

ผลของสารสกัดกากกาแฟต่อการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของแอลฟาอะไมเลสและไลเปส และการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน

Effect of Coffee Ground Extract on Antioxidation, Inhibition of Alpha-Amylase and Lipase Activities, and Antiadipogenesis

อรณิชา ครองยุดิ* และ สุภัตสร วันสุทธะ

Ornicha Krongyut* and Supasson Wansutha

สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

Department of Traditional Thai Medicine, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University

*E-mail: Ornicha.k@udru.ac.th

Received: Sep 03, 2022

Revised: Sep 19, 2022

Accepted: Sep 26, 2022

บทคัดย่อ

กากกาแฟเป็นสารอินทรีย์เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกาแฟแปรรูปกาแฟที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกากกาแฟต่อการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส และการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน เมื่อนำสารสกัดกากกาแฟที่สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70% มาวิเคราะห์พบว่าสารสกัดกากกาแฟมีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด เท่ากับ 50.54 ± 0.08 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และ 5.03 ± 0.15 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($IC_{50} = 171.18 \pm 0.21$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ($IC_{50} = 152.71 \pm 0.37$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเอนไซม์ไลเปส ($IC_{50} = 131.08 \pm 1.94$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน โดยการลดการสะสมไขมันใน pre-adipocyte ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมันได้ การที่สารสกัดกากกาแฟมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส และฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันทำให้สารสกัดกากกาแฟมีศักยภาพที่จะนำไปต่อยอดในการผลิตเป็นสารควบคุมน้ำหนักต่อไป

คำสำคัญ: กากกาแฟ การต้านอนุมูลอิสระ แอลฟาอะไมเลส ไลเปส การยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน

Abstract

Coffee ground is an organic waste from the coffee processing industry containing a number of bioactive compounds. This research aimed to investigate the effect of coffee ground extract on antioxidation, inhibition of alpha-amylase and lipase activities and antiadipogenesis. When the 70% ethanol extract of coffee ground was analyzed, it was found that the extract had total phenolic content and total flavonoid content of 50.54 ± 0.08 mg of gallic acid equivalent/g of extract and 5.03 ± 0.15 mg of quercetin equivalent/g of extract, respectively. It also exhibited antioxidant activity ($IC_{50} = 171.18 \pm 0.21$ μ g/mL) and inhibitory effect on alpha-amylase activity ($IC_{50} = 152.71 \pm 0.37$ μ g/mL) and lipase activity ($IC_{50} = 131.08 \pm 1.94$ μ g/mL). Furthermore, it was found to have antiadipogenic activity by reducing lipid accumulation in pre-adipocyte; hence, unable to develop into adipocyte. As a consequence of having antioxidant activity, inhibitory effect on alpha-amylase and lipase and antiadipogenic activity, the coffee ground extract has the potential to be further developed to anti-obesity agents.

Keywords: Coffee ground, Antioxidation, Alpha-amylase, Lipase, Antiadipogenesis

1. บทนำ

โรคอ้วน คือ โรคเรื้อรังที่เกิดจากการมีปริมาณไขมัน และการสะสมของไขมันในร่างกายมากเกินไป โรคอ้วนจึงเป็น ปัญหาสุขภาพระดับโลก [1] และเป็นปัจจัยเสี่ยงที่อาจ ก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) โรคหลอดเลือด หัวใจตีบ (Cardiovascular disease) และโรคไขมันอุดตัน ในเส้นเลือด (Hyperlipidemia) [2] ในประเทศไทยปัญหา โรคอ้วนไม่เพียงแต่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ แต่ยังส่งผลกระทบ ในด้านเศรษฐกิจของประเทศ โดยประเมินจากค่าใช้จ่าย รักษาพยาบาลโรคอ้วนในแต่ละปี พบว่า ค่าใช้จ่ายในการ รักษาพยาบาลโรคอ้วนมีมูลค่าหลายหมื่นล้านบาทต่อปี [3] ปัจจุบันมีแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคอ้วนหลายวิธี ได้แก่ วิธีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม เช่น การออกกำลังกาย การควบคุมการบริโภคอาหาร การใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และยา รวมทั้งการรักษาทางการแพทย์ เช่น การผ่าตัดเย็บ กระเพาะ และการดูดไขมัน ซึ่งวิธีนี้จะต้องอยู่ภายใต้การ ควบคุมของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ [4]

การมีปริมาณไขมันและการสะสมของไขมันในร่างกาย มากเกินไปมีสาเหตุจากการได้รับสารอาหารในปริมาณที่มาก เกินความต้องการ ส่งผลให้เกิดการสะสมของไขมันอย่าง ต่อเนื่อง โดยเฉพาะอาหารกลุ่มแป้งและไขมัน ซึ่งต้องผ่านการ ย่อยและการดูดซึมสารอาหาร กระบวนการดังกล่าวต้องอาศัย การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Alpha-amylase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตหรือแป้ง และเอนไซม์ไลเปส (Lipase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยไขมัน หากมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส จะสามารถ ป้องกันการถูกดูดซึมแป้งและไขมันเข้าสู่ร่างกายได้ [3] ด้วย หลักการและกลไกดังกล่าว ปัจจุบันมีการใช้ยาที่ยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ Orlistat และ Acarbose ในการควบคุมและลดน้ำหนัก [5] อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มี ผลข้างเคียงจากการใช้ยา มีราคาสูง และเข้าถึงได้ยาก ด้วย เหตุนี้จึงมีความพยายามในการหาสารจากธรรมชาติ เพื่อเป็น ทางเลือกหนึ่งในการใช้ควบคุมและรักษาโรคอ้วน อีกทั้งการใช้ สารธรรมชาติหรือพืชสมุนไพร นอกจากจะมีประโยชน์สำหรับ นำมาใช้ป้องกันและรักษาโรคอ้วนแล้ว ยังส่งเสริมสุขภาพแบบ องค์รวมอีกด้วย

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสารที่ไม่เสถียรทำให้ เกิดปฏิกิริยาได้ว่องไว ดังนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุล ต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือ สารพันธุกรรม ภาวะที่อนุมูลอิสระมากเกินไปจะก่ออันตรายแก่ร่างกาย เรียก ภาวะนี้ว่า สภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) [6] ซึ่งโดยปกติร่างกายจะผลิตสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเอง แต่ อาจจะไม่เพียงพอต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะเมื่อมี ปัจจัยภายนอกที่ส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระ เช่น รังสี และ สารพิษต่าง ๆ การมีอนุมูลอิสระมากเกินไปในร่างกายจะกำจัด ได้ไม่ทันส่งผลให้เกิดความผิดปกติเกิดขึ้นกับร่างกาย เช่น โรค เกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ โรคเบาหวาน โรคอ้วน และ โรคกระดูก เป็นต้น

กากกาแฟ (Coffee ground) จัดเป็นสารอินทรีย์ที่ เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกาแฟแปรรูปกาแฟ และร้านกาแฟสด ทั่วไป กากกาแฟถือว่าเป็นกากของเสียที่ส่งผลกระทบต่อ สิ่งแวดล้อม เพราะมีปริมาณคาร์บอนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก [7] หากมีการทิ้งลงสู่แหล่งน้ำจะส่งผลให้ค่า Biochemical Oxygen Demand (BOD) หรือปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ ต้องการใช้ในการย่อยสลายอินทรีย์สารที่มีอยู่ในน้ำ ในน้ำมี ปริมาณสูงขึ้น และหากมีการจัดการกากกาแฟที่ไม่ดี อาจ กลายเป็นแหล่งสะสมของเชื้อราและแบคทีเรียต่าง ๆ ที่เป็น อันตรายต่อมนุษย์ได้ ดังนั้นกากกาแฟจึงเป็นสารที่เหลือทิ้งที่ ควรนำมาเพิ่มมูลค่า ในกากกาแฟมีองค์ประกอบสารสำคัญ หลายชนิด เช่น โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) กรด ไขมัน (Fatty acids) โปรตีน คาเฟอีน (Caffeine) สารประกอบ ฟีนอลิก (Phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และแร่ธาตุต่าง ๆ โดยชนิด และปริมาณของสารเหล่านี้ อาจ แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของกาแฟ แหล่งปลูก ขั้นตอนการ ผลิต และวิธีการสกัด กากกาแฟสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ หลายอย่าง เช่น เป็นเชื้อเพลิง วัสดุปรับปรุงดินสำหรับการ เพาะปลูก ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และ เวชสำอาง [8], [9] ส่วนในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา ผลของสารสกัดกากกาแฟต่อการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส และการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดจากกาแฟ

นำกากกาแฟที่บดละเอียดแล้วมาสกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70% (70% Ethanol) โดยใช้อัตราส่วน 1:2 ส่วน (กากกาแฟสด 1 กิโลกรัมต่อเอทานอล 2 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางหรือผ้ากรองที่สะอาด และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แยกส่วนกากออกมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำส่วนสารสกัดที่ได้จากการกรองไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อระเหยแห้งตัวทำละลายออกไป แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer จากนั้นคำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัด (% yield) แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการศึกษาลำดับต่อไป

2.2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด (Total phenolic content) ดัดแปลงจาก Aryal et al. [10] เตรียมสารสกัดจากกาแฟในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาผสมกับ Folin & Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และสารละลาย 20% Sodium carbonate ปริมาตร 125 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ในการทดลองนี้ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) และสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น รวมทั้งหาค่า Coefficient of determination (R^2) เมื่อได้กราฟมาตรฐานแล้วให้นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากชุดการทดลองของสารสกัดจากกาแฟมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน และรายงานค่าปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg of gallic acid equivalent/g of extract หรือ mg GAE/g extract)

2.3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด (Total flavonoid content) ดัดแปลงจาก Aryal et al. [10] เตรียมสารสกัดจากกาแฟในเมทานอล (Methanol) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัด

ปริมาตร 100 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลาย 5% Aluminum chloride ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 437 นาโนเมตร ในการทดลองนี้ใช้เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) และสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น รวมทั้งหาค่า Coefficient of determination (R^2) เมื่อได้กราฟมาตรฐานแล้วให้นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากชุดการทดลองของสารสกัดจากกาแฟมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน และรายงานค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัด (mg of quercetin equivalent/g of extract หรือ mg QE/g extract)

2.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษานี้ใช้วิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งดัดแปลงจาก Chu et al. [11] เตรียมสารสกัดจากกาแฟในเมทานอล ให้มีความเข้มข้นในช่วง 62.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดปริมาตร 150 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และคำนวณค่า % Inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

เมื่อ

Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

At = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลองที่มีสารสกัดจากกาแฟที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

นำค่า % Inhibition และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากกาแฟไปสร้างกราฟ และหาค่า 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) ในการทดลองนี้ใช้วิตามินซี (Vitamin C) ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

2.5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดัดแปลงจาก Worsztynowicz et al. [12] เตรียมสารสกัดจากกาแฟในน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้น

ในช่วง 62.5-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัด ปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาผสมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (ความเข้มข้น 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในกระบอกน้ำแข็ง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 1% Corn starch ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม Dinitrosalicylic (DNS) reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด (80-90 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณ % inhibition ดังแสดงข้างต้น นำค่า % Inhibition และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากกาแฟไปสร้างกราฟ และหาค่า 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) ในการทดลองนี้ใช้ยา Acarbose ที่มีความเข้มข้นในช่วง 6.25-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

2.6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ดัดแปลงจาก Lee et al. [13] เตรียมสารสกัดจากกาแฟในน้ำ ปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นในช่วง 62.5-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดปริมาตร 80 ไมโครลิตรมา ผสมกับสารละลาย Tris-HCl buffer ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) และสารละลาย Ethylene ditetraamine (EDTA) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย p-Nitrophenyl butyrate (p-NPB) ใน Dimethylformamide ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 403 นาโนเมตร และคำนวณ % inhibition ดัง แสดงข้างต้น นำค่า % Inhibition และความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากกาแฟไปสร้างกราฟ และหาค่า 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) ในการทดลองนี้ใช้ยา Orlistat ที่มีความเข้มข้นในช่วง 6.25-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน

2.7. การทดสอบความเป็นพิษต่อ pre-adipocyte

Pre-adipocyte คือเซลล์ประเภท fibroblast ที่ สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipocyte) ได้ โดยเมื่อ pre-adipocyte มีการสะสมไขมันภายในเซลล์ ก็จะกลายเป็น เซลล์ไขมัน

Pre-adipocyte ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 3T3-L1 pre-adipocyte (ATCC CL-173) ซึ่งได้จาก American Type Culture Collection และจัดอยู่ในระดับความปลอดภัยทางชีวภาพระดับที่ 1 (Biosafety Level 1)

การทดสอบความเป็นพิษต่อ pre-adipocyte ของ สารสกัดจากกาแฟ ใช้วิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay [14] ทำ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในถาดเพาะเลี้ยง 96-well โดยใช้ความหนาแน่นเซลล์ 20,000 cells/well เลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal calf serum (FCS) จนกระทั่งมีปริมาณเซลล์เต็ม (100% confluence) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเตรียม สารสกัดจากกาแฟ โดยใช้ความเข้มข้นในช่วง 31.25-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตรไป เติมให้กับ pre-adipocyte ที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการ ทดสอบความเป็นพิษต่อ pre-adipocyte โดยเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นเติม Dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan (Formazan) แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แสดงถึงปริมาณการอยู่รอดของ เซลล์ (Viability) แล้วคำนวณหาร้อยละความอยู่รอดของเซลล์ เทียบกับชุดควบคุม (Control) โดยรายงานผลเป็นร้อยละ ความอยู่รอดเทียบกับชุดควบคุม (% Viability)

2.8. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ ไขมัน

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน เป็นการทดสอบการยับยั้งการสะสมไขมันใน pre-adipocyte เพื่อไม่ให้เซลล์ดังกล่าวกลายเป็นเซลล์ไขมัน (Adipocyte) ซึ่งทำโดยเลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 pre-adipocyte ในถาดเพาะเลี้ยง 24-well โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์ 30,000 cells/well เพาะเลี้ยงในอาหารชนิด DMEM ที่มี 10% FCS จนกระทั่งมี ปริมาณเซลล์เต็มถาด จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารสำหรับชักนำ ให้เซลล์เกิดกระบวนการ differentiation ได้ โดยเลี้ยงเซลล์ ในอาหาร DM1 ที่มี 10% FCS, สารละลาย 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, สารละลาย dexamethasone (DEX) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

และอินซูลิน (Insulin) ความเข้มข้น 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยในอาหาร DM1 มีสารสกัดจากกาแฟความเข้มข้นต่าง ๆ (12.5-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นอาหาร DM2 ที่มี 10% FCS และอินซูลิน ความเข้มข้น 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้คงการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากกาแฟเดิม เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้น เพาะเลี้ยงในอาหาร AM ที่มี 10% FCS ต่อเป็นเวลา 2 วัน โดยให้คงการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากกาแฟเดิม จากนั้นตรวจวัดปริมาณการสร้างไขมัน และการสะสมไขมันภายในเซลล์ ด้วยวิธี Oil Red O staining assay ซึ่งมีขั้นตอน คือ ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) และตรึง (Fix) เซลล์ ด้วยสารละลาย 3.7% Formaldehyde เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม 0.2% Oil Red O บ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายสีย้อมออกจากเซลล์ด้วย 100% Isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปศึกษาด้วย Inverted microscope และนำไปวัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สีที่วัดได้บอกถึงปริมาณการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน จากนั้นคำนวณหาร้อยละปริมาณการสะสมไขมัน เทียบกับชุดควบคุม และรายงานผลเป็นปริมาณร้อยละการสะสมไขมันเทียบกับชุดควบคุม (% Lipid accumulation)

2.9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทำซ้ำในแต่ละตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ ($n = 3$) แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) และเปรียบเทียบกับความแตกต่างของข้อมูลแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA (SPSS 22.0) โดยพิจารณาอย่างสำคัญทางสถิติ เมื่อ p -value < 0.05

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. การเตรียมสารสกัดจากกาแฟ

จากการสกัดจากกาแฟด้วยเอทานอล พบว่า ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดจากกาแฟที่ได้ เป็นผงละเอียด มีสีน้ำตาลเข้ม สำหรับน้ำหนักที่ได้ เท่ากับ 3361.87 กรัม คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (% yield) เท่ากับ ร้อยละ 1.12 ของน้ำหนักจากกาแฟ

3.2. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกาแฟ

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกาแฟ โดยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากกาแฟมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 171.18 ± 0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.95 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 1) โดยปกติแล้วฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมักเป็นผลของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ดังนั้นจึงได้วิเคราะห์ปริมาณของสารดังกล่าวในสารสกัดจากกาแฟ ซึ่งพบว่าสารสกัดจากกาแฟมีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด เท่ากับ 50.54 ± 0.08 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด และ 5.03 ± 0.15 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ (Table 1)

จากงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่าอนุมูลอิสระ เช่น Reactive oxygen species (ROS) เป็น ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคอ้วน และโรคเรื้อรังต่าง ๆ หากเซลล์มีการสะสม ROS จะทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์ และเซลล์จะหลั่งสารไซโตไคน์ (Cytokines) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดภาวะ metabolic syndromes ได้ [15] หากเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นกับเซลล์ไขมันก็อาจทำให้เซลล์ไขมันมีการสะสมไขมันมากขึ้น และนำไปสู่โรคอ้วนได้ ดังนั้นการต้านอนุมูลอิสระจึงอาจช่วยลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคอ้วนได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่พบในบัวหลวง และโรสแมรี่ (Rosemary) มีฤทธิ์ต้านโรคอ้วนได้ [16], [17] ดังนั้นการที่สารสกัดจากกาแฟมีสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์อาจมีส่วนทำให้สารสกัดจากกาแฟมีฤทธิ์ต้านโรคอ้วนได้เช่นกัน

นอกจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีรายงานว่าสารจากกาแฟมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ อีก เช่น ลดระดับน้ำตาลในเลือด [18] ด้านการอักเสบ [19] และยับยั้งเอนไซม์ Matrix metalloproteinases ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) เช่น คอลลาเจน (Collagen) และอีลาสติน (Elastin) การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่น และเหี่ยวแห้ง

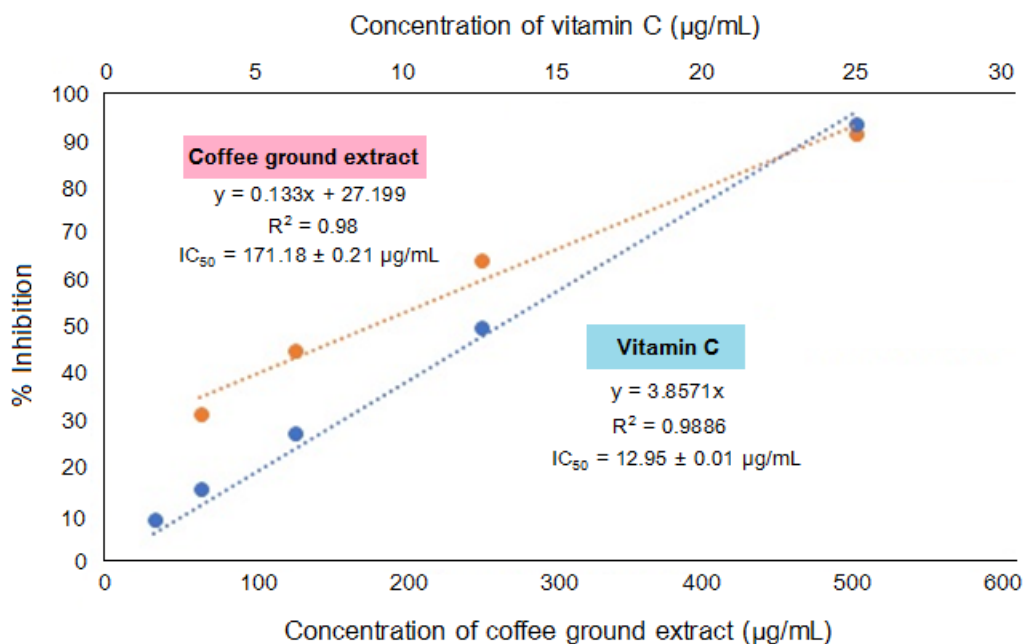


Figure 1 Antioxidant activity of coffee ground extract and vitamin C

Table 1 Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of coffee ground extract

Phytochemical content	Concentration	Standard	Standard curve* (Equation and R ²)
TPC	50.54 ± 0.08 mg GAE/g extract	Gallic acid	y = 0.0224x, R ² = 0.9938
TFC	5.03 ± 0.15 mg QE/g extract	Quercetin	y = 0.0176x, R ² = 0.9872

*y = measured optical density; x = concentration; R² = Coefficient of determination

3.3. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส

จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดจากกาแฟ พบว่าสารสกัดจากกาแฟมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 152.71 ± 0.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสน้อยกว่ายา Acarbose ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 32.42 ± 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 2) และพบว่าสารสกัดจากกาแฟมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 131.08 ± 1.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่ายา Orlistat ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 24.81 ± 0.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Figure 3) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าสารสกัดใบ

บัวหลวงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ดีมาก เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของยา Acarbose และยา Orlistat ตามลำดับ [16] การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส เป็นกลไกที่ยา Acarbose และยา Orlistat ใช้ในการควบคุมน้ำหนัก ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อคาร์โบไฮเดรต และไขมันไม่ถูกย่อยสลายก็ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์เพื่อไปสะสมในรูปของไขมันได้ การที่สารสกัดจากกาแฟมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส เช่นเดียวกับยา Acarbose และยา Orlistat จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากกาแฟอาจสามารถนำไปพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการควบคุมน้ำหนัก

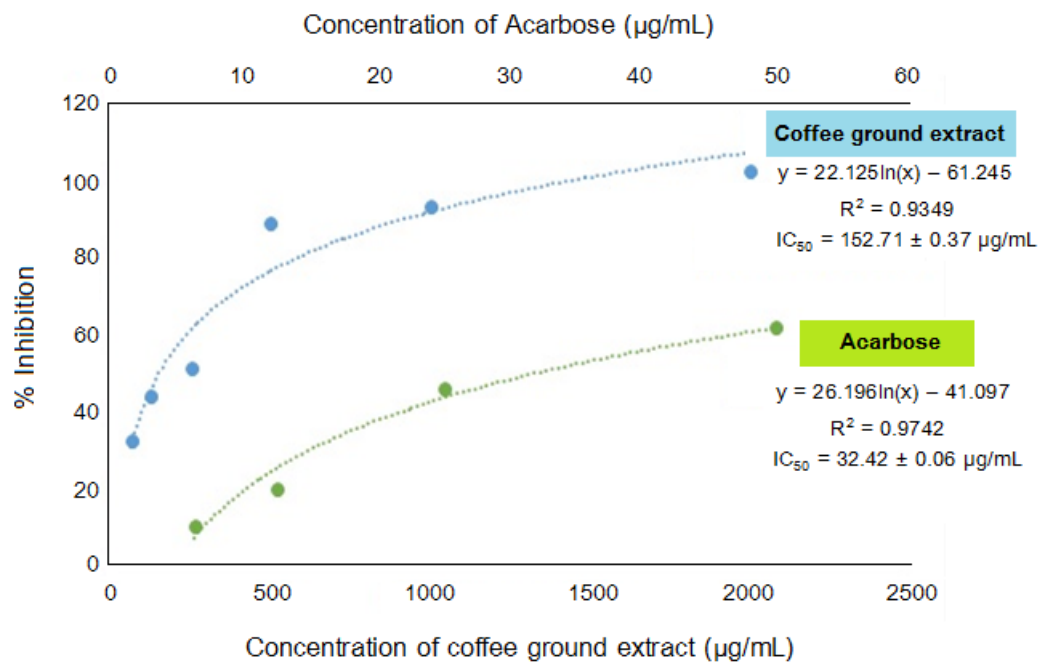


Figure 2 Inhibition of alpha-amylase activity by coffee ground extract and Acarbose

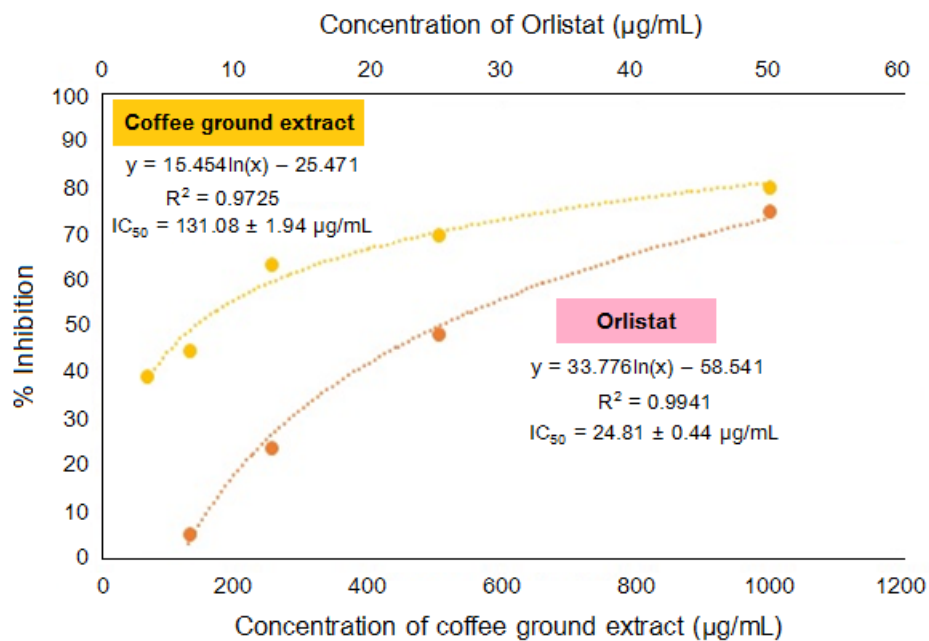


Figure 3 Inhibition of lipase activity by coffee ground extract and Orlistat

3.4. ความเป็นพิษต่อ pre-adipocyte

จากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อ pre-adipocyte ของสารสกัดจากกาแฟที่ความเข้มข้นในช่วง 31.25-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากกาแฟที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อ pre-adipocyte โดยค่าร้อยละความอยู่รอดเทียบกับชุดควบคุม (% Viability) ของ pre-adipocyte เท่ากับ 80.91 ± 1.04 และ 78.35 ± 0.99 % of control ตามลำดับ (Figure 4) ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกาแฟในการยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ไขมัน จึงเลือกเฉพาะความเข้มข้นของสารสกัดจากกาแฟในช่วงความเข้มข้น 12.5-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปทำการทดลอง เนื่องจากความเข้มข้นของสารสกัดจากกาแฟในช่วงนี้ไม่เป็นพิษต่อ pre-adipocyte นำความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไขมันนำไปทำการทดสอบต่อไป

3.5. การยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน เป็นการทดสอบการยับยั้งการสะสมไขมันใน pre-adipocyte เพื่อไม่ให้เซลล์ดังกล่าวเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ไขมัน (Adipocyte) ในการทดลองนี้ใช้สารสกัดจากกาแฟที่มีความเข้มข้นในช่วง 12.5-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากกาแฟที่มีความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสะสมไขมันใน pre-adipocyte ได้ โดยมีค่าร้อยละของการสะสมไขมันเทียบกับชุดควบคุม (% Lipid accumulation) เท่ากับ 43.28 ± 0.15 และ 26.56 ± 0.40 % of control (Figure 5) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการตรวจสอบการสะสมไขมันใน pre-adipocyte (Figure 6) ซึ่งพบว่า ในชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการให้สารสกัดจากกาแฟกับ pre-adipocyte ทำให้ pre-adipocyte มีการสะสมไขมันเป็นจำนวนมาก โดยสังเกตได้จากเซลล์มีการติดสี Oil Red O (ซึ่งย้อมติดไขมัน) เห็นเป็นสีแดงเป็นจำนวนมาก แต่เมื่อมีการให้สารสกัดจากกาแฟกับ pre-adipocyte จะเห็นการสะสมไขมันใน pre-adipocyte ลดลง ตามความเข้มข้นของสารสกัดจากกาแฟที่ให้เพิ่มขึ้น และเมื่อให้สารสกัดจากกาแฟที่มีความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ pre-adipocyte เซลล์แทบจะไม่มี การสะสมไขมัน เนื่องจากเซลล์มีการติดสี Oil Red O น้อยมาก ส่วนเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ undifferentiation คือ pre-adipocyte เมื่อเริ่มต้นการทดลองที่ยังไม่มีการกระตุ้นให้เข้าสู่กระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน (ยังไม่มี การกระตุ้นให้เซลล์สะสมไขมัน)

ดังนั้นเซลล์เหล่านี้จึงย้อมไม่ติดสี Oil Red O ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าเซลล์ที่ไม่มีการสะสมไขมันจะไม่มีการติดสี Oil Red O

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันได้ เช่น ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ (Alkaloids) และไกลโคไซด์ (Glycosides) [20] ส่วนกลไกที่สารเหล่านี้ใช้ในการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันยังไม่เป็นที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าอาจเกิดจากการที่สารดังกล่าวไปยับยั้งการสร้างหรือการทำงานของสารที่สำคัญในกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน เช่น Adiponectin, IL-6, Leptin, Fatty acid binding protein 4 (FABP4) และ Glucose transporter type 4 (GLUT4) หรืออาจเกิดจากการที่สารดังกล่าวไปรบกวนขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของ Pathway ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน เช่น Adenosine monophosphate-activated kinase (AMPK) pathway และ Phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K) pathway [20]

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากกาแฟมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์ไลเปส อีกทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันด้วยระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังเป็นเพียงการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป เช่น การทดลองในสัตว์ทดลอง และการทดลองทางคลินิก เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาพัฒนาต่อยอดเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อการควบคุมน้ำหนักต่อไป

5. References

- [1] Lin, X. and Li, H. 2021. Obesity: Epidemiology, pathophysiology, and therapeutics. **Frontiers in Endocrinology**. 12: 706978.
- [2] Masuo, K. and et al. 2011. Hypertension and diabetes in obesity. **International Journal of Hypertension**. 2011: 695869.
- [3] Paiboon, P. and et al. 2011. Impact of overweight and obesity on health-care costs in Thailand. **Journal of Health Systems Research**. 5(3): 287-298. (*in Thai*)

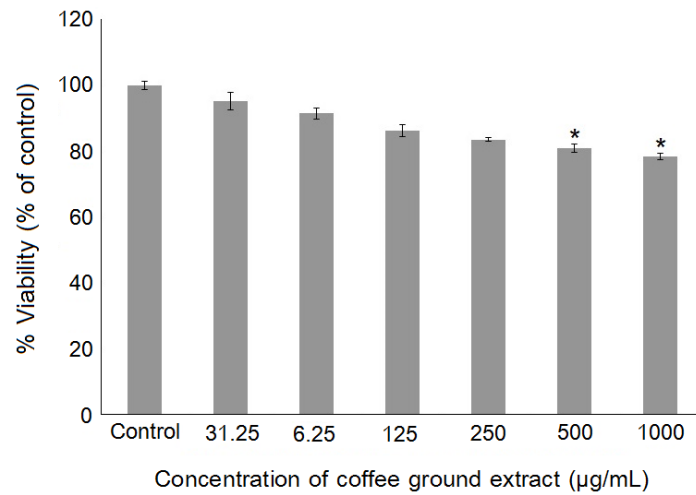


Figure 4 Cytotoxic effect of coffee ground extract at different concentrations on pre-adipocyte
*Significantly different from the control (p-value < 0.05)

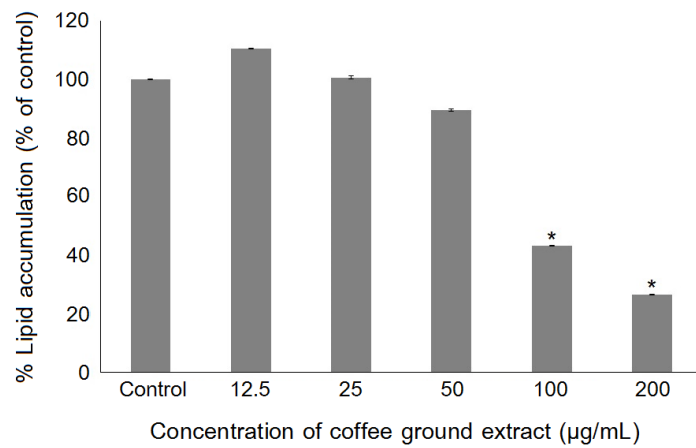


Figure 5 Antiadipogenic effect of coffee ground extract at different concentrations
*Significantly different from the control (p-value < 0.05)

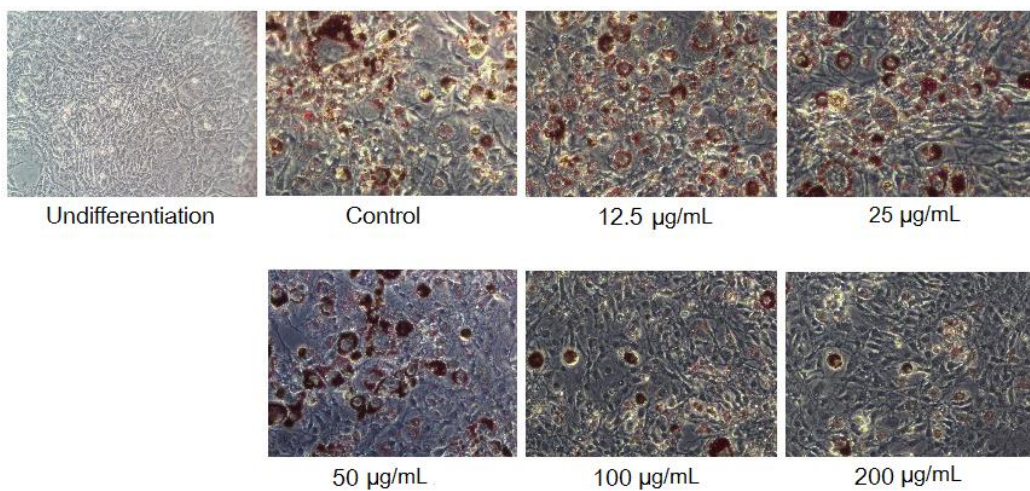


Figure 6 Antiadipogenic effect of coffee ground extract at different concentrations
as examined under an inverted microscope (20× magnification)

- [4] Ruban, A. and et al. 2019. Current treatments for obesity. **Clinical Medicine**. 19(3): 205-212.
- [5] Raptis, S.A. and Dimitriadis, G.D. 2001. Oral hypoglycemic agents: insulin secretagogues, α -glucosidase inhibitors and insulin sensitizers. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**. 109(Suppl. 2): S265-S287.
- [6] Pizzino, G. and et al. 2017. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2017: 8416763.
- [7] Wen, X. 2019. Large-scale converting waste coffee grounds into functional carbon materials as high-efficient adsorbent for organic dyes. **Bioresource Technology**. 272: 92-98.
- [8] Kanlayavattanukul, M., Lourith, N. and Chaikul, P. 2021. Valorization of spent coffee grounds as the specialty material for dullness and aging of skin treatments. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**. 8: 55.
- [9] Dziki, D. and et al. 2015. Ground green coffee beans as a functional food supplement - Preliminary study. **LWT - Food Science and Technology**. 63(1): 691-699.
- [10] Aryal, S. and et al. 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. **Plants (Basel)**. 8(4): 96.
- [11] Chu, Y., Chang, C. and Hsu, H. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80: 561-566.
- [12] Worsztynowicz, P. and et al. 2014. Pancreatic α -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). **Process Biochemistry**. 49(9): 1457-1463.
- [13] Lee, Y.M. and et al. 2012. Inhibitory activities of pancreatic lipase and phosphodiesterase from Korean medicinal plant extracts. **Phytotherapy Research**. 26(5): 778-782.
- [14] Chaiittianan, R. and et al. 2016. Anti-obesity potential of corn silks: Relationships of phytochemicals and antioxidation, anti-pre-adipocyte proliferation, anti-adipogenesis, and lipolysis induction. **Journal of Functional Foods**. 23: 497-510.
- [15] Furukawa, S. and et al. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**. 114(12): 1752-1761.
- [16] Ono, Y. and et al. 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 106(2): 238-244.
- [17] Bustanji, Y. and et al. 2010. Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**. 4(21): 2235-2242.
- [18] Martinez-Saez, N. and et al. 2017. Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. **Food Chemistry**. 216: 114-122.
- [19] Bessada, S.M.F., Alves, R. and Oliveira, M. 2018. Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. **Cosmetics**. 5(1): 5.
- [20] Guru, A. and et al. 2021. Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds. **Molecular Biology Reports**. 48: 743-761.