

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.04.014

罗发美, 谭文涵, 金红芳, 等. 基于高效液相色谱法分析烘焙程度对咖啡中绿原酸含量的影响[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(4): 102-110.
LUO F M, TAN W H, JIN H F, et al. Influence of baking degree on the content of chlorogenic acid in coffee by high performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(4): 102-110.

基于高效液相色谱法分析烘焙程度对咖啡中绿原酸含量的影响

罗发美, 谭文涵, 金红芳, 胡圆圆, 张晓花

(普洱市质量技术监督综合检测中心, 云南 普洱 665099)

摘要: 探究烘焙程度对 10 支不同产地 (产地一: 云南, 产地二: 非洲, 产地三: 美洲) 卡蒂姆咖啡豆中 7 种绿原酸化合物含量影响。采用高效液相色谱法测定生豆和烘焙豆中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 和 5-阿魏酰奎宁酸含量。经响应面法优化 7 种绿原酸化合物的最佳提取条件为 100 mL 0.1% 磷酸溶液沸水浴提取 30 min, 7 种绿原酸化合物在 2~150 mg/L 质量浓度范围内, 线性相关系数良好, 相关系数均大于 0.999 4, 方法检出限 0.005~0.500 mg/g, 定量限 0.02~2.00 mg/g, 咖啡生豆中绿原酸的含量最高, 其次是 5-阿魏酰奎宁酸。随着烘焙程度增加, 绿原酸和 5-阿魏酰奎宁酸含量显著降低 ($P < 0.05$), 新绿原酸和隐绿原酸含量先升高再降低, 异绿原酸 A 的降解速度明显高于异绿原酸 B 和异绿原酸 C, 绿原酸、5-阿魏酰奎宁酸的降解速度与其余 5 种绿原酸相比, 较为稳定。通过对不同烘焙程度下 7 种绿原酸化合物含量变化的研究, 可以进一步针对咖啡绿原酸功效成分进行评价, 为咖啡烘焙和品质控制提供参考依据。

关键词: 咖啡; 绿原酸含量; 烘焙程度; 降解; 高效液相色谱

中图分类号: TS202 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)04-0102-09

网络首发时间: 2023-06-30 11:42:07

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/11.3863.ts.20230629.1441.004.html>

Influence of Baking Degree on the Content of Chlorogenic Acid in Coffee by High Performance Liquid Chromatography

LUO Fa-mei, TAN Wen-han, JIN Hong-fang, HU Yuan-yuan, ZHANG Xiao-hua

(Pu'er Quality and Technical Supervision Comprehensive Inspection Center, Pu'er, Yunnan 665099, China)

Abstract: The effect of baking degree on the change of seven chlorogenic acid compounds in 10 different origins (origin 1: Yunnan, origin 2: Africa and America) of Cardim coffee. The content of chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C and 5-ferulicquinic acid in green coffee and baked coffee were determined

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 范春林专家工作站 (20210903); 国家市场监督管理总局技术创新中心 (咖啡质量基础与产业服务)

Supported by: The Fan Chunlin Expert Workstation (No. 20210903); the Technology Innovation Center of Coffee Quality Foundation and Industrial Services for State Market Regulation

作者简介: 罗发美, 女, 1982 年出生, 硕士, 高级工程师, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: 332551921@qq.com

by high performance liquid chromatography (HPLC). The optimum extraction conditions of seven chlorogenic acid compounds were optimized by response surface methodology. 100 mL 0.1% phosphoric acid solution was extracted in water bath for 30 min, and the calibration curves of the seven chlorogenic acid compounds showed good linearity with correlation coefficients of above 0.999 4 in the range of 2~150 mg/L. Limit of the detection (LOD) and the limit of the quantitative (LOQ) were 0.005~0.5 mg/g and 0.02~2 mg/g respectively. The content of chlorogenic acid in green coffee beans was the highest, followed by 5-ferulicquinic acid. With the increase of baking degree, the content of chlorogenic acid and 5-ferulicquinic acid decreased significantly ($P<0.05$). The content of neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid increased first and then decreased. The degradation rate of isochlorogenic acid A was significantly higher than that of isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C. The degradation rate of chlorogenic acid and 5-ferulicquinic acid was relatively stable compared with the other six kinds of chlorogenic acid. Through the study of the content changes of seven kinds of chlorogenic acid compounds under different baking degrees can further evaluate the efficacy of chlorogenic acids in coffee, and provide a reference basis for the quality control of coffee baking.

Key words: coffee; chlorogenic acid content; baking degree; degradation; high performance liquid chromatography

咖啡中绿原酸是奎宁酸和羟基肉桂酸之间形成的一大类酯, 含量较为丰富, 约占咖啡质量的 6%~12%^[1], 它们以位置异构体和几何异构体的复杂混合物形式存在于咖啡中, 其中咖啡酰奎宁酸 (caffeylquinic acid, CQA) 最丰富, 其次是阿魏酰奎宁酸类 (FQA)、二咖啡酰奎宁酸 (diCQA) 和对香豆素酰奎宁酸类 (p-CoQAs)^[2]。咖啡绿原酸不仅具有抗氧化、抗菌、保护心脏和神经、调控糖脂代谢和抗肿瘤等生物活性, 还是一种新型、天然的食物污染物抑制剂和免疫增强剂^[3-5], 也是咖啡苦味物质的来源之一^[6]。

烘焙条件对咖啡豆化学性质有较大影响, 其中绿原酸在烘焙过程中发生酰基迁移、脱水、差向异构化, 或与醋酸、奎宁酸和莽草酸的酯交换, 通过 4 种不同的反应途径产生热降解, 目前咖啡豆中共鉴别出 137 种不同的绿原酸衍生物^[7-8]。随着烘焙程度增加, 绿原酸内酯的形成改变了异构体间的含量比例^[9-10], 进一步绿原酸内酯的碳-碳键断裂, 形成咖啡酸、奎宁酸、奎宁内酯类, 逐步形成挥发性风味成分, 如呋喃、吡啶、吡咯和吡嗪等^[11]。MOON 等^[11]指出绿原酸总量随着烘焙程度的增加而降低; 轻度烘焙时, 新绿原酸和隐绿原酸含量较生豆有所上升^[12], 主要原因是绿原酸发生了异构体的转化; 异绿原酸类在烘焙

过程中同样发生转化, 并形成相应内酯^[13], 但未见其转化深入研究。除咖啡酰奎宁酸类、二咖啡酰奎宁酸 (主要成分是异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C), 阿魏酰奎宁酸类也是咖啡中含量较高的一类绿原酸。ADRIANA 等^[14]将中粒种咖啡生豆去咖啡因的水浸出物烘干后压缩成胶囊, 测定其成分发现 5-阿魏酰奎宁酸含量为 (22.1±0.02) μmol/0.4 g, 含量高于异绿原酸类; CLIFFORD 等^[15]报道罗布斯塔生豆中 5-阿魏酰奎宁酸含量为 1.11%。此外, 咖啡中绿原酸的检测方法, 主要有液相色谱法^[16]、液相色谱-质谱-质谱法^[17]等。胡皓等建立的分析方法完成了绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 等 6 种绿原酸定量分析, 并发现咖啡豆中绿原酸含量最高, 占 6 种绿原酸类化合物总量的 76.1%^[18]。笔者在前期的工作中, 发现咖啡生豆和烘焙豆中富含 5-阿魏酰奎宁酸, 但咖啡中 5-阿魏酰奎宁酸的检测方法、含量及其在烘焙过程中的变化规律均未见报道。

因此, 本研究采用液相色谱仪, 建立咖啡中 7 种绿原酸类化合物含量的定量分析方法, 并分析不同烘焙程度下, 绿原酸异构体间的动态转化关系及含量变化, 旨在为咖啡烘焙及其品质控制提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

乙酸(分析纯):四川西陇科学有限公司;磷酸(分析纯):天津市风船化学试剂科技有限公司;乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯):J.T.Baker。

绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$):天津阿尔塔科技有限公司;5-阿魏酰奎宁酸(纯度 $\geq 98\%$):上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪:日本岛津公司;AL204 万分之一电子天平:瑞士梅特勒托利多公司;DISCV-IV-60 纯水系统:云南福瑞达进口有限公司;BRZ2 咖啡烘焙机、Colorette 3b 专业咖啡颜色测定仪、VTA6S3 专业咖啡研磨仪:德国 PROBAT 仪器公司。

1.3 标准溶液配制

准确称取 5-阿魏酰奎宁酸 5 mg 用甲醇溶液定容于 5 mL 容量瓶中,质量浓度为 1 mg/mL;分别取质量浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的标准溶液各 50 μL ,绿原酸 150 μL ,5-阿魏酰奎宁酸 100 μL 用甲醇定容至 1 mL,得到隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 浓度为 50 mg/L、5-阿魏酰奎宁酸浓度为 100 mg/L、绿原酸浓度为 150 mg/L 的标准使用液,并再次逐级稀释配制成 2、5、10、20、40、50 mg/L 及 5-阿魏酰奎宁酸对应 2 倍和绿原酸对应 3 倍浓度的校准曲线系列溶液。

1.4 咖啡样品的准备

10 支咖啡豆由项目组成员联系生产厂家购买,并经专业的咖啡师剔除瑕疵豆后作为实验样品,10 支咖啡豆的信息详见表 1。

1.5 样品前处理

将实验豆粉碎至全部通过 60 目的样品筛,准确称取样品 0.2~0.3 g(精确至 0.1 mg)于 100 mL 比色管中,加入 100 mL 0.1%磷酸溶液,沸水浴中加热 30 min,冷却后用 0.1%磷酸溶液定容至

表 1 10 支咖啡豆的信息

Table 1 The information of 10 coffee beans

| 编号 | 产地 | 编号 | 产地 |
|----|-------|-----|----------|
| 1# | 普洱孟连县 | 6# | 临沧镇康县 |
| 2# | 普洱思茅区 | 7# | 大理宾川县 |
| 3# | 保山隆阳区 | 8# | 肯尼亚尼耶里产区 |
| 4# | 保山隆阳区 | 9# | 哥伦比亚惠兰产区 |
| 5# | 德宏芒市 | 10# | 巴拿马波奎特 |

100 mL,用 0.45 μm 水系膜过滤后,按照 1.5 的色谱条件进行色谱分析。

1.6 色谱条件

色谱柱:Aglient ZORBAX ODS-C18(150 mm \times 4.6 mm,5 μm);流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:330 nm;进样量为:10 μL ;流动相 A:0.5%乙酸水溶液,流动相 B:乙腈,梯度洗脱见表 2。

表 2 梯度洗脱表

Table 2 The table of gradient elution

| 时间/min | 流速/(mL/min) | A 流动相/% | B 流动相/% |
|--------|-------------|---------|---------|
| 0 | 1.00 | 95 | 5 |
| 20 | 1.00 | 85 | 15 |
| 22 | 1.00 | 75 | 25 |
| 25 | 1.00 | 85 | 15 |
| 35 | 1.00 | 75 | 25 |
| 40 | 1.00 | 95 | 5 |

1.7 咖啡豆样品的烘焙

10 支咖啡豆经专业的烘焙师按图 1 的烘焙曲线得到浅烘、中烘、深烘等 3 个程度的烘焙豆,烘焙好的咖啡豆经研磨仪研磨后,平行测定 3 次色值,取平均值为色值结果。

烘焙曲线:将 100 g 生咖啡豆放入烘焙机中,设置烘焙曲线:入豆温度 160 $^{\circ}\text{C}$,2 min 时达回温点 130 $^{\circ}\text{C}$,转黄时间 6 min;转黄温度 150 $^{\circ}\text{C}$;转棕时间 7.5 min;转棕温度:180 $^{\circ}\text{C}$;刚进入一爆出豆为浅烘,时间为 8~8.5 min,出豆温度 185 $^{\circ}\text{C}$,一爆结束时出豆为中烘,时间 9~9.5 min,出豆温度 190 $^{\circ}\text{C}$,二爆密集时出豆为深烘,时间 10~10.5 min,出豆温度 200 $^{\circ}\text{C}$,色值范围(浅焙:155~176;中烘:94~120;深烘:64~71),烘焙曲线详见图 1。

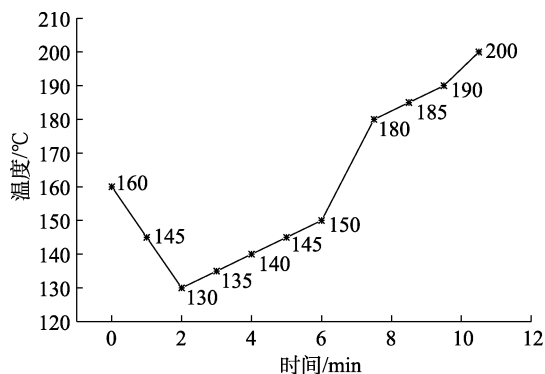


图 1 烘焙曲线
Fig.1 Roasting curve

1.8 单因素实验

以绿原酸的提取率作为响应值,对磷酸溶液的体积分数(0.025%、0.05%、0.1%、0.125%、0.15%),液料比(300:1、400:1、500:1、600:1、700:1)(mL:g)及提取时间(20、30、40、45 min)3个重要因素进行考察。

1.9 数据处理

采用 Design Expert 12 和 ORIGINPRO 统计软

件对样品前处理的方法进行单因素实验和响应面分析,采用 ORIGINPRO 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示含量变化显著。

2 结果与分析

2.1 样品前处理方法的优化

2.1.1 单因素实验结果

当磷酸的体积分数为 0.025%~0.1%时,绿原酸的提取量随着磷酸体积分数的增大而增大,当磷酸体积分数继续增大时,提取量反而下降,主要是绿原酸本身是一种有机酸,酸性条件有利于绿原酸的提取,而酸性太强会造成绿原酸的酸解。随着液料比及提取时间的增大,提取量均随之上升,当液料比达到 500:1 时绿原酸提取量开始下降,可能是提取溶剂体积增加,杂质溶出,干扰了绿原酸的提取;水浴提取时间 ≥ 30 min 时,提取率趋于稳定,因此选择磷酸体积分数为 0.1%,液料比为 500:1,提取时间为 30 min,详见图 2。

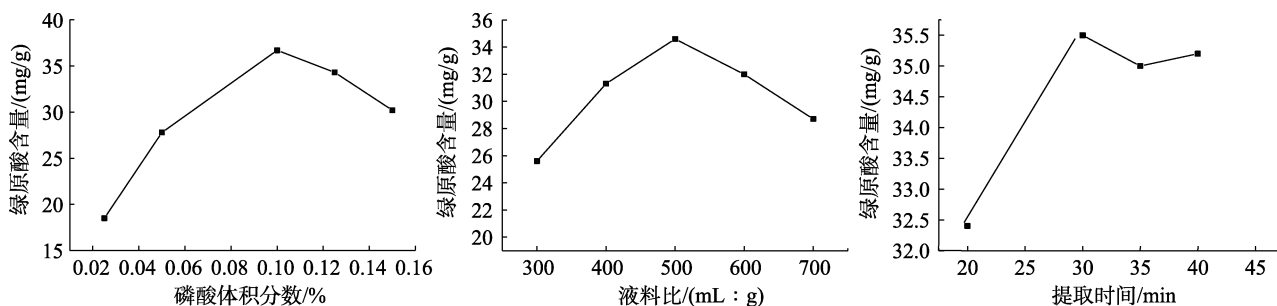


图 2 单因素实验结果
Fig.2 Results of single factor experiment

2.1.2 Box-Behnken 响应面优化实验

在单因素实验的基础上,以磷酸体积分数(X_1)、液料比(X_2)和提取时间(X_3)为考察因素,根据 Box-Behnken 响应面法进行三因素三水平的实验设计,以绿原酸的提取率(Y)为响应值,进行响应面分析。实验设计及结果见表 3。应用 Design-Expert 12 对数据进行多元线性回归和二项式拟合,得到回归方程为:

$$Y = 38.20 + 1.89X_1 + 0.9375X_2 + 0.4X_3 - 0.475X_1X_2 - 1.15X_1X_3 - 0.45X_2X_3 - 4.34X_1^2 - 5.39X_2^2 - 4.86X_3^2$$

对回归模型进行方差分析, $P < 0.0001$, $F = 283.37$,表明回归模型具有高度显著性。同时,

失拟项 $P = 0.1064 > 0.05$,无显著性,说明响应值与预测值之间有良好的拟合度和可信度。利用 ORIGIN 软件绘制各因素交互作用的响应面图,响应曲面坡度越大,表明该因素对响应值的影响越大。如图 3 所示,各因素对响应值影响的大小顺序为磷酸体积分数>液料比>提取时间。

2.1.3 模型验证

通过对回归方程求解,得到最佳提取条件如下:磷酸体积分数为 0.105%,液料比为 463.853 (mL:g),提取时间为 32.812 min,预测的响应值为 38.419 mg/g。为方便实际操作,将上述条件调整为磷酸体积分数 0.1%,液料比 500:1,提取时

表 3 Box-Behnken 实验因素、水平及结果

Table 3 Factors, levels and results of Box-Behnken experiments

| 序号 | 磷酸体积 分数/% | 液料比/ (mL : g) | 提取 时间/min | 绿原酸含量/ (mg/g) | 序号 | 磷酸体积 分数/% | 液料比/ (mL : g) | 提取 时间/min | 绿原酸含量/ (mg/g) |
|----|--------------|------------------|--------------|------------------|----|--------------|------------------|--------------|------------------|
| 1 | 0.0875 | 300 | 20 | 26.4 | 10 | 0.0875 | 450 | 32.5 | 38.3 |
| 2 | 0.0250 | 450 | 45 | 29.1 | 11 | 0.1500 | 450 | 20 | 31.2 |
| 3 | 0.0875 | 450 | 32.5 | 38.1 | 12 | 0.0875 | 450 | 32.5 | 38.4 |
| 4 | 0.0875 | 450 | 32.5 | 37.8 | 13 | 0.0250 | 300 | 32.5 | 25.0 |
| 5 | 0.0875 | 600 | 20 | 29.2 | 14 | 0.1500 | 300 | 32.5 | 30.1 |
| 6 | 0.0875 | 300 | 45 | 27.6 | 15 | 0.0250 | 600 | 32.5 | 27.8 |
| 7 | 0.0250 | 450 | 20 | 25.5 | 16 | 0.1500 | 600 | 32.5 | 31.0 |
| 8 | 0.0875 | 450 | 32.5 | 38.4 | 17 | 0.1500 | 450 | 45 | 30.2 |
| 9 | 0.0875 | 600 | 45 | 28.6 | | | | | |

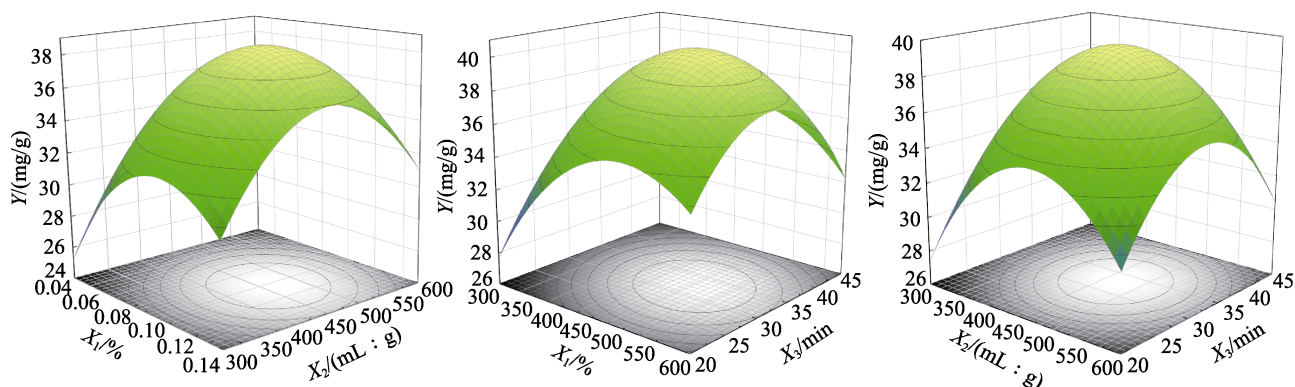


图 3 各因素交互作用的响应面图

Fig.3 Response surface plot of interaction of various factors

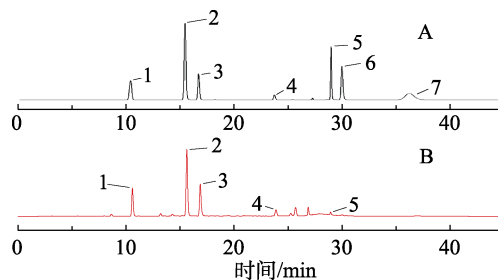
间 30 min。在该条件下, 进行 3 次平行实验验证模型的可靠性。结果表明, 平均提取率为 38.35 mg/g, 预测值相差 0.18%, 较为接近。表明优化后的提取条件是可靠的。

2.2 色谱条件的选择

主要比较了磷酸-甲醇、乙酸-乙腈流动相的分离效果。异绿原酸 B 和异绿原酸 A 结构相近, 采用乙酸-乙腈作为流动相的分离度优于磷酸-甲醇溶液, 故采用乙酸-乙腈作为流动相。结果显示, 7 种绿原酸化合物分离度良好, 咖啡生豆和烘焙豆中无杂质干扰目标物的测定。混合标准溶液(绿原酸含量 150 mg/L) 和中烘样品色谱图见图 4。

2.3 方法的线性范围和检出限

对方法的线性范围、检出限进行考察, 7 种绿原酸化合物的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限详见表 4。7 种绿原酸化合物在 2~150 mg/L 范围内具有良好的线性关系, 用 3 倍



1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸; 4. 5-阿魏酰奎宁酸; 5. 异绿原酸 B; 6. 异绿原酸 A; 7. 异绿原酸 C

1. Neochlorogenic acid; 2. Chlorogenic acid; 3. Cryptochlorogenic acid; 4. 5-O-ferulatequinic acid; 5. Isochlorogenic acid B; 6. isochlorogenic acid A; 7. Isochlorogenic acid C

图 4 混合标准溶液(绿原酸含量 150 mg/L) (A) 和中烘样品 (B) HPLC 图

Fig.4 HPLC Diagram of mixed standard solution (chlorogenic acid 150mg/L) (A) and medium baked sample (B)

信噪比、10 倍信噪比计算方法的检出限和定量限, 方法检出限 0.005~0.5 mg/g, 定量限 0.02~2 mg/g, 能够满足咖啡中 7 种绿原酸化合物定量分析的要求。

2.4 回收率及精密度

实验选取卡蒂姆生豆、深烘咖啡豆为样品, 分别添加 1.3 的标准使用液 (其中隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 浓度为 50 mg/L、5-阿魏酰奎宁酸浓度为 100 mg/L、绿原酸浓度为 150 mg/L 的标准使用液) 500 μ L、1 500 μ L, 按 1.5 完成试样前处理后, 按 1.6 的仪器条件进行测定。每个添加水平平行测定 6 次, 计算

7 种绿原酸化合物的平均回收率和相对标准偏差, 以考察方法的准确度和精密度, 在 0.1~0.3 mg/g、0.3~0.9 mg/g 两个水平进行加标回收实验, 方法的精密度和回收率详见表 5。方法的回收率范围 86.2%~103.0%; 相对标准偏差 2.7%~5.1%; 达到 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求, 可以用于咖啡中 7 种绿原酸化合物的定量分析。

表 4 7 种绿原酸化合物的线性范围、线性方程、检出限和定量限

Table 4 Linear range, linear equation, detection limit and quantification of 7 chlorogenic acid compounds

| 名称 | 线性方程 | 线性范围/(mg/L) | 相关系数 | 检出限/(mg/g) | 定量限/(mg/g) |
|----------|--------------------------|-------------|----------|------------|------------|
| 绿原酸 | $Y=31\ 246.8X-22\ 679.8$ | 6~150 | 0.999 9 | 0.005 | 0.02 |
| 隐绿原酸 | $Y=30\ 476.2X-8\ 919.14$ | 2~50 | 0.999 9 | 0.01 | 0.04 |
| 新绿原酸 | $Y=30\ 064.5X-5\ 629.82$ | 2~50 | 0.999 99 | 0.01 | 0.04 |
| 异绿原酸 B | $Y=36\ 879.7X-13\ 883$ | 2~50 | 0.999 4 | 0.05 | 0.2 |
| 异绿原酸 A | $Y=42\ 059.5X-18\ 732.5$ | 2~50 | 0.999 7 | 0.1 | 0.4 |
| 异绿原酸 C | $Y=40\ 065X-33\ 140.3$ | 2~50 | 0.999 95 | 0.1 | 0.4 |
| 5-阿魏酰奎宁酸 | $Y=3\ 065.8X-2\ 093.4$ | 4~100 | 0.999 99 | 0.5 | 2 |

表 5 方法的回收率及精密度

Table 5 Recovery and precision of the method

| 名称 | 卡蒂姆生豆加标水平 | | | | | | 深烘咖啡豆加标水平 | | | | | |
|----------|----------------|------------|-----------|----------------|------------|-----------|----------------|------------|-----------|----------------|------------|-----------|
| | 加标量/ (mg/g) | Mean/ % | RSD/ % | 加标量/ (mg/g) | Mean/ % | RSD/ % | 加标量/ (mg/g) | Mean/ % | RSD/ % | 加标量/ (mg/g) | Mean/ % | RSD/ % |
| 绿原酸 | 0.3 | 90.8 | 4.7 | 0.9 | 91.4 | 3.8 | 0.3 | 88.3 | 4.4 | 0.9 | 93.5 | 3.4 |
| 隐绿原酸 | 0.1 | 103.0 | 3.4 | 0.3 | 98.7 | 3.2 | 0.1 | 92.5 | 3.8 | 0.3 | 92.9 | 3.7 |
| 新绿原酸 | 0.1 | 94.7 | 2.7 | 0.3 | 96.4 | 3.5 | 0.1 | 90.6 | 3.5 | 0.3 | 92.8 | 4.6 |
| 异绿原酸 B | 0.1 | 88.5 | 3.9 | 0.3 | 102.5 | 4.6 | 0.1 | 87.3 | 3.6 | 0.3 | 96.4 | 3.7 |
| 异绿原酸 A | 0.1 | 87.8 | 4.2 | 0.3 | 90.3 | 3.1 | 0.1 | 88.4 | 4.5 | 0.3 | 89.6 | 2.9 |
| 异绿原酸 C | 0.1 | 90.9 | 4.8 | 0.3 | 91.4 | 2.9 | 0.1 | 88.0 | 4.8 | 0.3 | 94.3 | 4.3 |
| 5-阿魏酰奎宁酸 | 0.2 | 91.8 | 2.8 | 0.6 | 94.7 | 3.0 | 0.2 | 86.2 | 3.3 | 0.6 | 93.8 | 5.1 |

注: MEAN 表示平均回收率, RSD 表示相对标准偏差。

Note: MEAN represents average recovery rate, RSD represents relative standard deviation.

2.5 不同产区咖啡生豆中绿原酸含量的比较

对 10 支不同产地的咖啡生豆完成了 7 种绿原酸化合物含量测定, 其中 7 种绿原酸化合物的总量范围 85.8~105.3 mg/g, 最高的是德宏咖啡 105.3 mg/g, 其次是为大理咖啡 102.6 mg/g; 绿原酸范围 38.6~59.7 mg/g, 其中含量最高的是巴拿马咖啡 59.7 mg/g, 其次是德宏咖啡 55.0 mg/g, 绿原酸的含量占 7 种绿原酸化合物总量的 42.9%~60.7%; 5-阿魏酰奎宁酸含量 25.4~38.9 mg/g, 含量最高的是大理咖啡 38.9 mg/g, 其次是德宏咖啡 35.6 mg/g, 占 7 种绿原酸化合物总量的 25.8%~

38.3%。新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含量分别为 2.2~3.8 mg/g、4.3~5.7 mg/g、1.6~5.7 mg/g、0.7~1.7 mg/g、1.2~3.0 mg/g。

咖啡生豆中绿原酸含量最高, 其次是 5-阿魏酰奎宁酸, 咖啡生豆中 7 种绿原酸类化合物总量占生豆质量的 8.6%~10.5%, 与 ARIANA^[1]报道结果一致; 其次是 5-阿魏酰奎宁酸, 咖啡生豆中 5-阿魏酰奎宁酸含量占生豆质量的 2.5%~3.9%, 结果与 CLIFFORD AND JARVIS^[15]研究结果相比较偏高, 主要原因可能是本课题采用咖啡品种是卡

蒂姆, 而 CLIFFORD AND JARVIS 的研究咖啡品种是罗布斯塔。关于产地对 7 种绿原酸的含量影响, 本课题未发现显著规律, 有待深入研究。

2.6 烘焙过程中绿原酸异构体含量变化

2.6.1 绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸含量的变化

不同烘焙度绿原酸异构体的含量及与生豆中含量的变化结果详见表 6。绿原酸在烘焙过程中, 随着烘焙程度增加, 7 种绿原酸化合物总量、绿原酸的含量显著降低 ($P < 0.05$); 隐绿原酸和新绿原酸在浅烘时, 由于绿原酸的异构化, 先异构为隐绿原酸, 然后经分子内酰基迁移生成新绿原酸^[12], 导致隐绿原酸和新绿原酸浅烘时升高到生豆含量的 146%~237%和 185%~384%, 中烘为生豆中含量的 98%~154%和 124%~247%, 深烘时, 隐绿原酸和新绿原酸含量显著降低, 是生豆含量的 51%~72%和 41%~116%; 该结果与刘兴勇等^[19]的研究成果一致。

2.6.2 异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 含量的变化

异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 在浅烘、中烘、深烘的过程中, 异绿原酸 A 下降得最快, 浅烘下降为生豆含量的 19%~26%, 中烘为

7%~21%, 深烘下降到 0.5 mg/g 以下; 异绿原酸 B 和异绿原酸 C 浅烘下降为生豆含量的 59%~100%, 中烘为 30%~72%, 深烘下降到 1 mg/g 以下; 笔者比较了异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 在结构上的差异, 7 种绿原酸化合物的结构详见图 5, 从图中可知, 异绿原酸 B 和异绿原酸 C 比异绿原酸 A 在结构上多了一个酯键与 O 共轭体系, 所以推测三者热降解速度的差异可能与其共轭体系有关, 也不排除其热降解为其他的化合物。

2.6.3 5-阿魏酰奎宁酸含量的变化

绿原酸、5-阿魏酰奎宁酸在浅烘、中烘、深烘时的热降解与其余六种绿原酸相比, 比例较为稳定, 咖啡生豆中三个烘焙度绿原酸含量与生豆中绿原酸的比值分别为: 37%~52%、21%~31%、8%~11%; 咖啡生豆中三个烘焙度 5-阿魏酰奎宁酸的含量与生豆中绿原酸的比值分别为 63%~72%、45%~58%、31%~44%。笔者认为, 烘焙豆中绿原酸、5-阿魏酰奎宁酸含量与生豆中绿原酸、5-阿魏酰奎宁酸比值可以作为一个“参考值”, 用于评价烘焙师的水平和咖啡烘焙程度的内控化学指标。此外, 烘焙过程中绿原酸异构体含量的变化与产地无直接关系。

表 6 烘焙咖啡绿原酸异构体含量变化
Table 6 Changes of chlorogenic acid isomers in roasted coffee

| 绿原酸 | 烘焙程度 | | | | |
|-----------------------|------------|-----------|-----------|-----------|--|
| | 生豆 | 浅烘 | 中烘 | 深烘 | |
| 绿原酸含量/(mg/g) | 38.6~59.7 | 18.0~25.9 | 10.1~15.2 | 3.9~6.8 | |
| 绿原酸剩余量与生豆中总量占比/% | / | 37~52 | 21~31 | 8~11 | |
| 隐绿原酸含量/(mg/g) | 4.3~5.7 | 8.7~11.1 | 5.6~7.4 | 2.6~3.8 | |
| 隐绿原酸剩余量与生豆中总量占比/% | / | 146~237 | 98~154 | 51~72 | |
| 新绿原酸含量/(mg/g) | 2.2~3.8 | 6.3~8.6 | 4.2~5.8 | 0.9~3.2 | |
| 新绿原酸剩余量与生豆中总量占比/% | / | 185~384 | 124~247 | 41~116 | |
| 异绿原酸 B 含量/(mg/g) | 0.7~1.7 | 0.7~1.3 | 0.5~0.8 | 0~0.3 | |
| 异绿原酸 B 剩余量与生豆中总量占比/% | / | 59~100 | 30~58 | 0~30 | |
| 异绿原酸 A 含量/(mg/g) | 1.6~5.7 | 0.5~1.0 | 0.4~0.8 | 0~0.3 | |
| 异绿原酸 A 剩余量与生豆中总量占比/% | / | 19~26 | 7~21 | 0~11 | |
| 异绿原酸 C 含量/(mg/g) | 1.2~3.0 | 1.3~2.1 | 1.0~1.3 | 0~1.0 | |
| 异绿原酸 C 剩余量与生豆中总量占比/% | / | 60~100 | 37~72 | 0~56 | |
| 5-阿魏酰奎宁酸含量/(mg/g) | 24.3~38.9 | 17.5~25.6 | 14.2~19.0 | 10.4~12.3 | |
| 5-阿魏酰奎宁酸剩余量与生豆中总量占比/% | / | 63~72 | 45~58 | 31~44 | |
| 绿原酸总量/(mg/g) | 85.8~105.3 | 60.6~68.4 | 39.1~47.7 | 18.8~26.5 | |
| 绿原酸总量剩余量与生豆中总量占比/% | / | 63~77 | 39~53 | 21~27 | |

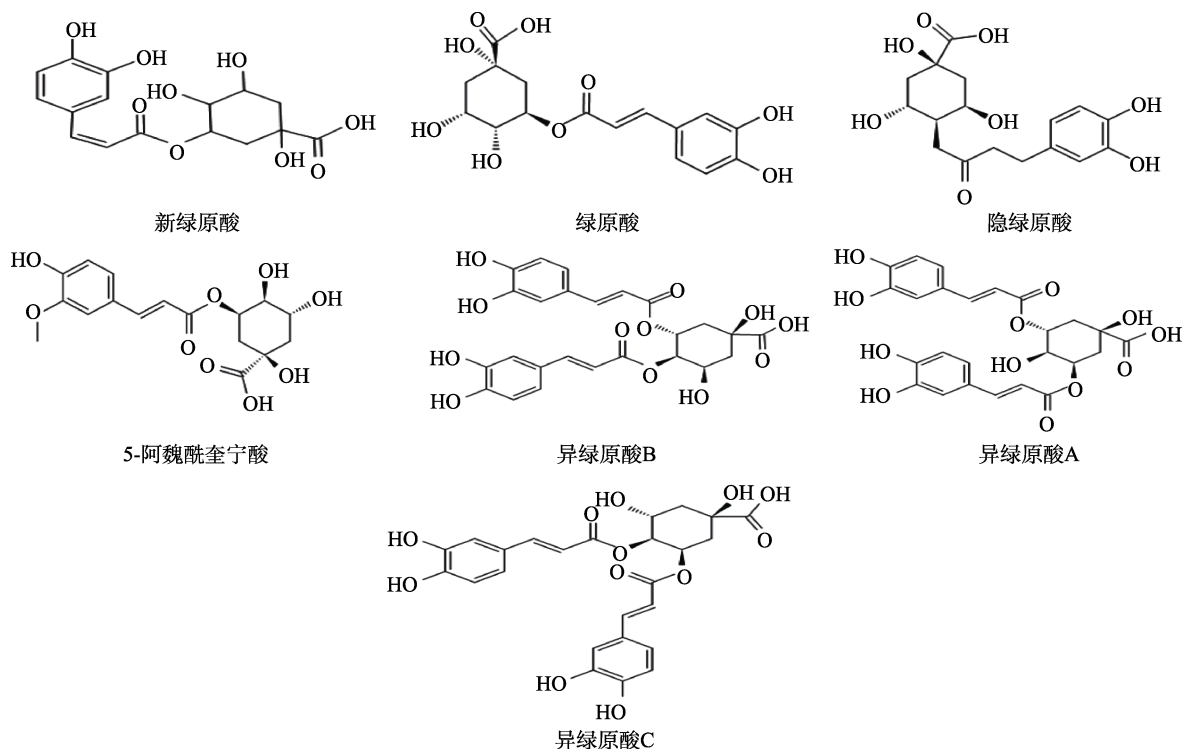


图 5 7 种绿原酸化合物的结构图

Fig.5 Structural diagrams of 7 chlorogenic acid compounds

3 结论

本研究建立了一种同时测定咖啡中 7 种绿原酸化合物的分析方法, 采用 100 mL 0.1%磷酸溶液水浴提取 30 min, 定容过滤后测定, 经考察, 方法的线性范围、回收率及检出限等满足定量分析要求。同时, 采用建立的分析方法测定了 10 支不同产地的卡蒂姆咖啡在不同烘焙程度下 7 种绿原酸化合物含量的变化; 结果表明, 随着烘焙程度增加, 绿原酸和 5-阿魏酰奎宁酸含量显著降低 ($P < 0.05$); 新绿原酸和隐绿原酸的含量先升高再降低; 异绿原酸 A 的热降解速度明显高于异绿原酸 B 和异绿原酸 C; 5-阿魏酰奎宁酸随着烘焙度增加, 含量逐渐降低, 与其余 5 种绿原酸相比较, 绿原酸、5-阿魏酰奎宁酸热降解速度较为稳定, 均可作为咖啡烘焙程度的“参考物”, 用于评价烘焙师的水平和咖啡烘焙程度的内控化学指标。本论文通过对不同烘焙程度下 7 种绿原酸化合物含量变化的研究, 可以进一步针对咖啡绿原酸中功效成分进行评价, 为咖啡烘焙和品质控制提供参考依据。

参考文献:

- [1] ARIANA F, TOMAS D P, DANILE M P, et al. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54(2): 374-381.
- [2] SILVIA C, ELENA G, LUCIANO N. Validation of a rapid ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of chlorogenic acids in roasted coffee[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2020, 55(11): e4634-e4634.
- [3] NAVEED M, HEJAZI V, ABBAS M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 97: 67-74.
- [4] JELENA T, SVETLANA M, JASMINA M, et al. Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid[J]. Food Chemistry, 2017, 237: 390-398.
- [5] SANTANA-GÁLVEZ J, CISNEROS-ZEVALLOS L, DANIEL A, et al. Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome[J]. Molecules, 2017, 22(3): 358.
- [6] LI Y T, LI L, MARIANNE N, et al. Kinetic investigation of the trapping of N ϵ -(carboxymethyl)lysine by 4-methylbenzoquinone: A new mechanism to control N ϵ -(carboxymethyl) lysine levels in foods[J]. Food Chemistry, 2018, 244: 25-28.
- [7] JAISWAL R, MATEI M F, GOLON A, et al. Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry

- based targeted and non-targeted analytical strategies[J]. *Food & function*, 2012, 3(9): 976-984.
- [8] ASAMENEW G, KIM H W, LEE M K, et al. Comprehensive characterization of hydroxycinnamoyl derivatives in green and roasted coffee beans: A new group of methyl hydroxycinnamoyl quinate[J]. *Food Chemistry: X*, 2019, 2(C): 100033.
- [9] FARAH A, DEPAULIS T, TRUGO L C, et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53(5): 1505-1513.
- [10] DAWIDOWICZ A L, TYPEK R. Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process[J]. *European Food Research and Technology*, 2016, 243(3): 379-390.
- [11] MOON J K, SHIBAMOTO T. Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, 58(9): 5465-5470.
- [12] GOMEZ B F, NITRIDE C, ULLATE M, et al. Inhibitors of advanced glycation end products from coffee bean roasting by-product[J]. *European Food Research and Technology*, 2018, 244(6): 1101-1110.
- [13] DAWIDOWICZ A L, TYPEK R. Transformation of chlorogenic acids during the coffee beans roasting process[J]. *European Food Research and Technology*, 2016, 243(3): 379-390.
- [14] ADRIANA F, MARIANA M, CARMEN M D, et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans[J]. *The Journal of nutrition*, 2008, 138(12): 2309-15.
- [15] CLIFFORD M N, JARVIS T. The chlorogenic acids content of green robusta coffee beans as a possible index of geographic origin[J]. *Food Chemistry*, 1988, 29(4): 291-298.
- [16] 辛晓晨, 鹿尘. 高效液相色谱法同时测定果蔬中绿原酸、表儿茶素、白藜芦醇[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(5): 532-535.
XIN X C, LU C. Simultaneous determination of chlorogenic acid, L-epicatechin and resveratrol in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2022, 32(5): 532-535.
- [17] 李葆林, 郗兰霞, 王鑫国, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定酸枣安神颗粒中 15 种成分[J]. *中成药*, 2022, 44(6): 1751-1755.
LI B L, XI L X, WANG X G, et al. Simultaneous determination of fifteen constituents in Suanzao Anshen Granules by UPLC-MS/MS[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(6): 1751-1755.
- [18] 胡皓, 宋红坤, 王继良, 等. 高效液相色谱法同时测定咖啡中 6 种绿原酸[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(7): 1634-1643.
HU H, SONG H K, WANG J L, et al. Determination of six chlorogenic acids by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of food safety & quality*, 2018, 9(7): 1634-1643.
- [19] 刘兴勇, 陈兴连, 杜丽娟, 等. 多因素交互作用导烘焙咖啡中绿原酸快速降解[J]. *食品科学*, 2021, 42(9): 7-14.
LIU X Y, CHEN X L, DU L J, et al. The interaction of various factors leads to rapid degradation of chlorogenic acid in roasted coffee beans during processing[J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 7-14. 完
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。