

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. การหาความชื้นในเมล็ดกาแฟ (AOAC Official Method 968.11, 2000)

ชั่งตัวอย่างกาแฟทั้งเมล็ดประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักแน่นอนในภาชนะอลูมิเนียมมีฝาปิดที่ผ่านการอบจนน้ำหนักคงที่ นำไปอบในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส ประมาณ 5.5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (Desicator) แล้วชั่งน้ำหนัก ทดลองอบซ้ำอีก จนได้น้ำหนักคงที่

คำนวณปริมาณความชื้นมาตรฐานแห้ง (dry basis)

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}$$

2. การวัดค่าสี

นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วไปบด และวัดค่าความสว่าง (L^*) ด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter Colorview Spectrometer model:9000) โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง (Illuminant) D65 มุมตกกระทบแสง 10 องศา

3. การคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบระเหยในกาแฟคั่ว

- เตรียมสารละลาย cyclohexanone 0.133 ml ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 mol/l ปรับปริมาตรเป็น 25 ml (cyclohexanone 99.5 % GLC, MW = 98.146, density = 0.941)
- ใช้ สารละลาย cyclohexanone ความเข้มข้น 5000 mg/l ปริมาตร 1×10^{-3} ml ในตัวอย่างกาแฟ 2.5 g

$$\text{ความเข้มข้นของสารประกอบระเหย } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Area (unknown volatile compound)} \times 0.005 \text{ mg} \times 1000 \text{ g}}{\text{Area (internal standard)} \times 2.5 \text{ g}}$$

4. การประมาณผลวิเคราะห์ทางสถิติ (SAS code)

```

options pageno=1 nodate nocenter;
data Volatile;
input rep date pck $ py fu et cy me ph;
title 'shelf life of volatile 4 packages';
lines;
1 15 cv 6.40 3.77 1.67 1.93 0.87 1.54
2 15 cv 6.50 3.77 1.67 1.97 0.71 1.49
1 15 cw 5.70 3.40 2.16 1.61 0.47 1.09
2 15 cw 5.76 3.82 1.80 1.78 0.52 1.52
1 15 rv 7.07 4.11 1.72 2.05 0.64 1.54
2 15 rv 5.92 4.02 1.59 1.91 0.56 1.31
1 15 rw 6.18 3.74 1.48 1.76 0.58 1.64
2 15 rw 6.88 4.57 1.78 2.22 0.66 2.07
1 30 cv 5.89 3.01 1.42 1.74 0.56 1.10
2 30 cv 6.30 3.45 1.61 1.84 0.47 1.13
1 30 cw 5.63 3.12 1.28 1.59 0.46 1.12
2 30 cw 5.77 3.54 1.46 1.83 0.61 1.28
1 30 rv 4.41 3.06 1.40 2.31 0.54 1.15
2 30 rv 4.24 2.78 1.37 1.61 0.55 1.06
1 30 rw 4.94 3.16 1.36 1.42 0.57 1.36
2 30 rw 4.81 2.72 1.39 1.56 0.42 1.23
1 60 cv 6.42 3.84 1.62 2.00 0.66 1.55
2 60 cv 7.31 4.22 1.88 2.05 1.41 1.71
1 60 cw 6.66 4.51 1.97 2.35 0.72 1.33
2 60 cw 5.15 3.54 1.66 1.91 0.62 1.12
1 60 rv 3.58 3.04 0.88 1.72 0.55 0.93
2 60 rv 3.95 3.39 0.90 1.91 0.60 1.09
1 60 rw 4.01 3.58 0.92 1.60 0.56 1.10
2 60 rw 3.57 2.81 1.36 1.15 0.39 0.88
1 90 cv 5.28 4.25 1.90 2.23 0.64 1.20
2 90 cv 5.46 3.74 1.83 2.58 0.67 1.11
1 90 cw 4.19 2.35 1.36 1.30 0.42 0.68
2 90 cw 2.99 2.62 1.36 1.00 0.47 0.76
1 90 rv 3.36 2.82 0.72 1.59 0.49 0.82
2 90 rv 3.70 2.82 0.76 1.19 0.51 0.82
1 90 rw 3.53 3.04 0.84 1.29 0.42 0.87
2 90 rw 3.51 2.67 0.76 1.15 0.41 0.65;
proc mixed method = reml noitprint;
class rep pck date;
model py = rep pck date date*pck/ddfm = satterth;
random rep*pck;
lsmeans pck/diff;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model py = pck date date*date pck*date pck*date*date;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model py = pck date pck*date/solution;
estimate 'Intercept for pck CV' intercept 1 pck 1 0 0 0;
estimate 'Intercept for pck CW' intercept 1 pck 0 1 0 0;
estimate 'Intercept for pck RV' intercept 1 pck 0 0 1 0;
estimate 'Intercept for pck RW' intercept 1 pck 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RW' date 1 pck*date 0 0 0 1;

```

```

estimate 'Slope for pck RV' date 1 pck*date 0 0 1 0;
estimate 'Slope for pck CW' date 1 pck*date 0 1 0 0;
estimate 'Slope for pck CV' date 1 pck*date 1 0 0 0;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class rep pck date;
model fu = rep pck date date*pck/ddfm = satterth;
random rep*pck;
lsmeans pck/diff;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model fu = pck date date*date pck*date pck*date*date;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model fu = pck date pck*date/solution;
estimate 'Intercept for pck CV' intercept 1 pck 1 0 0 0;
estimate 'Intercept for pck CW' intercept 1 pck 0 1 0 0;
estimate 'Intercept for pck RV' intercept 1 pck 0 0 1 0;
estimate 'Intercept for pck RW' intercept 1 pck 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RW' date 1 pck*date 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RV' date 1 pck*date 0 0 1 0;
estimate 'Slope for pck CW' date 1 pck*date 0 1 0 0;
estimate 'Slope for pck CV' date 1 pck*date 1 0 0 0;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class rep pck date;
model et = rep pck date date*pck/ddfm = satterth;
random rep*pck;
lsmeans pck/diff;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model et = pck date date*date pck*date pck*date*date;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model et = pck date pck*date/solution;
estimate 'Intercept for pck CV' intercept 1 pck 1 0 0 0;
estimate 'Intercept for pck CW' intercept 1 pck 0 1 0 0;
estimate 'Intercept for pck RV' intercept 1 pck 0 0 1 0;
estimate 'Intercept for pck RW' intercept 1 pck 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RW' date 1 pck*date 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RV' date 1 pck*date 0 0 1 0;
estimate 'Slope for pck CW' date 1 pck*date 0 1 0 0;
estimate 'Slope for pck CV' date 1 pck*date 1 0 0 0;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class rep pck date;
model cy = rep pck date date*pck/ddfm = satterth;
random rep*pck;
lsmeans pck/diff;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model cy = pck date date*date pck*date pck*date*date;
run;

```

```

proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model cy = pck date pck*date/solution;
estimate 'Intercept for pck CV' intercept 1 pck 1 0 0 0;
estimate 'Intercept for pck CW' intercept 1 pck 0 1 0 0;
estimate 'Intercept for pck RV' intercept 1 pck 0 0 1 0;
estimate 'Intercept for pck RW' intercept 1 pck 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RW' date 1 pck*date 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RV' date 1 pck*date 0 0 1 0;
estimate 'Slope for pck CW' date 1 pck*date 0 1 0 0;
estimate 'Slope for pck CV' date 1 pck*date 1 0 0 0;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class rep pck date;
model me = rep pck date date*pck/ddfm = satterth;
random rep*pck;
lsmeans pck/diff;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model me = pck date date*date pck*date pck*date*date;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model me = pck date pck*date/solution;
estimate 'Intercept for pck CV' intercept 1 pck 1 0 0 0;
estimate 'Intercept for pck CW' intercept 1 pck 0 1 0 0;
estimate 'Intercept for pck RV' intercept 1 pck 0 0 1 0;
estimate 'Intercept for pck RW' intercept 1 pck 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RW' date 1 pck*date 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RV' date 1 pck*date 0 0 1 0;
estimate 'Slope for pck CW' date 1 pck*date 0 1 0 0;
estimate 'Slope for pck CV' date 1 pck*date 1 0 0 0;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class rep pck date;
model ph = rep pck date date*pck/ddfm = satterth;
random rep*pck;
lsmeans pck/diff;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model ph = pck date date*date pck*date pck*date*date;
run;
proc mixed method = reml noitprint;
class pck;
model ph = pck date pck*date/solution;
estimate 'Intercept for pck CV' intercept 1 pck 1 0 0 0;
estimate 'Intercept for pck CW' intercept 1 pck 0 1 0 0;
estimate 'Intercept for pck RV' intercept 1 pck 0 0 1 0;
estimate 'Intercept for pck RW' intercept 1 pck 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RW' date 1 pck*date 0 0 0 1;
estimate 'Slope for pck RV' date 1 pck*date 0 0 1 0;
estimate 'Slope for pck CW' date 1 pck*date 0 1 0 0;
estimate 'Slope for pck CV' date 1 pck*date 1 0 0 0;
run;

```

5. ผลการวิเคราะห์แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหยในกาแฟ ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บ 90 วัน ภายใต้สภาวะการบรรจุแตกต่างกัน

Estimates (Pyridine)

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept for pck CV	6.6831	0.5257	23	12.71	<.0001
Intercept for pck CW	6.4908	0.5257	23	12.35	<.0001
Intercept for pck RV	6.1788	0.5257	23	11.75	<.0001
Intercept for pck RW	6.6066	0.5528	23	11.95	<.0001
Slope for pck RW	-0.04109	0.01104	23	-3.72	0.0011
Slope for pck RV	-0.03385	0.009283	23	-3.65	0.0013
Slope for pck CW	-0.02584	0.009283	23	-2.78	0.0106
Slope for pck CV	-0.01001	0.009283	23	-1.08	0.2920

Estimates (2-Furanmethanolacetate)

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept for pck CV	3.4282	0.3611	23	9.49	<.0001
Intercept for pck CW	3.8985	0.3611	23	10.80	<.0001
Intercept for pck RV	3.8345	0.3611	23	10.62	<.0001
Intercept for pck RW	3.8696	0.3797	23	10.19	<.0001
Slope for pck RW	-0.01156	0.007584	23	-1.52	0.1412
Slope for pck RV	-0.01189	0.006377	23	-1.86	0.0751
Slope for pck CW	-0.01099	0.006377	23	-1.72	0.0981
Slope for pck CV	0.006729	0.006377	23	1.06	0.3023

Estimates (3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine)

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept for pck CV	1.5259	0.1370	23	11.13	<.0001
Intercept for pck CW	1.8662	0.1370	23	13.62	<.0001
Intercept for pck RV	1.7740	0.1370	23	12.94	<.0001
Intercept for pck RW	1.7379	0.1441	23	12.06	<.0001
Slope for pck RW	-0.01012	0.002878	23	-3.52	0.0019
Slope for pck RV	-0.01244	0.002420	23	-5.14	<.0001
Slope for pck CW	-0.00482	0.002420	23	-1.99	0.0585
Slope for pck CV	0.003571	0.002420	23	1.48	0.1537

Estimates (1-(1-cyclohexen-1-yl)-ethanone)

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept for pck CV	1.7103	0.2001	23	8.55	<.0001
Intercept for pck CW	1.9337	0.2001	23	9.66	<.0001
Intercept for pck RV	2.1655	0.2001	23	10.82	<.0001
Intercept for pck RW	1.9479	0.2104	23	9.26	<.0001
Slope for pck RW	-0.00879	0.004202	23	-2.09	0.0478
Slope for pck RV	-0.00778	0.003534	23	-2.20	0.0380
Slope for pck CW	-0.00538	0.003534	23	-1.52	0.1412
Slope for pck CV	0.006814	0.003534	23	1.93	0.0663

Estimates (5H-5-Methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine)

Label	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept for pck CV	0.7143	0.1221	23	5.85	<.0001
Intercept for pck CW	0.5486	0.1221	23	4.49	0.0002
Intercept for pck RV	0.6046	0.1221	23	4.95	<.0001
Intercept for pck RW	0.6164	0.1284	23	4.80	<.0001
Slope for pck RW	-0.00238	0.002564	23	-0.93	0.3623
Slope for pck RV	-0.00102	0.002156	23	-0.47	0.6416
Slope for pck CW	-0.00025	0.002156	23	-0.12	0.9072
Slope for pck CV	0.000706	0.002156	23	0.33	0.7462

Estimates (4-Ethyl-2-methoxyphenol)

Standard

Label	Estimate	Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept for pck CV	1.4427	0.1467	23	9.84	<.0001
Intercept for pck CW	1.4513	0.1467	23	9.89	<.0001
Intercept for pck RV	1.4370	0.1467	23	9.80	<.0001
Intercept for pck RW	1.8705	0.1542	23	12.13	<.0001
Slope for pck RW	-0.01315	0.003081	23	-4.27	0.0003
Slope for pck RV	-0.00712	0.002590	23	-2.75	0.0114
Slope for pck CW	-0.00695	0.002590	23	-2.68	0.0133
Slope for pck CV	-0.00182	0.002590	23	-0.70	0.4882

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ข
คุณสมบัติของถุงบรรจุกาแฟ

Polyethylene terephthalate (PET)	12 micron
Polyethylene (PE)	30 micron
Aluminium (AL)	8 micron
Linear low density polyethylene (LLDPE)	60 micron
Total	110 micron

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ค
ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ค.1 ร้อยละความชื้นของเมล็ดกาแฟคั่ว

N	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% ความชื้น	0.70	0.67	0.70	0.68	0.70	0.67	0.69	0.67	0.71
% ค่าความสว่าง	21.23	21.31	21.19	22.2	22.21	22.22	21.19	21.14	21.17

จำนวนข้อมูลในตาราง n = 9

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ ค.2 พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟั่วที่ตรวจพบ ที่เวลาในการสกัดต่างกัน

T _R	สารประกอบ	พื้นที่ของสารประกอบ (Corrected area)			
		20 นาที	30 นาที	40 นาที	50 นาที
Furans					
1.35	2-Methylfuran	4.71	7.14	7.21	6.78
4.39	2-Furanmethanol	36.98	55.88	60.33	51.60
8.41	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	6.65	10.09	9.65	8.89
9.43	2-Furanmethanolacetate	24.96	37.80	40.25	33.11
13.13	3-Ethyl-4-methyl-2,5-furandione	5.00	9.22	9.27	7.57
15.54	2-(2-Furanylmethyl)-5-methylfuran	8.66	11.33	12.29	9.37
19.06	2,2'-[Oxybis(methylene)]bisfuran	5.86	7.84	9.70	6.29
22.03	2-n-Butylfuran	2.79	3.69	3.77	2.97
	Subtotal	95.60 ^b	142.99 ^a	148.87 ^a	123.19 ^a
Pyrazines					
3.76	Methylpyrazine	21.02	32.33	9.60	28.13
6.44	2,5-Dimethylpyrazine	37.27	55.78	57.21	43.42
9.63	2-Ethyl-6-methylpyrazine	4.54	6.99	6.82	5.66
9.72	2-Ethyl-5-methylpyrazine	15.19	22.23	6.06	16.25
12.41	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	10.28	14.70	15.20	11.05
14.41	5H-5-Methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine	4.66	8.94	9.87	8.96
	Subtotal	77.80 ^c	132.03 ^a	94.89 ^b	104.50 ^b
Phenol					
9.19	Phenol	-	5.04	5.05	4.48
18.38	4-Ethyl-2-methoxyphenol	9.30	12.32	15.53	13.76
19.35	2-Methoxy-4-vinylphenol	9.37	13.09	14.37	11.11
	Subtotal	18.67 ^b	30.45 ^a	34.95 ^a	29.34 ^a
Pyridine					
2.29	Pyridine	41.22	66.21	71.19	59.57
8.63	3-Ethylpyridine	-	6.48	7.04	4.82

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟั่วที่ตรวจพบ ที่เวลาในการสกัดต่างกัน

T _R	สารประกอบ	พื้นที่ของสารประกอบ (Corrected area)			
		20 นาที	30 นาที	40 นาที	50 นาที
10.37	N-Acetyl-4(H)-pyridine	2.86	5.16	4.83	3.99
	Subtotal	44.08 ^b	77.86 ^a	83.06 ^a	68.84 ^a
	Miscellaneous				
4.93	1-(Acetoxy)-2-propanone	9.99	14.98	15.07	13.23
12.11	1-(1H-Pyrrol-2-yl)-ethanone	2.62	4.83	4.79	3.32
	1-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-				
12.2	ethanone	4.14	5.54	5.70	4.49
	2-Furanylmethylester-3-methyl-				
16.77	butanoic acid	1.60	2.08	1.96	1.56
20.85	4-Ethenyl-1,2-dimethoxybenzene	3.17	3.96	4.06	2.98
	Subtotal	21.52 ^b	31.39 ^a	31.59 ^a	25.58 ^{ab}

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของข้อมูลที่

เปรียบเทียบ ณ เวลาต่างกัน

¹ พื้นที่ $\times 10^6$ ของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารประกอบระเหยที่เวลา 20 30 40 และ 50 นาที

จำนวนข้อมูล 2 ซ้ำ

ตารางที่ ค.3 พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมสิดกาแฟลั่วที่ตรวจพบ ที่น้ำหนักในการสกัดต่างกัน

t _R	สารประกอบ	พื้นที่ของสารประกอบ (Corrected area)		
		2.0 กรัม	2.5 กรัม	3.0 กรัม
	Furans			
1.35	2-Methylfuran	4.94	5.15	5.17
4.39	2-Furanmethanol	34.35	48.09	51.54
8.41	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	10.56	10.59	11.43
9.43	2-Furanmethanolacetate	19.74	29.78	32.62
13.13	3-Ethyl-4-methyl-2,5-furandione	6.32	7.55	6.21
15.54	2-(2-Furanylmethyl)-5-methylfuran	6.19	9.01	51.80
19.06	2,2'-[Oxybis(methylene)]bisfuran	3.64	6.14	6.51
22.03	2-n-Butylfuran	2.32	3.52	4.02
	Subtotal	88.06 ^b	119.82 ^a	126.59 ^a
	Pyrazines			
3.76	Methylpyrazine	21.00	24.20	26.35
6.44	2,5-Dimethylpyrazine	32.86	49.79	52.48
9.63	2-Ethyl-6-methylpyrazine	4.68	11.75	6.25
9.72	2-Ethyl-5-methylpyrazine	10.63	12.56	17.21
12.41	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	9.64	12.66	15.91
14.41	5H-5-Methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine	2.20	5.98	2.80
	Subtotal	81.01 ^a	116.94 ^a	121.01 ^a
	Phenol			
9.19	Phenol	-	4.39	3.76
18.38	4-Ethyl-2-methoxyphenol	5.63	8.95	13.12
19.35	2-Methoxy-4-vinylphenol	6.96	11.50	11.96
	Subtotal	12.59 ^b	24.85 ^a	27.38 ^a
	Pyridine			
2.29	Pyridine	35.02	56.24	52.02
8.63	3-Ethylpyridine		5.16	4.29
10.37	N-Acetyl-4(H)-pyridine	2.47	4.42	4.36

ตารางที่ ค.3 (ต่อ) พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟั่วที่ตรวจพบ ที่น้ำหนักในการสกัดต่างกัน

t_R	สารประกอบ	พื้นที่ของสารประกอบ (Corrected area)		
		2.0 กรัม	2.5 กรัม	3.0 กรัม
	Subtotal	37.49 ^b	65.82 ^a	62.65 ^a
	Miscellaneous			
4.93	1-(Acetoxy)-2-propanone	9.71	13.82	13.78
12.11	1-(1H-Pyrrol-2-yl)-ethanone	3.01	4.30	5.56
12.2	1-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-ethanone	4.70	5.42	7.23
16.77	2-Furanylmethylester-3-methyl-butanoic acid	1.00	1.78	1.78
20.85	4-Ethenyl-1,2-dimethoxybenzene	2.10	3.23	3.46
	Subtotal	20.53 ^b	28.55 ^a	29.37 ^a

หมายเหตุ^{abc} ตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของข้อมูล
 เปรียบเทียบที่น้ำหนักต่างกัน
^a พื้นที่ $\times 10^6$ ของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารประกอบระเหยที่น้ำหนัก 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม
 จำนวนข้อมูล 2 ซ้ำ

ตารางที่ ค.4 พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟั่วที่ตรวจพบ ที่อุณหภูมิในการสกัด
ต่างกัน

t _R	สารประกอบ	พื้นที่ของสารประกอบ (Corrected area)		
		50 °C	60 °C	70 °C
	Furans			
1.35	2-Methylfuran	-	-	-
4.39	2-Furanmethanol	22.25	33.14	34.90
8.41	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	7.76	9.33	6.74
9.43	2-Furanmethanolacetate	19.55	23.84	20.14
13.13	3-Ethyl-4-methyl-2,5-furandione	-	-	-
15.54	2-(2-Furanylmethyl)-5-methylfuran	6.50	8.28	7.75
19.06	2,2'-[Oxybis(methylene)]bisfuran	4.29	4.98	4.10
22.03	2-n-Butylfuran	2.90	4.00	2.80
	Subtotal	63.24 ^b	83.57 ^a	76.43 ^{ab}
	Pyrazines			
3.76	Methylpyrazine	19.26	8.26	18.89
6.44	2,5-Dimethylpyrazine	37.05	44.50	28.69
9.63	2-Ethyl-6-methylpyrazine	6.19	8.80	5.17
9.72	2-Ethyl-5-methylpyrazine	12.16	11.49	6.85
12.41	3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	4.33	4.91	2.32
14.41	5H-5-Methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine	3.94	4.89	3.10
	Subtotal	82.93 ^a	82.86 ^a	65.02 ^a
	Phenol			
9.19	Phenol	-	-	-
18.38	4-Ethyl-2-methoxyphenol	6.47	7.84	6.77
19.35	2-Methoxy-4-vinylphenol	7.39	8.66	7.48
	Subtotal	13.86 ^a	16.50 ^a	14.25 ^a
	Pyridine			
2.29	Pyridine	34.07	44.03	35.62
8.63	3-Ethylpyridine	-	-	-

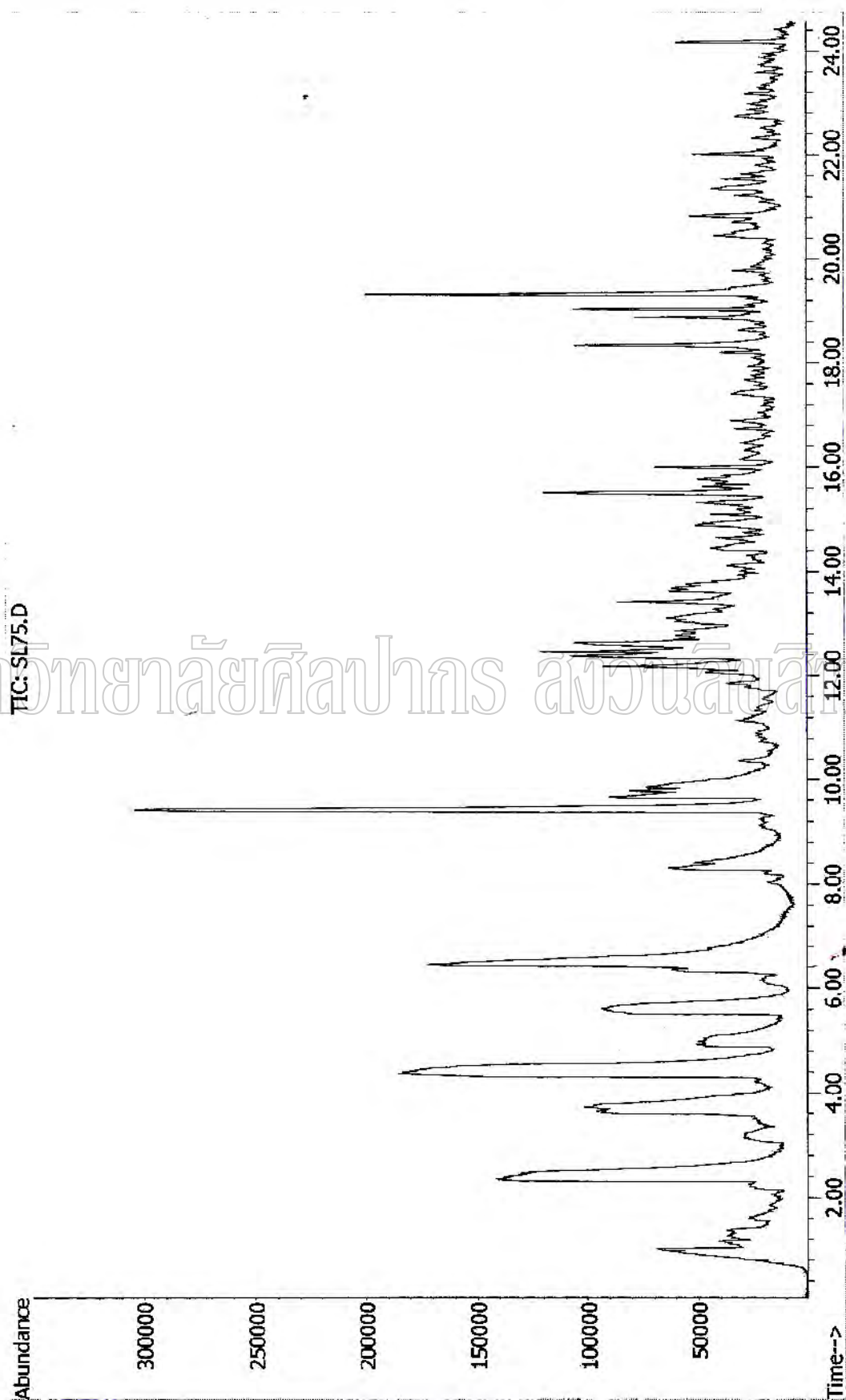
ตารางที่ ค.4 (ต่อ) พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟที่ตรวจพบ ที่อุณหภูมิในการสกัดต่างกัน

t_R	สารประกอบ	พื้นที่ของสารประกอบ (Corrected area)		
		50 °C	60 °C	70 °C
10.37	N-Acetyl-4(H)-pyridine	-	3.67	3.56
	Subtotal	34.07 ^a	45.86 ^a	37.39 ^a
	Miscellaneous			
4.93	1-(Acetoxy)-2-propanone	7.67	5.05	8.32
12.11	1-(1H-Pyrrol-2-yl)-ethanone	2.69	3.15	1.72
12.2	1-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-ethanone	4.67	5.86	4.04
16.77	2-Furanylmethylester-3-methyl-butanoic acid	1.45	1.62	1.04
20.85	4-Ethenyl-1,2-dimethoxybenzene	3.06	3.71	2.68
	Subtotal	19.54 ^a	19.40 ^a	17.81 ^a

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวนิลขสิทธิ์

หมายเหตุ^{abc} ตัวอักษรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของข้อมูลที่เปรียบเทียบที่อุณหภูมิต่างกัน

¹ พื้นที่ $\times 10^6$ ของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารประกอบระเหยที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส จำนวนข้อมูล 2 ซ้ำ

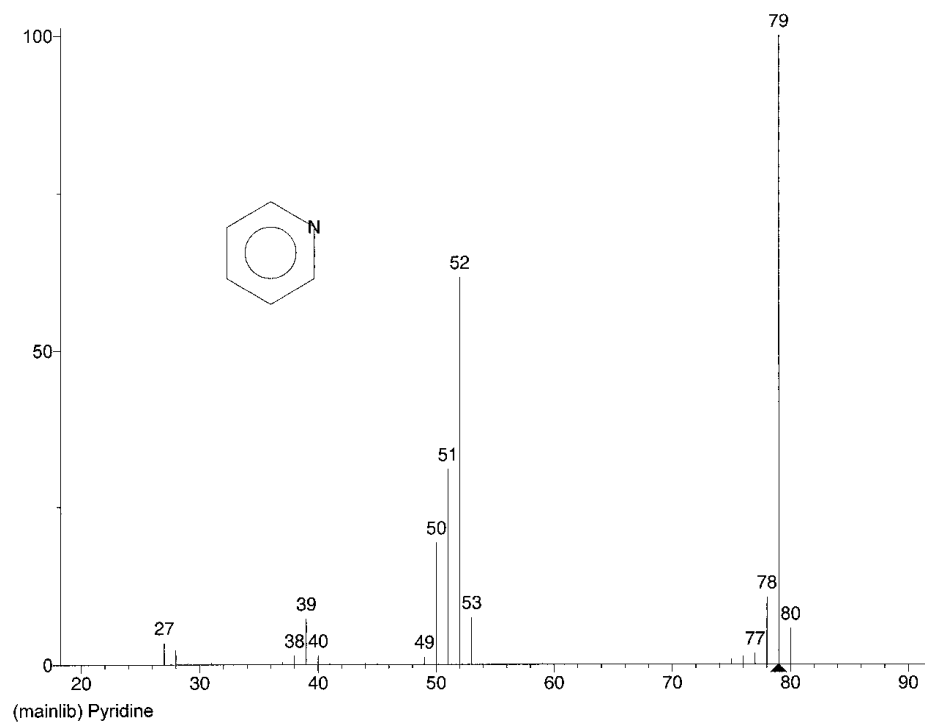


รูปที่ ค.1 โครมาโตแกรมของสารประกอบระเหยในกาแฟจากเครื่องกาชโรมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

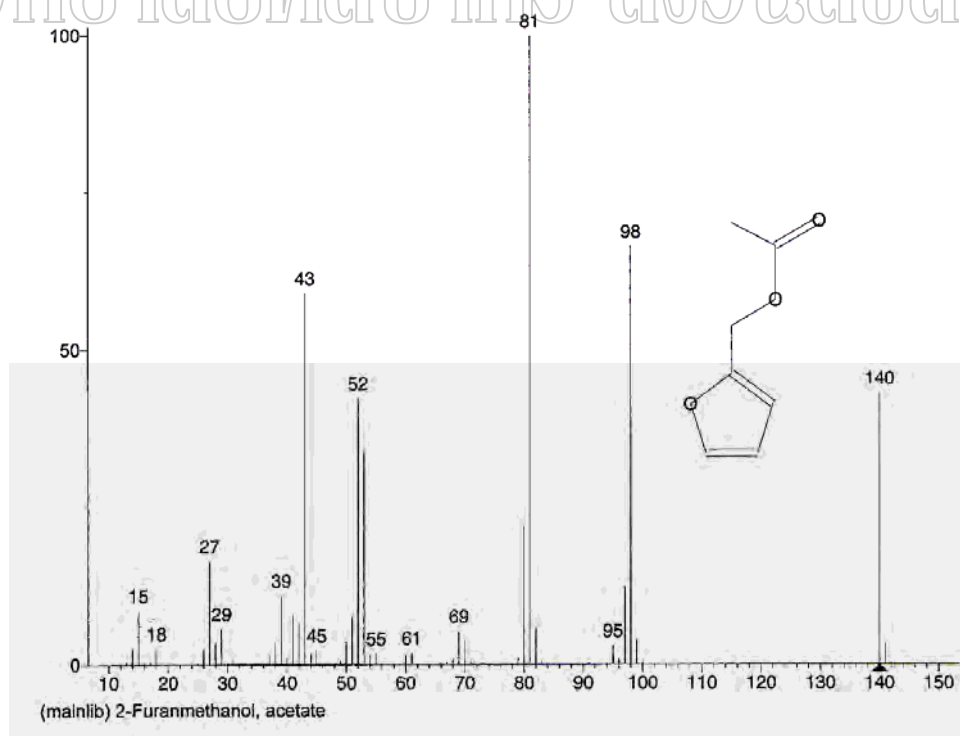
ภาคผนวก ง

สูตรโครงสร้างสารประกอบระเหยและแมสสเปกตรัมที่น่าสนใจในกาแฟ

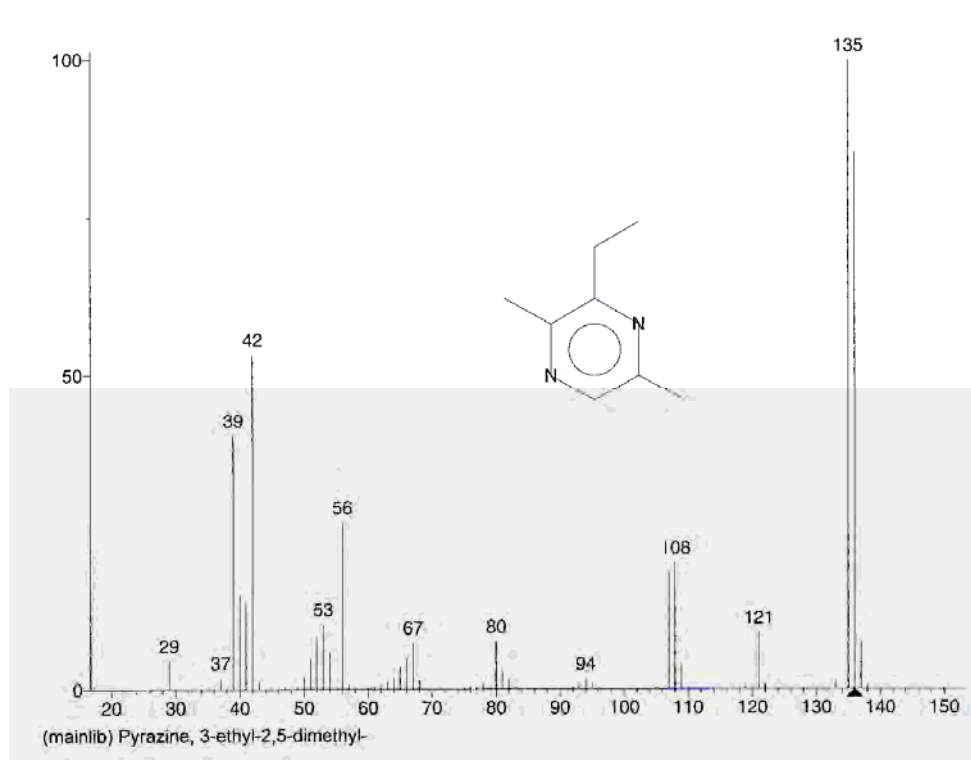
มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



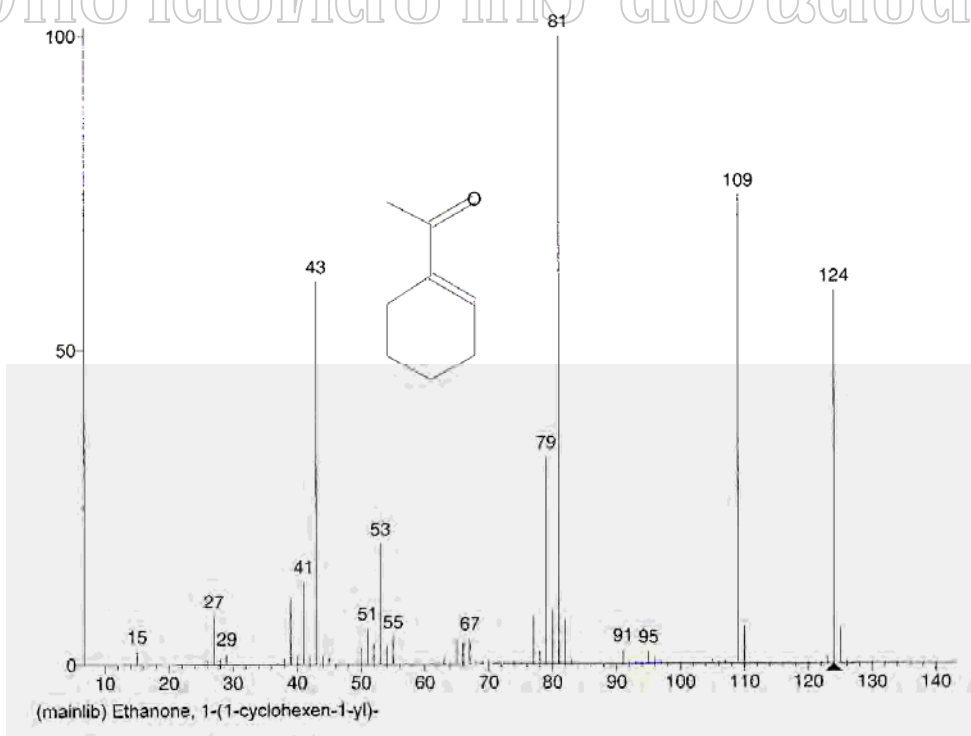
รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างและแมสสเปกตรัมของ pyridine



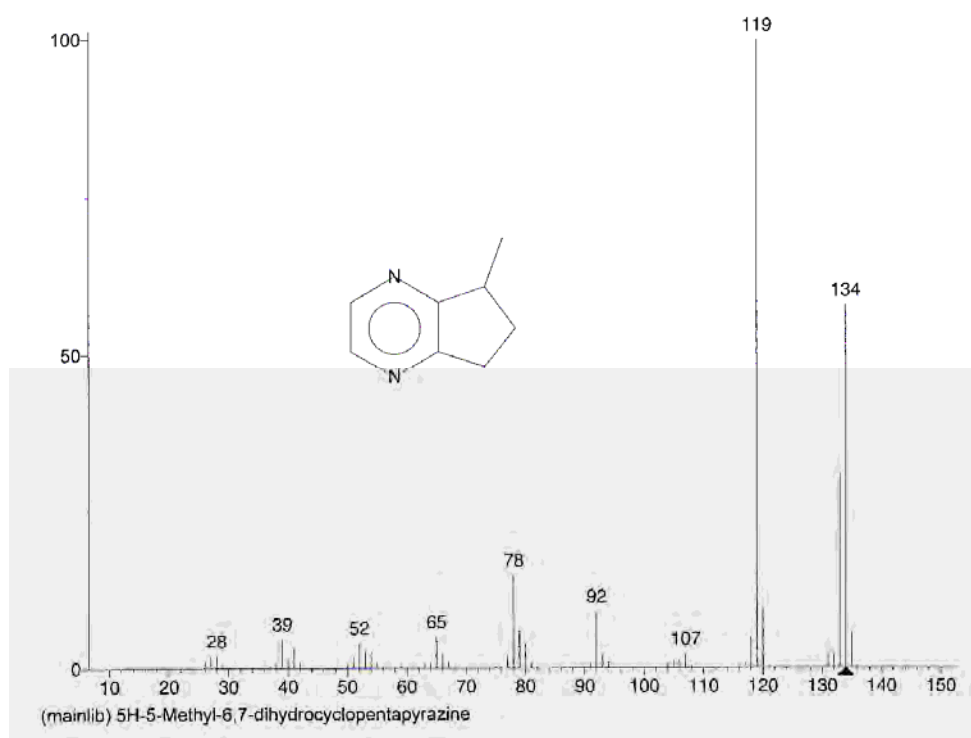
รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างและแมสสเปกตรัมของ 2-furanmethanolacetate



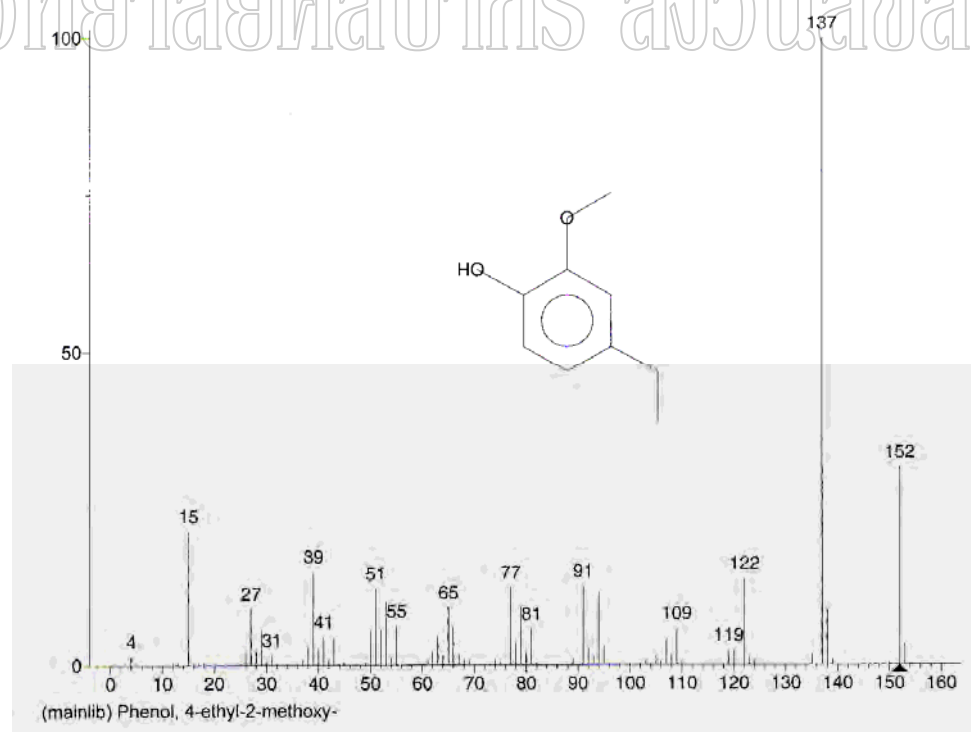
รูปที่ 3.3 สูตรโครงสร้างและแมสสเปกตรัมของ 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine



รูปที่ 3.4 สูตรโครงสร้างและแมสสเปกตรัมของ 1-(1-cyclohexen-1-yl)-ethanone



รูปที่ ๓.5 สูตรโครงสร้างและแมสสเปกตรัมของ 5H-5-methyl-6,7-dihydrocyclopentapyrazine



รูปที่ ๓.6 สูตรโครงสร้างและแมสสเปกตรัมของ 4-ethyl-2-methoxyphenol



การวิเคราะห์สารประกอบระเหยในกาแฟด้วยวิธีสกัดแบบโซลิดเฟสไมโครเอ็กแทรกชัน

ณฐมน รุ่งสร้างธรรม, ศุภชัย ลิขิจำนัณย*^๑, สุเชษฐ์ สมุหนันโต, บัณฑิต อินฉวงค์ และ อรุณศรี ลิขิจำนัณย

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม 73000

* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

โทรศัพท์และโทรสาร : (034) 219361, E-mail : arunsri@su.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษารวบรวมสารประกอบระเหยในกาแฟเป็นสองขั้นตอนคือ การสกัดและการวิเคราะห์ด้วยวิธี แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ขั้นตอนการสกัดสารทำได้หลายวิธี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายโดยตรง วิธี Purge and Trap การกักเก็บด้วยไออน้ำ และใช้ตัวทำละลายในสภาวะสูญญากาศ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดเหล่านี้ยุ่งยาก ใช้น้ำมันและอุปกรณ์ราคาแพง รวมทั้งต้องใช้สารเคมีในการสกัด ในงานวิจัยนี้ต้องการหาสารที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟ ด้วยวิธี Solid phase microextraction ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วไม่ต้องการใช้สารเคมี การสกัดได้ใช้ไซลิโคเน็กซ์ Polydimethyl siloxane เป็นตัวจับสารประกอบระเหยของกาแฟที่บรรจุในขวดแก้วชนิดมีขนาด 20 มิลลิกรัม และใช้หลอดลมเปลี่ยนตัวแปรที่เกี่ยวข้องในการสกัดคือ ปริมาณของกาแฟ (2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม) อุณหภูมิ (50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) และเวลา (20, 40 และ 50 นาที) และตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธี แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ใช้ตัวอย่างกาแฟ 2.5 กรัม อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการสกัด 30 นาที และขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีพบว่า สามารถใช้สารละลาย Cyclohexanone เป็น internal standard ที่เหมาะสม (5000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 0.1 M HCl) และจากการทดลองพบว่าสารประกอบระเหยที่จำเป็นพบมากที่สุดสิบสองของกาแฟอาราบิก้าที่ระดับปานกลาง ได้แก่ Pyridine, 2-Furanmethanol, 2-Furanmethanolacetate, Pyrazine, 2,5-Dimethylpyrazine และ 4-Ethyl-2-methoxyphenol เป็นต้น

บทนำ

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการหาสารที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟ ด้วยวิธี solid phase microextraction ซึ่งวิธีนี้สารประกอบระเหยที่สนใจอยู่ในสภาวะสมดุลระหว่างเมทริกซ์ ตัวอย่าง (sample matrix) และเฟสของแข็ง (Uraneula และ Pizarro, 2004) เฟสของแข็งเป็นโพลิเมอร์ดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์แยกออกจากตัวอย่าง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการประสิทธิภาพการสกัดสารโดยวิธีนี้ได้แก่ ชนิดของโพลิเมอร์ที่ใช้ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ความเข้มข้น ขนาดของโมเลกุลและปริมาณของสารประกอบที่พบในตัวอย่างไม่เหมาะสม (Kamavours และคณะ, 2005) ชนิดของ internal standard สำคัญสำหรับการวิเคราะห์ เพราะจะมีความไวต่อการรบกวนที่น้อยและไม่ควรจะมีในตัวอย่างไม่เหมาะสม มีประโยชน์ในการวิเคราะห์แบบ โครมาโตกราฟี คือ สามารถใช้ทำนายหาปริมาณสารที่สนใจหรือลดการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่สนใจโดยการคำนวณจากอัตราส่วนของสัญญาณ (signal ratio) และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารได้ โดยไม่หวั่นไหวต่อความแม่นยำและความถูกต้อง

วัตถุประสงค์

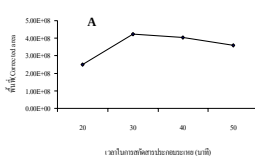
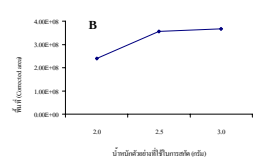
เพื่อศึกษาหาสารที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟด้วยวิธีสกัดแบบไมโครเอ็กแทรกชัน รวมถึงศึกษาชนิดของ internal standard ที่ใช้ลดความเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหยในกาแฟในตัว

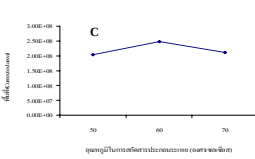
วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างกาแฟแห้ง เมล็ดกาแฟพันธุ์ *Coffea arabica* สายพันธุ์ H.528/46 จากศูนย์บริการวิชาการด้านพืช และปัจจัยการผลิตภาค 1 กรมวิชาการเกษตร อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแบบเปียกมาคัดเลือกให้ได้เมล็ดที่แก่สมบูรณ์ คั่วเมล็ดกาแฟ น้ำหนัก 70 กรัม แบบปานกลาง (อุณหภูมิประมาณ 210 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 6 นาที) ด้วยเครื่องคั่วกาแฟ (Precision coffee Roaster, 40201, USA) และวัดค่าความสว่างและความเข้มของสี เป็นดัชนีบ่งชี้ระดับการคั่วและหาปริมาณความเข้มข้นของเมล็ดกาแฟ ที่ผ่านการคั่วโดยใช้ความชื้นมาตรฐานแห้ง เมล็ดกาแฟคั่วที่ได้นำมาบรรจุในถุงบรรจุ ชนิดPET/Al/LLDPE บรรจุแบบสุญญากาศและเก็บในตู้แช่แข็ง ที่ -10 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์สารประกอบระเหย
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารด้วยวิธี headspace solid phase microextraction ใช้ไซลิโคเน็กซ์ ชนิดโพลิไดเมทิลไซลอกเซน (polydimethyl siloxane) ความหนา 100 ไมโครเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร (Supelco, USA) ในการสกัดสารประกอบระเหย วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบระเหยโดยใช้เครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี โดยวางแผนการทดลองแบบ complete randomized design วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ The least significant difference ศึกษาเวลาที่ที่เหมาะสม (20, 30, 40 และ 50 นาที) ปริมาณตัวอย่างกาแฟ (2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม) และอุณหภูมิที่เหมาะสม (50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส)
3. ศึกษาการใช้ internal standard ที่เหมาะสมสำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟคั่ว สารที่นำมาทดลองใช้เป็น internal standard ได้แก่ 2,4,6-trimethylpyridine; benzaldehyde; pyridine และ cyclohexanone ความเข้มข้น 5000 mg/l ใน 0.1 M HCl ใช้ปริมาณตัวอย่างกาแฟ 2.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วชนิดมีขนาด 20 มิลลิกรัม ผิดสารประกอบที่ใช้เป็น internal standard 1 ไมโครลิตร ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 60 องศาเซลเซียส

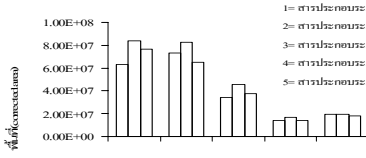
การวิเคราะห์สารประกอบระเหยโดยใช้ เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (HP 6890, Hewlett Packard) ตรวจวิเคราะห์ด้วย mass selective detector HP 5973 คอลัมน์ คือ fused silica capillary column HP-5 ใช้ก๊าซเฉื่อยเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของฮีเลียม 1.2 มิลลิกรัม/นาที อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 150 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิของ injector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส splitless mode ส่วนของเครื่องตรวจจับอุณหภูมิ ion source 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ quadrupole 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ MS interface 280 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ mass(m/z) ในช่วง 40-400 amu นำข้อมูลมาของสารประกอบระเหยที่ตรวจพบโดยเปรียบเทียบ mass spectral data ที่ได้รับ NIST 98 library (NIST98, USA)

ผลการทดลอง



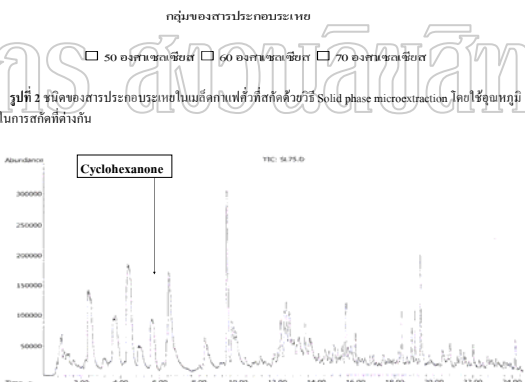
รูปที่ 1 สารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วที่สกัดด้วยวิธี Solid phase microextraction เวลาในการสกัด (รูป A) น้ำหนักตัวอย่าง (รูป B) และอุณหภูมิ (รูป C) ในการสกัดที่ต่างกัน



รูปที่ 2 ชนิดของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วที่สกัดด้วยวิธี Solid phase microextraction โดยใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ต่างกัน

1= สารประกอบระเหยกลุ่มฟิวแรน
2= สารประกอบระเหยกลุ่มไพราซีน
3= สารประกอบระเหยกลุ่มไพรีน
4= สารประกอบระเหยกลุ่มฟีนอล
5= สารประกอบระเหยกลุ่มอื่นๆ

กลุ่มของสารประกอบระเหย



รูปที่ 3 โครมาโตแกรมของสารประกอบระเหยในกาแฟคั่ว และชนิด internal standard : Cyclohexanone

สรุป

จากการศึกษาผลของเวลาในการสกัดสารประกอบระเหยของเมล็ดกาแฟคั่ว ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ใช้ตัวอย่างกาแฟ 2.5 กรัม อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการสกัด 30 นาที และขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารด้วยวิธี แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีพบว่าสามารถใช้สารละลาย Cyclohexanone เป็น internal standard สำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหย โดยเตรียม Cyclohexanone เข้มข้น 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 0.1 M HCl มีค่า retention time เท่ากับ 5.62 นาที และจากการทดลองพบว่า สารประกอบระเหยที่จำเป็นพบมากที่สุดสิบสองของกาแฟอาราบิก้าที่ระดับปานกลาง ได้แก่ Pyridine, 2-Furanmethanol, 2-Furanmethanolacetate, Pyrazine, 2,5-Dimethylpyrazine และ 4-Ethyl-2-methoxyphenol เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Kamavours, A., Kritsakis, A. and Hernandez, J. 2005. Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. Food Chemistry 90: 69-79.

Maria, C.A.B., Trigo, L.C., Neto, F.R., Moreira, R.F.A. and Alviano, C.S. 1996. Composition of Green Coffee Water-Soluble Fraction and Identification of Volatiles Formed During Roasting. Journal of Food Chemistry 55(3): 203- 207.1.

Uruneula, A. M. and Pizarro, J.M.G. 2004. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. Journal of Chromatography A. 1056: 49-56.

รูปที่ ๗.7 โปสเตอร์จัดแสดงในงานการประชุมสัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 8 ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ, 15-16 มิถุนายน 2549

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวณฐมน รุ่งสร้างธรรม
 ที่อยู่ 29/67 หมู่ 9 หมู่บ้านพฤษภาทูลเกล้า 2 ถนนอุทัย ตำบลปากแพรก
 อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี 71000
 E-mail address : nathamon_oy@yahoo.com

ประวัติการศึกษา
 พ.ศ. 2533 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)
 มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

ประวัติการทำงาน
 พ.ศ. 2533-2535 นักเคมี บริษัท โลหะตะกั่วไทย จำกัด
 พ.ศ. 2535-2540 รองหัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพ บริษัท โลหะตะกั่วไทย จำกัด
 พ.ศ. 2540-2543 หัวหน้าแผนกควบคุมคุณภาพ บริษัท โลหะตะกั่วไทย จำกัด
 พ.ศ. 2543-2548 ผู้จัดการแผนกควบคุมคุณภาพและสิ่งแวดล้อม บริษัท โลหะตะกั่วไทย จำกัด
 พ.ศ. 2541-2548 อาจารย์พิเศษภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย
 ราชภัฏกาญจนบุรี

พ.ศ. 2548 ผู้จัดการแผนกควบคุมคุณภาพ บริษัท ไทยคอปเปอร์อินดัสตรี จำกัด
 (มหาชน)

พ.ศ. 2549 หัวหน้าแผนกห้องปฏิบัติการเชื้อเพลิงและวัตถุดิบทดแทน บริษัท
 ปูนซีเมนต์นครหลวง จำกัด (มหาชน)