

abst.

ข้อมูลข่าวสาร วศ.

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ  
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ  
กช  
อว 25

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน  
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7 ว

ของ

นางพิศนีย์ จิ่งเจริญ  
นักวิทยาศาสตร์ 6 ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน  
ในกาแฟสำเร็จรูป

กลุ่มงานคุณค่าทางโภชนาการ  
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ  
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม

ข้อมูลข่าวส.ร.ของมหาวิทยาลัยบริการ  
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

# เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 7 ว

ของ

นางพิศนีย์ จึงเจริญ  
นักวิทยาศาสตร์ 6 ว

๑๑

|                     |
|---------------------|
| เลขที่ กข           |
| ๑๖25                |
| เลขทะเบียน 9890     |
| วันที่ 4 / ๑๖๗ / ๕๕ |

เรื่องที่ 1

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน  
ในกาแฟสำเร็จรูป

|                   |
|-------------------|
| ด้วยฉันทนันทนาการ |
| จาก               |
| ๑๑.               |

กลุ่มงานคุณค่าทางโภชนาการ  
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ  
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในกาแฟสำเร็จรูปและกาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออกสรุปได้ดังนี้

วิเคราะห์โดยวิธี Spectrophotometric ในช่วงการวิเคราะห์ 0.10 ถึง 2.00 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99975 กาแฟสำเร็จรูปพบปริมาณกาเฟอีนเฉลี่ยร้อยละ 4.096 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.0096 สัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 0.235 ส่วนกาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออกพบปริมาณกาเฟอีนเฉลี่ยร้อยละ 0.114 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.0068 สัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 5.949

และโดยวิธี Modified Bailey-Andrew กาแฟสำเร็จรูปพบปริมาณกาเฟอีนเฉลี่ยร้อยละ 4.074 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.029 สัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 0.708 ส่วนกาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออกพบปริมาณกาเฟอีนเฉลี่ยร้อยละ 0.108 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.007 สัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 6.455

จากการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี ถึงแม้ว่าผลวิเคราะห์ทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่วิธี Spectrophotometric มีความแม่นยำกว่า เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วกว่า ใช้สารเคมีน้อยกว่า วิธี Modified Bailey-Andrew

นอกจากนี้จากการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมาของวิธี Spectrophotometric พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.26 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ให้ผลร้อยละ  $99.26 \pm 0.31$  ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

# สารบัญ

|                                    | หน้า |
|------------------------------------|------|
| บทนำ                               |      |
| ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง      | 1    |
| คำนำ                               | 2    |
| วัตถุประสงค์                       | 9    |
| ประโยชน์ที่ได้รับ                  | 9    |
| ระยะเวลาดำเนินการ                  | 9    |
| วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการ | 10   |
| ตัวอย่าง                           | 10   |
| การวิเคราะห์ปริมาณกาเหไ้           |      |
| วิธี Modified Bailey - Andrew      | 10   |
| วิธี Spectrophotometric            | 13   |
| ผลการวิเคราะห์                     | 22   |
| วิจารณ์                            | 31   |
| สรุปผลการทดลอง                     | 32   |
| คำขอขอบคุณ                         | 33   |
| เอกสารอ้างอิง                      | 34   |

## สารบัญตารางและรูปภาพ

| ตาราง   | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน                                      | 22   |
| ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี Spectrophotometric   | 24   |
| ตารางที่ 3 ปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมาของวิธี Spectrophotometric                                       | 25   |
| ตารางที่ 4 ผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี Modified Bailey-Andrew                                       | 26   |
| ตารางที่ 5 การประเมินค่าทางสถิติของผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน<br>ในตัวอย่างที่ 1 เปรียบเทียบสองวิธี       | 27   |
| ตารางที่ 6 การประเมินค่าทางสถิติของผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน<br>ในตัวอย่างที่ 2 เปรียบเทียบสองวิธี       | 28   |
| ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนทั้งสองวิธี  | 29   |
| <br>  |      |
| รูปภาพ  |      |
| รูปที่ 1 สเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน  | 16   |
| รูปที่ 2 สเปกตรัมของสารละลายตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน   | 19   |
| รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ<br>สารละลายมาตรฐานกาเฟอีน และค่าการดูดกลืนแสง | 23   |
| รูปที่ 4 สเปกตรัมของกาแฟสำเร็จรูป   | 30   |

## บทนำ

### ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง

เนื่องจากประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 77 (พ.ศ. 2527) กำหนดให้กาแฟเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และได้กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของกาแฟซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ชนิด แต่ละชนิดมีข้อกำหนดของปริมาณกาแฟที่แตกต่างกัน จึงต้องมีการวิเคราะห์ปริมาณกาแฟที่มีอยู่ในกาแฟว่าเป็นไปตามที่มาตรฐานกำหนดหรือไม่ ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณกาแฟมีหลายวิธี เช่นวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 คอลัมน์ ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 246 ถึง 276 นาโนเมตร วิธีที่สกัดตะกอนกาแฟด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก (15) ละลายตะกอนด้วยอะซีโตนแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ใช้เครื่องมือพิเศษซึ่งมีราคาแพงคือ ก๊าซโครมาโทกราฟีและเอชพีแอลซี

ส่วนวิธีที่ห้องปฏิบัติการเคยใช้วิเคราะห์ปริมาณกาแฟคือ Modified Bailey-Andrew (16) มีหลักการคือสกัดกาแฟด้วยน้ำเดือด กรองและสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มย่อยกาแฟที่สกัดได้และระเหยแห้งแล้วด้วยกรด กลั่นและไทเทรตแล้วคำนวณปริมาณกาแฟ ถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ให้ผลวิเคราะห์แม่นยำดี แต่ขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 3 วัน

ต่อมาได้มีการศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกาแฟโดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของกาแฟในคลอโรฟอร์มที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วง 245 ถึง 300 นาโนเมตร วิธีนี้จึงน่าจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นทั้งในด้านความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดและรวดเร็ว จึงเป็นสาเหตุจูงใจให้มีการศึกษาในเรื่องนี้

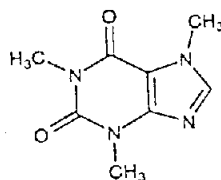
## คำนำ

กาเฟอีน คือสารประกอบอินทรีย์ประเภทแอลคาลอยด์ในกลุ่มเมธิล แซนธิน มีสูตรโมเลกุล  $C_8H_{10}N_4O_2$  (1,3,7, ไตรเมธิล แซนธิน) ซึ่งพบตามธรรมชาติในพืชกว่า 60 ชนิด (3) ที่สำคัญได้แก่ กาแฟ ชา และโคล่า ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2363 โดย Friendlieb Runge สกัดได้จากกาแฟ สารประกอบเคมีในกลุ่มเดียวกันที่มีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับกาเฟอีน และมักจะพบเป็นส่วนประกอบตามธรรมชาติในพืชที่มีกาเฟอีนในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ได้แก่ ซีโอฟีลลีน (1,3, ไคเมธิล แซนธิน) มีมากในชาและซีโอโบรมีน (3,7, ไคเมธิล แซนธิน) มีในโกโก้

มีการบริโภคเครื่องดื่มที่มีกาเฟอีนมานานแล้วตั้งแต่ 2700 ปี ก่อนคริสตศักราช (4) ชาวจีนนำใบชามาชงเป็นเครื่องดื่มและรู้จักกันแพร่หลายมานานกว่า 4000 ปี การปลูกกาแฟเกิดขึ้นครั้งแรกในตะวันออกกลางเมื่อ 600 ปีมาแล้ว จากนั้นเผยแพร่ไปในยุโรปและนิยมดื่มกาแฟกันอย่างกว้างขวาง สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกา เริ่มนิยมดื่มกาแฟประมาณ 200 ปีที่ผ่านมา และในปัจจุบันเป็นประเทศที่นำเข้าและบริโภคกาแฟมากที่สุด เครื่องดื่มโคล่ามีกำเนิดมาจากอาฟริกา ทำจากเมล็ดโคล่าที่มีปริมาณกาเฟอีนต่ำ ต่อมาได้นำไปพัฒนาจนได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในประเทศสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันมีการเติมกาเฟอีนและอัดก๊าซจนได้เป็นน้ำอัดลมโคล่า กาเฟอีนที่เติมลงไปนั้นอาจเป็นกาเฟอีนสังเคราะห์ หรือได้จากการสกัดออกจากเมล็ดกาแฟที่นำไปใช้ทำเป็นกาแฟที่มีกาเฟอีนต่ำ (decaffeinated coffee)

ข้อมูลทางเคมีและกายภาพของกาเฟอีน (4)

สูตรโครงสร้าง



ชื่อสามัญ : 3,7 dihydro - 1,3,7 trimethyl-1 H-purine-2,6-Dione

สมบัติทางเคมีและกายภาพ

เป็นผงสีขาวหรือผลึกสะท้อนแสงสีขาวรูปเข็ม ไม่มีกลิ่น รสขมเล็กน้อย จุดระเหิด 178 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลว ระหว่างอุณหภูมิ 234 - 239 องศาเซลเซียส ละลายได้ง่ายในน้ำเดือด และละลายได้ดีมากในเอทานอล คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต กาเฟอีนอาจเปลี่ยนสภาพได้ด้วยสารละลายด่างเข้มข้น

การทดสอบคุณภาพของกาเฟอีนทำเช่นเดียวกับการทดสอบแอลคาลอยด์ทั่วไป คือให้สีม่วงในปฏิกิริยาเมอริไซด์ (murexide reaction)

เภสัชวิทยาของกาเฟอีน เมื่อบริโภคกาเฟอีนเข้าไปจะถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็ว ในระบบทางเดินอาหารและดูดซึมเข้าสู่เส้นเลือดภายใน 30 - 120 นาที ความสามารถในการดูดซึมของร่างกายอยู่ระหว่าง 10 - 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว จะแพร่กระจายโดยทางกระแสเลือดเข้าสู่อวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่ร่างกายภายใน 5 นาที การแพร่กระจายตัวของกาเฟอีนเป็นสัดส่วนกับปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อ จะซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อและออกจากเนื้อเยื่อด้วยวิธีการซึมผ่านอย่างง่าย ๆ โดยไม่มีการสะสมของกาเฟอีนหรือเมตาบอไลต์ของกาเฟอีนในเนื้อเยื่อ (4) กาเฟอีนจะรวมตัวกับโปรตีนในเลือดค่อนข้างมาก ประมาณร้อยละ 10 - 30 เท่านั้น เมื่อกาเฟอีนแพร่กระจายทางกระแสเลือดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดกระบวนการเผาผลาญที่ตับ พบเมตาบอไลต์ชนิดแรกที่เกิดขึ้นในกระแสเลือดคือ พาราแซนธิน (5) หลังจากกาเฟอีนเข้าสู่ร่างกาย 3 ชั่วโมง จะถูกขับออกทางปัสสาวะ มีบางส่วนขับถ่ายออกทางอุจจาระ (2)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญคือฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางและระบบไหลเวียนโลหิต ซึ่งขึ้นกับขนาดและความถี่ของกาเฟอีนที่ได้รับว่าได้รับเป็นประจำหรือไม่ ความไวของแต่ละบุคคลต่อกาเฟอีน พยาธิสภาพของร่างกายเช่นโรคตับ จากการที่กาเฟอีนมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง จึงเป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคเครื่องดื่มที่มีกาเฟอีน ฤทธิ์นี้จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณหรือขนาดของกาเฟอีนที่ได้รับ ขนาดต่ำ 50 - 200 มิลลิกรัม จะช่วยกระตุ้นทำให้ไม่ง่วงนอน มีความตื่นตัว กระปรี้กระเปร่า สดชื่น ความคิดว่องไวขึ้น รู้สึกมีแรง เพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน ลดความอ่อนเพลีย ขนาดปานกลาง 200 - 500 มิลลิกรัม อาจทำให้ปวดศีรษะ เกรียด กระวนกระวาย มือสั่น นอนไม่หลับ ขนาดสูงถึง 1000 มิลลิกรัม จะเริ่มทำให้เกิดพิษของกาเฟอีน มีอาการ



กระสับกระส่าย ไม่อยู่นิ่ง พุดดิซซัด หัวใจเต้นเร็ว คลื่นไส้ เบื่ออาหาร ปัสสาวะบ่อย (2) ผลเหล่านี้เป็นผลเฉียบพลันที่เกิดกับผู้ที่ไม่ได้รับกาเฟอีนเป็นประจำ และเป็นการได้รับกาเฟอีนครั้งเดียวในขนาดที่บ่งไวข้างต้น ผู้ที่ได้รับกาเฟอีนเป็นประจำ ฤทธิ์เหล่านี้จะลดลง เนื่องจากทนต่อฤทธิ์ของกาเฟอีน

ในระบบไหลเวียนโลหิต กาเฟอีนอาจทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เพียง 5 - 10 มิลลิเมตรปรอท หัวใจเต้นช้าลงประมาณ 6 ครั้งต่อนาทีในช่วงแรก หลังจากนั้นจะกลับเพิ่มขึ้นจากปกติ 6 ครั้งต่อนาที กาเฟอีนในขนาดสูงทำให้หัวใจเต้นเร็ว และขนาดที่เป็นพิษอาจทำให้หัวใจเต้นผิดจังหวะ และความดันโลหิตสูงขึ้นได้ สำหรับคนที่ไวต่อฤทธิ์ของกาเฟอีน การได้รับกาเฟอีนในขนาดต่ำ อาจทำให้เกิดอาการหัวใจเต้นผิดปกติ ใจสั่น เวียนศีรษะ บุคคลเหล่านี้ไม่ควรดื่มเครื่องดื่มหรือรับประทานอาหารที่มีกาเฟอีน อย่างไรก็ตามจากหลักฐานที่มีการวิจัยกันมากมายพบว่ากาเฟอีนไม่ทำให้เป็นโรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (8) ในบางประเทศนิยมดื่มกาแฟที่ชงโดยวิธีต้มกาแฟคั่วบดและดื่มโดยไม่กรองกาก การดื่มกาแฟที่ชงในลักษณะนี้ ทำให้คอเลสเตอรอลในเลือดสูงได้ เนื่องจากในเมล็ดกาแฟมีน้ำมันคาห์วืออล (kahweol) ซึ่งมีฤทธิ์เพิ่มคอเลสเตอรอลในเลือดได้ น้ำมันชนิดนี้ถูกสกัดออกจากเมล็ดกาแฟด้วยน้ำร้อนได้แต่ไม่ผ่านกระดาษกรอง การดื่มกาแฟสำเร็จรูปหรือกาแฟคั่วบดซึ่งชงโดยการกรองกากจึงไม่ทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้น

ระบบทางเดินอาหาร กาเฟอีนสามารถเพิ่มการหลั่งกรดและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารได้ ทำให้อาการของโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้รุนแรงขึ้น แต่ยังไม่มียหลักฐานแสดงว่าการดื่มกาแฟหรือเครื่องดื่มที่มีกาเฟอีนทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารโดยตรง

กาเฟอีนมีฤทธิ์ขับปัสสาวะโดยลดการดูดซึมกลับของโซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียมจากท่อไตฝอย ทำให้เพิ่มการขับโซเดียม โพแทสเซียม รวมทั้งน้ำออกทางปัสสาวะ เกิดข้อสงสัยว่ากาเฟอีนอาจเป็นสาเหตุให้มีการสูญเสียแคลเซียมออกจากร่างกาย เป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคกระดูกเปราะบางในสตรีวัยหมดประจำเดือน แต่จากงานวิจัยจำนวนมาก ไม่พบว่ากาเฟอีนทำให้เกิดโรคกระดูกเปราะบางและกระดูกหักง่าย (9)

กาเฟอีนสามารถเพิ่มการทำงานของกล้ามเนื้อลายได้ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก แม้ว่าฤทธิ์การทำงานของกล้ามเนื้อลายจะไม่มากนัก แต่จะมีความสำคัญมากในการแข่ง

ชั้นที่จับเวลาหรือต้องใช้ประสิทธิภาพของกล้ามเนื้อสูงสุด เวลาที่ลดลงเพียงเล็กน้อยอาจจะตัดสินผลแพ้ชนะได้ โอลิมปิกสากลจึงกำหนดว่าถ้าตรวจพบกาเฟอีนในปีสภาวะเกิน 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะถือว่านักกีฬานั้นตั้งใจจะใช้กาเฟอีนเป็นยาได้ปี ระดับดังกล่าวของกาเฟอีนในปีสภาวะเกิดขึ้นได้เมื่อดื่มกาเฟอีนที่เข้มข้นติดต่อกัน 3 - 4 ถ้วยก่อนการแข่งขัน แต่เนื่องจากกาเฟอีนทำให้มือสั่น จึงทำให้งานที่ต้องใช้การประสานงานของกล้ามเนื้อหลายส่วนหรือต้องการการประสานงานที่แม่นยำลดลง เช่นการยิงปืน

ผลข้างเคียงและพิษของกาเฟอีน ในปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดโดยเฉพาะการรับประทานกาเฟอีนในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตามการบริโภคในปริมาณมากเกินไปมากกว่า 600 มิลลิกรัมต่อวัน เท่ากับกาแฟชงแก่ ๆ 5 - 6 ถ้วยอาจทำให้เกิดโรค caffeinism มีอาการวิตกกังวล กระสับกระส่าย ตื่นบ่อย หงุดหงิด ปวดศีรษะ และใจสั่นได้ ขนาดที่ทำให้เสียชีวิตในผู้ใหญ่ประมาณ 10 กรัม ซึ่งเท่ากับการดื่มกาแฟชงแก่ ๆ 80 - 100 ถ้วย ชา 150 ถ้วย เครื่องดื่มโคล่า 200 กระป๋อง ต่อเนื่องกันภายในครึ่งชั่วโมง ซึ่งในความเป็นจริงจะไม่สามารถดื่มเครื่องดื่มเหล่านี้ได้ในช่วงเวลาสั้น ๆ (7)

กาเฟอีนเป็นสารในอาหารและเครื่องดื่มที่ได้รับการศึกษามากที่สุด เนื่องจากมีการบริโภคสารนี้อย่างกว้างขวาง จึงมีการวิจัยเพื่อพิสูจน์ว่าการบริโภคกาเฟอีนจะมีผลเสียต่อสุขภาพในแง่ใดบ้างหรือไม่ เช่น การเกิดโรคมะเร็งของทางเดินอาหาร ตับอ่อน กระเพาะปัสสาวะ ไต เต้านม รังไข่ โรคไฟโบรซิสติกของเต้านมซึ่งเป็นก้อนเนื้อในเต้านมชนิดไม่เป็นอันตราย (10) การคลอดทารกที่พิการหรือน้ำหนักตัวต่ำกว่าปกติ (11) การตั้งครรภ์ยาก การแท้งลูก ภาวะดุกพรุน (12) ภาวะดุกเปราะบางและภาวะดุกหัก โรคของระบบการไหลเวียนโลหิต (13,14) ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน คอเลสเตอรอลในเลือดสูง แผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ จากหลักฐานที่มีอยู่จนถึงปัจจุบัน ไม่สามารถชี้ได้ว่าการบริโภคกาเฟอีนมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดโรคดังกล่าว

แต่ผลสรุปจากการวิจัยในหลายสถาบันต่างกัน ตั้งแต่ ค.ศ.1974 - 1989 พบว่าการบริโภคกาเฟอีน มีผลโดยตรงกับอัตราการเกิดทารกน้ำหนักน้อย หรือทารกคลอดก่อนกำหนด จะสังเกตได้ชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในหญิงที่บริโภคกาเฟอีนในปริมาณสูง และพบว่ากาเฟอีนมีผลทำให้ออสูจิมีการเคลื่อนไหวเร็วขึ้น โอกาสตั้งครรภ์ของหญิงที่สามีบริโภคกาเฟอีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และไม่พบความผิดปกติในรูปร่างของออสูจิ (4)

แต่การศึกษาทดลองในหญิงมีครรภ์ กลับพบว่าการบริโภคกาแฟอื่นในช่วงตั้งครรภ์มีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซม (4) ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะว่า หญิงมีครรภ์ควรหลีกเลี่ยงอาหารและเครื่องดื่มที่ผสมกาเฟอีน กาเฟอีนจะผ่านรกไปสู่เด็กในครรภ์ได้ พบระดับของกาเฟอีนในเลือดและเนื้อเยื่อของเด็กมีปริมาณสูงเท่ากับในเลือดและเนื้อเยื่อของมารดา มารดาที่บริโภคกาเฟอีนมาก ๆ พบว่ามีความสัมพันธ์เล็กน้อยกับทารกน้ำหนักน้อยกว่าปกติ(6) ในหญิงให้นม กาเฟอีนในน้ำนมจะมีปริมาณเป็นครึ่งหนึ่งของกาเฟอีนในเลือดมารดา ถ้ามารดาบริโภคอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีกาเฟอีน ทารกจะได้รับกาเฟอีนจากน้ำนมมารดาด้วย (6)

การบริโภคกาเฟอีนในประเทศไทย กาเฟอีนพบได้ในอาหารและเครื่องดื่มต่าง ๆ เช่นกาแฟ ชา ช็อคโกแลต เครื่องดื่มโคล่า เครื่องดื่มผสมกาเฟอีน ปริมาณการบริโภคกาเฟอีนจากเครื่องดื่ม 4 ประเภท รวมทั้งสิ้นประมาณ 376,492.5 มิลลิกรัม โดยมาจากกาแฟสำเร็จรูปมากที่สุด รองลงมาคือเครื่องดื่มโคล่า เครื่องดื่มผสมกาเฟอีน และกาแฟกระป๋องพร้อมดื่ม จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยการบริโภคกาเฟอีนต่อคนต่อวัน จะมีค่าประมาณ 23.7 มิลลิกรัมต่อคนต่อวัน และได้รับจากกาแฟมากที่สุดประมาณ 10.4 มิลลิกรัมต่อคนต่อวัน

ปริมาณกาเฟอีนที่มีในเครื่องดื่มและอาหารโดยประมาณเช่น กาแฟผงสำเร็จรูปถ้วยละ 40 - 108 มิลลิกรัม กาแฟสำเร็จรูปสกัดกาเฟอีนออกถ้วยละ 2 - 8 มิลลิกรัม ชาถ้วยละ 24 - 48 มิลลิกรัม เครื่องดื่มโคล่ากระป๋องละ 28 - 64 มิลลิกรัม กาแฟสำเร็จรูปชนิดกระป๋อง 80 - 200 มิลลิกรัม

การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนมีหลายวิธี เช่น Modified Bailey-Andrew Method (16) เป็นวิธีเดิมที่เคยใช้วิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในชาซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์มาก และใช้เวลานาน

อีกวิธีหนึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 คอลัมน์ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 246 ถึง 276 นาโนเมตร(15)

วิธีที่ใช้กันมากคือวิธีตกตะกอนกาเฟอีนด้วยกรดฟอสโฟมอลิบดีก(15) แล้วละลายตะกอนด้วยอะซีโตน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร

นอกจากนี้ยังมีวิธีจีแอลซี วิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนด้วยก๊าซโครมาโทกราฟี และวิธีเอชพีแอลซี นิยมมากในปัจจุบันเนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำและรวดเร็ว แต่เครื่องมือมีราคาสูงมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่น

ได้ทำการศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว ใช้เวลาสั้นลงกว่าเดิม ได้ผลถูกต้องแม่นยำ โดยใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งเป็นเครื่องมือที่อยู่ในห้องปฏิบัติการ ทำตามวิธีวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ที่กำหนดไว้ใน AOAC (17) และได้ศึกษาเพิ่มเติมในการหาค่าความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนในคลอโรฟอร์มให้การดูดกลืนแสงสูงสุด และจะใช้ค่าความยาวคลื่นที่ได้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณกาเฟอีนในตัวอย่างต่อไป นอกจากนี้ยังได้ทดลองหาช่วงของการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมสารละลายตัวอย่างกาแฟ 2 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณกาเฟอีนแตกต่างกัน โดยให้มีความเข้มข้นของกาเฟอีนในสารละลายตัวอย่างในปริมาณที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงการวิเคราะห์ดังกล่าวได้

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (18) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิลความยาวคลื่นประมาณ 190 - 800 นาโนเมตร สารเคมีซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนหรือสารอนินทรีย์ ทั้งที่มีสีและไม่มีสี จะมีสมบัติเฉพาะในการดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่นต่างๆกัน จากสมบัติของสารดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและในเชิงปริมาณอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำดี และมีสภาพไว (sensitivity) สูง เมื่อแสงที่อยู่ในช่วง ยูวี - วิสิเบิล ผ่านเข้าไปในโมเลกุลของสาร สารนั้นจะดูดกลืนแสงเฉพาะบางช่วง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอน ซึ่งโดยมากจะใช้พลังงานประมาณ 30 - 150 กิโลแคลอรีต่อโมล และเมื่อให้แสงที่ทะลุออกไปผ่านเข้าเครื่องกระจายแสง เช่นเกรตติง (grating) จะเห็นว่าสเปกตรัมหายไปส่วนหนึ่ง ส่วนที่หายไปนี้เรียกว่า absorption spectrum

หลักการหาปริมาณของสารกับการวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืน ในการวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนด้วยสารตัวอย่างนั้น ทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณแสงที่ผ่านทะลุออกมา โดยเปรียบเทียบกับแสงที่ผ่านออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่างเรียกว่าแบลนค์ อาศัยกฎการดูดกลืนแสงของแลมเบิร์ตและเบียร์ (Lambert - Beer's law) หรือที่รู้จักกันทั่วไปคือกฎของเบียร์ (Beer's law) (19) ที่ว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น แสงที่ให้ผ่านสารละลายนั้นต้องเป็นแสงโมโนโครเมติก (monochromatic) ซึ่งเป็นแถบแสงแคบ ๆ กระบวนการดูดกลืนแสงของแต่ละอนุภาคจะต้องไม่ขึ้นแก่กัน สารละลายจะต้องเจือจางและเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น จะได้กราฟเป็นเส้นตรง

การดูดกลืนแสงในช่วงแสงอัลตราไวโอเล็ต เป็นการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงคลื่นระหว่าง 200 ถึง 380 นาโนเมตร ส่วนการดูดกลืนแสงในช่วงแสงวิสิเบิล จะอยู่ในช่วงคลื่นระหว่าง 380 ถึง 780 นาโนเมตร

## วัตถุประสงค์

1. ทดสอบประสิทธิภาพของการดำเนินการในห้องปฏิบัติการใช้วิธี

Spectrophotometric

2. วิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในตัวอย่างกาแฟสำเร็จรูป และกาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออก โดยวิธี Spectrophotometric และวิธี Modified Bailey-Andrew เพื่อทดสอบความแม่นยำของทั้งสองวิธี

## ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้ผลการทดสอบประสิทธิภาพของการดำเนินการในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Spectrophotometric ที่มีประสิทธิภาพสูง
2. ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่มประเภทอื่น ๆ ต่อไป

## ระยะเวลาดำเนินการ

สิงหาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2539

## วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการ

ตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างกาแฟ 2 ชนิดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

1. กาแฟสำเร็จรูป
2. กาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาแฟีนออก

การวิเคราะห์ปริมาณกาแฟีน

### I. วิธี Modified Bailey-Andrew (16)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เตาไฟฟ้าพร้อมเครื่องควบแน่นกลั่นกลับ
- เตาแก๊ส
- เตากลั่นพร้อมชุดกลั่น
- เครื่องอังน้ำ
- เตาไฟฟ้า
- ขวดแก้วกนแบน 500 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ 100 และ 600 มิลลิลิตร
- กรวยแยก 500 มิลลิลิตร
- บีเปตต์ 5 และ 100 มิลลิลิตร
- กรวยแก้ว และกระเปาะแก้ว
- กระดาษกรองวัตแมน เบอร์ 41
- กระบอกตวง 50 และ 100 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วเจลด้าห์ล 500 มิลลิลิตร
- ขวดกลั่นกนกลม 1000 มิลลิลิตร
- บิวเรตต์ 50 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมีและสารละลาย (ใช้สารเคมีชั้นคุณภาพวิเคราะห์)

- แมกนีเซียมออกไซด์
- กรดซัลฟิวริก (1+9)
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 1
- คลอโรฟอร์ม
- กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 98
- คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- โพแทสเซียมซัลเฟต
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 40
- สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์แมล
- อินดิเคเตอร์ผสม เมทิลเรดร้อยละ 0.1 โบรโมเครโซลกรีนร้อยละ 0.1 อัตราส่วน 1 : 5 ในแอลกอฮอล์
- กรดบอริก ร้อยละ 4

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักแน่นอน ใส่ขวดแก้วกันแบน ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร และแมกนีเซียมออกไซด์ 10 กรัม เขย่าให้เข้ากัน ต่อกับเครื่องควบแน่นกลั่นกลับ ต้มไฟอ่อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำออกมาทำให้เย็น ถ่ายใส่ขวดแก้วปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้ง ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ที่มีส่วนที่กรองได้ครั้งแรก 25 มิลลิลิตร บีบอัด 300 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก (1+9) จำนวน 10 มิลลิลิตร

นำไปประเหยบนเตาไฟฟ้าจนปริมาตรลดลงเหลือประมาณ 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้ง



สกัดสารละลายในกรวยแยกด้วยคลอโรฟอร์ม รวม 6 ครั้ง ใช้คลอโรฟอร์ม 25 20 15 10 10 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ หลังจากการสกัดแต่ละครั้งตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วไขชั้นล่างรวมไว้ในกรวยแยกที่ 2

เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 จำนวน 5 มิลลิลิตรในกรวยแยกที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วไขชั้นล่างลงในขวดแก้วเจลาคาล์ขนาด 500 มิลลิลิตร สกัดสารละลายต่างในกรวยแยกที่ 2 ด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 10 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วไขชั้นล่างรวมไว้ในขวดแก้วเจลาคาล์ใบเดิม

นำไปประเหยคลอโรฟอร์มบนเครื่องอังน้ำให้แห้ง แล้วทำตามขั้นตอนของการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldahl ดังนี้

เติมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท 0.5 กรัม และ โพแทสเซียมซัลเฟต 10 กรัมใน ขวดแก้วเจลาคาล์เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาและเพิ่มอุณหภูมิ

เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร แล้วปิดปากขวดด้วยกระเปาะแก้ว

นำไป digest โดยใช้ไฟอ่อน จนได้สารละลายใสสีเขียว ใช้ไฟแรงให้สารละลายเดือดต่ออีก 1 ชั่วโมง 30 นาที ปิดไฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดกลั่น โดยใช้น้ำกลั่นล้างประมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปกลั่นบนเตากลั่น โดยรองรับแอมโมเนียที่กลั่นได้ด้วยขวดแก้วกันแบนซึ่งเติมกรดบอริก จำนวน 50 มิลลิลิตร และ อินดิเคเตอร์ผสม 5 - 10 หยด

เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 40 จำนวน 90 มิลลิลิตร ผ่านกรวยที่ปิดเปิดได้ ล้างกรวยด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย

ทำการกลั่นสารละลายแอมโมเนียลงในขวดกรดบอริกจนได้สารละลายสีฟ้าประมาณ 200 มิลลิลิตร

หยุดกลั่น ล้าง condenser และ adapter ด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย

นำไปไทเทรตกับกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์แมล จนถึงจุดยุติสีเทา

ทำแบบลงค์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน ร้อยละของน้ำหนัก} = \frac{(V_1 - V_0)N}{1000} \times \frac{V_2}{V_3} \times \frac{100}{W} \times 14$$

เมื่อ  $V_1$  คือ ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง เป็นมิลลิลิตร

$V_0$  คือ ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตแบลงค์ เป็นมิลลิลิตร

$N$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกเป็น  
นอร์แมล

$V_2$  คือ ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง  $W$  กรัม

$V_3$  คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด เป็นมิลลิลิตร

$W$  คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

$$\text{ปริมาณกาเฟอีน ร้อยละของน้ำหนัก} = \text{ปริมาณไนโตรเจน} \times 3.464$$

II วิธี Spectrophotometric (17)เครื่องมือและอุปกรณ์

- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer , model UV-240)
- เซลล์ (quartz cell) ขนาด 1 เซนติเมตร 1 คู่
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- ขวดแก้วปริมาตร 100 และ 200 มิลลิลิตร
- กรวยแยก 125 มิลลิลิตร
- กรวยขนาด 5 เซนติเมตร
- กระดาษกรองวัตแมน เบอร์ 41
- บีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร
- ปิเปตต์ 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

สารเคมีและสารละลาย (ใช้สารเคมีชั้นคุณภาพวิเคราะห์)

- กาเฟอินบริสุทธิ์
- สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ร้อยละ 1.5
- สารละลายรีคิวซิง (Reducing solution)
  - ละลายโซเดียมซัลไฟด์ 5 กรัม และโพแทสเซียมไทโอไซยาเนต 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- สารละลายกรดฟอสฟอริก
  - เจือจางกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 85 จำนวน 15 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 85 มิลลิลิตร
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
  - ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
- คลอโรฟอร์ม

การดำเนินการศึกษาทดลอง

1. การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์กาเฟอิน

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- stock standard solution ชั่งกาเฟอิน 0.1000 กรัมละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตร
- working standard solution เตรียมจาก stock standard solution ให้ได้สารละลายมาตรฐานกาเฟอิน ความเข้มข้น 0.10 0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร ใช้เป็นสารละลายสำหรับทำกราฟมาตรฐาน

1.2 การหาความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งสารละลายมาตรฐานกาเฟอินในคลอโรฟอร์มให้การดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{max}$ )

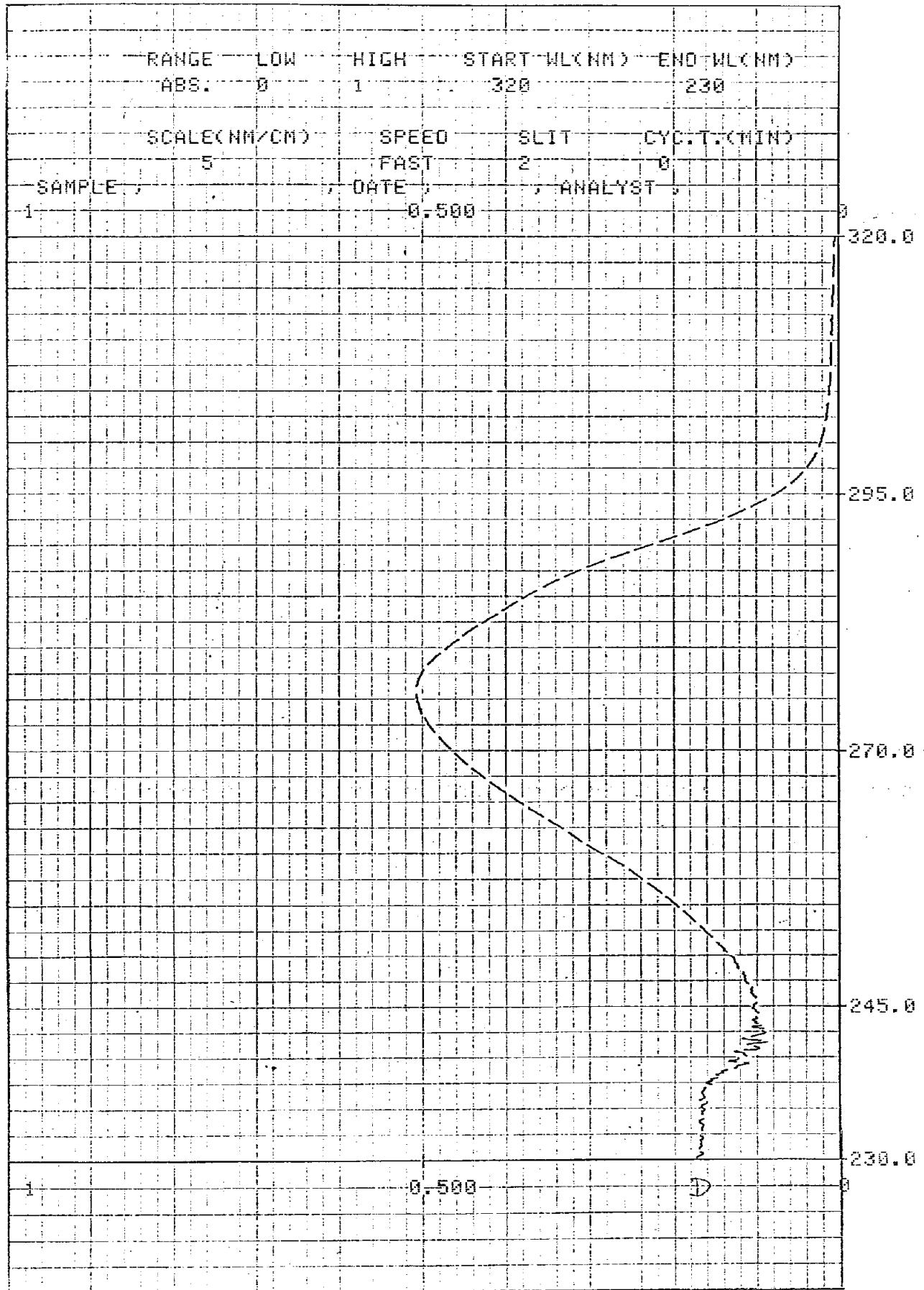
โดยนำสารละลายมาตรฐานกาเฟอินความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตเทียบกับคลอโรฟอร์ม โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งปรับให้มีสภาวะดังนี้ ความกว้างของช่องแสง (slit) 2 นาโนเมตร ความยาวคลื่นระหว่าง 230 ถึง 320

นาโนเมตรต่อนาที และสเกล 5 นาโนเมตรต่อเซนติเมตร บันทึกสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐาน ในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวข้างต้น พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 1

### 1.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน 0.10 0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร ( $\lambda_{\max}$ ) เทียบกับคลอโรฟอร์ม สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (รูปที่ 3)

รูปที่ 1 สเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน



## 2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เพื่อให้ปริมาณกาเฟอีนในสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.10 - 2.00 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่าเป็นช่วงที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ควรเตรียมสารละลายตัวอย่างดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 กาแฟสำเร็จรูป ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัม ให้ได้น้ำหนักแน่นอนในบีกเกอร์ ละลายด้วยน้ำเดือดใช้แกว่งแก้วคนให้ละลายหมด ถ่ายใส่ขวดแก้วปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างด้วยน้ำร้อนหลายครั้ง ตั้งทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเจือจางจนครบปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ตัวอย่างที่ 2 กาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออก ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ให้ได้น้ำหนักแน่นอนในบีกเกอร์ แล้วทำเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 1 แต่ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

## 3. วิธีวิเคราะห์

ปีเปตต์สารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ใส่กรวยแยกขนาด 125 มิลลิลิตร ทำแบบลงค์เช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง แต่ใช้น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรแทน เติมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ร้อยละ 1.5 จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม reducing solution 10 มิลลิลิตร เขย่า เติมสารละลายกรดฟอสฟอริกเจือจาง 1 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

สกัดกาเฟอีนด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที รวม 4 ครั้ง หลังการสกัดแต่ละครั้ง ล้างกรวยแยกด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 3 - 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

ไขชั้นล่างผ่านกระดาษกรองขนาด 7 เซนติเมตรซึ่งวางอยู่ในกรวยแก้วขนาด 5 เซนติเมตร ลงสู่ขวดแก้วปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

เมื่อสกัดครบ 4 ครั้ง ล้างกระดาษกรองด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.1 การวิเคราะห์โดยคุณภาพ เป็นการศึกษาเพิ่มเติมโดยนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดกาเฟอีนด้วยคลอโรฟอร์มตามวิธีในข้อ 3 แล้ว ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบบลงค์ โดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งตั้งความยาวคลื่น

ดูดกลืนแสงเทียบกับแบลนค์ โดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ซึ่งตั้งความยาวคลื่นระหว่าง 230 ถึง 320 นาโนเมตร ช่วงการดูดกลืนแสงจาก 0 ถึง 1 ความเร็ว (scan speed) 100 นาโนเมตรต่อนาที และสเกล 5 นาโนเมตรต่อเซนติเมตร ความกว้างของช่องแสง 2 นาโนเมตร บันทึกสเปกตรัมของสารละลายตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะเช่นเดียวกับสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน โดยมี ความยาวคลื่นแสงที่สารละลายตัวอย่างให้การดูดกลืนสูงสุดที่ 276 นาโนเมตร แสดงว่าสิ่งที่สกัดได้จากสารละลายตัวอย่างคือกาเฟอีน ดังแสดงในรูปที่ 2

3.2 การวิเคราะห์โดยปริมาณ นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดกาเฟอีนด้วยคลอโรฟอร์มตามวิธีในข้อ 3 แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลนค์ โดยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณกาเฟอีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน หรือคำนวณจาก factor

#### 4. วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณกาเฟอีน ร้อยละ} = \frac{A}{A_1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{100}{W}$$

เมื่อ A คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

A<sub>1</sub> คือค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

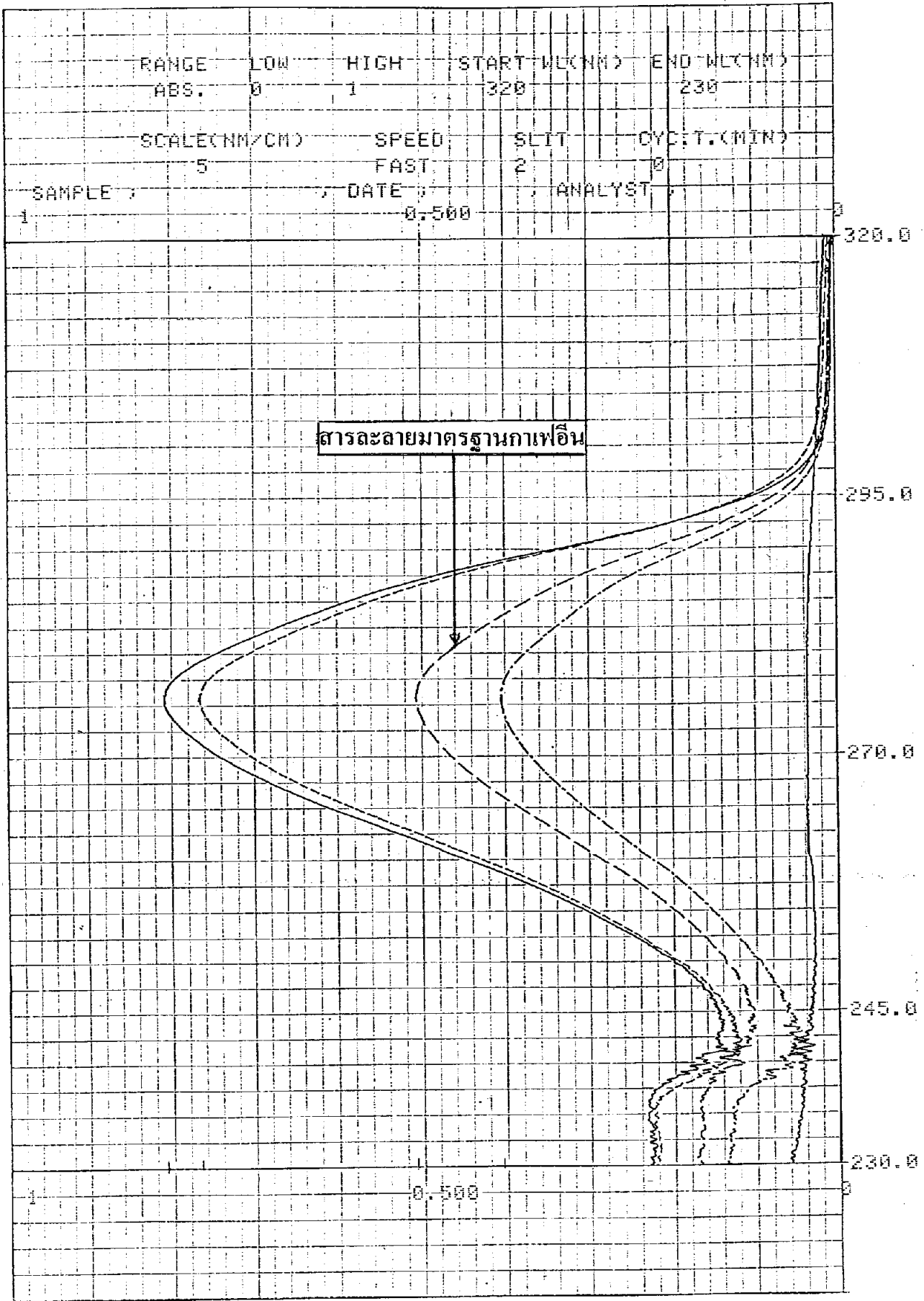
กาเฟอีน 6 ความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งคำนวณความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

V<sub>1</sub> คือปริมาตรทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง W กรัม

V<sub>2</sub> คือปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด เป็นมิลลิลิตร

W คือน้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

รูปที่ 2 สเปกตรัมของสารละลายตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน



SHIMADZU CORPORATION CHART 200-21522 D



## 5. การประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

### 5.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ ตามกฎของเบียร์ (linearity and range)

จากสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนที่เตรียมตามข้อ 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของกาเฟอีน 0.10 0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร (ตามตารางที่ 1) แล้วสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน 6 ความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง

### 5.2 การทดสอบความแม่นยำ (precision)

ทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในตัวอย่างกาแฟ 2 ตัวอย่าง ชั่งและเตรียมตัวอย่างในวันเดียวกันตามวิธีในข้อ 2 นำมาทดลองทำตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 วัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณปริมาณกาเฟอีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง

### 5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ หาปริมาณ

#### กาเฟอีนที่ได้กลับคืนมา (recovery)

ใช้วิธี standard addition โดยวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงไป ปริมาณต่าง ๆ กัน ทำการวิเคราะห์อีกครั้ง ผลต่างของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองครั้ง นำมาเปรียบเทียบกับปริมาณกาเฟอีนที่เติมลงไป ในตัวอย่าง จะได้ค่าปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมา

ใช้ตัวอย่างที่ 2 คือ กาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออก ซึ่งมีปริมาณกาเฟอีนน้อยมากในการทดสอบ ชั่งตัวอย่าง 1.000 กรัม เตรียมสารละลายตามวิธีในข้อ 2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

บีเปตต์สารละลายตัวอย่างใส่ในกรวยแยก 5 ใบ ใบละ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนในกรวยแยกแต่ละใบ เริ่มตั้ง แต่ 0 1 3 5 7 มิลลิลิตรตามลำดับ

แล้วดำเนินการตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี Spectrophotometric ในข้อ 3

ทำการวิเคราะห์ซ้ำ ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง

## ผลการวิเคราะห์

### 1. วิธี Spectrophotometric

จากการบันทึกสเปกตรัมของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน ความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 230 ถึง 320 นาโนเมตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร แสดงว่าที่ความยาวคลื่นนี้เหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนในคลอโรฟอร์ม (ตามรูปที่ 1)

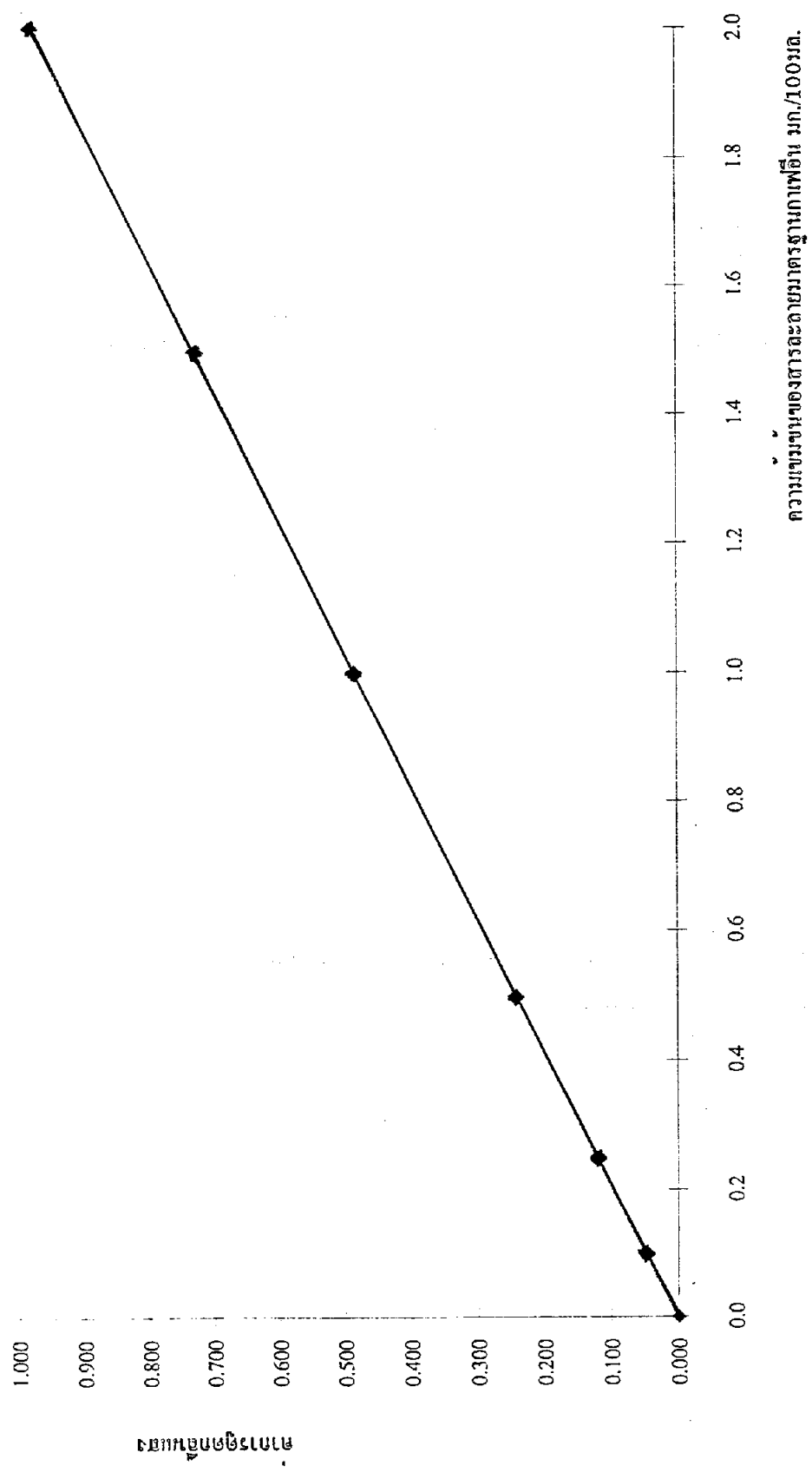
#### ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนกับค่าการดูดกลืนแสง พบว่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีนทั้ง 6 ความเข้มข้นมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วง 0.10 - 2.00 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 1 และรูปที่ 3) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r$ ) = 0.99975 ซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law)

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายมาตรฐานกาเฟอีน

| ความเข้มข้นของกาเฟอีน<br>มก/100 มล. | ค่าการดูดกลืนแสง<br>ที่ 276 นาโนเมตร | ค่าการดูดกลืนแสง<br>คำนวณเป็น 1 มก/100มล. |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 0.10                                | 0.048                                | 0.480                                     |
| 0.25                                | 0.120                                | 0.480                                     |
| 0.50                                | 0.242                                | 0.484                                     |
| 1.00                                | 0.484                                | 0.484                                     |
| 1.50                                | 0.720                                | 0.480                                     |
| 2.00                                | 0.982                                | 0.481                                     |
|                                     | เฉลี่ย                               | 0.481                                     |

รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  
 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อนและการดูดกลืนแสง



ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อน มก./100มล.

### ผลการทดสอบความแม่นยำ (precision)

จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนในกาแฟสำเร็จรูปจำนวน 2 ตัวอย่าง วิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 7 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน พบว่าได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) 0.0096 และ 0.0068 สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (coefficient of variation) ร้อยละ 0.235 และ 5.949 ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี Spectrophotometric

| ครั้งที่                      | ปริมาณกาเฟอีน ร้อยละ |               |
|-------------------------------|----------------------|---------------|
|                               | ตัวอย่างที่ 1        | ตัวอย่างที่ 2 |
| 1                             | 4.089                | 0.109         |
| 2                             | 4.105                | 0.124         |
| 3                             | 4.078                | 0.108         |
| 4                             | 4.104                | 0.113         |
| 5                             | 4.096                | 0.122         |
| 6                             | 4.102                | 0.115         |
| 7                             | 4.098                | 0.107         |
| ค่าเฉลี่ย (mean)              | 4.096                | 0.114         |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)      | 0.0096               | 0.0068        |
| สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (% CV) | 0.235                | 5.949         |

### ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์

โดยการวิเคราะห์หาปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมา (recovery) จากตัวอย่างที่ 2 กาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออก ทำตามวิธีทดสอบข้อ 5.3 เติมน้ำละลายมาตรฐาน กาเฟอีน 4 ความเข้มข้นซึ่งมีปริมาณกาเฟอีน 0.10 0.30 0.50 และ 0.70 มิลลิกรัม ทดสอบซ้ำความเข้มข้นละ 5 ครั้ง แล้ววิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ เติมน้ำ ตามขั้นตอนวิธีวิเคราะห์ พบว่าปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมา มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 99.0 - 99.60 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.31 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละ  $99.26 \pm 0.31$  ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมาของวิธี Spectrophotometric

| ปริมาณกาเฟอีน มิลลิกรัม     |         |             | ปริมาณกาเฟอีน<br>ที่ได้กลับคืนมา<br>ร้อยละ |
|-----------------------------|---------|-------------|--|
| ที่มีอยู่เดิมในตัวอย่าง     | ที่เติม | * ที่ตรวจพบ |  |
| 0.114                       | 0.10    | 0.213       | 99.0                                       |
| 0.114                       | 0.30    | 0.411       | 99.0                                       |
| 0.114                       | 0.50    | 0.612       | 99.60                                      |
| 0.114                       | 0.70    | 0.810       | 99.43                                      |
| ค่าเฉลี่ย                   |         |             | 99.26                                      |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน         |         |             | 0.31                                       |
| ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ |         |             | $99.26 \pm 0.31$                           |

\* ปริมาณกาเฟอีนที่ตรวจพบ เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำ 5 ครั้ง ของแต่ละความเข้มข้น

## 2. ผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน โดยวิธี Modified Bailey-Andrew

จากการวิเคราะห์กาแฟสำเร็จรูปจำนวน 2 ตัวอย่าง วิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 7 ครั้งในวันเดียวกัน พบว่าได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.029 และ 0.007 สัมประสิทธิ์ความแปรผัน ร้อยละ 0.708 และ 6.455 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน โดยวิธี Modified Bailey-Andrew

| ครั้งที่                      | ปริมาณกาเฟอีน ร้อยละ |               |
|-------------------------------|----------------------|---------------|
|                               | ตัวอย่างที่ 1        | ตัวอย่างที่ 2 |
| 1                             | 4.013                | 0.100         |
| 2                             | 4.091                | 0.101         |
| 3                             | 4.065                | 0.115         |
| 4                             | 4.091                | 0.111         |
| 5                             | 4.079                | 0.117         |
| 6                             | 4.097                | 0.110         |
| 7                             | 4.082                | 0.102         |
| ค่าเฉลี่ย (mean)              | 4.074                | 0.108         |
| ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)      | 0.029                | 0.007         |
| สัมประสิทธิ์ความแปรผัน (% CV) | 0.708                | 6.455         |

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์สารตัวอย่างเดียวกันโดยวิธีวิเคราะห์สองวิธี ด้วยการทดสอบสมมติฐานทางสถิติแบบที (t - Test) พบว่าค่า t ที่คำนวณได้จากผลวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 2.4127 และ 1.7638 ค่า t critical จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (degree of freedom = 6) มีค่าเท่ากับ 2.4469 และค่า P มีค่าเท่ากับ 0.0524 และ 0.1282 แสดงการประเมินค่าทางสถิติ (20) ในตารางที่ 5 และ 6 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ DATA ANALYSIS

ตารางที่ 5 การประเมินค่าทางสถิติของผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน ในตัวอย่างที่ 1 เปรียบเทียบสองวิธี

t - Test : Paired Two Sample for Means

|                              | วิธี Modified Bailey-<br>Andrew | วิธี Spectrophotometric |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Mean                         | 4.074                           | 4.096                   |
| Variance                     | 0.000833                        | 9.3 E - 05              |
| Observations                 | 7                               | 7                       |
| Pearson Correlation          | 0.617965844                     |                         |
| Hypothesized Mean Difference | 0                               |                         |
| df                           | 6                               |                         |
| t Stat                       | -2.412738246                    |                         |
| P (T <= t) one - tail        | 0.026189124                     |                         |
| t Critical one - tail        | 1.943180905                     |                         |
| P (T <= t) two - tail        | 0.052378248                     |                         |
| t Critical two - tail        | 2.446913641                     |                         |



ตารางที่ 6 การประเมินค่าทางสถิติของผลวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีน ในตัวอย่าง  
ที่ 2 เปรียบเทียบสองวิธี

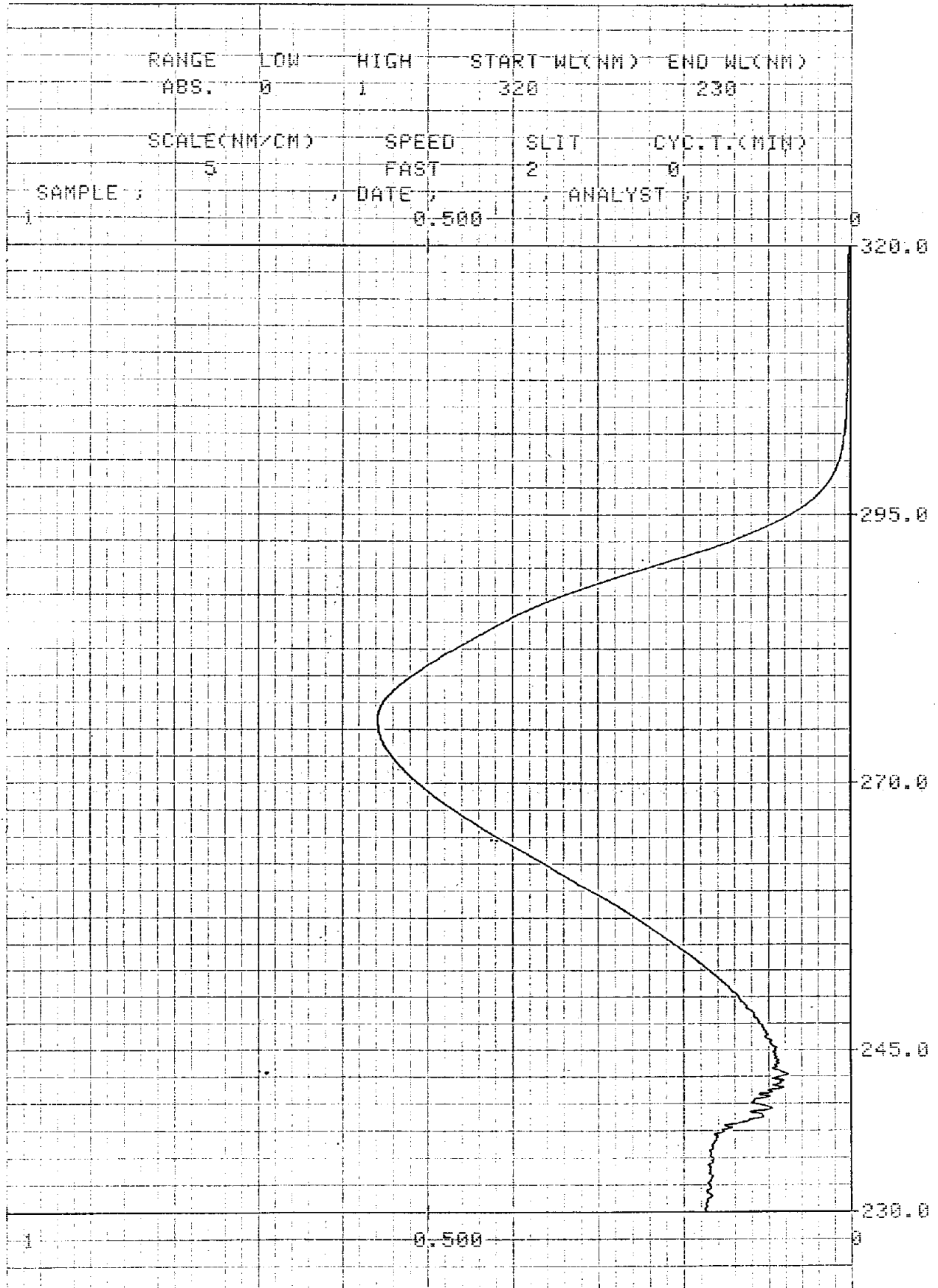
t - Test : Paired Two Sample for Means

|                              | วิธี Modified Bailey-<br>Andrew | วิธี Spectrophotometric |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Mean                         | 0.108                           | 0.114                   |
| Variance                     | 4.86667 E - 05                  | 4.6 E - 05              |
| Observations                 | 7                               | 7                       |
| Pearson Correlation          | 0.144423508                     |                         |
| Hypothesized Mean Difference | 0                               |                         |
| df                           | 6                               |                         |
| t Stat                       | -1.763834207                    |                         |
| P (T <= t) one - tail        | 0.064106627                     |                         |
| t Critical one - tail        | 1.943180905                     |                         |
| P (T <= t) two - tail        | 0.128213253                     |                         |
| t Critical two - tail        | 2.446913641                     |                         |

## ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนทั้งสองวิธี

| ข้อเปรียบเทียบ                                   | วิธีSpectrophotometric  | วิธีModified Bailey Andrew                       |
|--|---|--|
| ขั้นตอนการวิเคราะห์                              | มีขั้นตอนน้อยกว่า   | มีหลายขั้นตอนและยุ่งยากกว่า                      |
| การใช้สารเคมี                                    | ใช้น้อยชนิดกว่า (7ชนิด)   | ใช้หลายชนิด (12ชนิด)                             |
| การใช้อุปกรณ์ เครื่องแก้ว                        | จำนวนน้อยกว่า<br>9 ชิ้น/ตัวอย่าง  | จำนวนมากกว่า<br>18 ชิ้น/ตัวอย่าง                 |
| เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์                         | 1 วัน/ตัวอย่าง  | 3 วัน/ตัวอย่าง                                   |
| จำนวนตัวอย่างสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ต่อครั้ง | 6 ตัวอย่าง  | 3 ตัวอย่าง                                       |
| ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (ประเมินค่าทางสถิติ)  | มีความแม่นยำสูง   | มีความแม่นยำน้อยกว่า                             |
| ข้อจำกัดของการวิเคราะห์                          | ไม่สะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณกาเฟอีนมาก เพราะต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นพอเหมาะ | ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณกาเฟอีนมากได้ผลดี |

## รูปที่ 4 สเปกตรัมของกาแฟสำเร็จรูป



## วิจารณ์

การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณกาเฟอีนต่ำ เช่นตัวอย่างที่ 2 ซึ่งเป็นกาแฟสำเร็จรูปที่สกัดกาเฟอีนออก มีปริมาณกาเฟอีนเฉลี่ยร้อยละ 0.114 และ 0.108 ในตารางที่ 2 และ 4 จะได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันมากกว่าตัวอย่างที่ 1 ซึ่งมีปริมาณกาเฟอีนสูง ถึงแม้ว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างที่ 2 จะน้อยกว่าตัวอย่างที่ 1 แต่เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยซึ่งมีค่าน้อยมาก ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันจึงมากกว่าร้อยละ 2

## สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี Spectrophotometric พบว่าช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามกฎการดูดกลืนแสงของเบียร์ มีค่าตั้งแต่ 0.10 ถึง 2.00 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.99975 จากการทดสอบความแม่นยำโดยใช้กาแฟสำเร็จรูป 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 4.096 และ 0.114 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.0096 และ 0.0068 สัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 0.235 และ 5.949 และเมื่อทดสอบความถูกต้องโดยการหาปริมาณกาเฟอีนที่ได้กลับคืนมาได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.26 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.31 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์คิดเป็นร้อยละ  $99.26 \pm 0.31$  แสดงว่าวิธีนี้ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำดี

การวิเคราะห์ปริมาณกาเฟอีนโดยวิธี Modified Bailey - Andrew (ตารางที่ 4) ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 4.074 และ 0.108 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.029 และ 0.007 สัมประสิทธิ์ความแปรผันร้อยละ 0.708 และ 6.455

เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ทั้งสองวิธี เมื่อประเมินผลทางสถิติโดย Pair t-Test (ตารางที่ 5 และ 6) พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เนื่องจากค่า  $t$  ที่คำนวณได้ ( $t$  Stat) มีค่าน้อยกว่า  $t$  Critical จากตาราง  $2.4127 < 2.4469$  และ  $1.7633 < 2.4469$  หรือพิจารณาจากค่าความน่าจะเป็น ( $P$ ) = 0.052 และ 0.128 ซึ่งมีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญ ( $\alpha$ ) ที่กำหนดไว้ คือ 0.05

และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันของวิธี Spectrophotometric จะเห็นว่าค่าน้อยกว่าของวิธี Modified Bailey - Andrew ในตัวอย่างเดียวกัน แสดงว่าวิธี Spectrophotometric เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธี Modified Bailey - Andrew สมควรนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีกงศรี (ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ)  
คุณสุคนธ์ เนคมานุรักษ์ และคุณสุนทรี เปรื่องการ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อ  
บกพร่องของรายงานฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. นฤมล โกมลเสวิน, เอกสารเผยแพร่ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 1/2524 เรื่อง เครื่องดื่มบางชนิดที่ว่าทำให้ชุ่มช้ำนั้นจริงหรือไม่ และมีการควบคุมอย่างไร, วันที่ 10 กรกฎาคม 2524
2. ภัคดี โพธิศิริ, คาเฟอีน.....อันตราย ?, แพทยสมาคม ปีที่ 13, ฉบับที่ 11 พฤศจิกายน 2527, หน้า 581 - 585
3. Institute of Food Technologists (IFT) Expert Panel on food Safety & Nutrition. Caffeine. A Scientific Status Summary, 1987.
4. IARC, WHO, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal, Vol.51,1991.
5. Dews, P.B., Caffeine. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1984.
6. Erwin, Kastrup et al., BS, Pharm. Drug Facts and Comparisons, 1989 edition, Facts and comparisons, Division, USA. 1989.
7. Institute of Food Technology, Evaluation of Caffeine safety, Food Technol.41 (6) 1987 : 105 - 113.
8. Fried, R.E., Levine, D.M., Kwiterovich, P.O. et al. The effect of filtered-coffee consumption on plasma lipid levels, Journal of The American Medical Association, 267 : 811 - 815, 1992.
9. Barger-Lux, M.J., Heaney, R.H. & Stegman, M.R. Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women. American Journal of Clinical Nutrition, 52 : 722 - 725, 1990.
10. McDonald, A.D., Armstrong, B.G. & Sloan, M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and congenital defects. American Journal of Public Health, 82 : 91 - 93.
11. Barr, H.M. & Streissguth, A.P. Caffeine use during pregnancy and

- child outcome : a 7- year prospective study. Neurotoxicology and Teratology, 13 : 441 - 448, 1991.
- 12.Cooper, C., Atkinson, E.J., Wahner, M.W. et al. Is caffeine consumption a risk factor for osteoporosis ? Journal of Bone and Mineral Research, 7 : 465 - 471, 1992.
- 13.Bak, A.A.A. and Grobee, D.E. Caffeine, blood pressure, and serum lipids. American Journal of Clinical Nutrition, 53 : 971 - 975, 1991.
- 14.LaCroix, A.Z., Mead, L.A., Lian, G.K.Y. et al. Coffee consumption and the incidence of coronary heart disease. The New England Journal of Medicine, 315 : 977 - 982, 1986.
- 15.Kirk , Ronald S. and Sawyer, Pearson's composition and analysis of foods. 9<sup>th</sup> ed., Harlow ; Longman Scientific & Technical, 1991 : 360 - 373
- 16.Robert H. Dick, Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> ed. , vol.2 , chapter 30 :12 , Virginia : AOAC 1995
- 17.Richard D. Thompson , Official methods of analysis of AOAC international. 16<sup>th</sup> ed . , vol. 2 , chapter 29 : 3 , Virginia : AOAC 1995
- 18.G.D. Christian and J.E.O. Reilly, Instrumental Analysis 2<sup>nd</sup> edition. Allyn and Bacon, Ine., 1986.
- 19.แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1. พ.ศ.2535. หน้า 33 - 98.
- 20.ศิริชัย พงษ์วิชัย. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์. พิมพ์ครั้งที่ 8 สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, พ.ศ.2539. หน้า 150 - 159.
- 21.ศุภชัย ใช้เทียมวงศ์. ปฏิบัติการเคมีปริมาณวิเคราะห์. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, พ.ศ.2539. หน้า 225 - 239.