็มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p<0.05$) ส่วนเซลล์ที่ทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างอื่นๆ ที่สกัดด้วยน้ำ ได้แก่ A-D-DW, R-L-DW และ R-D-DW มีค่าร้อยละการสร้างคอลลาเจน เท่ากับ 2.65, 2.24 และ 0.93 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยสารสกัดตัวอย่างทั้ง 8 ชนิด (n = 4)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบการสร้างคอลลาเจนและปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก รวมถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว จากภาพที่ 6 แสดงให้เห็นว่า การสร้างคอลลาเจนมีความสัมพันธ์ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทั้งโดยวิธี FRAP และ ORAC ด้วยเช่นกัน



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบการสร้างคอลลาเจน กับ (ก) ปริมาณฟีนอลลิกรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี (ข) FRAP และ (ค) ORAC

5. ผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง

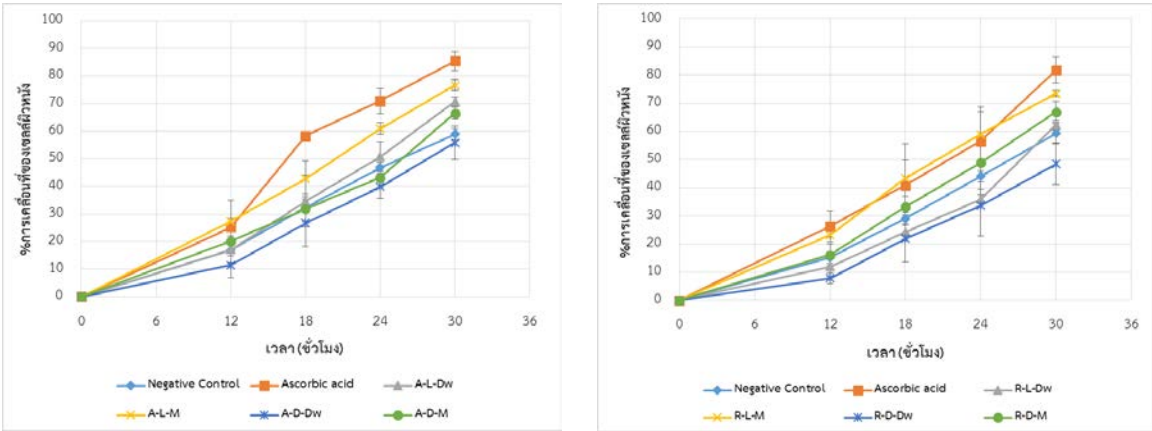
ผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว ดังตารางที่ 2 แสดงค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ ณ ช่วงเวลา 0, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ของ 2 กลุ่ม (รอบการทดสอบ) ได้แก่ กลุ่มสารสกัดกาแฟอาราบิก้าและกลุ่มสารสกัดกาแฟโรบัสต้า เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง ของสารสกัดกาแฟอาราบิก้าและโรบัสต้า ณ เวลา 0, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง (n = 3)

ชนิดสารสกัด	ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ ณ เวลา				
	0 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	30 ชั่วโมง
Negative Control I	0	16.9±4.9	32.3±5.0	46.8±2.0	59.0±2.0
Ascorbic acid I	0	25.2±3.2*	58.3±0.6*	70.9±4.5*	85.5±3.5*
A-L-Dw	0	17.1±4.9	34.7±9.2	50.8±5.3	70.7±1.5*
A-L-M	0	27.4±7.4*	42.8±6.5*	61.0±2.2*	76.7±2.0*
A-D-Dw	0	11.5±4.7	26.7±8.6	39.9±4.4	55.8±6.0
A-D-M	0	20.1±5.4	31.9±1.4	43.2±3.7	66.5±2.3
Negative Control II	0	15.2±2.2	29.0±2.4	44.1±1.9	59.3±3.7
Ascorbic acid II	0	26.3±5.4*	49.1±8.9*	56.5±12.1*	81.8±4.7*
R-L-Dw	0	12.0±3.8	24.3±2.9	35.9±1.6	62.4±1.8
R-L-M	0	23.2±4.7*	43.3±12.2*	58.9±8.0*	73.5±1.1*
R-D-Dw	0	7.8±2.0*	21.9±8.4*	33.8±11.0*	48.5±7.3*
R-D-M	0	16.2±3.8	33.3±3.7	49.0±9.6	67.0±3.7*

**แตกต่างจากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ ช่วงเวลานั้น*

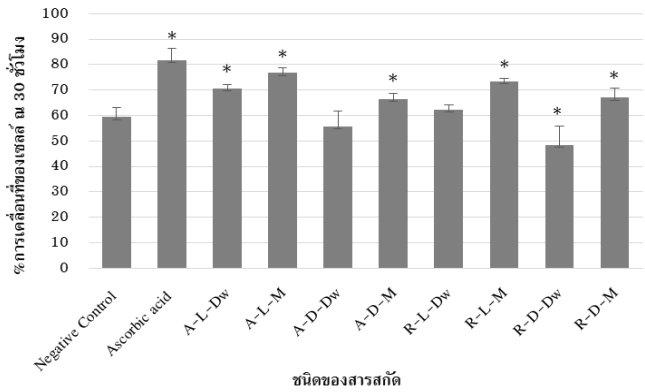
เมื่อพิจารณาแนวโน้มในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว ดังภาพที่ 8 จะเห็นได้ว่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง (%cell migration) ณ เวลา 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง นั่นคือเมื่อเวลาผ่านไป เซลล์ผิวหนังทั้งสองด้านมีการเคลื่อนตัวเข้ามาชิดกันของเซลล์



(ก) (ข)

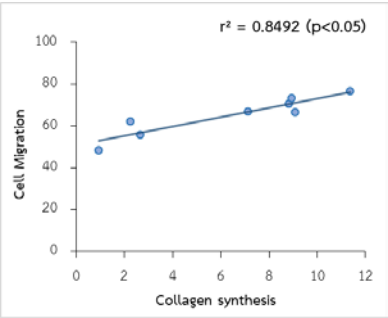
ภาพที่ 8 แนวโน้มการเคลื่อนตัวของเซลล์ ณ เวลา 0, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ของกลุ่ม (ก) สารสกัดกาแฟอาราบิก้า (ข) สารสกัดกาแฟโรบัสต้า และตัวอย่างควบคุม (n = 3)

เมื่อนำข้อมูลร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังทุกกลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบ ณ ชั่วโมงสุดท้ายของการทดสอบ จะเห็นได้ว่า กลุ่มสารทดสอบที่สกัดด้วยเมทานอลมีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์สูงกว่ากลุ่มสารทดสอบที่สกัดด้วยน้ำกลั่นในทุกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งสารสกัด A-L-M มีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์สูงสุดคือร้อยละ 76.7 รองลงมาคือ สารสกัด R-L-M ที่มีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 73.5 ซึ่งค่อนข้างสูงใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบสารสกัดอื่นๆ ที่มีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ได้แก่ สารสกัด A-L-DW, R-D-M และ A-D-M โดยมีค่าร้อยละเท่ากับ 70.7, 67.0 และ 66.5 ตามลำดับ แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนสารสกัด R-L-DW และ A-D-DW มีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ เท่ากับ 62.4 และ 55.8 ตามลำดับ พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p>0.05$) ในขณะที่สารสกัด R-D-DW มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่ำสุด เท่ากับ 48.5 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบแนวโน้มการเคลื่อนของเซลล์ที่ระยะเวลา 30 ชั่วโมง ในการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง (n = 3)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของเซลล์และคุณสมบัติในการสร้างคอลลาเจนของสารสกัด ดังภาพที่ 10 พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่า การเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง จะขึ้นอยู่กับการสร้างคอลลาเจนของเซลล์นั่นเอง



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบการสร้างคอลลาเจนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เมล็ดกาแฟคั่วมีสารองค์ประกอบสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก จากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า สารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่นในทุกกลุ่มตัวอย่าง โดยมีค่าสูงสุดในตัวอย่างสารสกัด A-L-M รองลงมาคือ R-L-M เช่นเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยในเรื่องของระดับการคั่ว ก็พบว่า สารสกัดที่คั่วระดับเข้ม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมต่ำกว่าสารสกัดที่คั่วระดับอ่อน สอดคล้องกับคุณสมบัติของฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่คงตัวและสลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อนหรือที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส (Hecimovic et al., 2011) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว ใช้วิธีวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน 2 กลไก ได้แก่ วีธี FRAP ซึ่งอาศัยหลักการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และ ORAC ซึ่งอาศัยหลักการถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอม ผลการทดลอบแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่วทั้ง 2 กลไก ซึ่งมีแนวแน้วโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยสารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น โดยมีค่าสูงสุดในตัวอย่างสารสกัด A-L-M สอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทั้งโดยวิธี FRAP และ ORAC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังภาพที่ 20 แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดังกล่าว ส่วนหนึ่งอาจมีผลมาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลักที่พบในเมล็ดกาแฟ

ในการทดสอบการสร้างคอลลาเจนของเซลล์ไฟโบรบาสลต์จะใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ปราศจากซีรัม เนื่องจาก fetal bovine serum (FBS) ซึ่งโดยปกติมีการเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ อาจมีผลต่อการเจริญของเซลล์และรบกวนการทดสอบได้ จากผลการศึกษาพบว่า กลุ่มสารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอลทุกตัวอย่าง มีค่าร้อยละสร้างคอลลาเจนของเซลล์ (% collagen synthesis) สูงกว่าสารตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัด A-L-M มีค่าร้อยละการสร้างคอลลาเจนของเซลล์สูงสุด แสดงให้เห็นว่า กลุ่มสารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอล มีคุณสมบัติช่วยให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้างคอลลาเจนได้ดีกว่าสารตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว มีส่วนช่วยกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ให้มีการสร้างคอลลาเจน ในกระบวนการหายของแผลในระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ นอกจากนี้ในระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่จะมีการสร้างเนื้อเยื่อบุผิว

พร้อมกับมีการแบ่งตัวของเซลล์และเคลื่อนเข้ามาชิดกันของขอบบาดแผล ซึ่งในการศึกษา ได้มีการทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง โดยวิธี scratch test และประเมินการเคลื่อนที่เข้ามาชิดกันของเซลล์ (cell migration) ในแต่ละช่วงเวลา จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่วในการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง นั่นคือเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ผิวหนังทั้งสองด้านมีการเคลื่อนตัวเข้ามาชิดกันของเซลล์ เสมือนกับเคลื่อนเข้ามาชิดกันของขอบบาดแผลนั่นเอง ทั้งนี้การเคลื่อนที่เข้ามาชิดกันของเซลล์ดังกล่าว ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) เนื่องจากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี sulforhodamine B (SRB) ไม่พบการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มากกว่าตัวอย่างควบคุม (ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ) โดยผลการทดสอบ กลุ่มสารทดสอบที่สกัดด้วยเมทานอล มีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์มากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ในทุกกลุ่มตัวอย่าง ในส่วนของสารสกัด R-D-DW ที่พบว่ามีร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมนั้น อาจเป็นไปได้ว่า สารสกัดดังกล่าวมีความสามารถกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในการสร้างคอลลาเจนได้ต่ำมากเมื่อเทียบกับสารสกัดกลุ่มอื่น จากผลการทดสอบการสร้างคอลลาเจน ดังภาพที่ 5 จึงส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังได้น้อยและได้ผลร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ต่ำมากนั่นเอง นอกจากคุณสมบัติในการสร้างคอลลาเจนจะมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง แสดงดังภาพที่ 10 การสร้างคอลลาเจนยังมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ดังที่ได้กล่าวไป แสดงดังภาพที่ 6 จึงเป็นไปได้ว่า การเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังอาจมีผลมาจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่นกัน

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดกาแฟคั่ว ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมถึงความสามารถของสารสกัดในการกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ให้มีการสร้างคอลลาเจน ซึ่งสัมพันธ์กับความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนัง จากการศึกษายังพบความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างคอลลาเจนของเซลล์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณฟีนอลิกรวม ซึ่งคาดว่าคุณสมบัติดังกล่าวมีส่วนช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ผิวหนังและส่งผลให้กระบวนการหายของแผลเกิดได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ระดับการคั่วและชนิดการสกัด ถือเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและฤทธิ์ของสารสกัดทดสอบที่ได้ โดยพบว่า สารสกัดเมล็ดกาแฟชนิดคั่วอ่อน ที่สกัดด้วยเมทานอล ให้ผลของปริมาณสารสำคัญ สารประกอบฟีนอลลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงความสามารถในการสร้างคอลลาเจนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ได้ดีกว่าตัวอย่างอื่น ซึ่งจากองค์ความรู้ดังกล่าวจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนอีกคุณสมบัติหนึ่งของเมล็ดกาแฟคั่วและยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีวัตถุประสงค์ในการสมานแผล ซึ่งอาจเป็นผลิตภัณฑ์อีกทางเลือกหนึ่งของผู้บริโภคต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Ascione F, Vasaturo A, Caserta S, D' Esposito V, Formisano P, Guido S. Comparison between fibroblast wound healing and cell random migration assays in vitro. Exp Cell Res 2016; 347(1): 123-32.

Cindric IJ, Kunstic M, Zeiner M, Stingeder G, Rusak G. Sample preparation methods for the determination of the antioxidative capacity of apple juices. Croat Chem Acta 2011; 84(3): 435-438.

Davalos A, Gómez-Cordoves C, Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. J Agric Food Chem 2004; 52: 48-54.

Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res 2010; 89(3): 219-229.

Hailemeskel B, Fullas F. The use of freshly roasted coffee bean powder in the treatment of burn wound: A case report. Dermatol Open J 2016; 1(2): 42-46.

Hecimovic I, Belscak-Cvitanovic A, Horzic D, Komes D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. Food Chem 2011; 129: 991-1000.

Jeong JH, Jeong HR, Jo YN, Kim HJ, Lee U, Heo HJ. Antioxidant and neuronal cell protective effects of Columbia arabica coffee with different roasting conditions. Prev Nutr Food Sci 2013; 18(1): 30-7.

Kenisa YP, Istiati, Juliastuti WS. Effect of robusta coffee beans extract ointment on full thickness wound healing. Dent J 2012; 45(1): 52-57.

Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirota M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica L.* and *C. canephora P.* accessions. Food Chem 2001; 75(2): 223-230.

Limtrakul P, Yodkeeree S, Thippraphan P, Punfa W, Srisomboon J. Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of *Cassia fistula* flower butanolic extract. BMC Complement Altern Med 2016; 16: 497.

Vignoli JA, Viegas MC, Bassoli DG, Benassi MT. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. Food Res Int 2014; 61: 279-285.

Yuwono HS. The new paradigm of wound management using coffee powder. Glob j Surg 2014; 2(2): 25-29.