

บทที่ 3

การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารโดยวิธี headspace solid phase microextraction

3.1 บทคัดย่อ

การศึกษาเรื่องการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบระเหยในกาแฟแบ่งเป็นสองขั้นตอนคือ การสกัดสารและการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ขั้นตอนการสกัดทำได้หลายวิธี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายโดยตรง โดยวิธี purge and trap โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ และโดยใช้ตัวทำละลายในสถานะสุญญากาศ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดเหล่านี้ยุ่งยาก ใช้เวลาและอุปกรณ์ราคาแพง รวมทั้งต้องใช้สารเคมีในการสกัด ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟ โดยวิธี headspace solid phase microextraction ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วไม่ต้องใช้สารเคมี การสกัดได้ใช้ไฟเบอร์ชนิด polydimethyl siloxane เป็นตัวจับสารประกอบระเหยของกาแฟที่บรรจุในขวดแก้วปิดสนิทขนาด 20 มิลลิลิตร และได้ทดลองเปลี่ยนตัวแปรที่เกี่ยวข้องในการสกัดคือ ปริมาณของกาแฟบด (2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม) อุณหภูมิ (50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) และเวลา (20, 30, 40 และ 50 นาที) และตรวจวิเคราะห์สารโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ผลการทดลองพบว่า สถานะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ใช้ตัวอย่างกาแฟบด 2.5 กรัม อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการสกัด 30 นาที และขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีพบว่าสามารถใช้สารละลาย cyclohexanone เป็น internal standard ที่เหมาะสม (5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 0.1 M HCl) และพบว่าสารประกอบระเหยที่น่าจะมีบทบาทต่อกลิ่นรสของกาแฟอาราบิก้า ได้แก่ pyridine; 2-furanmethanol; 2-furanmethanolacetate; pyrazine; 2,5-dimethylpyrazine และ 4-ethyl-2-methoxyphenol เป็นต้น

3.2 บทนำ

ในการวิเคราะห์สารประกอบระเหยในอาหาร ขั้นตอนการเตรียมสารประกอบให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงและมีสารอื่นเจือปนอยู่ด้วยน้อยที่สุด และไม่มีสารประกอบอื่นรบกวนการวิเคราะห์ มีความสำคัญมากเนื่องจากสารประกอบระเหยได้ง่าย วัตถุประสงค์ที่สำคัญของการสกัดสาร คือ เพื่อให้ได้สารที่สนใจที่มีความเข้มข้นพอเหมาะในการวิเคราะห์ เทคนิคการ

สกัดที่ดีจะต้องมีทั้งประสิทธิภาพ (efficiency) และความจำเพาะเจาะจง (selectivity) เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารประกอบที่สนใจและไม่ถูกรบกวนจากสารประกอบอื่นๆ วิธีการสกัดที่ใช้ได้แก่ วิธี liquid-liquid extraction, solid phase extraction, purge and trap และ headspace เป็นต้น ซึ่งวิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่มีข้อดีข้อเสียต่างกัน ได้แก่ การสูญเสียค่าใช้จ่ยอันเนื่องมาจากการสิ้นเปลืองสารเคมีและเสียเวลามากที่สุด และการใช้ตัวทำละลายในการสกัดอาจก่อให้เกิดอันตรายจากสารเคมีต่อผู้วิเคราะห์โดยตรง และมีการปนเปื้อนจากตัวทำละลาย

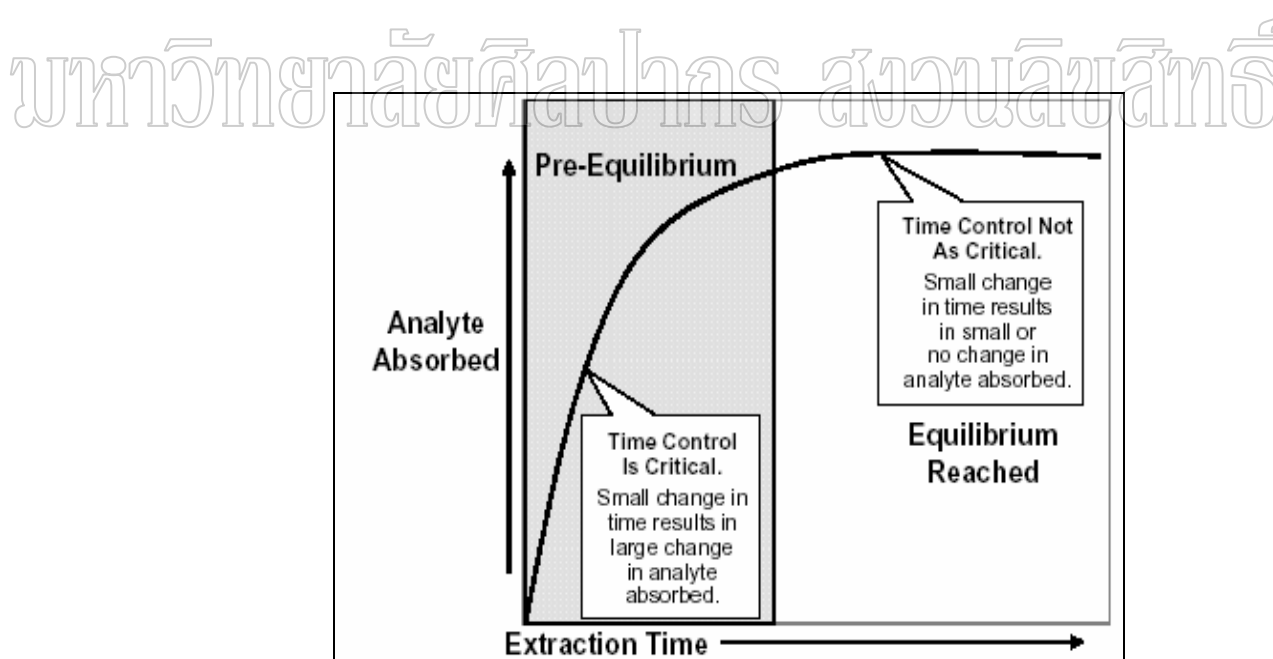
สารประกอบระเหยในกาแฟมีความซับซ้อน ดังนั้นในการวิเคราะห์สารประกอบระเหยจากเมล็ดกาแฟ จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการสกัดซึ่งทำได้หลายวิธี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายโดยตรง โดยวิธี purge and trap โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ และโดยใช้ตัวทำละลายในสถานะสูญญากาศ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดเหล่านี้ยุ่งยาก ใช้เวลาและอุปกรณ์ราคาแพง รวมทั้งต้องใช้สารเคมีในการสกัด ในงานวิจัยนี้ต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟ โดยวิธี solid phase microextraction ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วไม่ต้องใช้สารเคมี (Ibanez และคณะ, 1998) จุดประสงค์ของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ ต้องการให้สารประกอบระเหยที่สนใจอยู่ในสภาวะสมดุลระหว่างเมตริกซ์ของตัวอย่าง (sample matrix) และเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) (Uranuela และ Pizarro, 2004) ซึ่งเฟสอยู่นิ่งเป็น โพลีเมอร์ที่มีลักษณะเฉพาะตัวซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน (Cai และคณะ, 2001) คอยดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์แยกออกจากตัวอย่าง ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสารโดยวิธี solid phase microextraction ได้แก่ ชนิดของไฟเบอร์ที่ใช้ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ความเป็นขั้ว ขนาดของโมเลกุลและปริมาณของสารประกอบที่สนใจในตัวอย่าง (Kanavouras และคณะ, 2005)

การใช้ internal standards เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์แบบโครมาโตกราฟี สารประกอบที่ใช้เป็น internal standard จะถูกเติมเข้าไปในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นสูงๆ และมีปริมาตรน้อยๆ ซึ่งเรียกว่า spiking เพื่อไม่ให้เกิดการรบกวนสารประกอบที่สนใจ internal standard ควรจะมีโครงสร้างคล้ายกับสารที่สนใจ แต่ไม่ควรจะพบในตัวอย่าง internal standard มีประโยชน์ในการวิเคราะห์แบบโครมาโตกราฟี คือ สามารถใช้นำมาหาปริมาณสารที่สนใจหรือติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่สนใจโดยการคำนวณจากอัตราส่วนของสัญญาณ (signal ratio) และสามารถทำปริมาณวิเคราะห์ได้โดย ควรจะใช้ internal standard สำหรับทุกๆ 10 หรือ 20 ตัวอย่าง (Bulletin 928, 2001) การทำปริมาณวิเคราะห์ เมตริกซ์ของตัวอย่าง (sample matrix) มีผลต่อความ

แม่นยำและความถูกต้อง การเตรียมตัวอย่างโดยวิธี solid phase microextraction ต้องควบคุมเวลาและอุณหภูมิในการสกัด เวลาและอุณหภูมิมีผลต่อการวิเคราะห์ดังนี้

การควบคุมเวลาในการสกัดมีความสำคัญ รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของเวลาในการสกัดกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ดูดซับบนไฟเบอร์ เมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์จะเพิ่มขึ้น จนถึงจุดสมดุล ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่จุดสมดุลระหว่างไฟเบอร์และตัวอย่างจะคงที่

อุณหภูมิมีผลต่อสมดุลของการสกัด ระหว่างการสกัดมีสมดุลเกิดขึ้นระหว่างตัวอย่างกับที่ว่างเหนือสารตัวอย่าง ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการกระจายตัวของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างกับ ช่องว่างเหนือตัวอย่าง (headspace) การเปลี่ยนอุณหภูมิจะมีผลต่อการเปลี่ยนจุดสมดุลและมีผลต่อความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์บนไฟเบอร์ จึงควรจะต้องหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดก่อนทำการวิเคราะห์ เพราะการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมีผลต่อการวิเคราะห์ ดังนั้นควรควบคุมอุณหภูมิในการสกัดให้คงที่



รูปที่ 8 ผลของเวลากับการดูดซับปริมาณสารที่สนใจบนไฟเบอร์

ที่มา : Bulletin 929 (2001)

3.3 วัตถุดิบ

เมล็ดกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica*) สายพันธุ์ H.528/46 จากศูนย์บริการวิชาการด้านพืช และปัจจัยการผลิตตาก 1 กรมวิชาการเกษตร ตำบลแม่ท้อ อำเภอเมือง จังหวัดตาก ที่ผ่านกระบวนการผลิตแบบเปียก และผ่านกระบวนการคั่วแบบปานกลาง (อุณหภูมิประมาณ 210 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 6 นาที)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (material balance, BP3100S) บริษัท Sartorius, Germany

2. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, Hewlett-Packard HP6890 series) บริษัท Hewlett-Packard, USA

3. เครื่อง Mass Selective Detector (Hewlett-Packard HP 5973 Series) บริษัท Hewlett-Packard, USA

4. คอลัมน์ HP-5 (Agilent Technology Inc.) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

5. ก๊าซฮีเลียม 99.99%

6. โซลิดเฟส ไมโครเอกซแทรกชัน (solid phase microextraction, SPME) ไฟเบอร์ชนิดโพลีไดเมทิลไซลอกเซน (polydimethyl siloxane, nonbonded) ความหนา 100 ไมโครเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร (Supelco, USA)

7. เครื่องคั่วกาแฟ (Precision coffee Roaster, 40201, USA)

8. เครื่องบดกาแฟ (Precision Café Grinder, 2199, USA)

9. ตะแกรงร่อนขนาด 18 เมช (1.0 มิลลิเมตร)

10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

11. สารเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

- benzaldehyde บริษัท Fluka, Switzerland

- cyclohexanone บริษัท Fluka, Switzerland

- pyridine บริษัท Fluka, Switzerland

- 2,4,6-trimethylpyrazine บริษัท Fluka, Switzerland

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างกาแฟ

นำเมล็ดกาแฟดิบพันธุ์ *Coffea arabica* สายพันธุ์ H.528/46 ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแบบเปียกมาคัดเลือกให้ได้เมล็ดที่ดีและสมบูรณ์ คั่วเมล็ดกาแฟ น้ำหนัก 70 กรัม แบบปานกลาง (อุณหภูมิประมาณ 210 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 6 นาที) โดยวัดค่าความสว่างและความเข้มของสี (ภาคผนวก ก) เป็นดัชนีบ่งชี้ระดับการคั่วและหาปริมาณความชื้นสุดท้ายของเมล็ดกาแฟที่ผ่านการคั่วโดยใช้ความชื้นมาตรฐานแห้ง (ภาคผนวก ก) เมล็ดกาแฟคั่วที่ได้บรรจุในถุงบรรจุ ชนิด PET/Al/LLDPE บรรจุแบบสุญญากาศและเก็บในตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส) ก่อนทำการวิเคราะห์สารประกอบระเหย

3.5.2 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารโดยวิธี headspace solid phase microextraction

ใช้ไฟเบอร์ชนิดชนิดโพลีไดเมทิลไซลอกเซน (polydimethyl siloxane) ความหนา 100 ไมโครเมตร ความยาว 1 เซนติเมตร (Supelco, USA) ในการสกัดสารประกอบระเหย วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบระเหยโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

3.5.2.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด โดยบดตัวอย่างกาแฟ เป็นเวลา 15 วินาที ร่อนผ่านตะแกรง 18 เมช (1.0 มิลลิเมตร) ใช้ตัวอย่างกาแฟที่ผ่านการบดและร่อน 3.0 กรัม บรรจุในขวดแก้วปิดสนิทขนาด 20 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัด 4 เวลา คือ 20, 30, 40 และ 50 นาที ใช้อุณหภูมิในการสกัด 60 องศาเซลเซียส

3.5.2.2 ศึกษาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัด โดยบดตัวอย่างกาแฟ เป็นเวลา 15 วินาที ร่อนผ่านตะแกรง 18 เมช ใช้ตัวอย่างกาแฟที่ผ่านการบดและร่อน 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม บรรจุในขวดแก้วปิดสนิทขนาด 20 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัดที่ได้จากข้อ 3.5.2.1 ใช้อุณหภูมิในการสกัด 60 องศาเซลเซียส

3.5.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด โดยบดตัวอย่างกาแฟ เป็นเวลา 15 วินาที ร่อนผ่านตะแกรง 18 เมช ใช้ปริมาณตัวอย่างกาแฟที่ได้จากข้อ 3.5.2.2 ที่ผ่านการบดและร่อน บรรจุในขวดแก้วปิดสนิทขนาด 20 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัดที่ได้จากข้อ 3.5.2.1 ใช้อุณหภูมิในการสกัด 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

3.5.3 ศึกษาการใช้ internal standard ที่เหมาะสมสำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟคั่ว

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหยของเมล็ดกาแฟคั่วในสภาวะการเก็บและเวลาต่างกันพบว่าปัญหาในการติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบโดยเชิงปริมาณ คือ สัญญาณของโครมาโตแกรมไม่คงที่แม้ว่าการตั้งสภาวะของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีจะคงที่ ทำให้ไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหยในเชิงปริมาณได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารมาตรฐานเป็น internal standard ในการทดลองได้ทดลองใช้ internal standard หลายชนิด ได้แก่ 2,4,6-trimethylpyridine; benzaldehyde; pyridine และ cyclohexanone

3.5.3.1 เตรียมสารละลายสำหรับใช้เป็น internal standard ความเข้มข้น 5000 mg/l ใน 0.1 M HCl สารประกอบที่นำมาใช้ศึกษาสำหรับเป็น internal standard ได้แก่ 2,4,6-trimethylpyridine; benzaldehyde; pyridine และ cyclohexanone

3.5.3.2 ศึกษา internal standard ที่เหมาะสมโดยบดตัวอย่างกาแฟ เป็นเวลา 15 วินาที ร่อนผ่านตะแกรง 18 เมช ใช้ปริมาณตัวอย่างกาแฟ 2.5 กรัม บรรจุในขวดแก้วปิดสนิทขนาด 20 มิลลิลิตร ฉีดสารประกอบที่ใช้เป็น internal standard 1 ไมโครลิตร ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 60 องศาเซลเซียส

3.5.4 สภาวะเครื่องโครมาโตกราฟี – แมสสเปกโตรมิเตอร์ (gas chromatography-mass spectrometer)

การวิเคราะห์สารประกอบระเหยโดยใช้ เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography, model HP 6890, Hewlett Packard) ตรวจวิเคราะห์ด้วย mass selective detector HP 5973 (Agilent Technologies) ชนิดของคอลัมน์ คือ fused silica capillary column HP-5, biphenyldimethylpoly siloxane (Agilent Technologies) เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของก๊าซคงที่ 1.2 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส / นาที จนมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 150 องศาเซลเซียส ตั้งอุณหภูมิของ injector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส splitless mode 60 วินาที ส่วนของดีเทกเตอร์ตั้งอุณหภูมิ ion source 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ quadrupole 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ MS interface 280 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ mass(m/z) ในช่วง 40-400 amu การบ่งบอกชนิดของสารประกอบระเหยที่ตรวจพบโดยเปรียบเทียบ mass spectral data ที่ได้กับ NIST 98

library (NIST98, USA) พื้นที่ใต้พีคจะคำนวณโดย chemstation software version 2.0 (Hewlett Packard)

3.5.5 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) ด้วยโปรแกรม statistical analysis system program (SAS Institute, Inc., 1985, version 8.1) เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ The least significant difference (LSD)

3.6 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

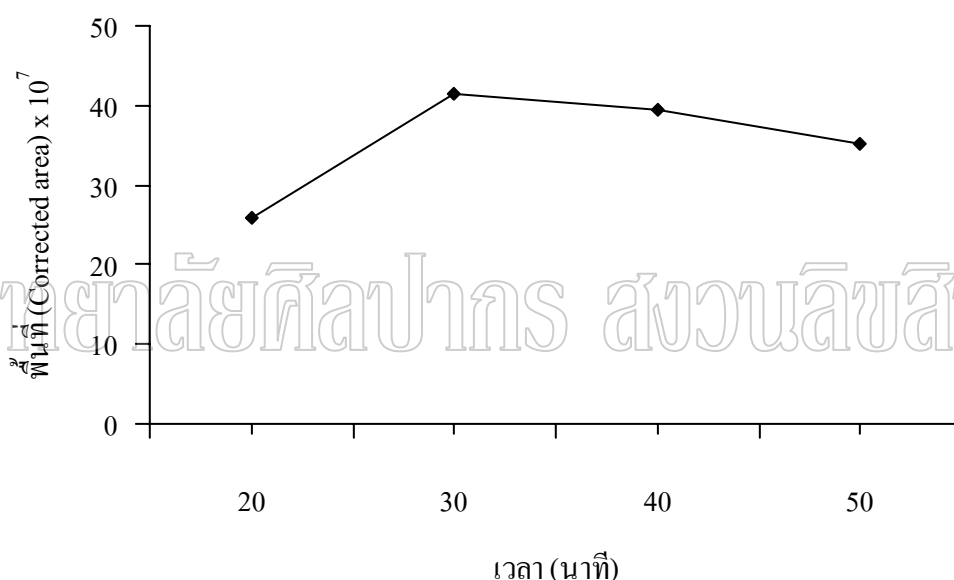
3.6.1 ศึกษาสภาวะการสกัดที่เหมาะสม

ปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสาร โดยวิธี solid phase microextraction ได้แก่ ชนิดของไฟเบอร์ที่ใช้ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ความเป็นขั้ว ขนาดของโมเลกุลและปริมาณของสารประกอบที่สนใจในตัวอย่าง (Kanavouras, 2005) ในการทดลองทำการคำนวณลี้ดคาเฟอีนจากกาแฟที่ระดับปานกลาง วัดค่าความสว่างเมล็ดกาแฟแล้วได้เท่ากับ 21.43 ± 0.44 และร้อยละความชื้นมาตรฐานแห้ง (dry basis) ได้เท่ากับ 0.69 ± 0.02 ผลการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ ค.1 (ภาคผนวก ค)

3.6.1.1 เวลาที่ใช้ในการสกัด (extraction time)

อัตราการเข้าสู่สมดุล (equilibration rate) ส่งผลต่อเวลาที่ใช้ในการสกัดสาร การสกัดสารโดยวิธี solid phase microextraction อัตราการเข้าสู่สมดุลขึ้นอยู่กับอัตราการส่งผ่านมวล (mass transfer rate) ของสารประกอบระเหย ค่าคงที่การกระจายตัว (distribution constant) ของโพลีเมอร์บนไฟเบอร์ (fiber coating) ชนิดและความหนาของโพลีเมอร์บนไฟเบอร์ (fiber coating) (Cai และคณะ, 2001) จากการทดลองทำการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส น้ำหนักตัวอย่างกาแฟที่ใช้เท่ากับ 3.0 กรัม ที่เวลา 20, 30, 40 และ 50 นาที ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 9 ซึ่งแสดงพื้นที่ของสารประกอบระเหยที่ตรวจพบที่เวลาในการสกัด 30 นาที มีพื้นที่ของสารประกอบระเหยมากที่สุด ที่เวลาในการสกัด 20 นาที มีพื้นที่ของสารประกอบระเหยน้อยสุด และพบว่าที่เวลา 40 และ 50 นาที พื้นที่ของสารประกอบระเหยมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารประกอบระเหยในกาแฟบางชนิดเกิดการสลายตัวที่เวลามากกว่า 30 นาที ซึ่งจาก

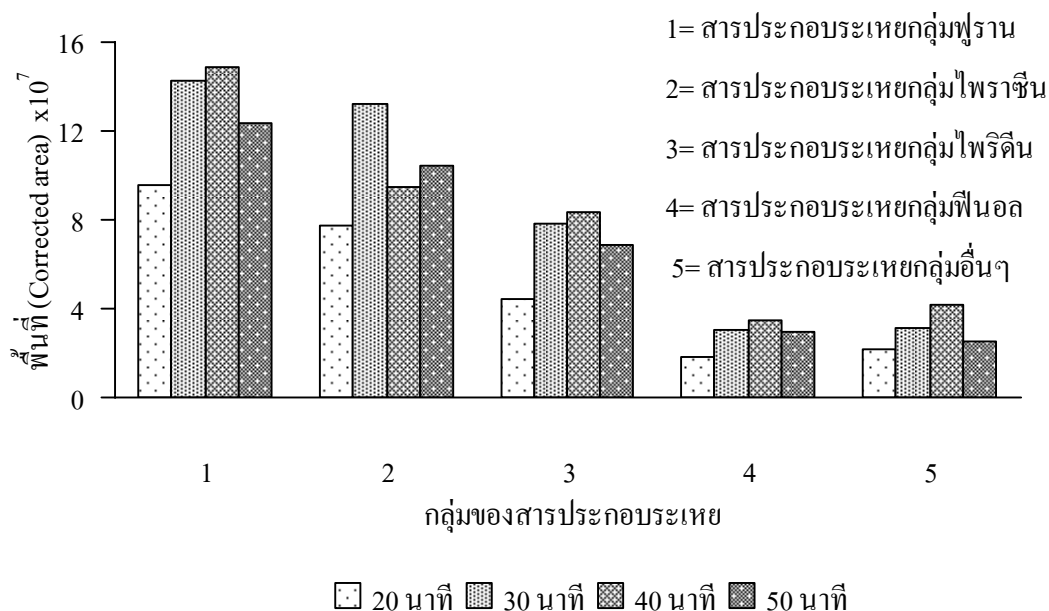
ตารางที่ ค.2 (ภาคผนวก ก) พบว่าสารประกอบที่มีปริมาณลดลง ได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟuran กลุ่มไพราซีน กลุ่มไพรีดีน กลุ่มฟีนอล และสารประกอบกลุ่มอื่นๆ และพบว่าที่เวลา 20 นาที สารประกอบระเหยบางตัวไม่ถูกสกัดออกมา ซึ่งได้แก่ phenol และ 3-ethylpyridine โดยที่เวลา 20 นาที อาจจะยังไม่เข้าสู่จุดสมดุลของการสกัด นอกจากนี้พบว่าพื้นที่สารประกอบระเหยที่เวลา 20 นาที มีความแตกต่างจากเวลาในการสกัด 30, 40 และ 50 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ซึ่งจากรายงานของ Strathmann และคณะ (2004) ซึ่งทำการสกัดสารประกอบในกาแฟโดยวิธี headspace solid phase microextraction ชนิดของไฟเบอร์ที่ใช้คือ 100 μm PDMS ใช้เวลามากกว่า 30 นาที ในการสกัดสารประกอบระเหยจากกาแฟ



รูปที่ 9 พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟที่เวลาในการสกัดต่างกัน

จากรูปที่ 10 แสดงพื้นที่ทั้งหมดโดยเฉลี่ยของสารประกอบระเหยกลุ่มต่างๆ ที่ตรวจพบที่เวลาในการสกัดต่างกัน พบว่าที่เวลาในการสกัดต่างๆ กลุ่มสารประกอบระเหยที่ตรวจพบมากที่สุด คือสารประกอบกลุ่มฟuran และรองลงมาคือกลุ่มไพราซีน กลุ่มไพรีดีน กลุ่มฟีนอล และสารประกอบกลุ่มอื่นๆ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Coffee Research Institute (2001) สารประกอบฟuranจัดเป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เกิดจากการสลายตัวปฏิกิริยาไฟโรไลซิสของน้ำตาลในปฏิกิริยาเมลลาร์ดในขั้นตอนการเกิดโพลีเมอร์ (Clarke และ Macrae, 1985; Maria และคณะ 1996) และการเกิดคาราเมล สารในกลุ่มฟuranมีกลิ่นไหม้ น้ำตาลไหม้คาราเมล (จิรสวัสดิ์, 2546) สารประกอบฟuranและอนุพันธ์ฟuranเป็นกลุ่มที่มี

ความสำคัญที่สุดของกลิ่นรสกาแฟ พบว่าน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตสสลายตัวไปถึงร้อยละ 99 ในระหว่างการคั่วกาแฟ



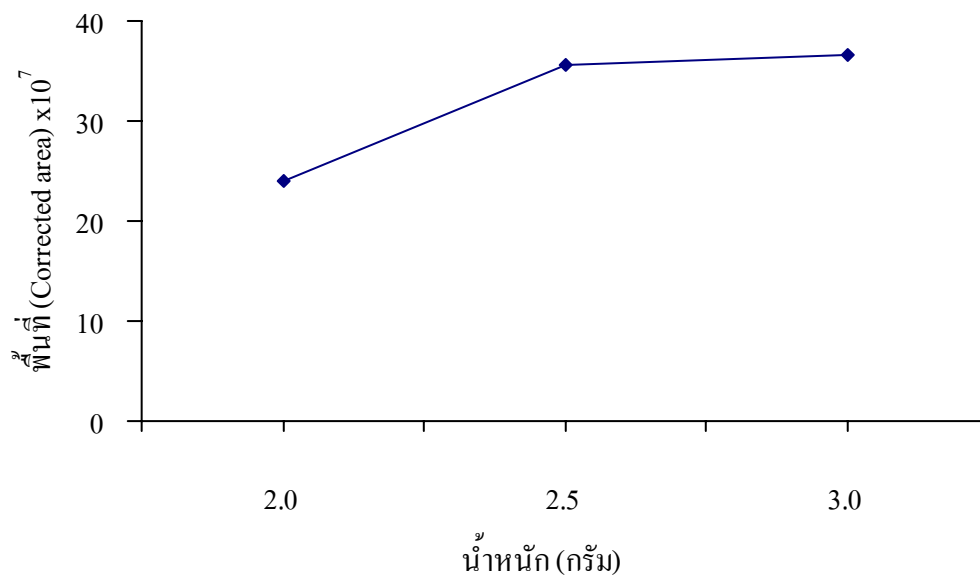
รูปที่ 10 พื้นที่ของสารประกอบระเหยกลุ่มต่างๆ ในเมล็ดกาแฟคั่วที่เวลาในการสกัดต่างกัน

3.6.1.2 น้ำหนักตัวอย่างกาแฟที่ใช้ในการสกัด

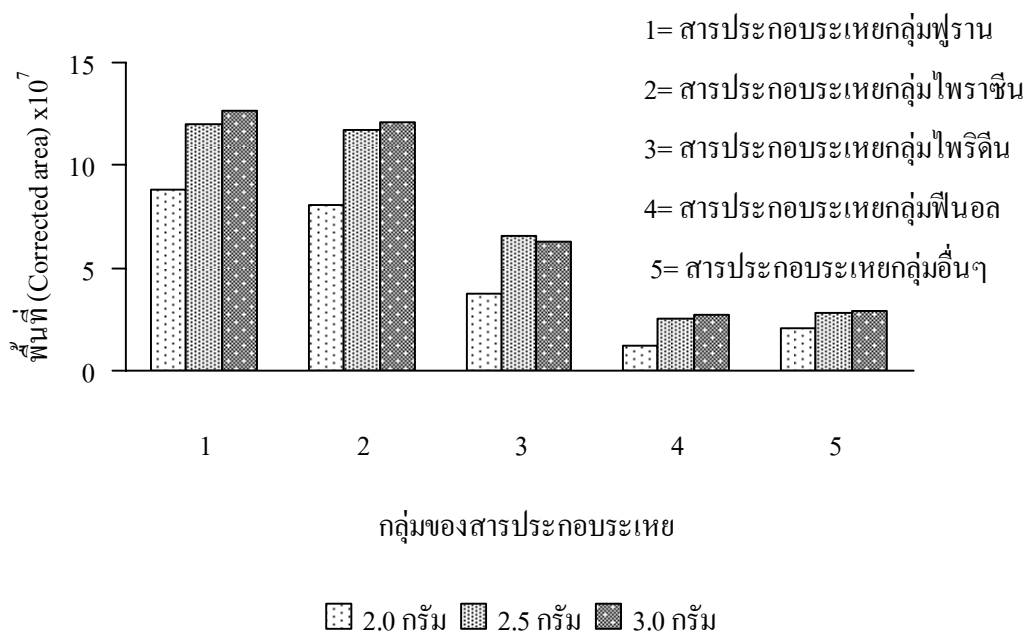
ในการสกัดโดยวิธี headspace solid phase microextraction จะมีสมดุลเกิดขึ้นระหว่างตัวอย่างกับปริมาตรว่างเหนือตัวอย่าง (headspace) (Bulletin 928, 2001) ดังนั้นน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดจึงส่งผลต่อการหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัด ในการศึกษาใช้ตัวอย่าง 2.0, 2.5, 3.0 กรัม เวลาในการสกัด 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ ค.3 (ภาคผนวก ค) จากน้ำหนักตัวอย่างกาแฟที่ใช้พบว่า น้ำหนักที่ต่างกันส่งผลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากรูปที่ 11 และพบว่าน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด 2.5 กรัมไม่แตกต่างจากน้ำหนักในการสกัด 3.0 กรัม ซึ่งจากรายงานของ Freitas และคณะ (2001) ได้ทำการสกัดสารประกอบระเหยในกาแฟ โดยวิธี headspace solid phase microextraction ชนิด 100 μ m PDMS ใช้ตัวอย่างกาแฟ 2.5 กรัม ในขวดบรรจุสารขนาด 20 มิลลิลิตร

จากรูปที่ 12 แสดงพื้นที่ทั้งหมดโดยเฉลี่ยของสารประกอบระเหยกลุ่มต่างๆที่ตรวจพบเมื่อใช้น้ำหนักตัวอย่างต่างกันพบว่ากลุ่มสารประกอบระเหยที่ตรวจพบมากที่สุด คือ กลุ่ม

สารประกอบกลุ่มฟuran และรองลงมาคือกลุ่มไพราซีน กลุ่มไพรีดีน กลุ่มฟีนอล และสารประกอบกลุ่มอื่นๆ ตามลำดับ



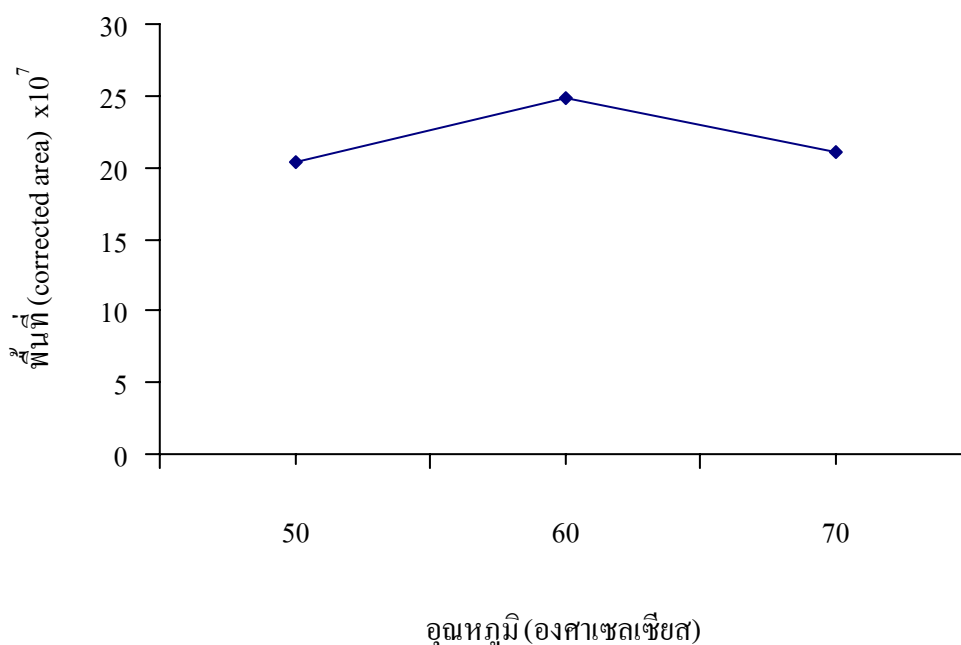
รูปที่ 11 พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมสส์คาแฟลล์ที่น้ำหนักในการสกัดต่างกัน



รูปที่ 12 พื้นที่ของสารประกอบระเหยกลุ่มต่างๆในเมสส์คาแฟลล์ที่ผ่านการสกัดที่น้ำหนักในการสกัดต่างกัน

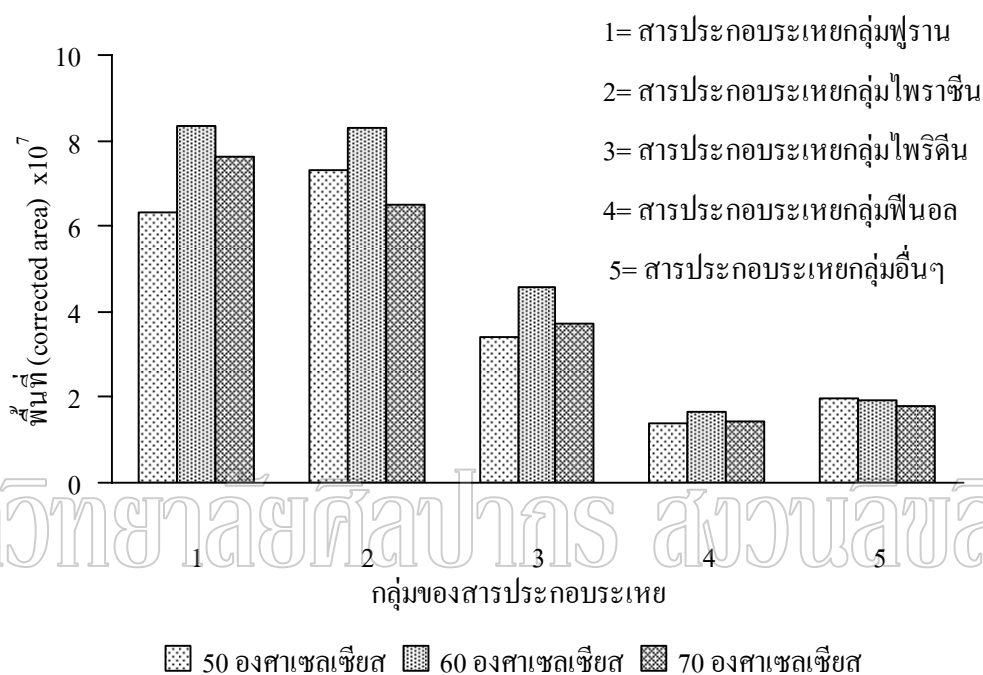
3.6.1.3 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด

อุณหภูมิมีผลต่อสมดุลของการสกัด ในการสกัดมีสมดุลเกิดขึ้นระหว่างการกระจายตัวของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างกับ ปริมาตรว่างเหนือตัวอย่าง (headspace) การเปลี่ยนอุณหภูมิส่งผลต่อการเปลี่ยนจุดสมดุล ในการศึกษาใช้ตัวอย่าง 2.5 กรัม เวลาในการสกัด 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 13 พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดทั้ง 3 อุณหภูมิไม่มีผลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อย่างไรก็ตามจากตารางที่ ค.4 (ภาคผนวก ค) พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัด 60 องศาเซลเซียสจะให้พื้นที่ทั้งหมดของสารประกอบระเหยมากที่สุด และที่อุณหภูมิในการสกัด 70 องศาเซลเซียส พื้นที่ของสารประกอบระเหยมีแนวโน้มลดลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสลายตัวของสารประกอบระเหยบางชนิดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยสารประกอบที่ลดลง ได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟuran กลุ่มไพราซีน กลุ่มไพรีดิน กลุ่มฟีนอล และสารประกอบกลุ่มอื่นๆ จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ตัวอย่าง 2.5 กรัม เวลาในการสกัด 30 นาที จุดสมดุลของการสกัดสารประกอบระเหยเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และสอดคล้องกับรายงานของ Ryan และคณะ (2004) ซึ่งทำการศึกษาสารประกอบระเหยของเมล็ดกาแฟอาราบิก้า และโรบัสต้าหลังคั่วโดยวิธี headspace solid phase microextraction



รูปที่ 13 พื้นที่ของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วที่อุณหภูมิในการสกัดต่างกัน

จากพื้นที่บนโครมาโตแกรมซึ่งแสดงได้ด้วยกราฟรูปที่ 14 พบว่าที่อุณหภูมิในการสกัด 50 องศาเซลเซียส สารประกอบระเหยกลุ่มไพราซีนมีพื้นที่ของสารประกอบที่สกัดได้มากที่สุด และที่อุณหภูมิในการสกัด 60 และ 70 องศาเซลเซียส สารประกอบระเหยกลุ่มฟูราน มีพื้นที่ของสารประกอบที่สกัดได้มากที่สุด และพบสารประกอบกลุ่มไพราซีน กลุ่มไพรีดิน กลุ่มฟีนอล และกลุ่มอื่นๆ รองลงมาตามลำดับ



รูปที่ 14 พื้นที่ของสารประกอบระเหยกลุ่มต่างๆในเมล็ดกาแฟคั่วที่อุณหภูมิในการสกัดต่างกัน

3.6.2 การใช้ internal standard

สารประกอบระเหยในกาแฟมีความซับซ้อนและมีมากกว่า 800 ชนิด การติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหยที่สนใจทำได้ยากเนื่องจากไม่มี internal standard ที่เหมาะสม จากรายงานของ Wongpornchai และคณะ (2004) ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหยในข้าวโดยใช้ สารประกอบ 2,4,6-trimethylpyridine เป็น internal standard มีค่า retention time เท่ากับ 11.30 นาที

งานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ สารประกอบ 2,4,6-trimethylpyridine เป็น internal standard ในกาแฟคั่ว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 9.40 นาที ทำให้ไม่สามารถใช้เป็น internal standard ได้

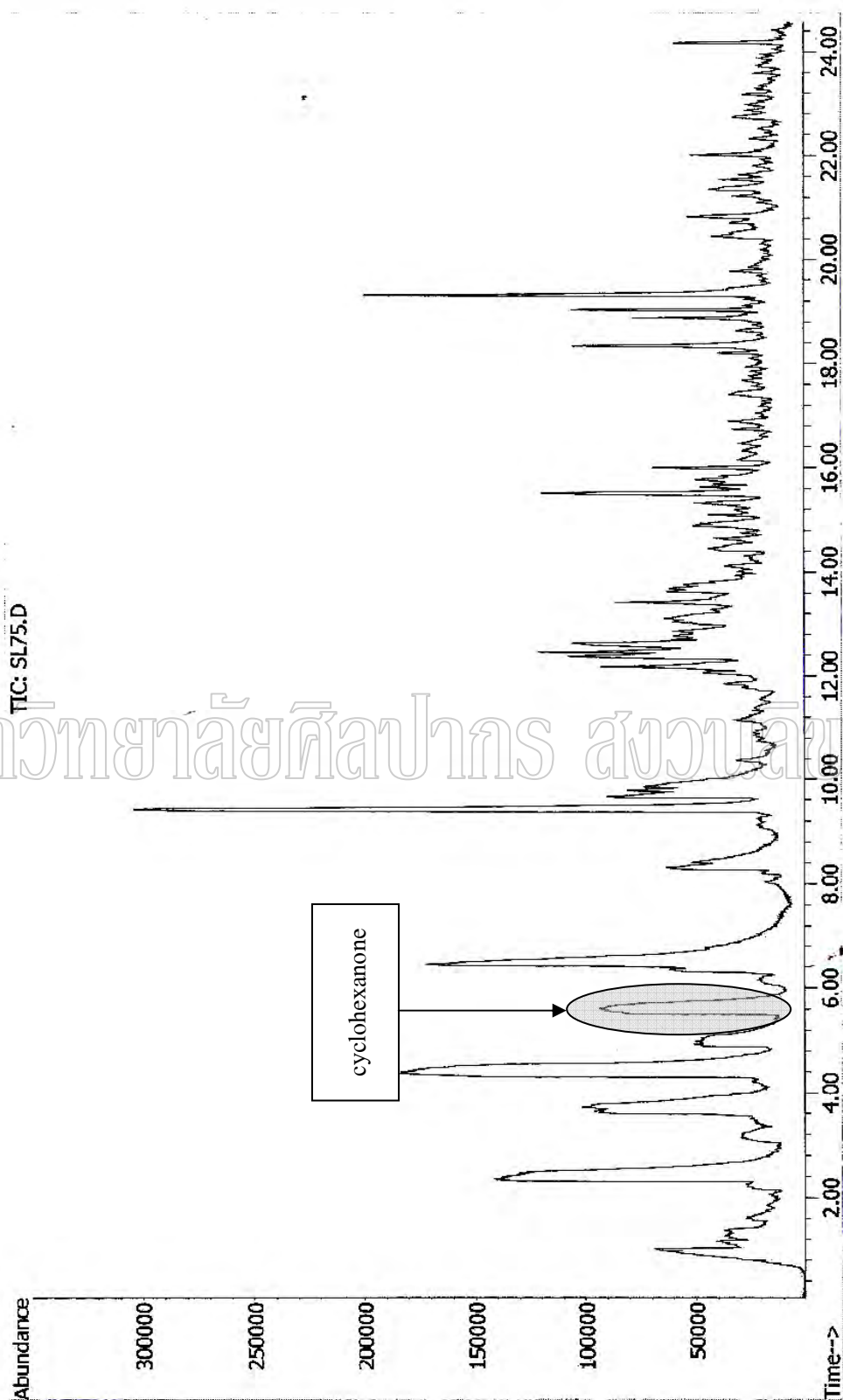
เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกับ peak ของ 2-furanmethanolacetate ($t_R = 9.43$) เมื่อทดลองใช้สารประกอบ benzaldehyde เป็น internal standard พบว่า มีค่า retention time เท่ากับ 8.51 นาที และเกิดการซ้อนทับกับ peak ของสารประกอบ 5-methyl-2-furancarboxaldehyde ($t_R = 8.41$) สารประกอบ pyridine มีค่า retention time เท่ากับ 2.29 นาที pyridine เป็นสารประกอบที่พบในกาแฟคั่ว และเมื่อนำมาหาค่า recovery พบว่ามีค่าต่ำเกินไปไม่สามารถนำมาใช้เป็น internal standard สำหรับกาแฟคั่วได้ และสารประกอบ pyridine มีค่า retention time น้อยเกิน peak ที่ได้มีลักษณะ board และเมื่อใช้สารประกอบ cyclohexanone เป็น internal standard มีค่า retention time เท่ากับ 5.62 นาที พบว่าสารประกอบ cyclohexanone ไม่รบกวน peak ของสารประกอบระเหยที่สนใจ ซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 15

3.7 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณของสารประกอบระเหยที่ตรวจพบอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เวลาที่เหมาะสมในการสกัด คือ 30 นาที และเมื่อศึกษาผลของน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด พบว่าน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด 2.0 กรัม แตกต่างจากน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด 2.5 และ 3.0 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และน้ำหนักตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัด คือ 2.5 กรัม และพบว่าอุณหภูมิในการสกัดไม่มีผลต่อปริมาณของสารประกอบระเหยที่ตรวจพบอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สามารถสกัดสารประกอบระเหยของเมล็ดกาแฟคั่วได้มากที่สุด

นอกจากนั้นในขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีพบว่าสามารถใช้สารละลาย cyclohexanone เป็น internal standard ที่เหมาะสม (5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 0.1 M HCl) มีค่า retention time เท่ากับ 5.62 นาที

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปโดยการศึกษาเปรียบเทียบสภาวะในการเก็บเมล็ดกาแฟคั่ว จะใช้น้ำหนักตัวอย่าง 2.5 กรัม อุณหภูมิในการสกัด 60 องศาเซลเซียส และ เวลาในการสกัด 30 นาที และสามารถใช้อุณหภูมิ cyclohexanone เป็น internal standard สำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงสารประกอบระเหย



รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของสารประกอบระเหยในเมล็ดกาแฟคั่วเมื่อใช้สารประกอบ cyclohexanone ($t_R=5.62$ นาที)
เป็น internal standard

บรรณานุกรม

- จิรสวัสดิ์ ภูวภิรมย์. 2546. “ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อสารให้กลิ่นรสของกาแฟผสมแบบไทย”
วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Bulletin 928. 2001. SUPELCO. Supelco park, Bellefonte, PA 16823-0048 USA.
- Bulletin 929. 2001. SUPELCO. Supelco park, Bellefonte, PA 16823-0048 USA.
- Cai, J., Liu, B. and Su, Q. 2001. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid
phase microextraction for the determination of volatile flavor components. *Journal of
Chromatography A* 930: 1-7
- Coffee Research Institute. 2001. <http://www.coffeeresearch.org/science/aromaman.htm>
- De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., Neto, F.R. Aquino, 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.
- Flament, V. 2002. *Coffee Flavor Chemistry*. England: John Wiley & Sons, Ltd. 396 p.
- Freitas, A.M.C. Parreira, C. and Vilas-Boas, L. 2001. The Use of an Electronic Aroma-sensing
Device to Assess Coffee Differentiation-Comparison with SPME Gas Chromatography
-Mass Spectrometry Aroma Patterns. *Journal of Food Composition and Analysis* 14:
513-522.
- Ibanez, E., Sebastian, S.L., Ramos, E., Tabera, J. and Reglero, G. 1998. Analysis of volatile
fruits components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry* 63(2):
281-286.
- Kanavouras, 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.
- Ryan, D., Shellie, R., Tranchida, P., Casilli, A., Mondello, L. and Marriott, P. 2004. Analysis of
roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas
chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*
1054: 57-65.

Strathmann, S., Pastorelli, S. and Simoneau, C. 2004. Investigation of the interaction of active packaging material with food aroma compounds. *Sensors and Actuators B*: 1-5.

Urunuela, 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*: 1-8.

Wongpornchai, S., Dumri, K. and Jongkaewwattana, S. 2004. Effect of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. *Food Chemistry* 87(2004): 407-414.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์