

การหาปริมาณคาเฟอีนในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

ของเหลวสมรรถนะสูง

Determination of Caffeine Content in Arabica Coffee Beans Using High-Performance Liquid Chromatography

รุจิรา คุ่มทรัพย์ และ เสาวภา ชูมณี*

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ ประเทศไทย

Ruchira Khoomsab and Saowapa Chumanee*

Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun, Thailand

บทคัดย่อ

คาเฟอีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทอัลคาลอยด์ มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางมักพบในเมล็ดกาแฟ สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หาปริมาณคาเฟอีนในเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea Arabica* L.) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตรวจวัดด้วยไดโอดอาร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 274 nm ทำการสกัดคาเฟอีนจากเมล็ดกาแฟด้วยอัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดใช้ตัวทำละลายเมทานอลร่วมกับน้ำ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกใช้คอลัมน์ชนิด C8 ร่วมกับการใช้เฟสเคลื่อนที่แบบไอโซเครติกประกอบด้วยตัวทำละลายเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตร ใช้อัตราการไหล 1 mL/min ปริมาตรการฉีด 5 μ L การประเมินความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์พบว่า มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 10.00 μ g/mL (ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ, R² เท่ากับ 0.9999) ค่าขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 0.13 และ 0.43 μ g/mL ตามลำดับ ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์อยู่ในช่วง 1.02-5.21% และค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 96.00-98.50% วิธีวิเคราะห์นี้ ได้นำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิก้าที่ปลูกพื้นที่ต่างกัน และพบปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.10-1.49 % โดยน้ำหนัก

* Corresponding author : saowapa@pcru.ac.th

คำสำคัญ : กาแฟ, คาเฟอีน, อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, เครื่องตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์

Abstract

Caffeine is an alkaloid organic compound. It has a stimulating effect on the central nervous system, often found in coffee beans. This research aimed to determine the caffeine content in *Coffea Arabica* L. beans using high-performance liquid chromatography with a diode array detector in the wavelength of 274 nm. The amount of caffeine in coffee beans was extracted by ultrasound-assisted extraction with methanol-water. The optimum separation was performed on the C8 column with isocratic elution consisting of methanol and water (30:70, v/v) as mobile phase at a 1 mL/min flow rate. The injection volume was 5 μ L. In the evaluation of method validation, it was found that there was a linear relationship in the concentration range of 0.50 – 10.00 μ g/mL ($R^2 = 0.9999$). The limit of detection and quantification were 0.13 and 0.43 μ g/mL, respectively. The relative standard deviation percentage was 1.02-0.21%, while the percent recovery varied between 96.00 and 98.50%. The method was applied to determine the caffeine content in samples of roasted Arabica coffee beans grown in various locations. It was found that the caffeine content in the samples was in the concentration range of 1.10–1.49% w/w.

Keywords : Coffee, Caffeine, Ultrasound-assisted extraction, High-Performance Liquid Chromatography, Diode-Array Detector

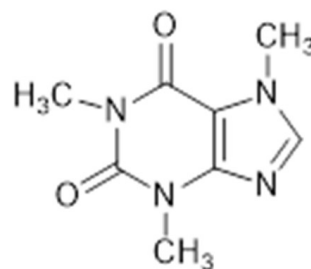
ที่มาและความสำคัญ

กาแฟ (coffee) เป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมาก ส่วนประกอบหลักที่พบในเมล็ดกาแฟ ได้แก่ คาโรโบไฮเดรต (ประมาณ 60%) ไขมัน คาเฟอีน สารประกอบแร่ธาตุ กรดคลอโรจีนิค ไตรโกเนลลีน กรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน และสารประกอบระเหยง่าย การบริโภคกาแฟเป็นประจำทุกวันมีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเฉพาะบางอย่าง เช่น โรคตับแข็ง โรคพาร์กินสัน และมะเร็งลำไส้ กาแฟมีมากกว่า 500 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่เป็นที่ต้องการมากที่สุดคือ กาแฟพันธุ์อาราบิก้า (arabica) และกาแฟพันธุ์โรบัสต้า (robusta) [1] คาเฟอีนเป็นสารประกอบที่สำคัญที่มีอยู่ในกาแฟ มีชื่อทางเคมีว่า 1,3,7-trimethylxanthine เป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทอัลคาลอยด์ จำพวกแซนทีน สูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 1 (ข) เป็นสารที่ไม่มีกลิ่น มีรสขม [2-4] มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง มีสรรพคุณชูกำลัง ดื่มแล้วรู้สึกสดชื่นกระปรี้กระเปร่า [5] อย่างไรก็ตามการบริโภคกาแฟจนได้รับปริมาณคาเฟอีนมากเกินไปเป็นเหตุทำให้อนอนไม่หลับ หัวใจเต้นเร็ว อันตรายต่อสุขภาพ [2] ปริมาณคาเฟอีนในกาแฟอาราบิก้าดิบ อยู่ที่ 0.9 ถึง 1.4% โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่กาแฟโรบัสต้ามีตั้งแต่ 1.5% ถึง 2.6% โดยน้ำหนักแห้ง [6]

การหาปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างกาแฟ นิยมใช้เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงด้วยการ



(ก)



(ข)

ภาพที่ 1: (ก) ตัวอย่างเมล็ดกาแฟอาราบิก้าคั่วกลาง (ข) สูตรโครงสร้างคาเฟอีน

ตรวจวัดด้วยไดโอดอาร์เรย์หรือยูวี-วิสิเบิล [7-13] ปัจจุบันเมล็ดกาแฟคั่วพันธุ์ อาราบิก้า นิยมใช้ปรุงในเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ที่มีขายในร้านกาแฟตามแหล่งชุมชนเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วพันธุ์อาราบิก้า ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงและตรวจวัดด้วยไดโอดอาร์เรย์ (HPLC/DAD) พร้อมทั้งพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ให้เป็นงานประจำ (routine) ในห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ สำหรับการบริการวิชาการและการเรียนการสอนได้อีกด้วย

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี และการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐานในงานวิจัยนี้คือ สารมาตรฐานคาเฟอีน ผลิตจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา เตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น $1,000 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งคาเฟอีน 0.1000 กรัม ละลายด้วยเมทานอลต่อน้ำ อัตราส่วน 30:70 โดยปริมาตร ปริมาตร 100 mL แล้วเก็บไว้ตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 4°C ในขวดสีชาก่อนใช้งาน สำหรับการเจือจางสารละลายที่นำไปใช้ แต่ละความเข้มข้นก่อนใช้ เตรียมใหม่ทุกครั้งโดยใช้เมทานอลต่อน้ำ (30:70) เป็นตัวทำละลาย สารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ เมทานอล (methanol, MeOH) เกรด HPLC จากบริษัท CARLO ERBA ประเทศอิตาลี และน้ำปราศจากไอออน (deionized water, $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) ผลิตจากเครื่อง Arium® Pro ultrapure water system ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในดำเนินการวิจัย ประกอบด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) เครื่องบดตัวอย่าง เครื่องล้างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) รุ่น WUC-D03H (DAIHAN Scientific ประเทศเกาหลี) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น V18R (Dynamica ประเทศจีน) และเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพร้อมด้วยตัวตรวจวัดไดโอดอาร์เรย์ (HPLC/DAD) รุ่น Agilent 1260 Infinity (Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วยปั๊มความดันสูงสุดแบบ quaternary pump VL (G1311C), ระบบกำจัดฟองอากาศด้วยสุญญากาศ (Degasser, G1322A) ระบบฉีดสารอัตโนมัติ (autosampler, G1329B) อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ

(thermostatted column compartment, G1316A) และ ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ (diode array detector, G1321C) ระบบการควบคุมและการประมวลผลใช้ซอฟต์แวร์ OpenLAB CDS ChemStation เวอร์ชัน C.01.07 แผ่นกรองชนิดไนลอน ขนาดอนุภาค $0.22\ \mu\text{m}$ เส้นผ่าศูนย์กลาง $13\ \text{mm}$ สำหรับการเตรียมตัวอย่าง และ ขนาดอนุภาค $0.20\ \mu\text{m}$ เส้นผ่าศูนย์กลาง $47\ \text{mm}$ สำหรับกรองเฟสเคลื่อนที่

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารคาเฟอีนได้ใช้คอลัมน์ Zorbax Eclipse Plus C18 ($100 \times 4.6\ \text{mm}$, $3.5\ \mu\text{m}$) สำหรับเฟสเคลื่อนที่ได้ทดสอบอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วนโดยปริมาตร ดังนี้ 30:70, 40:60 และ 50:50 ทดสอบปริมาตรการฉีดตั้งแต่ $5\text{--}20\ \mu\text{L}$ อัตราการไหล $1.0\ \text{mL/min}$ ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ $30\ ^\circ\text{C}$ ความยาวคลื่น $274\ \text{nm}$

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ [14-16] แบลงค์ของตัวอย่าง (sample blank) ในการทดสอบของงานวิจัยนี้ ใช้กากกาแฟที่ปราศจากสารคาเฟอีน โดยผู้วิจัยนำกากกาแฟไปต้มน้ำร้อนจำนวน 3 ชั่วโมง เพื่อสกัดคาเฟอีนออกจนหมด

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity) นีตสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน ที่ความเข้มข้น $6.00\ \mu\text{g/mL}$ สารละลายแบลงค์ของตัวอย่าง และสารละลายตัวอย่าง เข้าเครื่อง HPLC/DAD ตรวจสอบการแยกของสารคาเฟอีนจากสารอื่น ต้องมีค่าเวลาที่สารเคลื่อนที่ (retention time) ตรงกับสารมาตรฐานและให้พีคที่ไม่ซ้อนทับกัน

การทดสอบช่วงและความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity) ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนทั้งหมด 7 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ $0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00$ และ $10.00\ \mu\text{g/mL}$ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/DAD ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีค (แกน y) โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) มีค่าเกณฑ์การยอมรับได้อยู่ในช่วง $0.995\text{--}1.000$

การทดสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) คำนวณขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณจากกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณค่าความชัน (slope) และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นกราฟ (sy/x) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ y-intercept โดยคำนวณ LOD จากสูตร $(3 \times \text{sy/x})/\text{slope}$ และ LOQ จากสูตร $(10 \times \text{sy/x})/\text{slope}$

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ทดสอบโดยการเตรียม spiked สารมาตรฐานคาเฟอีน 3 ระดับความเข้มข้นดังนี้ $100, 400$ และ $600\ \mu\text{g}$ ลงในกากกาแฟ จากนั้นนำไปสกัดตามวิธีเช่นเดียวกับการสกัดตัวอย่าง ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเท่ากับ $100\ \text{mL}$ ความเข้มข้นที่ได้มีค่าเท่ากับ $1.0, 4.0$ และ $6.0\ \mu\text{g/mL}$ แต่ละระดับทำการทดสอบ 10 ซ้ำ และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC/DAD ความแม่นยำของการวิเคราะห์คำนวณได้จากค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) และความเที่ยงของการวิเคราะห์คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) [17] โดยค่าที่ยอมรับตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ถึง $10\ \mu\text{g/mL}$ ค่าความ

แม่นยำในช่วง 80-110% และเกณฑ์การยอมรับความเที่ยง มีอยู่ในช่วง 6-8%

การเตรียมตัวอย่างเมล็ดกาแฟและการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน

ตัวอย่างเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจำนวน 7 ตัวอย่าง ที่มีแหล่งปลูกแตกต่างกัน นำแต่ละตัวอย่างมาบดละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh การสกัดตัวอย่างดำเนินการตามงานวิจัยของ Rostagno และคณะ [18] รายละเอียดดังนี้ ซึ่งตัวอย่างกาแฟน้ำหนัก 0.5 กรัมลงในหลอดทดลองป่นเหวี่ยง ขนาด 50 mL สกัดครั้งแรกด้วย 50 อัลตราซาวนด์ด้วยเครื่องล้างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 20 นาที ที่ 60 °C หลังจากการสกัดแต่ละครั้ง ตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 10 °C ที่ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง รวมสารสกัดทั้ง 3 ครั้งลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน และกรองสารละลายผ่าน ไซริงค์ฟิลเตอร์ ไนลอน (nylon syringe filter) ขนาด 0.22 μm และนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/DAD คำนวณปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างหน่วยร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง (%w/w) ดังสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณคาเฟอีน (\%w/w)} = \frac{C \times V \times d.f}{10^4 \times W}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของคาเฟอีนที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/mL}$)

V = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายตัวอย่าง (mL)

$d.f$ = อัตราส่วนการเจือจางสารละลาย

W = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

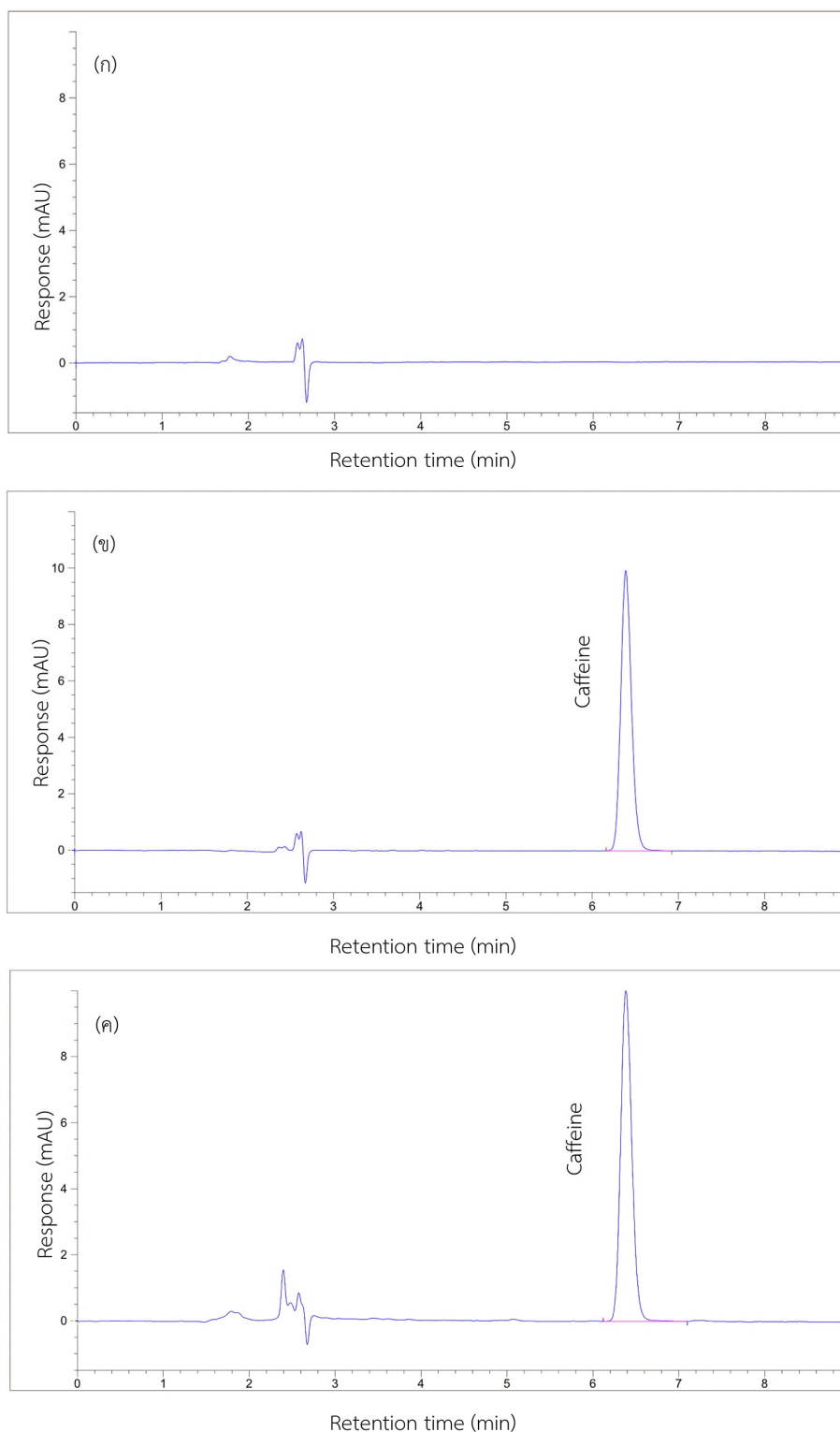
สถิติสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่ว ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ นำคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) ประเมินความแตกต่างของข้อมูลด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางโครมาโทกราฟี

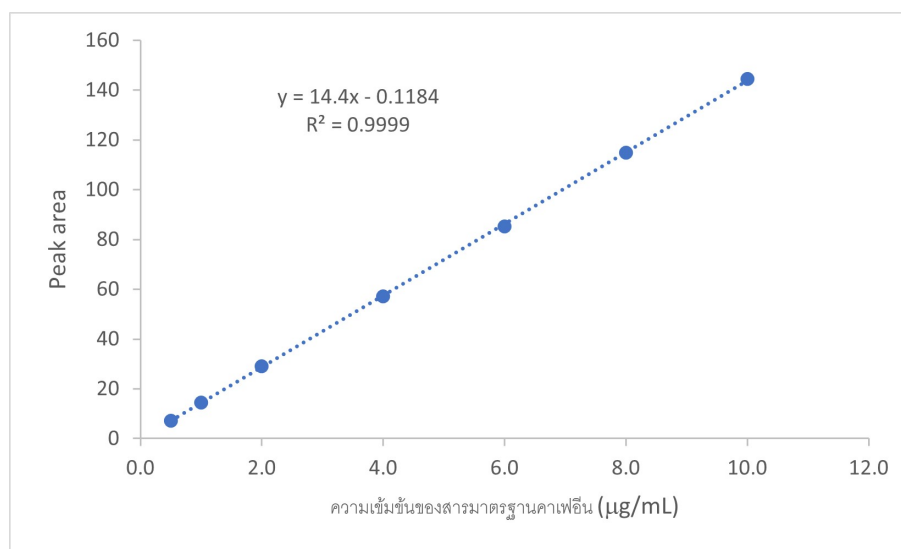
สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน ด้วยเทคนิค HPLC/DAD โดยใช้คอลัมน์ Zorbax Eclipse Plus C8 (250 x 4.6 mm, 5 μm) เฟสเคลื่อนที่เป็นแบบไอโซเครติก (isocratic) ประกอบด้วยเมทานอลต่อน้ำ เช่นเดียวกับงานของ Pokhrel และคณะ [4] สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ในอัตราส่วนเท่ากับ 30:70 อัตราการไหล 1.0 mL/min ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 30 °C ความยาวคลื่น 274 nm ปริมาตรการฉีด 5 μL สภาวะนี้เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากความชัดเจนของการแยก และความสมมาตรของพีคที่ได้ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (retention time) ของสารละลายคาเฟอีนมีค่าเท่ากับ 6.4 นาที



ภาพที่ 2: โครมาโทแกรมของสารละลาย (ก) แปลงค์ของตัวอย่าง (ข) สารละลายมาตรฐานคาเฟอีน ความเข้มข้น 6.00 $\mu\text{g/mL}$ และ (ค) สารละลายตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วกลาง S3 (เจือจาง 10 เท่า)

ตารางที่ 1: พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานคาเฟอีน แต่ละความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ Caffeine ($\mu\text{g/mL}$)	Peak area (mAU)				SD	RSD (%)
	1	2	3	เฉลี่ย		
0.50	7.369	7.198	7.201	7.26	0.098	1.35%
1.00	14.703	14.258	14.558	14.51	0.23	1.58%
2.00	28.532	28.921	29.502	28.99	0.49	1.69%
4.00	57.244	57.002	57.332	57.19	0.17	0.30%
6.00	85.800	84.246	85.654	85.23	0.86	1.01%
8.00	115.319	114.463	115.158	114.98	0.46	0.40%
10.00	145.771	144.144	143.916	144.61	1.01	0.70%

ภาพที่ 3: กราฟเส้นตรงของสารมาตรฐานคาเฟอีน ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-10.0 $\mu\text{g/mL}$

ผลการศึกษาการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ จากการฉีดสารละลาย ได้ผลแสดงดังภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ (ก) แบลงค์ของตัวอย่าง (ข) สารละลายมาตรฐานคาเฟอีนความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (ค) สารละลายตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วกลาง S3 เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลายนี้ พบว่าสภาวะของวิธีมีความจำเพาะสามารถแยกได้อย่างชัดเจน

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง จากการวิเคราะห์คาเฟอีนช่วงความเข้มข้น 0.5 – 10 $\mu\text{g/mL}$ และสร้างกราฟมาตรฐานพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = 14.3998x - 0.1184$ มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) เท่ากับ 0.9999 ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 1 และ กราฟ

ตารางที่ 2: ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของคาเฟอีนที่ 3 ระดับความเข้มข้น (n=10)

สาร	เติมคาเฟอีน ($\mu\text{g/mL}$)	ความเข้มข้นเฉลี่ย $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
คาเฟอีน	1.00	0.96 $\pm$ 0.05	96.00	5.21
	4.00	3.94 $\pm$ 0.04	98.50	1.02
	6.00	5.82 $\pm$ 0.06	97.00	1.03

ตารางที่ 3: ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟ จำนวน 7 ตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	ตัวอย่างเมล็ดกาแฟ	ปริมาณคาเฟอีน (%w/w)
S1	เมล็ดกาแฟคั่วกลาง*	1.10 $\pm$ 0.01 ^e
S2	เมล็ดกาแฟคั่วเข้ม*	1.19 $\pm$ 0.02 ^d
S3	เมล็ดกาแฟคั่วกลาง**	1.26 $\pm$ 0.01 ^c
S4	เมล็ดกาแฟคั่วเข้ม**	1.33 $\pm$ 0.02 ^b
S5	เมล็ดกาแฟคั่วเข้ม	1.34 $\pm$ 0.02 ^b
S6	เมล็ดกาแฟคั่วเข้ม	1.49 $\pm$ 0.02 ^a
S7	เมล็ดกาแฟคั่วเข้ม	1.22 $\pm$ 0.01 ^d

^{a-d} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

*, ** ตัวอย่างที่มาจากแหล่งปลูกเดียวกัน แตกต่างกันที่การคั่วเมล็ดกาแฟ

มาตรฐานดังภาพ ที่ 3

ผลการทดสอบขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ จากการวิเคราะห์คาเฟอีนขีดจำกัดในการตรวจพบ และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณที่คำนวณได้จากสมการกราฟมาตรฐานของคาเฟอีน มีค่าเท่ากับ 0.13 และ 0.43 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ จากการวิเคราะห์ความแม่นยำและความเที่ยงโดยการเติมสารมาตรฐานคาเฟอีน 3 ระดับความเข้มข้นคือ 1.00, 4.00 และ 6.00 $\mu\text{g/mL}$ ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำภายในหนึ่งวัน จากการทดสอบได้ค่าร้อยละการกลับคืน อยู่ในช่วง 96.00-98.50 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 8% ที่ระดับความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด แสดงผลดังตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟ

วิธีการวิเคราะห์นี้ได้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่ว พันธุ์อาราบิก้า จำนวน 7 ตัวอย่าง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 3

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง S1-S7 พบว่าตรวจพบคาเฟอีนทุกตัวอย่าง ซึ่งปริมาณคาเฟอีนที่พบในเมล็ดกาแฟคั่วมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.10-1.49 % โดยน้ำหนัก ปริมาณคาเฟอีนพบมากที่สุดใน S6 เมล็ดกาแฟคั่วเข้ม และปริมาณคาเฟอีนที่พบน้อยที่สุดใน S1 เมล็ดกาแฟคั่วกลาง จะเห็นได้ว่าปริมาณคาเฟอีนในกาแฟอาราบิก้า อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Shehata และคณะ [6] และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะเห็นว่าระดับความเข้มของการคั่วส่งผลต่อปริมาณคาเฟอีน โดยเมล็ดกาแฟคั่วเข้มจะมีปริมาณคาเฟอีนมากกว่าคั่วกลาง ในตัวอย่างที่มาจากแหล่งเดียวกัน และถ้าแหล่งปลูกแตกต่างกันก็ส่งผลต่อปริมาณคาเฟอีนที่แตกต่างกันด้วย

สรุปผลการวิจัย

วิธีการวิเคราะห์นี้ มีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว การประเมินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ มีพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้คือ ความจำเพาะเจาะจง ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการใช้งาน ชัดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดปริมาณ ความแม่นยำและความเที่ยง พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดตาม AOAC ดังนั้นแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์และใช้เป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการ สำหรับตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วที่มีขายในท้องตลาดได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหลักสูตรสาขาวิชาเคมี และศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่สนับสนุนเครื่องมือและสารเคมี สำหรับการวิจัยและสำเร็จตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- [1] Piotr Konieczka P., Aliaño-González M.J., Ferreiro-González M., Barbero G.F., Palma M. (2020). Characterization of arabica and robusta coffees by ion mobility sum spectrum. *Sensors*. 20(11), 3123 (1-15).
- [2] พัทธนี สุวรรณวิมลกิจ. (2542). กาแฟสกัดคาเฟอีน. *วารสารเกษตร*. 15(1), 1-10.
- [3] Wanyika H., Gatebe E., Gitu L., Ngumba E., Maritim C. (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. *African Journal of Food Science*. 4(6), 353-358.
- [4] Pokhrel P., Shrestha S., Rijal S.K., Rai K.P. (2016). A simple HPLC Method for the Determination of Caffeine Content in Tea and Coffee. *Journal of Food Science and Technology Nepal*. 9, 74-78.

- [5] สุพัตรา รักษาพรต, สุนิษา สุวรรณเจริญ, เรืองวิทย์ สว่างแก้ว, เกศสุดา สามารถ, จิตรลดา บุญเผ่า. (2561) การผลิตสบูคาเฟอีนเพื่อเพิ่มมูลค่ากากกาแฟเหลือทิ้ง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 46(1), 38–43.
- [6] Shehata A.B., Rizk M.S., Rend E.A. (2016). Certification of caffeine reference material purity by ultraviolet/visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography with diode-array detection as two independent analytical methods. *Journal of Food Drug Analysis*. 24(4), 703–715.
- [7] Bohrer D., Lapinski J., De Carvalho L.N., Do Nascimento P.T., Viana C. (2019) Development and Validation of an HPLC-DAD Method to Quantify Caffeine in Time-release Dosage Forms. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81(4), 626-632.
- [8] Lopez-Sanchez R. del C., Lara-Diaz V.J., Aranda-Gutierrez A., Martinez-Cardona J.A., Hernandez J.A. (2018). HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2018, 1-11.
- [9] Naser L.R., Sameh A., Muzaffar I., Omar A.R., Ahmed M.A. (2018). Comparative evaluation of caffeine content in Arabian coffee with other caffeine beverages. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 12(2), 19–26.
- [10] Craig A.P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. (2016). Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*. 154, 481-485.
- [11] Aly A.A., Kassem M.A., Amin A.S. (2013). Determination of caffeine in roasted and irradiated coffee beans with gamma rays by high performance liquid chromatography. *Food Science and Quality Management*. 22, 28-34.
- [12] Lima A.R., Pereira R.G., Abrahão S.A., Zangeronimo M.G., Paula F.B., Duarte S.M. (2013). Effect of decaffeination of green and roasted coffees on the in vivo antioxidant activity and prevention of liver injury in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(3), 506-512.
- [13] Karima B., Amira-Guebailia H., Boulmouk Y., Houache O. (2014). HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 45, 1314–1320.
- [14] ทิพวรรณ นิงน้อย. (2549). แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

- [15] Chandran S., Singh R. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Die Pharmazie* . 62, 4–14.
- [16] Jitkaew N., Sinaviwat S. (2022). Method validation for determination of sucralose in beverage by high performance liquid chromatography. *Bulletin of Applied Sciences*. 11(11), 35–44.
- [17] Tanaviyutpakdee P., Karnpanit W., Alongkornchotikul R. (2022). The Importance of Method Validation for Risk Assessment of Exposure to Chemicals in Foods. *Thai Journal of Toxicology* 37(1), 27–44.
- [18] Rostagno M.A., Manchón N., D'Arrigo M., Guillamón E., Villares A., García-Lafuente A., et al. (2011). Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*. 685, 204–211.