ว. กรมวิทย. พ. 2541. 40 (3) : 317-325

การวิเคราะห์ปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มโดยวิธี HPLC

Determination of Caffeine in Ready to Drink Coffee by HPLC

สุวรรณี ธีรภาพธรรมกุล
วีระพร แจ่มศรี
กองอาหาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Suvannee Teerapapthamkul
Veeraporn Jamsri
Division of Food
Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์แคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้ column μ Bondapak C18 mobile phase เป็นสารผสมของ น้ำ เมทธานอล และกรดอะซิติก (80:19:1) โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร จากการทดสอบความแม่นยำพบว่า ให้ค่าความแม่นยำสูง ผลของการทดสอบประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของกาแฟดำและกาแฟใส่นมได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.8 ± 5.7 และ 96.6 ± 3.9 และค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวนร้อยละ 5.7 และ 4.1 ตามลำดับ กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีนและพื้นที่ใต้ peak เป็นเส้นตรงในช่วง 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 ได้ใช้วิธีดังกล่าวในการวิเคราะห์ปริมาณ แคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จ พร้อมดื่มที่บรรจุในภาชนะต่างๆ ระหว่างปี 2538-2540 จำนวน 149 ตัวอย่าง พบปริมาณ แคฟเฟอีนระหว่าง 0.76-120.7 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มชนิด กาแฟดำ กาแฟใส่นม และโอเลี้ยง เท่ากับ 69.5 ± 24.9, 64.5 ± 22.4 และ 7.3 ± 8.8 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจพบปริมาณแคฟเฟอีนสูงสุดในกาแฟบรรจุกระป๋องและต่ำสุดในกาแฟบรรจุขวดพลาสติก

ABSTRACT

To study and develop method for determination of caffeine in ready to drink coffee by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using column μ Bondapak C18, mobile phase is a mixture of water, methanol and acetic acid (80:19:1) with UV detector at wavelength of 276 nanometre. By testing precision,the results was high. The percentage recovery at 10 and 50 ug/ml of caffeine added in black coffee and milk coffee were 99.8 ± 5.7 and 96.6 ± 3.9 whereas relative standard deviation (RSD) were 5.7% and 4.1% ,respectively. The relative between the concentration of caffeine and peak area was found to be linear in the range of 5-100 ug/ml with the correlation coefficient (r) 0.9999. Analysis caffeine contents in 149 ready to drink coffee samples during the year 1995-1997 were performed using this method. The caffeine contents were found in the range of 0.76-120.7 mg/100 ml. The average caffeine contents in black coffee, milk coffee and O-Leing were 69.5 ± 24, 64.5 ± 22.4 and 7.3 ± 8.8 mg/100 ml, respectively. The highest caffeine content was found in canned coffee and lowest caffeine content was detected in plastic bottle coffee .

Keywords: caffeine, ready to drink coffee

บทนำ

การบริโภคเครื่องดื่มประเภท ชา กาแฟ น้ำอัดลม ที่มีส่วนผสมของโคล่า เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของโกโก้ และเครื่องดื่มผสมแคฟแฟอีนเป็นประจำจะทำให้เกิดความเคยชิน และติดเป็นนิสัย ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องดื่มเหล่านี้มีสารที่เรียก **"แคฟเฟอีน"** เป็นส่วนประกอบ "แคฟเฟอีนมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางถ้าได้รับปริมาณน้อย (50-200 มิลลิกรัมต่อวัน) จะทำให้ร่างกายกระปรี้กระเปร่าไม่ง่วงนอน หายจากอาการอ่อนเพลียและสามารถปฏิบัติงานได้อย่างต่อเนื่อง แต่ถ้าได้รับปริมาณมากถึง 200-500 มิลลิกรัมต่อวัน[1] จะทำให้ปวดศีรษะ กระวนกระวาย มือสั่นและนอนไม่หลับ ผู้ที่มีความไวต่อแคฟเฟอีนอาจเกิดอาการหัวใจเต้นผิดปกติ ใจสั่น และเวียนศีรษะ แคฟเฟอีนยังมีผลต่อระบบทางเดินอาหาร โดยเพิ่มการหลั่งกรด และน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้แล้วยังมีฤทธิ์ขับปัสสาวะ[2] ฤทธิ์ของแคฟเฟอีนจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคล พยาธิสภาพของร่างกาย เช่นโรค ตับ และยังขึ้นอยู่กับการรับประทานเป็นประจำ ปริมาณและความถี่ของการบริโภค ขนาด ของแคฟเฟอีนที่ทำให้ผู้ใหญ่เสียชีวิตประมาณ 5-10 กรัม และเด็กเล็กประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม[1]

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีแคฟเฟอีนเป็นส่วนประกอบออกจำหน่ายในรูปกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำสกัดจากกาแฟบดหรือน้ำที่ได้จากการละลายกาแฟสำเร็จรูป ผสมน้ำตาล และอาจมีครีมเทียมหรือนมผสมอยู่ด้วยหรือไม่ก็ได้ และบรรจุในภาชนะปิดสนิท กาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มที่จำหน่ายในท้องตลาด ถ้าผลิตจากกาแฟคั่วบดแท้หรือกาแฟผงสำเร็จรูปเรียก **"กาแฟดำ"** แต่ถ้ามีครีมเทียมหรือนมสดผสมเรียก **"กาแฟใส่นมหรือกาแฟเย็น"** ถ้าผลิตจากกาแฟผสมชนิดบด มีลักษณะเหมือนกาแฟดำแต่ผู้ผลิตมักเรียกผลิตภัณฑ์ **"โอเลี้ยง"** เครื่องดื่มเหล่านี้ขณะนี้เป็นที่นิยมบริโภคแพร่หลายเนื่องจากกาแฟเป็นเครื่องดื่มที่มีกลิ่นและรสชาติเป็นที่นิยมของผู้บริโภค เมื่อจำหน่ายในรูปแบบของกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม ทำให้สะดวกในการบริโภคเพราะไม่เสียเวลาในการเตรียมเหมาะกับภาวะในปัจจุบันที่คนส่วนใหญ่ไม่มีเวลา เครื่องดื่มประเภทนี้ไม่มีการควบคุมปริมาณแคฟเฟอีน และมีปริมาณแคฟเฟอีนต่างๆ กัน บางตัวอย่างพบในปริมาณสูงมากและสูงกว่าเครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีนหลายเท่า (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้มีการควบคุมปริมาณแคฟเฟอีน ให้มีได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุทุกขนาด[3]) จึงทำให้เกิดความวิตกว่าเครื่องดื่มประเภทนี้อาจจะมาแทนเครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีน เนื่องจากไม่มีการจำกัดปริมาณแคฟเฟอีน และแคฟเฟอีนที่ตรวจพบมาจากส่วนผสมของผงกาแฟในสูตรหรืออาจมีการเติมแคฟเฟอีนที่ได้จากการสังเคราะห์ ถ้าบริโภคแคฟเฟอีนในปริมาณสูงและมีความถี่มากอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค จึงมีการสำรวจปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มที่จำหน่ายในท้องตลาดเพื่อเฝ้าระวังความปลอดภัยและเป็นแนวทางในการกำหนดปริมาณแคฟเฟอีนในเครื่องดื่มเหล่านี้

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคฟเฟอีนในเครื่องดื่มโดยวิธีสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม[4] ขั้นตอนการสกัดมักเกิดปัญหา มี emulsion โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีนมหรือครีมเป็นส่วนผสมในสูตร และต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ทำให้ยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาวิธีที่เหมาะสมที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคฟเฟอีนได้อย่างถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว โดยเลือกศึกษาและทดสอบวิธีของ Woollard,D.C.[5] โดยวิธี HPLC

วัตถุและวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มที่บรรจุในภาชนะปิดสนิท จำหน่ายในท้องตลาด เก็บจากสถานที่

ผลิต ร้านค้าในเขตกรุงเทพฯและจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ตั้งแต่ปี พ.ศ 2538-2540 จำนวน 149 ตัวอย่าง ได้แก่ กาแฟดำ 55 ตัวอย่าง กาแฟใส่นมหรือกาแฟเย็น 64 ตัวอย่างและโอเลี้ยง 30 ตัวอย่าง

สารเคมีและสารมาตรฐาน

methanol HPLC grade (Merck),acetic acid AR. (Merck)

Mobile phase ใช้ methanol : H_2O : acetic acid (19:80:1) กรองผ่านกระดาษกรองชนิด Nylon-66 (Alltech) ขนาด 0.45 ไมครอน และไล่อากาศออกโดยใช้ vacuum degassing

Carrez I solution: 3.6 กรัม potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (Merck) ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

Carrez II solution: 7.2 กรัม zinc sulfate heptahydrate (BDH) ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีน (caffeine) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานแคฟเฟอีน (Sigma) 0.1000 กรัม ละลายในน้ำร้อน ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ใช้เป็น stock standard solution

สารละลายมาตรฐานทีโอโบรมีน (theobromine) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานทีโอโบรมีน (Sigma) 0.0500 กรัม ละลายในน้ำร้อน ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ

สารละลายมาตรฐานทีโอฟีย์ลลีน (theophylline) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานทีโอฟีย์ลลีน (Sigma) 0.0500 กรัม ละลายในน้ำร้อน ถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph ของ Thermo Separating Product ประกอบด้วย pump model constaMetric 3200, injector fixed volume 20 ไมโครลิตร, UV detector model spectro-Monitor 3200, computing integrator model Lazer 486DX2

Column μ Bondapak C18 (Waters) ขนาด 3.9 x 300 mm with guard column ODS ขนาด 4 x 10 mm

Ultrasonic bath

สภาวะเครื่องมือ

Flow rate 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วง UV ที่ 276 นาโนเมตร, Chart speed 0.5 เซนติเมตรต่อนาที, Detector sensitivity 0.005 AUFS และใช้ระบบ Isocratic

วิธีวิเคราะห์

ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 40 มิลลิลิตร เติม Carrez I solution และ Carrez II solution อย่างละ 2 มิลลิลิตร (เพื่อตกตะกอนโปรตีนและ สาร interfere substance อื่นๆ) ตั้งบน water bath ประมาณ 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรอง No. 1 แล้วกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การสร้างกราฟมาตราฐาน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีน stock standard solution (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 0.5,1.0,3.0,5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น สารละลายนี้มีความเข้มข้น 5, 10, 30, 50 และ

100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ กรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ HPLC สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคฟเฟอีนกับค่าพื้นที่ใต้ peak

การทดสอบความแม่นยำ (Precision)

ทดสอบในตัวอย่าง 2 ชนิด คือกาแฟดำและกาแฟใส่นม เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่กล่าวมา 6 ซ้ำ รายงานผลในรูปของค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (Relative Standard Deviation, RSD)

การทดสอบประสิทธิภาพวิธี (Accuracy)

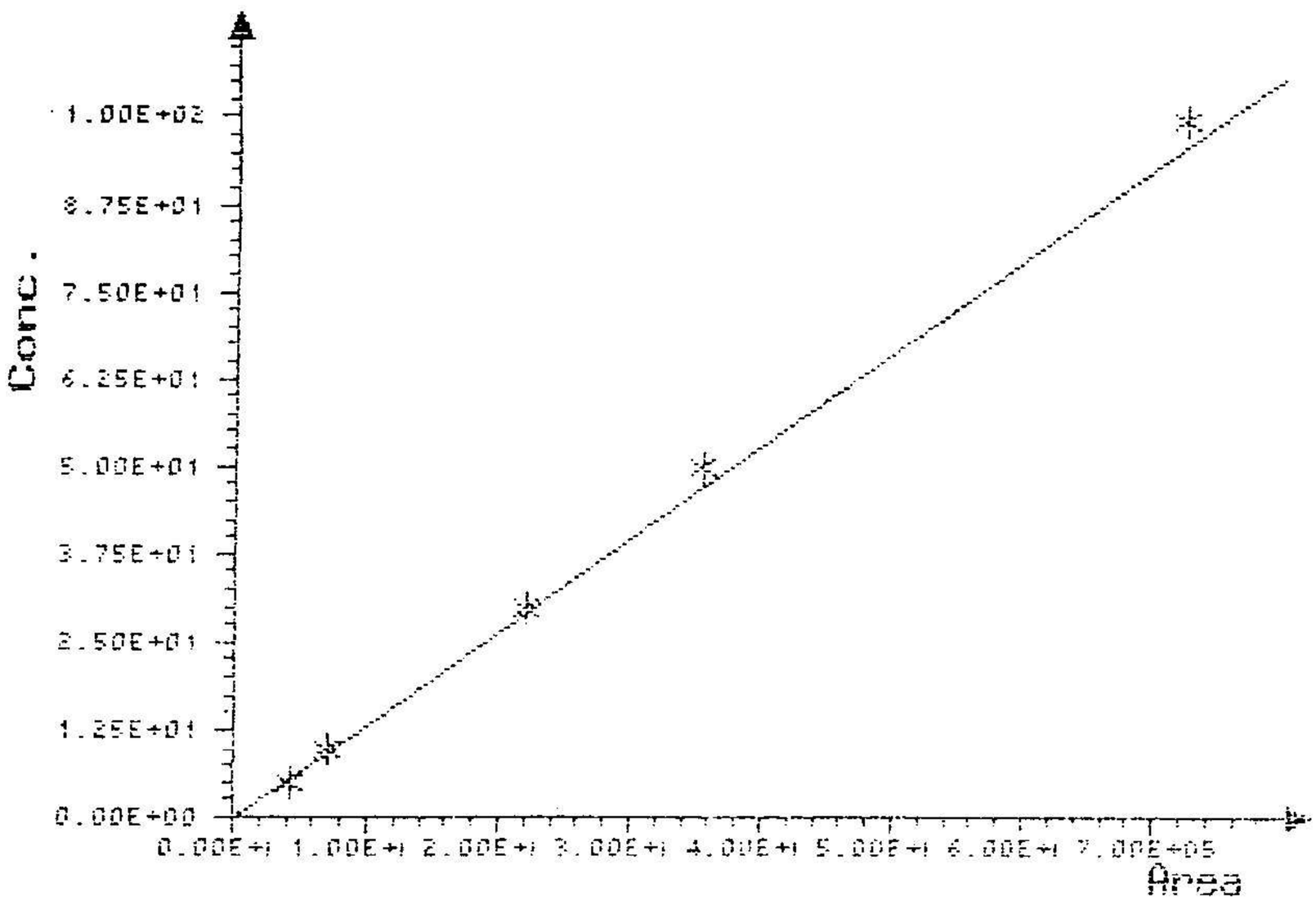
ทดสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีนในตัวอย่างกาแฟปรุงสำเร็จ พร้อมดื่ม 2 ชนิด คือกาแฟดำและกาแฟใส่นมให้มีความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ตามขั้นตอนที่กล่าวมา 3 ซ้ำ คำนวณประสิทธิภาพวิธีจากปริมาณที่ตรวจพบการรายงานผลค่าประสิทธิภาพวิธีรายงานในรูปของ % Recovery

ผล

จากการ plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคฟเฟอีนในช่วง 5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับค่าพื้นที่ใต้ peak พบว่ากราฟเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r) เป็น 0.9999 ดังแสดงในรูปที่ 1

Avr. Fitting Calibration Curve of : caff

Area	Conc.
7.23E+05	1.00E+02
3.57E+05	5.00E+01
2.21E+05	3.00E+01
7.26E+04	1.00E+01
4.38E+04	5.00E+00



Response Factor (Area) = 1.33E-04

Standard Deviation = 2.05E+00 Correlation Coef. = 0.9999

รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแคฟฟาอีนและค่า peak area

เมื่อนำตัวอย่าง 2 ชนิด คือ กาแฟดำและกาแฟใส่นมมาทำการทดสอบความแม่นยำ โดยเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ 6 ซ้ำ ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation,SD) เท่ากับ 0.74 และ 0.79 และ %RSD เท่ากับ 0.67 และ 1.27 ตามลำดับ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีนที่ความเข้มข้ม 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของทั้ง 2 ตัวอย่าง เตรียมตัวอย่าง และวิเคราะห์ 3 ซ้ำ พบว่าค่า % Recovery เฉลี่ยเป็น 99.8 ± 5.7 และ 96.6 ± 3.9 ค่า % RSD เป็น 5.7 และ 4.1 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

นำวิธีที่ได้ทดสอบแล้ว มาสำรวจปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มที่บรรจุในภาชนะต่างๆ พบปริมาณแคฟเฟอีนระหว่าง 0.76-120.7 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยปริมาณแคฟเฟอีนใน กาแฟดำ กาแฟใส่นมและโอเลี้ยงเท่ากับ 69.5 ± 24.9,64.5 ± 22.4 และ 7.3 ± 8.8 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาปริมาณแคฟเฟอีนของตัวอย่างตามภาชนะบรรจุ พบว่าปริมาณแคฟเฟอีนเฉลี่ยในกาแฟที่บรรจุ ในกระป๋อง ขวดแก้ว และขวดพลาสติก เท่ากับ 68.3 ± 24.9, 49.9 ± 28.9 และ 16.8 ± 21.8 ตามลำดับ และเมื่อคำนวณปริมาณแคฟเฟอีนที่ผู้บริโภคได้รับต่อหน่วยบรรจุ จะพบแคฟเฟอีนสูงสุดในกาแฟดำที่บรรจุกระป๋องเท่ากับ 217.3 มิลลิกรัมต่อ 180 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพวิธีวิเคราะห์ ของแคฟฟาอีน ในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม

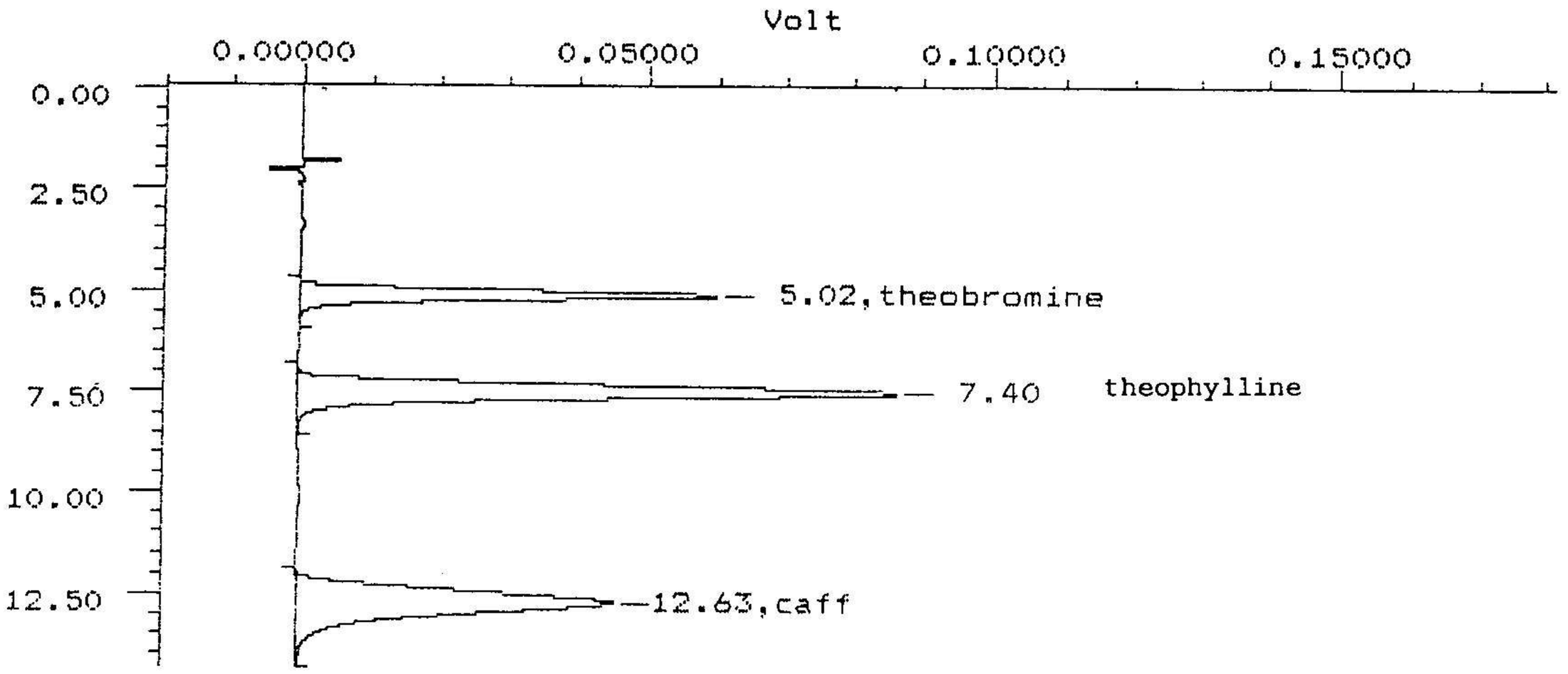
ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่าง (มคก/มล)	ปริมาณที่เติม (มคก/มล)	ปริมาณที่พบ (มคก/มล) (n=3)	ร้อยละของประสิทธิภาพวิธี (n=3)	%RSD
กาแฟดำ	83.5	10	10.43	104.3±4.0	3.8
	88.3	50	47.64	95.3±1.8	1.9
	ค่าเฉลี่ย			99.8±5.7	5.7
กาแฟใส่นม	62.2	10	9.66	96.6±6.1	6.8
	54.6	50	48.30	96.6±1.4	1.4
	ค่าเฉลี่ย			96.6±3.9	4.1

ตารางที่ 2 ปริมาณแคฟเฟอีนที่ตรวจพบในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มชนิดต่างๆ

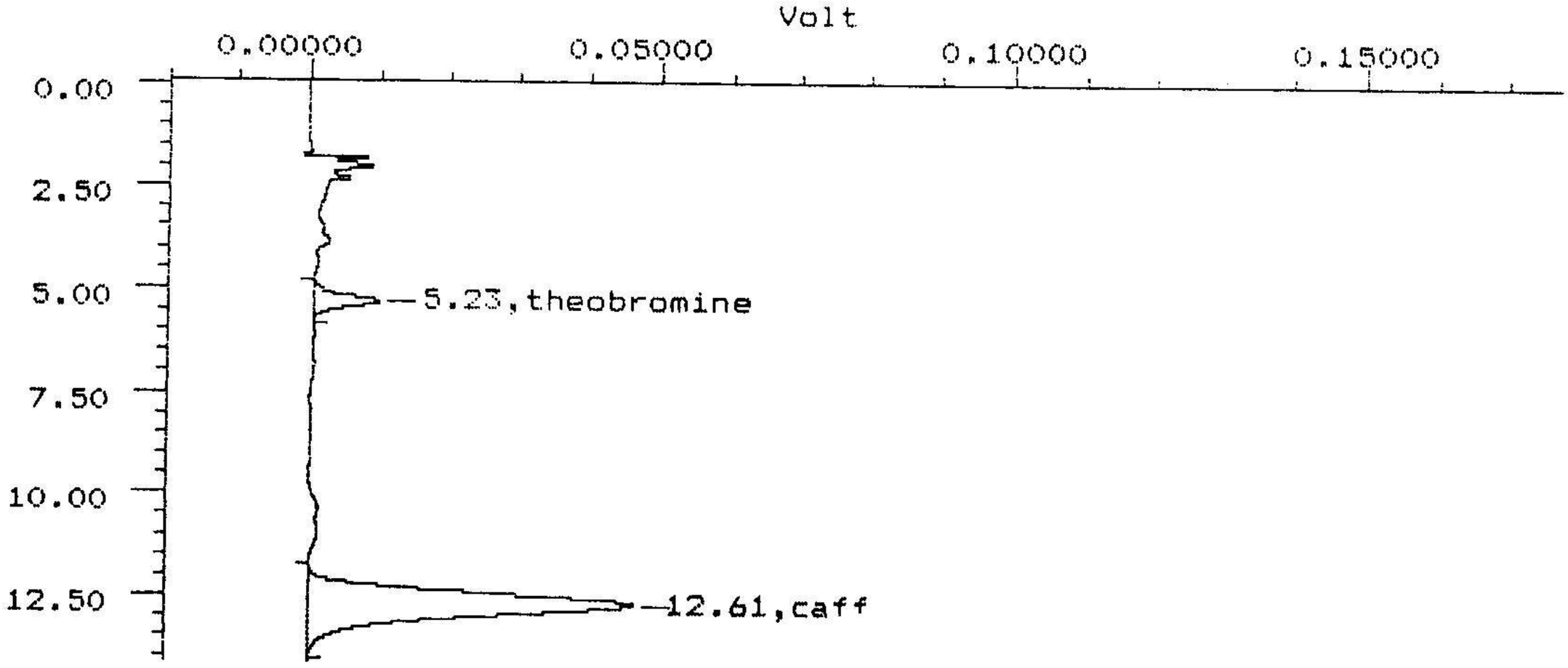
ชนิดของตัวอย่าง	ภาชนะบรรจุ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณแคฟเฟอีน (มก/100มล)	
			ต่ำสุด-สูงสุด	เฉลี่ย
กาแฟดำ	กระป๋อง	44	24.9-120.7	76.3
	ขวดแก้ว	8	20.3- 52.8	35.9
	พลาสติก	3	47.1- 71.4	59.6
	รวม	55	20.3-120.7	69.5±24.9
กาแฟใส่นม	กระป๋อง	47	20.0-103.3	64.7
	ขวดแก้ว	14	16.0- 99.7	66.5
	พลาสติก	3	49.6- 54.4	53.7
	รวม	64	20.0-103.3	64.5±22.4
โอเลี้ยง	กระป๋อง	3	1.7- 19.9	8.4
	ขวดแก้ว	3	0.8- 28.9	10.3
	พลาสติก	24	0.76- 30.6	6.8
	รวม	30	0.76-30.6	7.3±8.8

ตารางที่ 3 ปริมาณแคฟเฟอีนที่ตรวจพบในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม ที่บรรจุในภาชนะต่างๆ

ภาชนะบรรจุ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณแคฟเฟอีน (มก/100มล)		ปริมาณแคฟเฟอีนสูงสุดที่ผู้บริโภคได้รับต่อหน่วยบรรจุ (มก)
		ต่ำสุด-สูงสุด	เฉลี่ย ($\bar{X}$±SD)	
กระป๋อง(180 มล)	94	1.7-120.7	68.3±24.9	217.3
ขวดแก้ว(150 มล)	25	0.8- 99.7	49.9±28.9	149.5
พลาสติก(200 มล)	30	0.76-71.4	16.8±21.8	142.8



รูปที่ 2 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน 3 ชนิด



รูปที่ 3 แสดง Chromatogram ของแคฟเฟอีน ที่ตรวจพบในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่ม

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มโดยวิธี HPLC ที่ได้นำเสนอและทำการทดสอบเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ผลการทดสอบความแม่นยำ ในตัวอย่างกาแฟดำและกาแฟใส่นมได้ค่า % RSD เป็น 0.67 และ 1.27 ตามลำดับ แสดงว่ามีความแม่นยำสูง และผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีของทั้ง 2 ตัวอย่างได้ค่า % Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.8 ± 5.7 และ 96.6 ± 3.9 ตามลำดับ แสดงว่ามีความถูกต้อง ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นๆ วิธีนี้ให้ค่า detection limit เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การตรวจวิเคราะห์แคฟเฟอีนโดยวิธีสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และหาปริมาณ โดยใช้ Spectrophotometer[4] แม้เป็นวิธีง่าย แต่มีปัญหาในขั้นตอนการสกัด ถ้าตัวอย่างมีส่วนผสมของนมหรือครีมขั้นตอนการสกัดจะเกิด emulsion ทำให้ค่าที่ได้น้อยกว่าปกติและมีความเบี่ยงเบนสูง นอกจากนี้ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการนำสารที่ได้จากการสกัด (residue) มาทำการสกัดซ้ำ ทำให้สิ้นเปลืองคลอโรฟอร์มและใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ซึ่งปัจจุบันตัวอย่างมีจำนวนมากจึงต้องหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ค่าที่ได้ถูกต้องและรวดเร็ว การหาปริมาณแคฟเฟอีนโดยใช้ HPLC ได้มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ Ashoor S.H. และ คณะ[6] ได้ศึกษาโดยใช้ เมทธานอลและน้ำ เป็น mobile phase มีขั้นตอนการสกัดแคฟเฟอีนด้วยคลอโรฟอร์มก่อนวัดโดยใช้ HPLC Terada H. และคณะ[7] ใช้เมทธานอล น้ำ และฟอสเฟทบัฟเฟอร์ เป็น mobile phase มีขั้นตอนการแยกแคฟเฟอีนออกจากตัวอย่างโดยผ่าน Sep-Pak C18 ซึ่งผู้วิจัยได้เคยศึกษาวิธีของ Terada H. และคณะ[7] แล้ว เฉพาะในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แต่ % Recovery ต่ำ อาจเนื่องมาจาก Sep-Pak มีข้อจำกัดในการดูดซับ Woolard D.C.[5] ได้ศึกษาวิธีหา solid โดยวิเคราะห์ปริมาณทีโอโบรมีน เพื่อ ใช้เป็นตัวบงชี้ปริมาณโกโก้ในผลิตภัณฑ์นมผง ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาและดัดแปลงวิธีของ Woolard D.C.[5] ในการหาปริมาณแคฟเฟอีนเนื่องจากพบว่าสภาวะที่ใช้หาปริมาณทีโอโบรมีนสามารถใช้หาแคฟเฟอีนได้ peak แยกกันได้ดีและเป็นวิธีง่าย รวดเร็วไม่ต้องผ่านขั้นตอน การสกัด แต่ได้ปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้ clearing solution เพื่อตกตะกอนสารรบกวนต่างๆ ทำให้สารละลายตัวอย่างใส เนื่องจากกาแฟมีสารอัลคาลอยด์ (alkaloid) หลายชนิด ในการตรวจวิเคราะห์จึงใช้ column ชนิดยาว ทำให้ peak แยกได้ดีแม้ว่าจะต้องใช้เวลานานในการแยก peak ของแคฟเฟอีน (retention time =12.6 นาที) chromatogram ของแคฟเฟอีนแสดงในรูปที่ 2 และ 3

ผลการสำรวจปริมาณแคฟเฟอีน ในกาแฟสำเร็จรูปพร้อมดื่ม ชนิดกาแฟดำ กาแฟใส่นม และโอเลี้ยง พบว่าปริมาณแคฟเฟอีนเฉลี่ยในกาแฟดำ และกาแฟใส่นมมีค่าใกล้เคียงกันคือ 69.5 ± 24.9 และ 64.5 ± 22.4 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตาราง2) ปริมาณแคฟเฟอีนที่ตรวจพบส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับสูตรถ้าปริมาณผงกาแฟสำเร็จหรือกาแฟ แท้ชนิดบดที่มีอยู่ในสูตรสูงจะตรวจพบแคฟเฟอีนในปริมาณมาก สำหรับโอเลี้ยงไม่ว่าบรรจุในภาชนะชนิดใดพบว่าปริมาณแคฟเฟอีนต่ำ คือ พบเฉลี่ย 7.3 ± 8.8 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากมีการใช้กาแฟผสมในสูตรซึ่งมีปริมาณแคฟเฟอีนต่ำ จาก การตรวจวิเคราะห์พบแคฟเฟอีนในกาแฟผสมร้อยละ 0.03-1.1 ในขณะที่กาแฟผงสำเร็จรูปและกาแฟแท้ชนิดบดพบร้อยละ 1.8-4.1 และ 1.0-2.4 ตามลำดับ[5]

กาแฟสำเร็จรูปพร้อมดื่มบรรจุในภาชนะต่างๆ มีขนาดบรรจุที่แตกต่างกัน บรรจุกระป๋องขนาด 170-250 มิลลิลิตร ขวดแก้วขนาด 150-250 มิลลิลิตร และขวดพลาสติก ขนาด 200-500 มิลลิลิตร ตรวจพบแคฟเฟอีนต่ำในกาแฟปรุงสำเร็จที่บรรจุในขวดพลาสติกซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์โอเลี้ยง ส่วนที่บรรจุในภาชนะอื่นๆ เป็นกาแฟดำและกาแฟใส่นม เมื่อพิจารณาปริมาณแคฟเฟอีนที่ผู้บริโภคได้รับต่อหน่วยบรรจุ พบแคฟเฟอีนสูงสุดในกาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มที่บรรจุกระป๋อง ขวดแก้วและขวดพลาสติกเท่ากับ 217.3 มิลลิกรัมต่อ 180 มิลลิลิตร,149.5 มิลลิกรัมต่อ 150 มิลลิลิตร และ 142.8 มิลลิกรัมต่อ 200 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 3) ปริมาณแคฟเฟอีนต่อหน่วยบรรจุที่ตรวจพบสูงสุดจะพบมากเป็น 2 และ 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟผงสำเร็จรูป 1 ถ้วย (ประมาณ 40-

108 มิลลิกรัมต่อ 150 มิลลิลิตร)[1] และเครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีน 1 ขวด (50 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ) การบริโภคแคฟเฟอีนในปริมาณปกติสำหรับผู้ที่มีสุขภาพดีอาจจะไม่มีผลต่อร่างกาย แต่ถ้าบริโภคในปริมาณมากและมีความถี่สูงอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เนื่องจากตรวจพบว่ากาแฟปรุงสำเร็จพร้อมดื่มบางยี่ห้อมีปริมาณแคฟเฟอีนสูง เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค หน่วยงานที่เกี่ยวข้องควรมีมาตรการในการควบคุมปริมาณแคฟเฟอีนในเครื่องดื่มชนิดนี้ โดยกำหนดให้มีการแจ้งปริมาณแคฟเฟอีนที่ฉลาก เพื่อให้ผู้บริโภคเป็นผู้พิจารณาเลือกซื้อ และตระหนักถึงปริมาณแคฟเฟอีนที่ได้รับต่อวัน

สรุป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคฟเฟอีนโดยวิธี HPLC เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดที่ยุ่งยาก มีความถูกต้องและแม่นยำสูง สามารถตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็วเหมาะกับงานวิเคราะห์ที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ผลการสำรวจปริมาณแคฟเฟอีนในกาแฟปรุงสำเร็จชนิดต่างๆ พบว่ามีช่วงที่แตกต่างกันมากแม้ในเครื่องดื่มประเภทเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่มีกฎหมายควบคุมปริมาณแคฟเฟอีนในเครื่องดื่มดังกล่าวปริมาณแคฟเฟอีนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณผงกาแฟในสูตร และยังไม่มีการสำรวจข้อมูลเกี่ยวกับการบริโภคแคฟเฟอีนในประเทศไทย ดังนั้นถ้าบริโภคแคฟเฟอีนจากแหล่งต่างๆ ในปริมาณมากก็อาจทำให้เกิดอันตรายได้ ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจสามารถใช้เป็นแนวทาง เพื่อหามาตรการในการควบคุมปริมาณแคฟเฟอีนในเครื่องดื่มเหล่านี้ เพื่อคุ้มครองผู้บริโภคและเผยแพร่ให้ผู้บริโภคทราบและตระหนักถึงปริมาณแคฟเฟอีนที่ได้รับซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. ภาวิช ทองโรจน์ และ ชัยชาญ แสงมณี 2539. เอกสารในการสัมมนาวิชาการเรื่องแคฟเฟอีน วันที่ 19 สิงหาคม ณ โรงแรมสยามซิตี้
2. Graham, D.M. 1978. Caffeine : Its identity, dietary sources, intake and biological effects. Nutr. Rev. 36:97-102.
3. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2536. เครื่องดื่มผสมแคฟเฟอีน. จุลสารสัมพันธ์ ปีที่ 14 ฉบับที่ 165, หน้า 5-8.
4. กล้า อิศราภิรมย์ 2532. แคฟเฟอีนในชาและกาแฟที่จำหน่ายในท้องตลาด โภชนาการสาร 23 (4) ตุลาคม-ธันวาคม. หน้า 198.
5. Woollard,D.C. 1982. The determination of cocoa solids in milk powder product using High Performance Liquid Chromatography. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology.17,63-68.
6. Ashoor,S.H, Seperich,G.J, Monte W.C. and Welty,J. 1983.High Performance Liquid Chromatographic Determination of Caffeine in Decaffeinated Coffee, Tea, and Beverage Product. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(3):606-608.
7. Terada,H. and Sakabe,Y. 1984. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Theobromine, Theophylline and Caffeine in Food Products. J. Chromatograph. 291:453-459.