

การตรวจสอบหาสารให้กลิ่นในกาแฟอาราบิก้าด้วย Gas Chromatography –  
Olfactometry – Mass Spectrometry  
Characterization of Arabica Coffee Aroma by Gas Chromatography – Olfactometry –  
Mass Spectrometry

จิราภรณ์ บุราคร<sup>1</sup> และ ปวีณา พลราช<sup>1\*</sup>  
Jiraporn Burakorn<sup>1</sup> and Paweena Phonrat<sup>1\*</sup>

Received 14 June 2024, Revised 20 September 2024, Accepted 22 September 2024

ABSTRACT

This study analyzed the volatile compounds in Arabica coffee using SPME Gas Chromatography-Olfactometry Mass Spectrometry with a non-polar capillary column (HP-5MS) and a desorption temperature of 60°C. The analysis by Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) revealed that the most abundant volatile compounds contributing to the aroma of Arabica coffee belong to the groups of pyrazines, furans, and pyrroles. Notable examples of these compounds include 2,6-dimethylpyrazine, which imparts a roasted aroma; 2-ethyl-3-methylpyrazine, which provides a pandan leaf scent; 2-furanmethanol, which gives a rancid or green off-note; and 1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole, which has a grassy green off-flavor. The method validation showed a linear response within the concentration range of 1-40 mg/L. The limits of detection and quantification were found to be 0.21 and 0.7 mg/kg, respectively.

**Keywords:** Volatile compounds, Arabica coffee, GC-O-MS/MS

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้วิเคราะห์สารให้กลิ่นที่สำคัญในกาแฟอาราบิก้าด้วยเทคนิค SPME Gas Chromatography-Olfactometry Mass Spectrometry โดยใช้แคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ (HP-5MS) และอุณหภูมิในการบ่มสกัดที่ 60 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) พบว่าสารระเหยที่ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟอาราบิก้าที่มีปริมาณมากที่สุดอยู่ในกลุ่มไพราซีน ฟูแรน และไพโรล โดยมีตัวอย่างสารที่สำคัญ ได้แก่ 2,6-dimethylpyrazine ซึ่งให้กลิ่นคั่ว, 2-ethyl-3-methylpyrazine ให้กลิ่นใบเตย, 2-furanmethanol ให้กลิ่นเน่าหรือเหม็นเขียว, และ 1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole ให้กลิ่นเหม็นเขียวหญ้า การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1-40 มิลลิกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณของการตรวจวัดเท่ากับ 0.21 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ

**คำสำคัญ:** สารให้กลิ่นในกาแฟ กาแฟอาราบิก้า GC-O-MS/MS

<sup>1</sup> กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.) แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Department of Science Service, Ministry of Higher Education, Science, Research and Innovation, Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok, 10400. Thailand.

\* Corresponding author: E-mail address: paweena.phon28@gmail.com

## คำนำ

กาแฟ (Coffee) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ประเทศไทยนิยมปลูกกาแฟ 2 สายพันธุ์ คืออาราบิก้าและโรบัสต้า ซึ่งกาแฟอาราบิก้าได้รับความนิยมมากเพราะมีเอกลักษณ์ของกลิ่นที่หอมพร้อมกับรสชาติที่กลมกล่อมนุ่มนวล ต้นกาแฟพันธุ์อาราบิก้าจะเจริญเติบโตได้ดีในถิ่นอากาศเย็นและพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลราว 1,000 เมตรขึ้นไป นิยมปลูกในเขตพื้นที่ทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย ตาก น่าน แม่ฮ่องสอน และลำปาง เป็นต้น (กำพล, 2551)

เมล็ดกาแฟที่เข้าสู่กระบวนการคั่ว (Coffee roast) จะทำให้กาแฟมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ปกติสามารถแบ่งระดับการคั่วออกเป็น 3 ระดับ คือ คั่วเข้ม (Dark roast), คั่วกลาง (Medium roast) และคั่วอ่อน (Light roast) อุณหภูมิในการคั่วและระดับในการคั่วที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อคุณภาพ รสชาติของกาแฟ รวมถึงสารให้กลิ่นที่สำคัญก็แตกต่างกันไปด้วย โดยเมล็ดกาแฟที่มีระดับการคั่วที่เข้ม (Dark roast) มีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม รสชาติไปในแนวदारกช็อกโกแลต สำหรับการคั่วระดับเข้มมากจะมีสีเข้มจนถึงดำ รสชาติมีความขมเข้มไม่เหลือความเปรี้ยว ส่วนการคั่วระดับกลาง (Medium roast) จะมีความเปรี้ยว เป็นระดับที่ค่อนข้างนิยมเพราะให้รสชาติที่กลมกล่อม ดึงเอกลักษณ์ของกาแฟในแต่ละพื้นที่ปลูกได้เป็นอย่างดี และการคั่วระดับอ่อน (Light roast) การคั่วในระดับนี้จะให้สีน้ำตาลอ่อนเหมือนเปลือกไม้ รสชาติจะมีความเปรี้ยว

การวิเคราะห์สารระเหยได้ โดยวิธีการสกัดสารด้วยเทคนิค Solid Phase Micro Extraction (SPME) เป็นเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย เตรียมตัวอย่างโดยไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (solventless) ในการสกัดตัวอย่าง ข้อดีของการวิเคราะห์คือสามารถสกัดสารได้ครั้งละหลายตัวอย่าง (อรพินท์, 2564) เทคนิค SPME ได้รับความนิยมในการนำไปประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม นิติวิทยาศาสตร์ เกษษกรรม อาหาร เครื่องดื่ม และสารให้กลิ่น สารอินทรีย์ระเหยง่าย (VOCs) (สุภาพร, 2561) จึงเป็น

เทคนิคที่เหมาะสมกับวิธีวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ในกาแฟ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography - Olfactometry - Mass Spectrometer (GC-O-MS) และศึกษาสารระเหยในกาแฟที่ให้กลิ่นสำคัญด้วย Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O) ในแคปิลารีคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิด รวมถึงพัฒนาวิธีให้มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นและมีความถูกต้องของการวิเคราะห์

## อุปกรณ์และวิธีการ

### วัตถุดิบและสารเคมี

กาแฟสายพันธุ์ Arabica 100% บดละเอียด ยี่ห้อหมอกม่วน (Mokmuan), ยี่ห้อดอยหวาน (Doiwhan) และยี่ห้อดอยช้าง (Doichang) ที่มีการคั่วแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ คั่วเข้ม (Dark roast), คั่วกลาง (Medium roast) และคั่วอ่อน (Light roast)

สารมาตรฐาน 2,6-Dimethylpyrazine ( $C_8H_8N_2$ ) ความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 96% บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี และสารมาตรฐาน Alkane ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบตั้งแต่ 7-40 อะตอม ( $C_7 - C_{40}$ )

### เครื่องมือ

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography; GC) รุ่น 7890B ยี่ห้อ Agilent Technology (ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่องตรวจวัดสัญญาณแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) รุ่น 7000D ชนิด Triple Quadrupole ยี่ห้อ Agilent Technology (ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่อง Olfactometry รุ่น Sniffer 9100 ยี่ห้อ Brechbuhler (ประเทศสวิตเซอร์แลนด์), แคปิลารีคอลัมน์ (Capillary column) สำหรับ GC/MS ชนิดนอนโพลาร์ (Non-polar; HP-5MS), ชนิดโพลาร์ (Polar; DB-WAX) ยี่ห้อ Agilent Technology ขนาด 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m (ประเทศสหรัฐอเมริกา), อุปกรณ์โซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (Solid Phase Microextraction; SPME) 50/30  $\mu$ m; DVB/CAR/PDMS ยี่ห้อ Supelco (ประเทศสหรัฐอเมริกา), เครื่องชั่งไฟฟ้า (electronic analytical balance) รุ่น Quinti x 224-1S ยี่ห้อ Sartorius (ประเทศเยอรมนี) และนาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)

ความละเอียด 1/100 วินาที ชนิดตั้งโต๊ะ (Desktop timer) รุ่น 440-9805 ยี่ห้อ RS PRO (ประเทศอังกฤษ)  
**การหาอุณหภูมิของคอลัมน์ที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ระเหยได้ในกาแฟด้วยเทคนิค SPME**

การสกัดสารที่ระเหยได้ด้วยเทคนิคโซลิดเฟส ไมโครเอกซ์แทรกชัน (Solid Phase Micro Extraction; SPME) โดยศึกษาอุณหภูมิของแคปิลารีคอลัมน์ที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยที่ 2 อุณหภูมิ คือที่

60 °C และ 90 °C (Poowadol *et al.*, 2018) ในแคปิลารีคอลัมน์ (Capillary column) ทั้ง 2 ชนิด คือชนิดนอน-โพลาร์ (Non-polar; HP-5MS) และชนิดโพลาร์ (Polar; DB-WAX) โดยทำการชั่งผงกาแฟตัวอย่างละ 1.5000 ± 0.0010 กรัม ลงในขวด Headspace vial ขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมนำไปวางในถาดเครื่อง GC ตัวอย่างสารระเหยจะถูกดูดซับไว้ด้วย SPME fiber และถูกฉีดเข้าเครื่อง GC-O-MS/MS อัตโนมัติ มีสภาวะการตั้งค่าต่างๆ ดังแสดงใน Table 1 และ Table 2

**Table 1** Components and configurations of the GC-O-MS/MS instrument. (ชวีน และ ภิญจดา, 2558)

GC Column (GC-O-MS/MS)	Non-polar (HP-5MS)
Incubation temperature	60 °C
Detector	Mass spectrometry (MS)
Injection temperature	250 °C
GC mode	Splitless
MS quadrupole temperature	150 °C
Ion source temperature	230 °C
Electron ionization (EI) voltage	70 eV
Mass spectra scan range	30-300 amu
Mass spectra scan speed	45 amu/s
Carrier gas	Helium (He)
Carrier gas flow	1.2 mL/min
Nitrogen flow	1.5 mL/min

**Table 2** Oven conditions of the GC instrument. (ณัฐกานต์ และคณะ, 2557)

Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Hold time (min)	Run time (min)
-	50	5	5.00
4	220	0	47.50

**การวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟ (Odour Active Compounds)**

การวิเคราะห์สารให้กลิ่นที่สำคัญด้วย Gas

Chromatography - Olfactometry (GC-O) สารที่ระเหยได้ที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์แล้ว จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งจะเข้าสู่ Sniff port ของเครื่อง

Olfactometry และอีกส่วนหนึ่งจะเข้าสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณ Mass spectrometry (MS) จากนั้นผู้ดมกลิ่นที่ผ่านการฝึกฝนให้มีความคุ้นเคยกับลักษณะกลิ่นกาแฟแล้วจำนวน 3 คน จะทำการดมกลิ่นสารระเหยที่แยกได้จาก Sniff port เป็นระยะเวลา 30 นาที ในระหว่างการดมกลิ่น จะมีการจดบันทึกเวลาที่ดมกลิ่นต่างๆได้ พร้อมทั้งบรรยายคุณลักษณะของกลิ่นนั้นๆ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ/ผู้ประเมินแต่ละคน (Suriyaphan *et al.*, 2001)

#### การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation)

##### การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน 2,6-dimethylpyrazine จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 2, 5, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient,  $R^2$ )

##### การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)

ตรวจสอบความแม่นยำของวิธีโดยเติมสารละลายมาตรฐาน 2,6-dimethylpyrazine ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินความแม่นยำของวิธีโดยค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery)

##### การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)

ตรวจสอบความเที่ยงภายในวัน (Intra-day) โดยเติมสารละลายมาตรฐาน 2,6-dimethylpyrazine ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนระดับความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และการตรวจสอบความเที่ยงต่างวัน (Inter-day) โดยเติมสารละลายมาตรฐาน 2,6-dimethylpyrazine ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนระดับความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน

ประเมินความเที่ยงของวิธีโดยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, %RSD) และ HORRAT

การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดในการวัดปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) โดยการทดสอบสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

การวิเคราะห์ปริมาณสารในตัวอย่างกาแฟทางการค้า การวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2,6-dimethylpyrazine ในตัวอย่างกาแฟสายพันธุ์ Arabica (100%) ยี่ห้อหมอกมวนเปรียบเทียบกับกาแฟสายพันธุ์ Arabica (100%) ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด จำนวน 2 ตัวอย่าง

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Agilent MassHunter Qualitative Analysis (B.07.00) เกณฑ์ในการระบุสารประกอบที่วิเคราะห์ได้จำเป็นต้องมีการจับคู่แมสสเปกตรัมกับค่า linear retention index (LRI) ในฐานข้อมูล NIST ของสารประกอบชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถคำนวณได้จาก

$$LRI = 100 \left( \frac{t - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right) + n$$

โดย LRI คือ Linear retention index

t คือ Retention time ของสารประกอบ

n คือ จำนวนอะตอมคาร์บอนของ n-alkane พิก่อนพีคของสารประกอบที่สนใจ

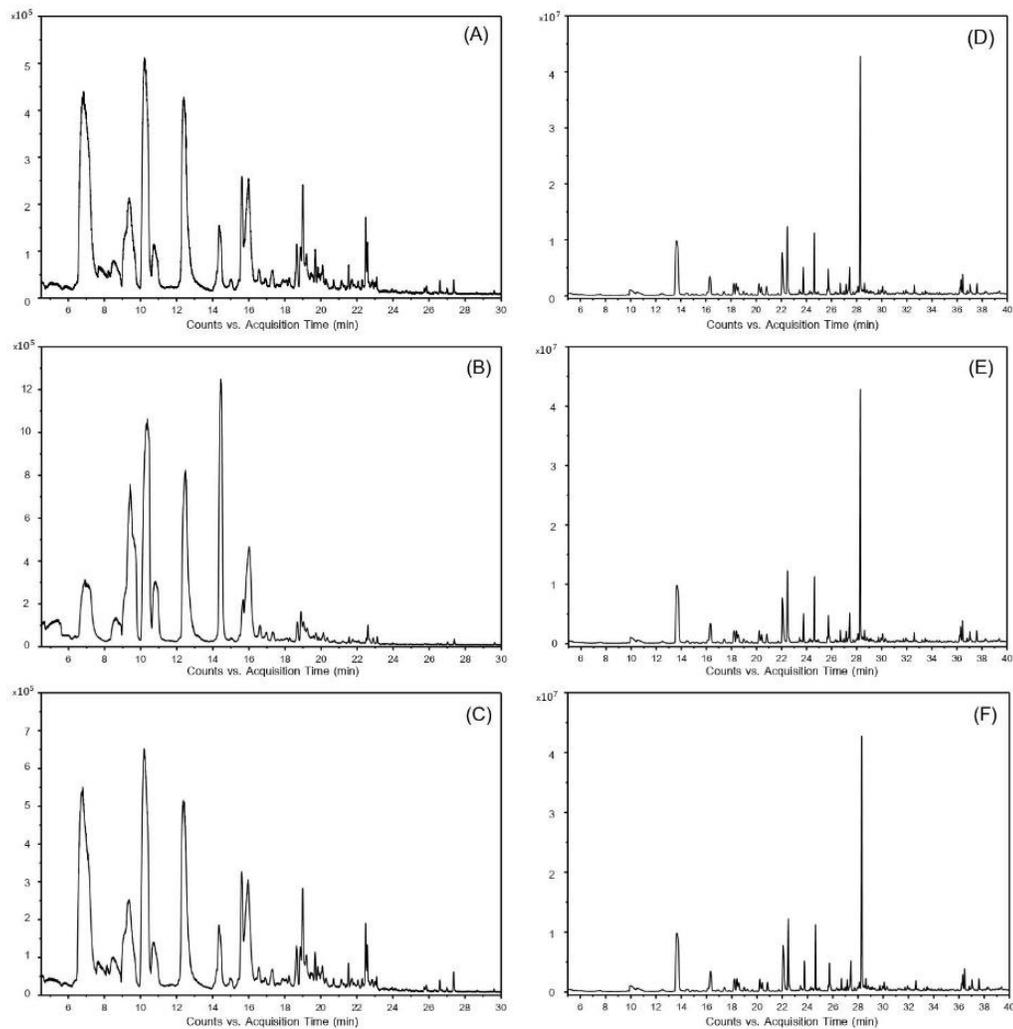
n+1 คือ จำนวนอะตอมคาร์บอนของสารละลายมาตรฐาน n-alkane พิกัดจากสารประกอบที่สนใจ (Bianchi *et al.*, 2007)

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### ผลการหาอุณหภูมิของคอลัมน์ที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ระเหยได้ในกาแฟด้วยเทคนิค SPME

การสกัดสารที่ระเหยได้ในกาแฟด้วยเทคนิคโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (Solid Phase Micro Extraction; SPME) โดยศึกษาอุณหภูมิของแคปิลารีคอลัมน์ที่เหมาะสมในการสกัดสาร 2 ชนิด คือชนิดนอนโพลาร์ (Non-polar; HP-5MS) และชนิดโพลาร์ (Polar; DB-WAX) จากการทดลอง พบว่าการวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยได้ในกาแฟด้วย Gas Chromatography – Olfactometry Mass Spectrometry ใน

แคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ สามารถแยกสารที่ระเหยในกาแฟได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับแคปิลารีคอลัมน์ชนิดโพลาร์ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารระเหยที่ 60 °C ดังแสดงใน Figure 1 เนื่องจากแคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ จะสามารถแยกสารผสมโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) ได้ดี ซึ่งในกาแฟจะพบสารในกลุ่ม PAHs ซึ่งเกิดจากขั้นตอนในการผลิตกาแฟคั่ว และการวิเคราะห์หากลิ่นที่สำคัญด้วย (GC-O) พบว่า แคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟได้ดีกว่า



**Figure 1** Representative total ion chromatograms (TIC) of coffee mokmuan: capillary column (non-polar, HP-5) (A) dark roasted (B) medium roasted (C) light roasted: capillary column (polar, DB-WAX) (D) dark roasted (E) medium roasted (F) light roasted

## ผลการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นสำคัญใน กาแฟหมอกม่วน

การวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟหมอกม่วนด้วย Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O) พบสารให้กลิ่นที่สำคัญในกาแฟหมอกม่วนคั่วเข้มที่เป็นไปได้ทั้งหมด 24 ชนิด ประกอบด้วย Carboxylic acid 1 ชนิด, Furans 6 ชนิด, Ketones 3 ชนิด, Phenols 2 ชนิด, Pyrazines 8 ชนิด, Pyridine 1 ชนิด และ Pyrroles 3 ชนิด ดังแสดงใน Table 3 สารให้กลิ่นที่สำคัญในกาแฟหมอกม่วนคั่วกลางที่เป็นไปได้ทั้งหมด 27 ชนิด ประกอบด้วย Carboxylic acids 2 ชนิด, Furans 7 ชนิด, Ketones 5 ชนิด, Pyrazines 9 ชนิด, Pyridine 1 ชนิด และ Pyrroles 3 ชนิด ดังแสดงใน Table 4 และสารให้กลิ่นที่สำคัญในกาแฟหมอกม่วนคั่วอ่อนที่เป็นไปได้ทั้งหมด 22 ชนิด ประกอบด้วย Carboxylic acids 2 ชนิด, Furans 5 ชนิด, Ketones 2 ชนิด, Pyrazines 9 ชนิด, Pyridine 1 ชนิด และ Pyrroles 3 ชนิด ดังแสดงใน Table 5

จากการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟหมอกม่วนทั้ง 3 ระดับการคั่ว พบสารระเหยที่ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟมากที่สุดเป็นสารในกลุ่มไพราซีน เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์โดยเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ระยะแรกของการให้ความร้อน (จิสวัสตี และ, 2546) สารในกลุ่มไพราซีนจะให้กลิ่นถั่วเน่าหรือหรือกลิ่นคั่ว สารในกลุ่มฟูแรน เป็น สาร ที่ พบ ปริมาณ รอง ลง มา จะให้กลิ่นเหม็นเขียว พบถัดมาเป็นสารในกลุ่มคีโตน เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นของไดคีโตน (diketone) หรืออาจเกิดจากไพโรไลซิสของคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ (Nishimura & Mihara, 1990) สารในกลุ่มไพโรลจะให้กลิ่นเหม็นเขียวหญ้าหรือกลิ่นจุนและสารในกลุ่มฟีนอล, Carboxylic acids และไพรีดีน ตามลำดับ

**Table 3** Tentative volatile compound of mokmuan coffee dark roast.

No.	Tentative Compound	HP-5MS Column				DB-WAX Column			
		RT (min)	LRI		Odor Description	RT (min)	LRI		Odor Description
			Exp	Database			Exp	Database	
	<b>Carboxylic acid</b>								
1	Acetic acid	-	-	660-662	-	22.067	1458	1415-1479	Vinegar
	<b>Furans</b>								
2	furfural	-	-	828-839	-	22.481	1464	1421-1493	Sour
3	2-furanmethanol	10.229	857	845-866	Roasted, Coffee	28.293	1665	1613-1686	Potato crisp
4	5-methylfurfural	14.368	-	958-977	-	25.743	1568	1536-1608	Coffee
5	furfuryl acetate	15.623	990	998	Nail polish	24.631	1535	1523-1559	Lipstick smell, Pungent
6	2,2'-methylenebis furan	19.007	1086	1085.6	Medicinal, Pungent	26.704	1601	1615	Herb
7	2-furfuyl-5-methyl furan	22.493	1176	-	Green	28.631	1676	-	fishy, sour
	<b>Ketones</b>								
8	3,5-Octadienone	18.255	1062	1076-1102	Herb	-	-	1516-1569	-
9	1-(2-furanyl)-Ethanone	-	-	914-918	-	23.753	1501	1461-1538	Coffee
10	2-acetyl butyrolactone	-	-	891-922	-	27.444	1636	1592-1666	Popcorn, Butter
	<b>Phenols</b>								
11	4-ethyl-2-methoxyphenol	25.854	1269	1243-1281	Pandan leaves, Sweet	37.578	-	1983-2057	-
12	2-methoxyphenol	-	-	1086-1090	-	33.470	1860	1885-1814	Herbal, Molasses

**Table 3** Tentative volatile compound of mokmuan coffee dark roast. (continue)

No.	Tentative Compound	HP-5MS Column				DB-WAX Column			
		RT (min)	LRI		Odor Description	RT (min)	LRI		Odor Description
			Exp	Database			Exp	Database	
	<b>Pyrazines</b>								
13	Methylpyrazine	9.195	821	799-836	Green	16.318	1272	1238-1288	cocoa
14	2,5-dimethylpyrazine	12.497	909	889-928	Pandan leaves	18.215	1333	1281-1348	Roasted
15	2,6-dimethylpyrazine	12.400	906	912-920	Roasted, Coffee	18.398	1341	1300-1360	Musty
16	2-ethyl-3-methylpyrazine	15.991	1006	999-1001	Medicinal, Green	20.827	1405	1363-1419	Herbal
17	2-ethyl-5-methylpyrazine	15.904	994	1001-1004	Chocolate	20.224	1398	1358-1432	cocoa
18	2-ethyl-6-methylpyrazine	15.874	992	991-1001	Sweet	20.417	1401	1375-1415	Pandan leaves
19	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	18.862	1071	1077-1088	Medicinal, Herbal	22.589	1469	1458-1477	Coffee
20	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	18.880	1072	1075-1083	Coffee, Fragrant, Floral	-	-	1416-1458	-
	<b>Pyridine</b>								
21	Pyridine	9.846	-	753-769	-	13.654	1190	1160-1220	Sour
	<b>Pyrroles</b>								
22	2-Carboxaldehydeprrrole	9.462	1015	1008-1018	Green	-	-	2013-2038	-
23	2-Acetyl-1-methylpyrrole	18.648	1069	-	Medicinal, Chemicals, Pungent	-	-	1645-1647	-
24	1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole	22.581	1178	1185.4	Vegetable, Green, Pungent	-	-	1817	-

Exp = LRI values from the experiment calculated using n-alkanes standard on the HP-5 MS and DB-WAX columns

Database = LRI values from NIST database on the HP-5 MS and DB-WAX columns

Odor Description = Odor active compounds identified through Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O)

**Table 4** Tentative volatile compound of mokmuan coffee Medium roast.

No.	Tentative Compound	HP-5 MS				DB-WAX			
		RT (min)	LRI		Odor Description	RT (min)	LRI		Odor Description
			Exp	Database			Exp	Database	
	<b>Carboxylic acids</b>								
1	Acetic acid	-	-	660-662	-	22.040	1459	1415-1479	Vinegar
2	4-Hydroxy-Butanoic acid	-	-	-	-	27.427	1636	-	Pungent
	<b>Furans</b>								
3	3-Furaldehyde	9.421	822	-	ferment	22.495	1457	1426-1455	ferment
4	Furfural	9.633	828	828-839	ferment	22.499	1458	1421-1493	ferment
5	2-Furanmethanol	10.368	855	845-866	Coffee, Popcorn	28.306	-	1613-1686	-
6	5-methyl furfural	14.440	966	958-977	ferment	25.768	1568	1536-1608	Coffee
7	furfuryl acetate	15.687	991	998	Nail polish	24.640	1537	1523-1559	Printer ink, Pungent
8	2,2'-methylenebis furan	19.026	1087	1085.6	Sweet	26.704	1601	1615	Herb
9	2-furfuy-5-methyl furan	22.512	1176	-	Green, Coffee	28.640	1679	-	Grassy, fetid
	<b>Ketones</b>								
10	1-(acetyloxy)-2-Propanone	10.827	858	876	Roasted	-	-	1469-1483	-
11	1-Hydroxy-2-Propanone	-	-		-	17.449	1305	1274-1323	Plastic
12	3,5-Octadienone	18.263	1062	1076-1102	Sweet	-	-	1516	-
13	1-(2-furanyl)-Ethanone	-	-	914-918	-	23.773	1506	1479-1538	Musty

**Table 4** Tentative volatile compound of mokmuan coffee Medium roast. (continue)

No.	Tentative Compound	HP-5 MS				DB-WAX			
		RT (min)	LRI		Odor Description	RT (min)	LRI		Odor Description
			Exp	Database			Exp	Database	
14	1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)- Ethanone	27.012	1320	-	Balm, Cool	-	-	-	-
	<b>Pyrazines</b>								
15	2,3-dimethylpyrazine	-	-	911-922	-	18.997	1343	1326-1346	Popcorn
16	2,5-dimethylpyrazine	12.484	909	889-928	Coffee	18.416	1340	1291-1348	Pandan leaves, Popcorn
17	2,6-dimethylpyrazine	12.473	907	912-920	Pandan leaves, Grassy	18.402	1401	1320-1360	Pandan leaves
18	2-ethyl-3-methylpyrazine	16.016	1006	999-1001	Coffee, Grassy	20.842	1409	1363-1414	Sweet, Pandan leaves
19	2-ethyl-5-methylpyrazine	15.890	993	1001-1004	Printer ink	20.233	1396	1367-1432	Spice, Herbal
20	2-ethyl-6-methylpyrazine	15.907	994	991-1001	Medicinal, Coffee	22.224	1463	1375-1415	Coffee
21	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	18.889	1072	1077-1088	Herb, Coffee	22.604	1468	1458-1477	Ovaltine, Chocolate
22	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	18.877	1071	1075-1083	Herb, Medicinal	22.140	1456	1416-1458	Coffee
23	3,5-diethyl-2-methylpyrazine	21.755	1151	1159-1162	Pungent, Coffee	23.535	1499	1469	Roasted, Coffee
	<b>Pyridine</b>								
24	Pyridine	6.895	-	753-769	-	13.665	1190	1157-1220	Sour
	<b>Pyrrole</b>								
25	2,3-dimethyl pyrrole	9.373	820	-	Grassy, Pungent	-	-	-	-
26	3-Acety-1-methyl-pyrrole	18.692	1069	-	Medicinal, Grassy	-	-	-	-
27	1-(2-furanylmethyl)-1H-Pyrrole	22.604	1178	1185.4	Grassy	32.605	-	1817-1833	-

Exp = LRI values from the experiment calculated using n-alkanes standard on the HP-5 MS and DB-WAX columns

Database = LRI values from NIST database on the HP-5 MS and DB-WAX columns

Odor Description = Odor active compounds identified through Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O)

**Table 5** Tentative volatile compound of mokmuan coffee light roast.

No.	Tentative Compound	HP-5 MS				DB-WAX			
		RT (min)	LRI		Odor Description	RT (min)	LRI		Odor Description
			Exp	Database			Exp	Database	
	<b>Carboxylic acids</b>								
1	Acetic acid	-	-	660-662	-	22.042	1457	1415-1479	Vinegar
2	4-Hydroxy-Butanoic acid	-	-	-	-	27.422	1637	-	Pungent
	<b>Furans</b>								
3	3-Furaldehyde	9.366	828	-	ferment	22.495	1466	1426-1455	Sauce
4	Furfural	9.403	830	828-839	ferment	22.502	1468	1421-1493	Grassy
5	2-Furanmethanol	10.348	848	845-866	ferment	28.302	1679	1613-1686	ferment, Grassy
6	5-methyl furfural	14.385	969	958-977	Pungent, Grassy	25.767	1567	1536-1608	Grassy
7	furfuryl acetate	15.635	993	998	Nail polish	24.641	1537	1523-1559	Pungent, Plastic
	<b>Ketones</b>								
8	1-(acetyloxy)-2-Propanone	10.752	861	876	Roasted	-	-	1469-1483	-
9	1-(2-furanyl)-Ethanone	-	-	914-918	-	23.768	1500	1479-1538	Smoky, Medicinal
	<b>Pyrazines</b>								
10	Ethylpyrazine	-	-	910-946	-	18.566	1340	1330-1359	Musty
11	Methylpyrazine	-	-	799-836	-	16.335	1274	1238-1288	Sour
12	2,5-dimethylpyrazine	12.447	909	889-928	Pandan leaves	18.240	1333	1291-1348	Printer ink, Medicinal

**Table 5** Tentative volatile compound of mokmuan coffee light roast. (continue)

No.	Tentative Compound	HP-5 MS				DB-WAX			
		RT (min)	LRI		Odor Description	RT (min)	LRI		Odor Description
			Exp	Database			Exp	Database	
13	2,6-dimethylpyrazine	12.326	907	912-920	Coffee, Roasted, Nail polish	18.411	1336	1320-1360	Nail polish
14	2-ethyl-3-methylpyrazine	15.980	995	999-1001	Medicinal, Printer ink, Coffee	20.847	1408	1363-1414	Herbal, Plastic
15	2-ethyl-5-methylpyrazine	-	-	1001-1004	-	20.231	1396	1367-1432	Pungent, Spice
16	2-ethyl-6-methylpyrazine	15.870	993	991-1001	Nail polish	-	-	1375-1415	-
17	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	18.850	1071	1075-1083	Medicinal, Pungent, Herbal	22.132	1458	1416-1456	Vinegar
18	3,5-diethyl-2-methylpyrazine	21.726	1152	1159-1162	Medicinal	-	-	1469	-
	<b>Pyridine</b>								
19	Pyridine	7.126	-	753-769	-	13.719	-	1157-1220	Sour
	<b>Pyrrole</b>								
20	2-Acety-1-methyl-pyrrole	-	-	-	-	28.121	1664	1949-1983	Roasted
21	3-Acety-1-methyl-pyrrole	18.646	1071	-	Pungent	-	-	-	-
22	1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole	22.567	1178	1185.4	Grassy		-	1817-1833	-

Exp = LRI values from the experiment calculated using n-alkanes standard on the HP-5 MS and DB-WAX columns

Database = LRI values from NIST database on the HP-5 MS and DB-WAX columns

Odor Description = Odor active compounds identified through Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O)

### ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีของสารมาตรฐาน 2,6-dimethylpyrazine โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ความเข้มข้น 1 - 40 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 0.995-1

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy) ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ประเมินความแม่นยำของวิธีโดยค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) มีค่าอยู่ในช่วง 80 - 115% ดังแสดงใน Table 6

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี โดยการตรวจสอบภายในวัน (Intra-day) และต่างวัน (Inter-day) ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินความเที่ยงของวิธีด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และ HORRAT ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังแสดงใน Table 6 และการตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบต่ำสุดและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณที่ตรวจวัดได้ คือ 0.21 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

**Table 6** Method Validation of 2,6 Dimethylpyrazine

2,6 Dimethylpyrazine			
Linearity	1-40 mg/kg		
Accuracy	Measured concentration (mg/kg)		
	1	10	40
mean±SD	0.96±0.02	8.50±0.22	34.37±0.45
%Recovery	95.65	84.98	85.90
Precision: Intra-day			
mean±SD	0.97±0.01	8.55±0.15	34.59±0.23
%RSD	1.43	1.77	0.66
HORRAT	0.13	0.23	0.11
Precision: Inter-day			
mean±SD	0.95±0.02	8.50±0.20	34.49±0.49
%RSD	2.07	2.41	1.43
HORRAT	0.19	0.31	0.23
LOD	0.21 mg/kg		
LOQ	0.7 mg/kg		

### ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างกาแฟทางการค้า

การวิเคราะห์สารที่ระเหยได้ในกาแฟหมอกม่วนด้วย Gas Chromatography – Olfactometry - Mass Spectrometer (GC-O-MS) สกัดสารระเหยได้ด้วยเทคนิคโซลิดเฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน (Solid Phase Micro Extraction; SPME) ในกาแฟหมอกม่วนที่มีการคั่วแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ คั่วเข้ม, คั่วกลาง และคั่วอ่อน

พบว่า สารที่มีปริมาณมากเป็นสารในกลุ่ม Pyrazine ให้กลิ่นถั่วเน่าหรือกลิ่นคั่ว ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่สำคัญในกาแฟหมอกม่วน ผู้วิจัยจึงนำวิธีตรวจสอบความใช้ได้ที่พัฒนาขึ้นนี้ ตรวจสอบหาปริมาณสารในกาแฟที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 2 ตัวอย่าง คือกาแฟดอยหวาน (Doiwhan) และกาแฟดอยช้าง (Doichang) ที่มีการคั่วต่างกัน 3 ระดับ คือ คั่วเข้ม, คั่วกลางและคั่วอ่อน ปริมาณสารที่ตรวจวัดได้ในกาแฟ แสดงใน Table 7

**Table 7** Quantification of mokmuan coffee, Doichang coffee and Doiwhan coffee with 3 levels of roasted

Types Coffee / Roast Level (µg/kg)	Dark Roasted (mean±SD)	Medium Roasted (mean±SD)	Light Roast (mean±SD)
Mokmuan	6.571±0.217	5.735±0.090	3.953±0.015
Doichang	3.897±0.106	3.706±0.181	3.161±0.135
Doiwhan	3.813±0.135	3.780±0.124	2.852±0.221

### สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์สารระเหยที่ได้ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟอาราบิก้าด้วย Gas Chromatography - Olfactometry - Mass Spectrometer (GC-O-MS) สกัดสารด้วยเทคนิค Solid Phase Micro Extraction (SPME) ในกาแฟอาราบิก้าที่ห่อหมอกม่วน ที่มีระดับการคั่ว 3 ระดับ คือ คั่วเข้ม คั่วกลาง และคั่วอ่อน ในแคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ (HP-5MS) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มสกัด 60 องศาเซลเซียส พบสารที่ให้กลิ่นสำคัญในกาแฟหมอกม่วนที่มีความเป็นไปได้ในกาแฟหมอกม่วนคั่วเข้มทั้งหมด 24 ชนิด กาแฟหมอกม่วนคั่วกลางทั้งหมด 27 ชนิด และกาแฟหมอกม่วนคั่วอ่อนทั้งหมด 22 ชนิด

การวิเคราะห์ลักษณะกลิ่นของกาแฟหมอกม่วนด้วย Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O) สารที่ระเหยได้ที่พบปริมาณมากที่สุดเป็นสารในกลุ่ม Pyrazines ให้กลิ่นถั่วเน่าหรือกลิ่นคั่ว ส่วนสารที่พบปริมาณรองลงมาเป็นสารในกลุ่ม Furans จะให้กลิ่นเหม็นเขียวและกลิ่นเหม็นฉุน ซึ่งจากการวิเคราะห์ในแคปิลารีคอลัมน์ 2 ชนิด คือชนิดนอน-โพลาร์ (Non-polar : HP-5MS) และชนิดโพลาร์ (Polar : DB-WAX) พบว่าแคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ (Non-polar : HP-5MS) มีอิทธิพลส่งผลให้เกิดกลิ่นและสารที่ระเหยได้ในกาแฟมากกว่า เพราะแคปิลารีคอลัมน์ชนิดนอน-โพลาร์ เป็นคอลัมน์ที่ไม่มีขั้วจะสามารถแยกสารผสมโพลีไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) ได้ดี ซึ่งในกาแฟคั่วมีการปนเปื้อนสารในกลุ่ม PAHs ที่เกิดจากการเผาไหม้ในขั้นตอนจากการผลิตกาแฟคั่วการตรวจสอบความ

ใช้ได้ของวิธีของสารมาตรฐาน 2,6-dimethylpyrazine โดยมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1 - 40 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9997 การตรวจสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy) ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินความแม่นยำของวิธีโดยใช้ค่าร้อยละกลับคืน (% Recovery) มีค่าเท่ากับ 95.65%, 84.98% และ 85.90% ตามลำดับ การตรวจสอบความเที่ยงของวิธี โดยการตรวจสอบภายในวัน (Intra-day) และต่างวัน (Inter-day) ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 3 ระดับ คือ 1, 10 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประเมินความเที่ยงของวิธีด้วยค่า %RSD และ HORRAT พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ชัดจำกัดในการตรวจพบต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ และชัดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณคือ 0.21 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสามารถตรวจวัดปริมาณสารมาตรฐานในกาแฟที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่มีระดับการคั่ว 3 ระดับ พบว่ามีปริมาณสารในช่วง 2.852 ถึง 6.571 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

อย่างไรก็ตาม วิธีการวิเคราะห์สารระเหยในกาแฟที่พัฒนาขึ้นนี้ ยังไม่ได้ถูกนำไปใช้ในสถานประกอบการจริง แต่สามารถคาดการณ์ได้ว่า ในอนาคตอาจนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนากระบวนการคั่วกาแฟ โดยสามารถควบคุมกลิ่นและรสชาติที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังช่วยควบคุมอุณหภูมิและเวลาในการคั่วเพื่อให้ได้คุณภาพกาแฟที่สอดคล้องกับความต้องการของตลาด นอกจากนี้ ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและควบคุมคุณภาพกลิ่นของกาแฟเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและตรงตามความต้องการของผู้บริโภคอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- กำพล เมืองโคมพัส. (2551). การผลิตกาแฟอาราบิก้าให้มีคุณภาพเหมาะสมกับพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์. <http://lib.doa.go.th/multim/e-book/EB00518.pdf>
- จิรสวัสดิ์ ภูวิกรมัย และ สิริ ชัยเสรี. (2546). สารระเหยในกาแฟโรบัสต้าของไทย. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร*. (น. 124-131). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชวิน จุลาเกตุโพธิชัย และ ภิญรดา นุ่นขาว. (2558). การวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารที่ระเหยได้ในกาแฟตามแหล่งเพาะปลูกโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ-โซลิด เฟสไมโครเอกซ์แทรกชัน-แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรีร่วมกับเคโมเมทริกซ์ [ปริญญาณิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย]. <https://www.car.chula.ac.th/display7.php?bib=2054215>
- ณัฐกานต์ อึ้งศิริสวัสดิ์, วรณวิบูลย์ กาญจนบุญชร, และวรรณิ จิรภาคย์กุล. (2557). การระบุชนิดของสารระเหยในควันที่ผลิตจากกากกาแฟสด. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร*. (น. 130-137). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภาพร แสงศรีจันทร์. (2561). การเตรียมสารตัวอย่างโดยวิธี *solid phase microextraction (SPME)*. <https://erp.mju.ac.th/articleDetail.aspx?qid=867>
- อรพินทร์ เจียรถาวร. (2564). *เทคนิคการสกัดสารในการวิเคราะห์ทางเคมี*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., & Musci, M. (2007). Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of separation science*, 30(4), 563–572. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600393>
- Nishimura, O., & Mihara, S. (1990). Investigation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(4), 1038-1041.
- Poowadol T., Chadin K., Kanet W., Natchanun L., & Thumnoon N. (2018). Identification of volatile compounds and selection of discriminant markers for elephant dung coffee using static headspace gas chromatography mass spectrometry and chemometrics. *Molecules*. 23(8), 1910. <https://doi.org/10.3390/molecules23081910>
- Suriyaphan, O., Drake, M.A., Chen, X.Q., & Cadwallader, K.R. (2001). Characteristic aroma components of British farmhouse cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(3), 1382-1387. <https://doi.org/10.1021/jf001121I>