

เทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์สายโซ่สั้นในตัวอย่างกาแฟโดยเครื่องสกัดด้วยเฟสของแข็งอัตโนมัติ

Sample preparation techniques for the determination of short-chain organic acids in coffee samples by the automated solid-phase extractor

ณัฐนรี รัตนคันทรัง¹, กานต์ธิดา คงแทน², พิสมัย ปิ่นศรีทอง¹, รุสนี กุลวิจิตร¹ และ ศักดิ์ชัยบดี ปิ่นศรีทอง^{1*}
Natnaree Rattanakunsong¹, Kantida Kongtan², Pisamai Pinsrithong¹,
Roosanee Kulvijitra¹ and Sakchaibordee Pinsrithong^{1*}

Received: 29 July 2023 ; Revised: 9 November 2023 ; Accepted: 6 December 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคเตรียมตัวอย่างเพื่อลดสารรบกวนก่อนการวิเคราะห์กรดอินทรีย์สายโซ่สั้น 6 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดไอโซบิวทีริก กรดบิวทีริก กรดไอโซวาเลอริก และกรดวาเลอริกด้วยเครื่อง GC จากตัวอย่างกาแฟสกัดด้วยหม้อต้ม การเตรียมตัวอย่างใช้เมทานอลกับน้ำปราศจากไอออนเจือจางตัวอย่าง 5 เท่า แยกอนุภาคขนาดใหญ่ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วทำความสะอาดโดยเครื่องสกัดด้วยเฟสของแข็งอัตโนมัติ สภาวะที่ศึกษา ได้แก่ คาร์ทริดจ์ชนิด Sep-ed C18 อัตราในการไหล 0.1 mL/min และปริมาตรตัวอย่าง 5 mL ผลจากการศึกษาลักษณะกายภาพของตัวอย่างก่อนและหลังเตรียมตัวอย่างขนาดอนุภาคลดลงจาก $6.78 \pm 4.69 \mu\text{m}$ เป็น $1.40 \pm 0.74 \mu\text{m}$ ผลค่าสีความเป็นสีแดง สีเหลือง และดัชนีความเหลืองลดลง แต่มีค่าความสว่างและค่าดัชนีความขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ผลการศึกษาความใช้ได้ของวิธีได้ช่วงการวิเคราะห์ที่กว้างเพียงพอต่อการใช้งาน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (r) > 0.9997 ขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 2.5-10 mg/L ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณอยู่ในช่วง 5-20 mg/L ร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วง 93.8 ± 3.6 ถึง 104.3 ± 1.8 และความเที่ยงในการทำซ้ำในช่วงร้อยละ 1.6-4.7 ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์การยอมรับ ทั้งนี้การวิเคราะห์ทางเคมีในเชิงคุณภาพด้วยเครื่อง GC-MS พบกลุ่มกรดอินทรีย์สัดส่วนร้อยละพื้นที่ใต้กราฟ 36.4-50.4 และการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยคำนวณต่อน้ำหนักเมล็ดกาแฟด้วยเครื่อง GC-FID พบปริมาณกรดอินทรีย์รวมในช่วง 3.08-7.92 g/kg

คำสำคัญ: เครื่องสกัดด้วยเฟสของแข็งอัตโนมัติ, กรดอินทรีย์โซ่สั้น, กาแฟ, แก๊สโครมาโทกราฟี

Abstract

The objective of this research was to study sample preparation techniques for reducing interference before analyzing six types of short-chain organic acids: acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, and valeric acid, using gas chromatography (GC) from coffee samples brewed with a moka pot. The sample preparation used a fivefold dilution of the sample with methanol and deionized (DI) water, then separated the larger particles using a centrifuge, and cleaned the sample using an automated solid-phase extractor with Sep-ed C18 cartridges at a loading rate of 0.1 mL/min and sample volume of 5 mL. The results from the study of the physical characteristics of the samples before and after preparation showed a reduction in particle size from $6.78 \pm 4.69 \mu\text{m}$ to $1.40 \pm 0.74 \mu\text{m}$. The values for red color intensity, yellow color intensity, and yellowness index decreased, while brightness and whiteness index increased significantly with a statistical significance at $P < 0.05$. The method's usability yields an adequately broad analytical range, with a linear correlation coefficient (r) > 0.9997 . The detection limit was in the range of 2.5-10 mg/L, and the quantification limit was in the range of 5-20 mg/L. The recovery rate ranged from $93.8 \pm 3.6\%$

¹ สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี สุราษฎร์ธานี 84100

¹ Office of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110, Thailand

² Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, 84100, Surat Thani, Thailand

* Corresponding Author E-mail Address: Sakchaibordee.s@psu.ac.th

to 104.3±1.8% and the reproducibility was in the range of 1.6-4.7%, which was acceptable. Furthermore, the qualitative analysis using GC-MS identified the area under the graph ranging from 36.4% to 50.4% and the quantitative analysis, calculated per coffee bean weight, using of GC-FID revealed that the total content of organic acids to be in the range of 3.08-7.92 g/kg.

Keywords: Automate solid phase extractor, Short-chain fatty acids, coffee, gas chromatograph

บทนำ

ปัจจุบันการบริโภคกาแฟเป็นที่นิยมอย่างมากและแพร่หลายอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะกาแฟสดหรือกาแฟคั่วบด ด้วยความต้องการที่สูงขึ้นกาแฟจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย และมีแนวโน้มในการบริโภคเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (Utrilla-Catalan *et al.*, 2022) คุณภาพกาแฟประกอบด้วยกลิ่น ความเข้มข้น รสชาติ และกลิ่นรสที่เหลือหลังจากการกลั่น ภายในเมล็ดกาแฟประกอบไปด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น คาเฟอีน ซึ่งเป็นสารที่ช่วยสร้างกลิ่นหอม รสชาติขม และกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่ทำให้กาแฟมีรสเปรี้ยว รสเปรี้ยวที่ไม่มากเกินไปเป็นคุณสมบัติที่ดีของกาแฟ เป็นต้น (Moon *et al.*, 2009) โดยชนิดและปริมาณของกรดในกาแฟที่แตกต่างกันเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการกำหนดคุณภาพ ราคา และความนิยมของผู้บริโภคในท้องตลาด (Angeloni *et al.*, 2023) ซึ่งปริมาณของกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์กาแฟ รูปแบบการคั่ว วิธีการสกัดกาแฟ และเทคนิคการตรวจวัด (Yeager *et al.*, 2021) ที่ให้ช่วงการวิเคราะห์หรือความจำเพาะกับชนิดกรดอินทรีย์ในกาแฟที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาวิธีการตรวจวัดชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นต่ออุตสาหกรรมกาแฟ โดยงานวิจัยนี้สนใจศึกษาชนิด และปริมาณกรดอินทรีย์สายโซ่สั้น (Short-chain fatty acids, SCFAs) (Sun *et al.*, 2020) ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ 6 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดไอโซบิวทริก กรดบิวทริก กรดไอโซวาเลอริก และกรดวาเลอริก จากเมล็ดกาแฟที่ได้จากการสกัดด้วยหม้อต้มกาแฟ (Moka Pot) (Gianino, 2007) ซึ่งเป็นวิธีที่ให้น้ำกาแฟหรือกาแฟเอสเปรสโซ่เข้มข้น และเป็นวิธีการสกัดที่ใช้อุปกรณ์ราคาประหยัด (Kaffe, 2023) โดยกรดอินทรีย์ที่สนใจศึกษาจัดเป็นกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ พบได้บ่อยในตัวอย่างน้ำกาแฟ โดยเฉพาะกรดอะซิติกซึ่งเป็นสารสำคัญที่แสดงรสเปรี้ยวของน้ำกาแฟ (Rune *et al.*, 2023) แต่เนื่องจากตัวอย่างน้ำกาแฟสกัดที่สกัดได้ประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดนอกจากกรดอินทรีย์ที่ศึกษา เช่น คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล เซลลูโลส ลิกนิน โปรตีน น้ำมัน คาเฟอีน และกรดแทนนิก เป็นต้น (Saud & Salamatullah, 2021) ซึ่งสารประกอบที่สนใจคือกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดจัดเป็นองค์ประกอบส่วนน้อยในตัวอย่างกาแฟ (Ramalakshmi & Raghavan, 1999) ทำให้กระบวนการวิเคราะห์นั้นมีผลของสารรบกวนจากองค์ประกอบอื่น ๆ ส่งผลต่อการวิเคราะห์สารที่สนใจ

สารรบกวนหลายชนิดมีจุดเดือดค่อนข้างสูงทำให้ตกค้างบริเวณหัวฉีดสารกรณีใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เป็นผลให้ไบนอร์และคอลัมน์ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเสื่อมสภาพการใช้งาน (Chun *et al.*, 2016) ดังนั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนออกจากตัวอย่างน้ำกาแฟก่อนวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของกรดอินทรีย์ที่สนใจ โดยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่มีการศึกษาในการทดสอบน้ำกาแฟที่นิยมใช้ เช่น เทคนิคเฮดสเปซร่วมกับตัวดูดซับของแข็งปริมาณน้อย ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารกลุ่มให้กลิ่นจำพวกอัลดีไฮด์ และคีโตน เป็นต้น โดยเทคนิคนี้สามารถสกัดลดสารรบกวนและทำความสะอาดสารที่สนใจไปพร้อมกัน (Yu *et al.*, 2021) แต่เทคนิคนี้ยังไม่เหมาะกับกลุ่มสารอินทรีย์ละลายได้ดีในตัวอย่างของกลุ่มกรดอินทรีย์ และนอกจากนี้เทคนิคที่มีการใช้ในการเตรียมตัวอย่างน้ำกาแฟคือ เทคนิคการเซนตริฟิวซ์เพื่อแยกตะกอนหรือสารรบกวนออก (O'Driscoll, 2014) และเทคนิคการทำความสะอาดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) (Caprioli *et al.*, 2016) ซึ่งทั้งสองเทคนิคจะช่วยแยกตะกอนขนาดใหญ่ และลดสารรบกวนออกจากตัวอย่างกาแฟได้ตามลำดับ

สำหรับเครื่องมือที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์ในตัวอย่างกาแฟ คือเครื่องมือกลุ่มโครมาโทกราฟี เช่น เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Rune *et al.*, 2023) และเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) (Jumhawan *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตาม HPLC นิยมใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์กึ่งระเหยหรือระเหยยาก (Jham *et al.*, 2002) จึงไม่เหมาะสมสำหรับกรวิเคราะห์กรดอินทรีย์สายโซ่สั้นที่มีจุดเดือดอยู่ในช่วง 118 ถึง 185 °C (Raposo *et al.*, 2013) ดังนั้นเครื่อง GC จึงเหมาะสำหรับการตรวจวัดกรดอินทรีย์สายโซ่สั้น

ในงานวิจัยนี้จึงได้สนใจศึกษาการเตรียมตัวอย่างโดยการเจือจางตัวอย่างเพื่อลดสารรบกวนแล้วใช้เทคนิคเซนตริฟิวซ์เพื่อแยกตะกอน และสารรบกวนออกร่วมกับการศึกษาการทำมาสะอาดตัวอย่างด้วยเครื่องสกัดด้วยเฟสของแข็งอัตโนมัติที่ช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างของผู้ทดสอบซึ่งโดยปกติต้องใช้เวลามากกว่าครั้งในการเตรียมตัวอย่างต่อกระบวนการวิเคราะห์ทั้งหมด (Ronald E. Majors, 2013) และการกรองตัวอย่างอีกครั้งด้วยเมมเบรน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC โดยศึกษาการสกัด การทำความสะอาด และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ด้วยเครื่อง GC ตัวตรวจวัดเฟลมไอออไนเซชัน (GC-FID) ที่มีจุดเด่นคือ ใช้งานง่าย ต้นทุนการวิเคราะห์และการบำรุงรักษาที่ไม่สูงมาก เมื่อเทียบกับเครื่อง GC ตัวตรวจวัดชนิดแมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) และเครื่องดังกล่าวมีในห้องปฏิบัติการพื้นฐานทั่วไป (St-Gelais, 2014) และวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย GC-MS เป็นการยืนยันผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยแมสสเปกตรัมเทียบกับฐานข้อมูล (Library) ในตัวอย่างที่ผ่านการสกัด และผ่านการทำความสะอาดด้วยสภาวะที่เหมาะสม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. สารมาตรฐาน สารเคมี

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ กรดอะซิติก และกรดโพพิโอนิก กรดไอโซบิวทีริก กรดบิวทีริก กรดไอโซวาเลอริก และกรดวาเลอริก (Alfa aesar, Massachusetts, U.S.) หรือ Short-chain fatty acids, SCFAs โดยจะเตรียมสารผสมกรดอินทรีย์เข้มข้น 5,000 mg/L ยกเว้นกรดอะซิติกจะเตรียมความเข้มข้น 10,000 mg/L เนื่องจากสัญญาณตอบสนองกับเครื่อง GC ของกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นเดียวกันน้อยกว่ากรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งปริมาตรสารละลายที่เตรียมคือ 25 mL ในตัวทำละลายเมทานอล (Lab scan, Thailand) ต่อน้ำ (DI) สัดส่วนเท่ากันเป็นสารละลายสต็อก ก่อนเจือจางเพื่อการตรวจสอบประสิทธิภาพเครื่องมือ ทดสอบการใช้ได้ของวิธีและเป็นสารมาตรฐานในการทดสอบเชิงปริมาณ

2. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาทางเคมี สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ใช้ GC-FID รุ่น 7820 ยี่ห้อ Agilent ปริมาตรสารที่ฉีด 1 μ L อุณหภูมิหัวฉีด 240 °C สัดส่วนแบ่งสารทั้ง 1 : 5 คอลัมน์ HP-Innowax (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m) อุณหภูมิตู้อบเริ่มต้น 60 °C คงที่ 3 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้น 40 °C ต่อนาที จนได้ 140 °C คงที่ 1 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้นอีก 5 °C ต่อนาที จนได้ 160 °C คงที่ไว้ 2 นาที เวลาทดสอบทั้งหมด 12 นาที ไล่สารตกค้างอื่น ๆ หลังการวิเคราะห์ (Post run) ที่ 240 °C เป็นเวลา 10 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพา อัตราไหล 1.5 mL/min อุณหภูมิตัวตรวจวัด 240 °C โดยอัตราไหลแก๊สเชื้อเพลิง (H_2) แก๊สออกซิแดนซ์ (Air zero) และ แก๊ส Make up (N_2) เท่ากับ 30 mL/min, 300 mL/min และ 25 mL/min ตามลำดับ

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพจะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่สภาวะการทดสอบเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ของเครื่อง GC-FID โดยใช้เครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Agilent โดย GC รุ่น 7890 และ MS รุ่น 5977B โดยใช้โปรแกรม Method translation ที่ติดตั้งอยู่ในโปรแกรม MassHunter B.07.06.2704 ของเครื่อง GC-MS แปลงค่าสภาวะการทดสอบของเครื่อง GC-FID ส่วนของระบบ GC เป็นสภาวะการทดสอบ

ของเครื่อง GC-MS โดยกำหนดค่าความเร็วการวิเคราะห์ (Speed gain) เท่ากับ 1 ซึ่งสภาวะการทดสอบของเครื่อง GC-MS ที่ได้ คือปริมาตรสารที่ฉีด 1 μ L อุณหภูมิหัวฉีด 240 °C สัดส่วนแบ่งสารทั้ง 1 : 25 คอลัมน์ VF-WaxMS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) อุณหภูมิตู้อบเริ่มต้น 60 °C คงที่ 3 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้น 40 °C ต่อนาที จนได้ 140 °C คงที่ 1 นาที เพิ่มขึ้นอีก 5 °C ต่อนาที จนได้ 160 °C คงที่ไว้ 2 นาที เวลาทดสอบ 12 นาที และ Post run 240 °C เป็นเวลา 10 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สพา อัตราไหล 0.9 mL/min อุณหภูมิเชื่อมต่อ (Transfer Line) 240 °C สภาวะเครื่อง MS แหล่งกำเนิดแมส (MS source) เท่ากับ 230 °C เริ่มเก็บข้อมูลแมสที่ 5 นาทีตั้งแต่ช่วงมวล 35 m/z ถึง 500 m/z สำหรับผลข้อมูลที่ได้แต่ละแมสพีคจะนำไประบุชนิดสารประกอบโดยเทียบกับฐานข้อมูล Wiley เวอร์ชัน 10 และ NIST เวอร์ชัน 14

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างก่อนและหลังการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ ขนาดอนุภาคโดยจะศึกษาด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคและการกระจายตัว (LPSA) รุ่น LS 230 ยี่ห้อ Beckman Coulter และภาพถ่าย 3 มิติของตัวอย่างศึกษาด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ รุ่น Leica M205 ยี่ห้อ Leica โดยการถ่ายภาพจะหยุดตัวอย่างก่อนและหลังการเตรียมตัวอย่างปริมาตรเท่ากันคือ 50 μ L ลงบนพลาสติกใส

ศึกษาวิเคราะห์ค่าสีของตัวอย่างก่อนและหลังการเตรียมตัวอย่างในโหมดส่องผ่าน โดยใช้เครื่องวัดสีแบบสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Color Spectrophotometer) รุ่น UltraScan Pro ยี่ห้อ HunterLab จากนั้นนำค่าสีที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าสีในแต่ละหน่วยวัด โดยใช้การทดสอบ t-test: two-sample assuming equal variances ในโปรแกรม Microsoft excel (Microsoft, 2023) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) เพื่อประเมินความแตกต่างของค่าสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-FID

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรต่าง ๆ ของเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อให้ได้สภาวะในการแยกและการตรวจวัดที่ดีที่สุด ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่อุณหภูมิหัวฉีด ซึ่งอุณหภูมิหัวฉีดที่เหมาะสมจะต้องให้สารที่ต้องการวิเคราะห์กลายเป็นไอทั้งหมด แต่อุณหภูมิต้องต่ำกว่าอุณหภูมิจำกัดของคอลัมน์ ดังนั้นการตั้งค่าอุณหภูมิควรให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ไม่มากหรือน้อยเกินไป (Hassan *et al.*, 2021) และอุณหภูมิตัวตรวจวัด ซึ่งเป็นอุณหภูมิของตัวตรวจวัดต้องมีค่ามากกว่าจุดเดือดของสารที่วิเคราะห์ โดยในการศึกษาจะเจือจางสารละลายสต็อก 100 เท่า ฉีดเข้าสู่เครื่อง GC-FID ช่วงอุณหภูมิหัวฉีดสารที่ศึกษาตั้งแต่อุณหภูมิ 120-240 °C และ ช่วงอุณหภูมิตัวตรวจวัดของ GC-FID ที่ศึกษาตั้งแต่อุณหภูมิ 200-250 °C

4. การศึกษาการทำความสะอาดด้วยเครื่องสกัดโดยเฟสของแข็งอัตโนมัติ (Auto SPE)

โดยในการศึกษาการทำความสะอาดตัวอย่างและแยกสารที่ไม่ต้องการทดสอบออกจากตัวอย่างจะใช้เครื่อง Auto SPE แขนกลอัตโนมัติเคลื่อนที่ได้แนวแกน X Y Z รุ่น Freestyle SPE ยี่ห้อ LCTECH โดยในการศึกษาจะเจือจางสารละลายสต็อก 100 เท่า เพื่อศึกษาหาชนิดตัวสกัดเฟสของแข็งที่เหมาะสม ได้แก่ ชนิดเหมาะกับสารมีขั้วสูงคือ HyperSep FL (Thermo fisher scientific, USA) และชนิดเหมาะกับสารขั้วต่ำถึงสูง คือ Strata-X (Phenomenex, USA) และ Spe-ed C18 (Applied separations, USA) (Sciences, 2023) ปรับสภาวะก่อนใช้งานด้วยเมทานอล 5 mL จากนั้นศึกษาอัตราการไหลตัวอย่างผ่านตัวสกัดเฟสของแข็ง โดยไหลตัวอย่างด้วยอัตราไหลผ่านที่ต่างกัน ตั้งแต่อัตราต่ำสุดที่สามารถกำหนดด้วยเครื่อง Auto SPE คือ 0.1-1.3 mL/min และสุดท้ายศึกษาปริมาณในการไหลตัวอย่าง โดยใช้สารมาตรฐานไหลผ่านตัวสกัดเฟสของแข็งด้วยปริมาตรที่ต่างกัน ตั้งแต่ 1-9 mL ก่อนไล่ด้วยอากาศปริมาตร 6 mL ให้แห้ง โดยทุกการศึกษาจะคงที่ค่าปัจจัยที่ไม่ได้ศึกษาและเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ศึกษา เมื่อได้ปัจจัยที่ดีที่สุด จะคงที่ปัจจัยนั้นไว้และเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ศึกษาถัดไป รายงานค่าในรูปแบบร้อยละการได้กลับคืนของการสกัด (%Recovery, %RR)

5. การศึกษาความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

5.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Calibration curve) โดยเจือจางจากสารละลายสต็อกข้อ 1 จำนวน 11 ระดับความเข้มข้นทั้งหมด ได้แก่ 5,000, 2,500, 1,250, 500, 250, 100, 40, 20, 10, 5 และ 2.5 mg/L ในตัวทำละลายเมทานอลต่อ DI สัดส่วน 5 : 1 (กรดอะซิติกจะมีความเข้มข้นสูงเป็น 2 เท่า) ฉีดแต่ละความเข้มข้นสู่เครื่อง GC-FID จำนวน 3 ซ้ำต่อความเข้มข้น จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณตอบสนอง

5.2 ศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ศึกษาโดยการเจือจางสารละลายสต็อก 50 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/L จากนั้นเจือจางอีก 5 ระดับความเข้มข้นคือ 40, 20, 10, 5 และ 2.5 mg/L (กรดอะซิติกจะมีความเข้มข้นสูงเป็น 2 เท่า) ในตัวทำละลายเมทานอลต่อ DI สัดส่วน 5 : 1 โดยความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ให้อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N) มากกว่าหรือเท่ากับ 3 และ 10 จะกำหนดให้เป็น LOD และ LOQ ตามลำดับ (ICH, 2006)

5.3 ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) โดยความแม่นยำ แสดงถึงความใกล้เคียงของผลการทดสอบต่อค่าจริง เป็นตัววัดว่าผลวิเคราะห์แต่ละค่าอยู่ใกล้ค่าจริงมากน้อย

แค่ไหน แสดงได้ด้วย %RR ซึ่งเป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของวิธีที่มีต่อสารที่สนใจในตัวอย่าง ทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำกาแฟเข้มข้น เติมสารละลายมาตรฐานลงไปที 2 ระดับความเข้มข้นตามความเข้มข้นที่ตรวจพบในตัวอย่างจริง ซึ่งกำหนดให้ความเข้มข้นที่เติมจะเจือจางสารละลายสต็อก 100 เท่า และ 50 เท่า กำหนดเป็น Level 1 และ Level 2 ตามลำดับ นำมาเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบตามข้อ 6.2 เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ในหัวข้อที่จะกล่าวถัดไป จากนั้นคำนวณค่า %RR โดยคำนวณจากร้อยละความเข้มข้นที่เติมสารมาตรฐานรวมกับความเข้มข้นสารที่สนใจวิเคราะห์ในตัวอย่างที่มีอยู่เดิม (C_{spike}) ลบด้วยค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ของสารที่สนใจในตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน ($C_{unspike}$) หารด้วยค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป (ตัวอย่าง (C_{add})) การศึกษาจะทำซ้ำทั้งหมด 2 ครั้ง ทุกครั้งของแต่ละความเข้มข้นจะฉีดสารสู่เครื่อง GC-FID 3 ซ้ำ

ผลการวิเคราะห์ค่า %RR ถูกนำมาประเมินความแตกต่างทางสถิติในสองขั้นตอน โดยใช้ ANOVA: single factor สำหรับเปรียบเทียบสารประกอบทั้ง 6 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน และใช้ t-test สำหรับเปรียบเทียบค่าใน 2 ระดับความเข้มข้นของสารประกอบชนิดเดียวกัน การวิเคราะห์ทั้งหมดดำเนินการด้วยโปรแกรม Microsoft Excel เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าสีของตัวอย่าง และสำหรับความเที่ยงที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่เดียวกัน ระบุความเที่ยงในรูปแบบของร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของตัวอย่าง C_{spike} โดยศึกษาที่ความเข้มข้นเดียวกับความแม่นยำ

6. การวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่างกาแฟเข้มข้นจะเลือกศึกษาตัวอย่างเมล็ดกาแฟที่จำหน่ายในประเทศไทยและระบบบนฉลากบรรจุภัณฑ์เป็นเมล็ดกาแฟคั่วกลาง (medium) ศึกษาจำนวน 5 ยี่ห้อ ตัวอย่างที่ 1-5 (S1-S5) โดยตัวอย่างที่สุ่มเลือกเป็นตัวอย่างที่ซื้อผ่านช่องทางออนไลน์ในประเทศไทย นำมาเตรียมตัวอย่างทดสอบ คำนวณผลการวิเคราะห์ ดังนี้

6.1 เตรียมตัวอย่างน้ำกาแฟสกัด การเตรียมตัวอย่างน้ำกาแฟสกัด (Figure 1(A)) ทำได้โดยการชั่งเมล็ดกาแฟคั่วประมาณ 30.0 g บันทึกร้านหนักที่แน่นอน แล้วมาบดด้วยเครื่องบดกาแฟ รุ่น SN7820 ยี่ห้อ ETZEL เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 2 รอบ โดยสัดส่วนน้ำหนักของเมล็ดกาแฟต่อผงกาแฟบดเท่ากับ 1:1 จากนั้นนำผงกาแฟบดไปสกัดด้วยหม้อต้มกาแฟ โดยการต้มจะเติมน้ำ 120 mL ลงในหม้อต้ม จากนั้นให้ความร้อนด้วยเปลวไฟ อุณหภูมิภายนอกหม้อต้มประมาณ 93-98 °C รอจนเดือดหมดได้น้ำกาแฟเข้มข้น แบ่ง

น้ำกาแฟที่ได้ใส่ขวดแก้วฝาปิดสนิท จัดเก็บไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °C เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

6.2 การเจือจาง แยกตะกอนและการทำความสะอาดด้วยเครื่อง Auto SPE กระบวนการเตรียมตัวอย่าง (Figure 1(B)) โดยใช้ตัวอย่างน้ำกาแฟเข้มข้น 5 mL นำมาเจือจางลดสารรบกวนก่อนทดสอบด้วยเมทานอล (HPLC grade, Lab scan, Thailand) กับน้ำ DI โดยสารอินทรีย์ที่ละลายและเจือจางจะเลือกจากคุณสมบัติการผสมและเข้ากันได้กับน้ำ (Interchim, 2023) สัดส่วนเท่ากันปริมาตรรวม 10 mL เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 mL ด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตร ก่อนนำไปแยกตะกอนเอาอนุภาคขนาดใหญ่ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น Velocity 14R ยี่ห้อ Dynamica ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 10 mL มาแบ่งใส่ขวดเก็บสารขนาด 22 mL นำไปวางในเครื่อง Auto SPE โหลดตัวอย่างปริมาตร 5 mL ที่อัตราการไหล 0.1 mL/min ผ่านคาร์ทริดจ์ชนิด Sep-ed C18 หลังได้ตัวอย่างน้ำกาแฟสกัดแล้วและผ่านการทำความสะอาด นำไปกรองต่อด้วยตัวกรองเมมเบรน 0.22 µm (Nylon Syringe Filters) แล้วแบ่งใส่ขวดฉีดสารเพื่อศึกษาองค์ประกอบด้วยเครื่อง GC-MS และวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่อง GC-FID ต่อไป

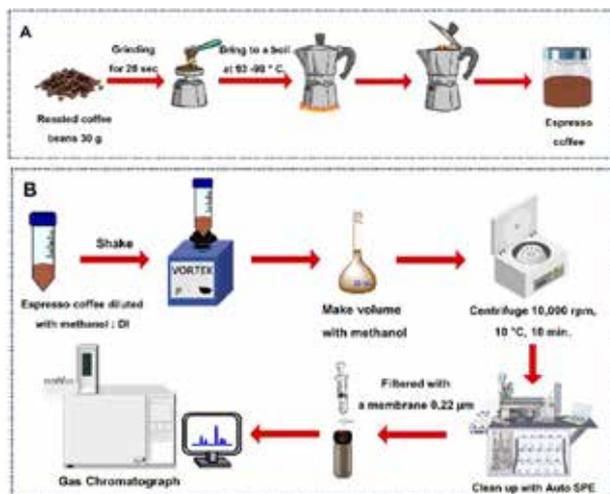


Figure 1 (A) Roasted coffee beans extraction with a moka pot (B) Sample preparation espresso coffee with auto SPE

6.3 คำนวณผลการวิเคราะห์ การคำนวณปริมาณกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยการสกัดด้วยหม้อต้มกาแฟ และผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการที่ศึกษา ก่อนนำไปฉีดเข้าสู่เครื่อง GC-FID เพื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดต่อน้ำหนักกาแฟที่ใช้ด้วยสมการที่ 1

$$C_S = \frac{C_{curve} \times V_{dis} \times V_{water}}{V_{sample} \times W_{sample} \times 1000} \dots\dots\dots\text{สมการที่ 1}$$

C_S คือ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ หน่วย g/kg

C_{curve} คือ ความเข้มข้นกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเทียบกับสมการเส้นตรง หน่วย mg/L

V_{dis} คือ ปริมาตรการละลายทั้งหมดได้แก่ ปริมาตรตัวอย่างน้ำกาแฟเข้มข้นและปริมาตรตัวทำละลายเจือจาง หน่วย mL

V_{sample} คือ ปริมาตรน้ำกาแฟเข้มข้น หน่วย mL

V_{water} คือ ปริมาณน้ำ ที่เติมลงในหม้อต้ม หน่วย L

W_{sample} คือ น้ำหนักเมล็ดกาแฟที่ใช้ หน่วย kg

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ผลศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC-FID

ผลการศึกษาอุณหภูมิหัวฉีดสารและตัวตรวจวัดพบว่า สัญญาณจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อุณหภูมิหัวฉีดสัญญาณเฉลี่ยจะคงที่ที่ 180 °C เป็นต้นไป แต่ค่า %RSD จะน้อยลง (< 5.3%) เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 220 °C เป็นผลจากการกลายเป็นไอสมบูร์นของกรดอินทรีย์ ในขณะที่อุณหภูมิตัวตรวจวัดสัญญาณจะสูงขึ้นจนถึง 240 °C จากนั้นจะคงที่ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของทั้งหัวฉีดสารและตัวตรวจวัดจะเลือกเหมือนกันที่ 240 °C ทั้งสองพารามิเตอร์ เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ทำให้สัญญาณการตอบสนองกับกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดที่สูงมีความเที่ยงที่ดี และค่าอุณหภูมิที่เลือกไม่เกินขีดจำกัดของคอลัมน์ (ขีดจำกัดคอลัมน์ < 270 °C) และการเลือกใช้อุณหภูมิสูงโดยเฉพาะส่วนของหัวฉีดจะลดการปนเปื้อนต่อการฉีดสารครั้งถัดไป (Carry over) ได้ดี ผลการศึกษาการแยกของกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดด้วยสภาวะที่กำหนดแสดงโครมาโทแกรมของการแยกชัดเจน (Figure 2) เวลาสารถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ (Retention time) อยู่ในช่วง 6.50-9.00 นาที โดยลำดับการออกจากคอลัมน์สอดคล้องตามจุดเดือดของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด (Rosmalina *et al.*, 2020) โดยโครมาโทแกรมที่ได้ แสดงพีคสัญญาณแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ค่าประสิทธิภาพทางโครมาโทกราฟ ความสมมาตร (Symmetry) ของสัญญาณของพีค มีลักษณะเป็นหางทางด้านหลัง (Tailing peak) ดัง Figure 2 นอกจากนี้ค่าการแยก (Resolution) ซึ่งแสดงการแยกของพีคแต่ละชนิดมีค่าตั้งแต่ 5.02-14.21 แสดงถึงการแยกของพีคสารกับพีคก่อนหน้า ออกจากกันอย่างชัดเจน และมีค่าการแยกมากกว่า 1.5 แสดงถึงการแยกที่ดีไม่มีการซ้อนทับกันของพีคแต่ละชนิดที่ศึกษา (Shimadzu, 2018)

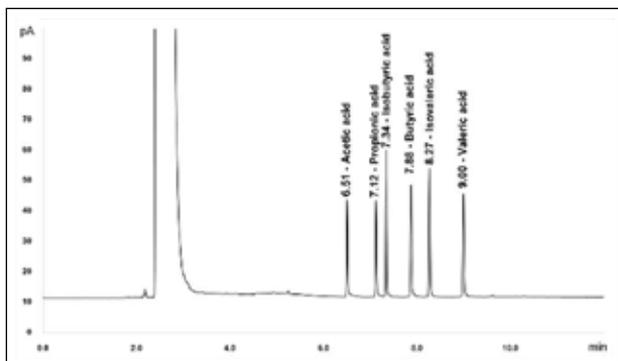


Figure 2 Chromatogram of a mixture of organic acids under optimization GC-FID

2. ผลการศึกษาการทำความสะอาดด้วย Auto SPE

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อลดผลสารรบกวน และลดอนุภาคขนาดใหญ่ที่จะมีผลต่อเครื่อง GC แสดงผลการศึกษาที่ได้ดังนี้

ผลการศึกษาชนิดของคาร์ทริดจ์ที่เหมาะสมกับสารที่สนใจวิเคราะห์ จากการศึกษ (Figure 3(A)) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าคาร์ทริดจ์ชนิด Spe-ed C18 ค่า %RR สารประกอบกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดสูงสุด คืออยู่ในช่วงร้อยละ 58.8 ± 3.5 ถึง 65.9 ± 3.4 เนื่องจากตัวดูดซับชนิดนี้มีขั้วต่ำ (Walker & Mills, 2002) ปลดปล่อยสารที่สนใจวิเคราะห์ ที่มีขั้วออกมามากที่สุดเมื่อเทียบกับคาร์ทริดจ์ชนิดอื่นที่ศึกษา เหมาะกับนำไปทำความสะอาดก่อนการวิเคราะห์ สามารถยึดจับสารรบกวนกลุ่มขั้วต่ำอื่น ๆ ได้ดี เช่น น้ำมัน ที่อยู่ในตัวอย่าง น้ำกาแฟได้ดี ด้วยสภาพขั้วเดียวกันกับสารรบกวน และปลดปล่อยสารที่สนใจวิเคราะห์ออกมา

ผลการศึกษาลำดับถัดไป อัตราในการไหลลดสารที่สนใจด้วยเครื่อง Auto SPE (Figure 3(B)) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอัตราในการไหลลดตัวอย่าง 0.1 mL/min และเป็นอัตราไหลต่ำสุดที่สามารถกำหนดได้ของ Auto SPE แสดง %RR กรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้า และแสดง %RR อยู่ในช่วงร้อยละ 93.2 ± 4.5 ถึง 100.3 ± 4.8 เนื่องจากเป็นอัตราในการไหลลดตัวอย่างที่ช้า ตัวดูดซับจะปล่อยกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดแบบสมดุลได้ดีกว่าอัตราในการไหลลดตัวอย่างที่เร็ว

ผลการศึกษาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสม (Figure 3(C)) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อปริมาตรตัวอย่างเพิ่มขึ้น %RR ก็จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จนถึงปริมาตรในการไหลลด 5 mL %RR ที่ได้มีค่าคงที่ ดังนั้นจึงเลือกปริมาตรในการไหลลดตัวอย่าง 5 mL เป็นปริมาตรที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นปริมาณที่ไม่เยอะจนเกินไป และลดเวลาการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับปริมาตรในการไหลลดที่ 7 mL และ 9 mL และยังให้ค่าความแม่นยำและความเที่ยงที่ดี โดยมีค่า %RR ของการสกัดสารประกอบกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดอยู่ในช่วงร้อยละ 94.9 ± 3.9 ถึง 104.2 ± 4.9

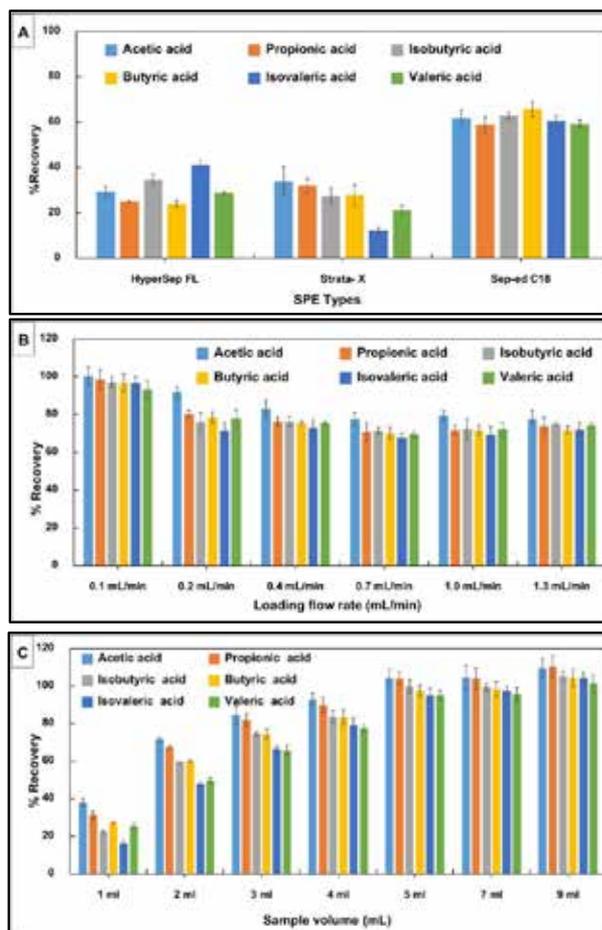


Figure 3 Comparison of the extraction recovery using (A) SPE Types (B) Loading flow rate (C) Sample volume (n=3)

3. ผลการศึกษาลักษณะกายภาพของตัวอย่าง

เนื่องจากในตัวอย่างน้ำกาแฟสกัดประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด และยังมีส่วนประกอบที่สกัดได้มีขนาดอนุภาคที่ขนาดใหญ่เกินไปสำหรับการฉีดโดยตรงเข้าสู่เครื่อง GC (Angeloni *et al.*, 2023) ซึ่งอนุภาคที่ขนาดใหญ่เกินไปนี้ไม่สามารถที่จะกรองอย่างง่ายด้วยชุดกรองเมมเบรนขนาด $0.22 \mu\text{m}$ เพื่อไปทดสอบได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม เพื่อแยกเฉพาะสารที่สนใจคือกรดอินทรีย์สายโซ่สั้นออกมา ผลจากการศึกษาทางกายภาพ การศึกษาขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง LPSA (Figure 4) ตัวอย่างน้ำกาแฟ (ตัวอย่างที่ 5) ก่อนการเตรียมตัวอย่าง แสดงผลของค่าอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ $6.78 \mu\text{m}$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ $4.69 \mu\text{m}$ ค่ากลาง (Median, d_{50}) เท่ากับ $5.99 \mu\text{m}$ การกระจายของขนาดอนุภาคที่ตรวจพบตั้งแต่ 0.040 ถึง $27.39 \mu\text{m}$ และหลังการเตรียมตัวอย่างตาม Figure 1(B) ก่อนนำไปทดสอบด้วยเครื่อง GC แสดงค่าอนุภาคเฉลี่ยลดลงเหลือ $1.40 \mu\text{m}$, SD เท่ากับ $0.74 \mu\text{m}$, d_{50} เท่ากับ $1.13 \mu\text{m}$ การกระจายของขนาดอนุภาคที่ตรวจพบตั้งแต่ 0.28 ถึง $3.21 \mu\text{m}$ ซึ่งผลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ผ่านการเตรียม

ด้วยวิธีการที่นำเสนอเมื่อเทียบกับก่อนการเตรียม ขนาดอนุภาคของตัวอย่างลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค และผลการศึกษจากการใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอถ่ายภาพ (Figure 5) ซึ่งแสดงให้เห็นชัดว่าตัวอย่างก่อนการเตรียมตัวอย่าง แสดงภาพถ่ายสีเข้มสูงกว่าตัวอย่างหลังการเตรียมตัวอย่าง

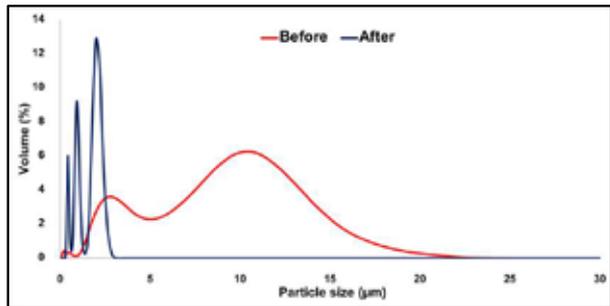
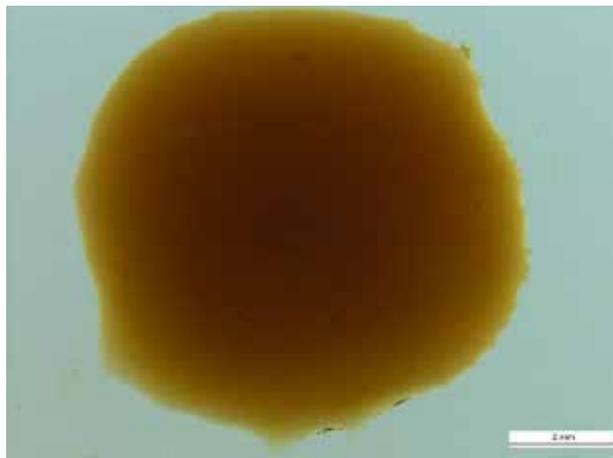


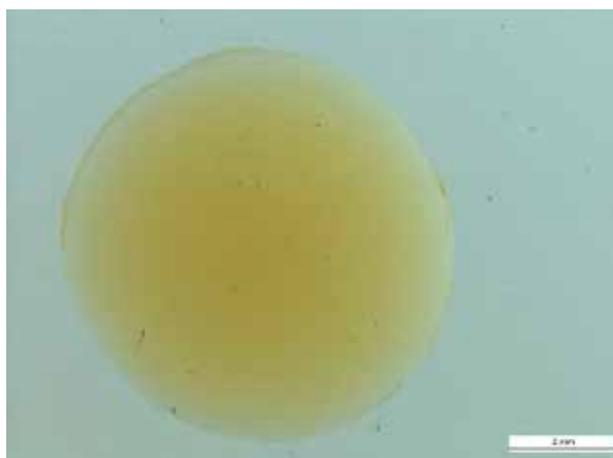
Figure 4 Comparison of LPSA measurements in different particle size (—) before and (—) after sample preparation espresso coffee

ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาค่าสีด้วยเครื่องวัดสีแบบสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ของตัวอย่างน้ำกาแฟตัวอย่างเดียวกัน (Table 1) ซึ่งค่าสีแสดงความสอดคล้องกับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่ดูดกลืนแสงได้ จากผลการทดสอบที่ได้ ค่า L^* คือค่าความสว่าง (Brightness) ซึ่งผลที่ได้ของตัวอย่างหลังการเตรียมมีค่าสีแสดงความสว่างมากกว่าตัวอย่างก่อนการเตรียม และสอดคล้องกับค่า WI [D65/10] คือค่าดัชนีความขาว ณ สภาวะแหล่งกำเนิดแสง (Illuminant) D65 และมุมมองผู้สังเกตการณ์ (Observer) 10 องศา โดยตัวอย่างหลังเตรียมแสดงค่าความขาวมากกว่าตัวอย่างก่อนการเตรียม แสดงถึงการลดลงของสารอินทรีย์รบกวนที่ได้กำจัดไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ค่า a^* ที่ใช้กำหนดสีแดงหรือสีเขียว ค่า b^* ใช้กำหนดสีเหลืองหรือสีน้ำเงิน ค่า YI [D65/10] คือ ค่าดัชนีความเหลือง ณ สภาวะแหล่งกำเนิดแสง D65 และมุมมองผู้สังเกตการณ์ 10 องศา ผลการทดสอบทั้ง 3 ปัจจัย

ที่ได้ของตัวอย่างหลังการเตรียมจะมีค่าความเป็นสีแดงและสีเหลือง ดัชนีความเหลืองน้อยกว่าตัวอย่างก่อนการเตรียมและมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ แสดงถึงตัวอย่างหลังการเตรียมมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ที่มีหมู่โครโมฟอร์ดูดกลืนแสงได้ดี อยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าตัวอย่างก่อนการเตรียม (Yeager *et al.*, 2022)



(A)



(B)

Figure 5 Comparison of Stereo microscope (A) before and (B) after sample preparation coffee

Table 1 $L^*a^*b^*$ WI * YI Color values obtained from before and after sample preparation (n=5)

Sample Prep.	Before	After
L^*	22.8±0.0 ^a	23.2±0.0 ^b
a^*	3.5±0.0 ^a	1.1±0.0 ^b
b^*	4.3±0.0 ^a	0.2±0.0 ^b
WI	-50.2±0.4 ^a	1.68±0.2 ^b
YI	30.1±0.2 ^a	3.4±0.1 ^b

^{a, b}=different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) within the same row by t-test

4. ผลการศึกษาความใช้ได้ของวิธี

ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวัดของกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด (Table 2) กรดอินทรีย์ทุกสารประกอบแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (r) ที่ได้จากโปรแกรม Chem station ที่เป็นซอฟต์แวร์คำนวณผลการวิเคราะห์ของเครื่อง GC (Agilent, 2009) อยู่ในช่วง 0.99972-0.99999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ดีคือมากกว่า 0.99 ตามเกณฑ์การยอมรับอ้างอิงของ AOAC (AOAC, 2002) และกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดให้ช่วงการวิเคราะห์ที่กว้าง ซึ่งหากคำนวณผลการวิเคราะห์ตามหัวข้อวิธีการศึกษาข้อ 6 จะได้ช่วงการวัดของวิธีคือกรดอะซิติกมีช่วงความเข้มข้น 0.4-200 g/kg กรดโพรพิโอนิกมีช่วงความเข้มข้น 0.2-100 g/kg และกรดไอโซบิวทีริก กรดบิวทีริก กรดไอโซวาเลอริก และกรดวาเลอริก มีช่วงความเข้มข้น 0.1-100 g/kg ซึ่งมีค่าเพียงพอต่อการใช้งาน

สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่มีการรายงานในวารสารทบทวนวรรณกรรมก่อนหน้า ซึ่งรายงานกรดอะซิติกที่ตรวจพบในโรบัสต้าและอราบิก้าน้อยกว่า 5 และ 70 g/kg ตามลำดับ (Yeager *et al.*, 2021) และจากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่ให้สัญญาณของสารต่อสัญญาณรบกวน (S/N) มากกว่าหรือเท่ากับ 3 และ 10 เพื่อใช้ในการคำนวณค่า LOD และ LOQ ตามลำดับ (Table 2) และคำนวณผลการวิเคราะห์ของวิธีตามหัวข้อวิธีการศึกษาในข้อ 6 จะได้ค่า LOD และ LOQ ต่อนำหนักตัวอย่าง ของกรดอะซิติกเท่ากับ 0.2 g/kg และ 0.4 g/kg กรดโพรพิโอนิกที่มีค่าเท่ากับ 0.1 g/kg และ 0.2 g/kg ตามลำดับ และกรดอินทรีย์ 4 ชนิด มีค่าเท่ากับ 0.05 g/kg และ 0.1 g/kg ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอสำหรับตรวจวัดกรดอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำกาแฟตามที่มีการรายงานก่อนหน้า (Rune *et al.*, 2023)

Table 2 Analytical performance of the method for the determination of SCFAs (n=3)

No.	RT (min)	SCFAs	Linearity (mg/L)	Calibration curve	R	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
1	6.51	Acetic acid	20-10,000	y=2.82x-115.17	0.99999	10	20
2	7.12	Propionic acid	10-5,000	y=5.35x-89.19	0.99990	5	10
3	7.34	Isobutyric acid	5-5,000	y=5.35x-94.57	0.99991	2.5	5
4	7.88	Butyric acid	5-5,000	y=5.80x-107.12	0.99990	2.5	5
5	8.27	Isovaleric acid	5-5,000	y=6.63x-182.56	0.99972	2.5	5
6	9.00	Valeric acid	5-5,000	y=6.54x-158.65	0.99979	2.5	5

จากการประเมินความแม่นยำในรูปแบบ %RR และความเที่ยงในรูปแบบ %RSD ของสารมาตรฐานที่เติมลงไป ในตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 5) และนำไปสกัดและแยกตะกอนก่อนทดสอบ จากนั้นไปทำความสะอาดด้วยเครื่อง Auto SPE (Figure 1(B)) แสดงค่าความแม่นยำของการวัดของวิธีที่ศึกษาให้ค่า %RR (Table 3) ที่ได้ของทั้ง 6 สารประกอบมีค่าเฉลี่ย Level 1 ช่วง 95.3 ± 4.7 ถึง 104.3 ± 1.8 และ Level 2 ช่วง 93.8 ± 3.6 ถึง 97.7 ± 2.1 ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ $P > 0.05$ โดยมีความเที่ยงในรูปแบบ %RSD ของทั้ง 6 สารประกอบ Level 1 อยู่ในช่วงร้อยละ 2.0-4.6 Level

2 อยู่ในช่วงร้อยละ 1.6-4.7 ซึ่งจากผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงวิธีการเจือจาง แยกตะกอน และทำความสะอาดด้วยเครื่อง Auto SPE ที่นำเสนอ ช่วยลดขนาดอนุภาคขนาดใหญ่ที่อาจอุดตันไลเนเนอร์หรือคอลัมน์ ลดผลของสารรบกวนจากค่าสีที่เปลี่ยนไป และแสดงให้เห็นความแม่นยำและความเที่ยงที่ดีในการวิเคราะห์ ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับอ้างอิงจาก AOAC ซึ่งความแม่นยำ (%RR) อยู่ในช่วงร้อยละ 90-107 และมีความเที่ยง (%RSD) น้อยกว่า 5.3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ศึกษา 100 mg/L (AOAC, 2016)

Table 3 Accuracy (% RR) and precision (% RSD) of sample preparation for determination of SCFAs (n=2)

SCFAs	Level 1		Level 2	
	%RR \pm SD	%RSD	%RR \pm SD	%RSD
Acetic acid	95.3 \pm 4.7 ^{1a}	2.0	96.7 \pm 2.5 ^{2a}	2.3
Propionic acid	104.3 \pm 1.8 ^{1b}	4.5	97.7 \pm 2.1 ^{2b}	4.7
Isobutyric acid	99.7 \pm 3.4 ^{1c}	3.8	96.7 \pm 4.3 ^{2c}	1.6
Butyric acid	96.9 \pm 3.3 ^{1d}	4.6	94.3 \pm 2.0 ^{2d}	3.2
Isovaleric acid	95.5 \pm 4.0 ^{1e}	3.4	96.2 \pm 2.1 ^{2e}	3.9
Valeric acid	97.0 \pm 1.6 ^{1f}	3.5	93.8 \pm 3.6 ^{2f}	4.1

Different numbers and superscript letters for %RR indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) within columns (compounds) and rows (concentrations) as determined by ANOVA and t-test respectively.

5. ผลการการศึกษาตัวอย่างน้ำกาแฟสกัด

การศึกษาด้วย GC-MS แสดงดัง Table 4 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเมล็ดกาแฟสกัดทั้ง 5 ยี่ห้อเมื่อประกอบหลักที่สามารถระบุชนิดสารประกอบได้เหมือนกัน คือกรดอะซิติกที่เป็นสารให้รสเปรี้ยวในกาแฟ (Yeager *et al.*, 2023) แสดงในรูปแบบเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟเมื่อเทียบกับในแต่ละตัวอย่างคือมีสัดส่วนร้อยละ 27.1-34.3 ร้อยละพื้นที่ใต้กราฟสูงเป็นอันดับสองคือ เฟอร์ฟูริลแอลกอฮอล์ (2-Furanmethanol) สัดส่วนร้อยละ 10.3-23.9 โดยเป็นสารให้รสขม เหม็นเขียว ใหม่ที่พบมากในกาแฟคั่วถึงคั่วระดับกลาง (Cerny *et al.*, 2021)

และหากคิดเฉพาะกลุ่มกรดอินทรีย์จะได้สัดส่วนร้อยละพื้นที่ใต้กราฟรวม 36.4-50.4 นอกจากนี้หากแยกตามชนิดกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ของทั้ง 5 ตัวอย่างที่ศึกษา กลุ่มที่ตรวจพบเรียงตามลำดับมากไปน้อยคือ กลุ่มกรดอินทรีย์ กลุ่มฟิวแรน กลุ่มคีโตน และ กลุ่มฟีนอล สัดส่วนร้อยละพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยที่พบคือ 41.0 ± 5.6 , 21.3 ± 5.5 , 9.1 ± 2.8 และ 1.1 ± 0.5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นำเสนอสามารถสกัดกรดอินทรีย์ได้สูงสุดสอดคล้องตามจุดประสงค์การวิเคราะห์

Table 4 Qualitative chemical components of the extract coffees with GC-MS

No.	RT (min)	Compound Name	Groups	CAS#	Area %				
					S1	S2	S3	S4	S5
1	5.62	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	116-09-6	8.8	2.8	2.7	10.3	4.6
2	6.58	Acetic acid	Acid	64-19-7	34.3	28.8	27.1	28.7	30.1
3	6.68	2-Propanone, 1-(acetyloxy)-	Ketone	592-20-1	nf	3.9	nf	nf	2.4
4	6.76	2-furan-carboxaldehyde	Furan	98-01-1	2.1	2.8	3.1	5.4	2.2
5	7.10	Ethanone, 1-(2-furanyl)-	Furan	1192-62-7	nf	0.4	0.4	0.2	0.4
6	7.14	Formic acid	Acid	64-18-6	3.3	nf	nf	2.5	2.5
7	7.25	Propionic acid	Acid	79-09-4	4.6	4.2	4.1	4.4	4.2
8	7.50	Isobutyric acid	Acid	79-31-2	3.1	0.9	0.8	nf	nf
9	7.69	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	Furan	620-02-0	0.9	0.7	0.4	3.0	1.2
10	8.07	Butyric acid	Acid	107-92-6	0.7	1.1	1.0	nf	1.3
11	8.37	2-Furanmethanol	Furan	98-00-0	10.3	23.9	21.6	12.1	16.5
12	8.49	Isovaleric acid	Acid	503-74-2	1.7	3.1	2.7	2.0	2.0
13	9.26	Valeric acid	Acid	109-52-4	2.7	1.0	0.8	nf	1.4
14	9.74	1,2-Cyclopentanedione	Ketone	3008-40-0	1.4	1.3	1.4	1.4	1.8

Table 4 Qualitative chemical components of the extract coffees with GC-MS (cont.)

No.	RT (min)	Compound Name	Groups	CAS#	Area %				
					S1	S2	S3	S4	S5
15	10.51	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-	Ketone	80-71-7	nf	0.7	0.8	0.8	0.6
16	10.98	Phenol, 2-methoxy-	Phenol	90-05-1	0.7	1.5	1.4	1.6	0.5

Note: The compounds were identified by using of Wiley10&NIST14 libraries, with a match score $\geq 70\%$, nf=Not found

Table 5 Organic acid found in different coffee samples and their concentrations (g/kg)

No.	Compounds	Organic acid concentrations (g/kg)				
		S1	S2	S3	S4	S5
1	Acetic acid	6.54 \pm 0.34	3.08 \pm 0.13	2.76 \pm 0.14	2.63 \pm 0.13	3.88 \pm 0.12
2	Propionic acid	0.53 \pm 0.02	0.31 \pm 0.00	0.30 \pm 0.01	0.31 \pm 0.02	0.34 \pm 0.07
3	Isobutyric acid	0.28 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	nd	nd
4	Butyric acid	0.16 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	0.16 \pm 0.01	nd	0.24 \pm 0.01
5	Isovaleric acid	0.16 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.21 \pm 0.00	0.15 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01
6	Valeric acid	0.25 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	nd	0.16 \pm 0.02

Note: nd=not detectable, $V_{dis}=25$ mL, $V_{Sample}=5$ mL, $V_{water}=0.12$ L, $L=0.03$ kg

ผลการศึกษาค้นหาเฉพาะปริมาณกรดอินทรีย์สายโซ่สั้น ทั้ง 6 ชนิดในตัวอย่างด้วยเทคนิค GC-FID ซึ่งผลความเข้มข้นที่ได้เมื่อเทียบกับสมการเส้นตรง นำไปคำนวณความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในเมล็ดกาแฟด้วยสมการที่ 1 แสดงความเข้มข้นของกรดอินทรีย์รวม

Table 5) อยู่ในช่วง 3.08-7.92 g/kg โดยความเข้มข้นของกรดอินทรีย์สายโซ่สั้นรวมในตัวอย่างที่ศึกษาเรียงตามลำดับมากไปน้อย คือ S1 > S5 > S2 > S3 > S4 ซึ่งปริมาณที่ตรวจวัดได้ส่งผลกระทบต่อรสชาติความเปรี้ยวของน้ำกาแฟของแต่ละตัวอย่างจากมากไปน้อยตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์สายโซ่สั้นในตัวอย่างกาแฟคั่วกลางสกัดน้ำกาแฟด้วยหม้อต้ม แล้วนำไปเตรียมตัวอย่างด้วยการเจือจางลดผลรบกวนด้วยเมทานอลกับน้ำ หมุนเหวี่ยงแยกอนุภาคขนาดใหญ่ร่วมกับการทำความสะอาดด้วยเครื่อง Auto SPE ด้วยสภาวะที่ดีที่สุด สามารถลดอนุภาคขนาดใหญ่ที่มีผลกับการทดสอบกับเครื่อง GC ทำให้ขนาดอนุภาคมีขนาดลดลงอย่างชัดเจน ผลของค่าสี ซึ่งแสดงปริมาณสารอินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ที่เป็นสารรบกวนการวิเคราะห์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้การศึกษากำหนดปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเครื่อง GC ทำได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้สภาวะการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ให้ประสิทธิภาพการแยกกรดอินทรีย์สายโซ่สั้นได้ดี การเตรียมตัวอย่างที่นำเสนอค่าความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย

GC-MS แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างที่นำเสนอ แสดงปริมาณกลุ่มกรดอินทรีย์ในสัดส่วนที่สูงสุด ตรงตามจุดประสงค์การวิเคราะห์กรดอินทรีย์สายโซ่สั้นที่ต้องการ ทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่อง GC-FID มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำในการรายงานผล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ คุณณัฐ ฝดุงกุล สำหรับการทดสอบขนาดอนุภาคและรองศาสตราจารย์อาชีษัน แกสमान ผู้อำนวยการสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำการฝึกงานของนักศึกษา สหกิจ และสนับสนุนบุคลากรสำนักเครื่องมือ ฯ สร้างผลงานวิจัย ที่มผู้วิจัยต้องขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Agilent, T. (2009). Agilent chemStation, *Understanding Your ChemStation*. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G2070-91126_Understanding.pdf

Angeloni, G., Masella, P., Spadi, A., Guerrini, L., Corti, F., Bellumori, M., Calamai, L., Innocenti, M., & Parenti, A. (2023). Using ground coffee particle size and distribution to remodel beverage properties. *European Food Research and Technology*, 249(5), 1247-1256. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04210-3>

- AOAC. (2002). AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. *AOAC Official Methods of Analysis*, 1-38.
- AOAC. (2016). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *AOAC Official Methods of Analysis*, 1-18. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf
- Caprioli, G., Navarini, L., Cortese, M., Ricciutelli, M., Torregiani, E., Vittori, S., & Sagratini, G. (2016). Quantification of isoflavones in coffee by using solid phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 51(9), 698-703. <https://doi.org/10.1002/jms.3802>
- Cerny, C., Schlichtherle-Cerny, H., Gibe, R., & Yuan, Y. (2021). Furfuryl alcohol is a precursor for furfurylthiol in coffee. *Food Chemistry*, 337, 128008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128008>
- Chun, H.-J., Poklis, J. L., Poklis, A., & Wolf, C. E. (2016). Development and Validation of a Method for Alcohol Analysis in Brain Tissue by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *Journal of analytical toxicology*, 40(8), 653-658. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw075>
- Gianino, C. (2007). Experimental analysis of the Italian coffee pot "moka". *American Journal of Physics-AMER JPHYS*, 75, 43-47. <https://doi.org/10.1119/1.2358157>
- Hassan, H., Othman, M. F., Zakaria, Z. A., Ahmad Saad, F. F., & Abdul Razak, H. R. (2021). Multivariate optimisation and validation of the analytical GC-FID for evaluating organic solvents in radiopharmaceutical. *Journal of King Saud University-Science*, 33(6), 101554. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101554>
- ICH. (2006). ICH Topic Q 2 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodolog. *European Medicines Agency*, 1-15.
- Interchim. (2023). *Solvent miscibility table & cut-of*. <http://interchiminc.com/flash-prep-hplc-solvent-properties.html>
- Jham, G. N., Fernandes, S. A., Garcia, C. F., & da Silva, A. A. (2002). Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. *Phytochem Anal*, 13(2), 99-104. <https://doi.org/10.1002/pca.629>
- Jumhawan, U., Putri, S. P., Yusianto, Bamba, T., & Fukusaki, E. (2015). Application of gas chromatography/flame ionization detector-based metabolite fingerprinting for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 555-561. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.005>
- Kaffe, B. (2023). *How many methods are there to extract drinking coffee?*. <https://bwildkaffe.com>
- Microsoft, C. (2023). *Microsoft excel (version 365)* [Computer software]. <https://www.microsoft.com>
- Moon, J.-K., Yoo, H. S., & Shibamoto, T. (2009). Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5365-5369. <https://doi.org/10.1021/jf900012b>
- O'Driscoll, D. J. (2014). Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *MethodsX*, 1, 264-268. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.10.006>
- Ramalakshmi, K., & Raghavan, B. (1999). Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 39, 441-456. <https://doi.org/10.1080/10408699991279231>
- Raposo, F., Borja, R., Cacho-Rivero, J., Mumme, J., Orupöld, K., Esteves, S., Arias, J., Picard, S., Nielfa Gonzalez, A., Scherer, P., Wierinck, I., Aymerich, E., Cavinato, C., Rodríguez, D. C., Garcia-Mancha Delgado-Urena, N., Lens, P. N. L., & Fernandez-Cegri, V. (2013). First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error. *Trends in Analytical Chemistry*, 51, 127-144. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.007>
- Ronald E. Majors, W., DE. (2013). *Review sample preparation for chromatograph*. https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf

- Rosmalina, R., Rani, W., Hamidah, U., & Sintawardani, N. (2020). Determination of volatile fatty acids in tofu wastewater by capillary gas chromatography with flame ionization detection: A Comparison of extraction methods. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 483, 012038. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/483/1/012038>
- Rune, C. J. B., Giacalone, D., Steen, I., Duelund, L., Münchow, M., & Clausen, M. P. (2023). Acids in brewed coffees: Chemical composition and sensory threshold. *Current Research in Food Science*, 6, 100485. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100485>
- Saud, S., & Salamatullah, A. M. (2021). Relationship between the Chemical Composition and the Biological Functions of Coffee. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247634>
- Sciences, G. (2023). *How to Select a Sorbent Depending on the Sample Matrix and Target Analyte*. https://www.glsciences.com/product/spe_columns/about_a_spe/01043.html
- Shimadzu, C. (2018). *About Resolution, Part 1*. <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/resol-1.html>
- St-Gelais, A. (2014). *GC Analysis-Part V. FID or MS for Essential Oils?*. <https://phytochemia.com/en/2014/09/02/gc-analysis-part-v-fid-or-ms-for-essential-oils/>
- Sun, L., Gong, M., Lv, X., Huang, Z., Gu, Y., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2020). Current advance in biological production of short-chain organic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 9109-9124. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10917-0>
- Utrilla-Catalan, R., Rodríguez-Rivero, R., Narvaez, V., Díaz-Barcos, V., Blanco, M., & Galeano, J. (2022). Growing Inequality in the Coffee Global Value Chain: A Complex Network Assessment. *Sustainability*, 14(2), 672. <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/2/672>
- Walker, V., & Mills, G. A. (2002). Solid-phase extraction in clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 39(Pt 5), 464-477. <https://doi.org/10.1258/000456302320314476>
- Yeager, S., Batali, M., Guinard, J.-X., & Ristenpart, W. (2021). Acids in coffee: A review of sensory measurements and meta-analysis of chemical composition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63, 1-27. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1957767>
- Yeager, S. E., Batali, M. E., Guinard, J.-X., & Ristenpart, W. D. (2023). Acids in coffee: A review of sensory measurements and meta-analysis of chemical composition. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(8), 1010-1036. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1957767>
- Yeager, S. E., Batali, M. E., Lim, L. X., Liang, J., Han, J., Thompson, A. N., Guinard, J.-X., & Ristenpart, W. D. (2022). Roast level and brew temperature significantly affect the color of brewed coffee. *Journal of Food Science*, 87(4), 1837-1850. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16089>
- Yu, J. M., Chu, M., Park, H., Park, J., & Lee, K. G. (2021). Analysis of Volatile Compounds in Coffee Prepared by Various Brewing and Roasting Methods. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/foods10061347>