

高效液相色谱-紫外双波长同时测定咖啡及咖啡制品中10种化合物含量

邵金良^{1,2}, 杨东顺¹, 樊建麟¹, 刘兴勇¹, 杜丽娟¹, 王 丽¹, 刘宏程^{1,2,*}, 汪禄祥^{1,*}

(1. 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 云南 昆明 650223;

2. 农业部农产品质量安全风险评估实验室(昆明), 云南 昆明 650223)

摘 要: 建立高效液相色谱-紫外双波长测定咖啡及咖啡制品中葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸含量的方法。样品用甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, *V/V*)作为提取溶剂经超声波提取, 过聚四氟乙烯滤膜后在Shiseido CAPCELL PAK MG II C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)上, 以甲醇-0.10%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 选择254 nm和320 nm双波长进行目标化合物的检测。10种化合物在0.10~100.0 mg/L范围内具有良好的线性关系, 相关系数(*r*)不小于0.999, 检出限为0.05~0.10 mg/kg, 定量限为0.16~0.28 mg/kg。在20、40、100 mg/kg添加量的加标回收率为80.00%~113.8%, 相对标准偏差在3.63%~9.10%之间。该方法操作简单、重复性和稳定性好, 适合咖啡及咖啡制品中10种化合物同时测定及定量分析。

关键词: 高效液相色谱; 紫外双波长; 咖啡及咖啡制品; 多酚类化合物; 生物碱类化合物

Simultaneous Determination of 10 Polyphenolic and Alkaloidal Components in Coffee and Coffee-Based Products by HPLC-Double Wavelength UV Detection

SHAO Jinliang^{1,2}, YANG Dongshun¹, FAN Jianlin¹, LIU Xingyong¹, DU Lijuan¹, WANG Li¹, LIU Hongcheng^{1,2,*}, WANG Luxiang^{1,*}

(1. Institute of Agriculture Quality Standards and Testing Technique, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China;

2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-Products (Kunming), Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China)

Abstract: The aim of this study was to establish a method for the simultaneous determination of polyphenolic compounds including neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, cynarin, 1,5-dicaffeoylquinic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C and alkaloidal compounds including caffeine and trigonelline in coffee and coffee-based products. These 10 components were extracted ultrasonically with 0.10% phosphoric acid solution-methanol (50:50, *V/V*) and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) at 254 nm and 320 nm. The chromatographic separation was performed on a Shiseido CAPCELL PAK MG II C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm) by using 0.10% phosphoric acid solution-methanol as the mobile phase. The average recoveries of the 10 analytes in spiked samples ranged from 80.00% to 113.8%, with relative standard deviations (RSDs) of 3.63%~9.10%. The calibration curves for these analytes were linear in the range of 0.10~100.0 mg/L with correlation coefficients of more than 0.999. The limits of detection (LODs) varied from 0.05 to 1.0 mg/kg and the limits of quantitation (LOQ) ranged from 0.16 to 0.28 mg/kg for 10 polyphenolic and alkaloidal components. The method showed good repeatability, accuracy and stability and enabled the accurate quantification of 10 polyphenolic and alkaloidal components in coffee and coffee-based products.

Key words: HPLC; double UV wavelengths; coffee and coffee-based products; polyphenolic compounds; alkaloidal compounds

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612022

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2016)12-0128-06

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 农业部2014年农业行业标准制定和修订项目; 云南省科技惠民专项(农业)重点项目(2014RA054);

云南省科技创新平台建设计划(公共科技服务)项目(2014DA001);

云南省农业科学院农产品质量与食品安全省创新团队计划项目(2015HC025)

作者简介: 邵金良(1979—), 男, 副研究员, 硕士, 研究方向为农产品质量安全与分析检测。E-mail: shaojinliang@126.com

*通信作者: 刘宏程(1975—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为农产品质量安全与风险评估。E-mail: liuorg@163.com

汪禄祥(1966—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为农产品质量安全与品质评价。E-mail: wangluxiang@sina.com.cn

引文格式:

邵金良, 杨东顺, 樊建麟, 等. 高效液相色谱-紫外双波长同时测定咖啡及咖啡制品中10种化合物含量[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 128-133. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612022. <http://www.spkx.net.cn>

SHAO Jinliang, YANG Dongshun, FAN Jianlin, et al. Simultaneous determination of 10 polyphenolic and alkaloidal components in coffee and coffee-based products by HPLC-double wavelength UV detection[J]. Food Science, 2016, 37(12): 128-133. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612022. <http://www.spkx.net.cn>

咖啡 (*Coffea* spp.) 是茜草科 (Rubiaceae)、咖啡属 (*Coffea*) 常绿灌木或小乔木^[1], 与茶叶、可可并称为世界3大饮料, 咖啡具有独特醇厚的香味, 含大量的活性成分而具有减肥、提神醒脑、利尿、抗氧化等保健功效, 被越来越多的消费者所喜爱^[2]。绿原酸 (咖啡酸与奎宁酸形成的酯)、咖啡因和葫芦巴碱是咖啡中独特的次生代谢产物^[3]。咖啡中发现存在多种绿原酸的同分异构体, 具有抗氧化、抗肿瘤、保肝利胆、清除自由基等功效^[4-5]。咖啡含有咖啡因和葫芦巴碱^[6], 咖啡因是一种黄嘌呤生物碱化合物, 又称为1,3,7-三甲基黄嘌呤, 对心脑血管系统、消化系统、肿瘤化疗的生化调节、神经官能症和偏头痛等有一些积极作用^[7-8], 是咖啡中较为重要的风味物质^[9]。葫芦巴碱 (3-碳酸-N-甲基吡啶) 为尼克酸甲基化的产物, 是植物体内的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸代谢或转化而产生的, 具有降血糖、抗肿瘤等作用, 其含量与咖啡品种、生长环境和加工工艺有关^[10-11]。生咖啡豆在焙炒加热过程中, 绿原酸、葫芦巴碱、多糖、脂肪和蛋白质等发生不同程度的美拉德、Strecker降解、焦糖化等化学反应, 生成吡嗪类、呋喃类、吡咯类、吡喃类和吡啶类化合物, 还有大量的醛类、酮类、酚类、酯类、醇类化合物, 这些复杂的化合物形成咖啡的特征风味^[12-14]。

关于葫芦巴碱、绿原酸和咖啡因等化合物的分析国内外均有报道, 检测方法主要有高效液相色谱法^[15-17]、毛细管电泳-电化学检测法^[18-19]、高效液相色谱-质谱法^[20-22]和分光光度法^[23]等。但是采用高效液相色谱法同时测定咖啡及其咖啡制品中葫芦巴碱、绿原酸和咖啡因含量的研究报道比较少。云南具有纬度低、海拔高、昼夜温差大等独特优势, 特别适合咖啡的生长, 其种植的咖啡具有口味层次多样化的优点, 是全国最大的咖啡生产和出口基地^[24-27]。受气候和土壤等环境因素的影响, 不同产地咖啡其葫芦巴碱、咖啡因和绿原酸含量有一定的差异性。本实验采用高效液相色谱-紫外双波长同时测定咖啡及咖啡制品中葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的含量, 方法可为评价咖啡及其相关产品的品质质量提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

速溶咖啡粉购于本地超市; 生咖啡豆和烘焙咖啡豆粉碎后过60目筛, 备用。

葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品 (经高效液相色谱峰面积归一化法测定, 纯度质量分数大于98%) 成都曼思特生物科技有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱级) 德国Merck公司; Millipore-Q超纯水。

e2695-2489高效液相色谱仪 (在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、2489紫外检测器)、Empower 3色谱数据工作站 美国Waters公司; JJ200电子分析天平 江苏省常熟市双杰测试仪器厂; KQ500-E型超声清洗器 江苏昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 高效液相色谱条件

色谱柱为Shiseido CAPCELL PAK MG II C₁₈色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 进样量10.0 μL; 柱温35.0 °C; 葫芦巴碱和咖啡因的检测波长为254 nm, 5-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸检测波长为320 nm; 流动相A为甲醇, 流动相B为0.10%磷酸溶液; 流速1.00 mL/min; 梯度洗脱程序为: 0~20 min, 12%~30% A, 20~50.0 min, 20%~50% A, 50~55 min, 50%~12% A。样品过聚四氟乙烯滤膜后再进样。

1.2.2 对照品溶液的配制

分别准确称取葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的对照品10 mg, 用甲醇溶解并定容至10 mL容量瓶中, 摇匀, 得到单一对照品溶液, 然后分别量取上述对照品溶液1 mL于10 mL容量瓶中并用甲醇定容, 得到绿原酸、5-咖啡酰奎宁酸、4-咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、

4,5-二咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸和1,5-二咖啡酰奎宁酸质量浓度分别为100 mg/L的混合对照品溶液, 4℃储存, 备用。

1.2.3 样品前处理

1.2.3.1 浸泡过夜

称取0.50 g咖啡样品, 置于250 mL具塞锥形瓶中, 加入50 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V), 室温条件下浸泡24 h后, 过0.45 μm滤膜, 待测。

1.2.3.2 振荡提取

称取0.50 g咖啡样品, 置于250 mL具塞锥形瓶中, 加入20 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V), 室温条件下振荡提取30 min, 静置, 将上清液转入25 mL容量瓶中, 样品残渣再用20 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V), 提取1次, 合并2次提取液, 用甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V)定容至25 mL, 过0.45 μm滤膜, 待测。

1.2.3.3 热浸提

称取0.50 g咖啡样品, 置于250 mL具塞锥形瓶中, 加入20 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V), 80℃水浴加热提取30 min, 静置, 将上清液转入25 mL容量瓶中, 样品残渣再用20 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V), 提取1次, 合并2次提取液, 冷却后用甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V)定容至25 mL, 过0.45 μm滤膜, 待测。

1.2.3.4 超声波提取

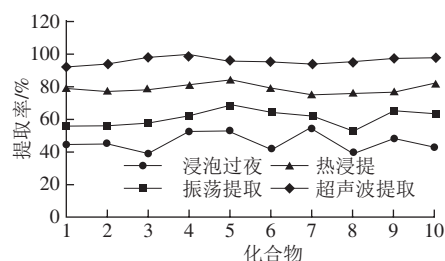
称取0.50 g咖啡样品, 置于250 mL具塞锥形瓶中, 加入20 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V), 室温条件下超声(功率200 W、频率40 kHz)提取10 min, 静置, 转移定容于50 mL容量瓶中; 继续加入20 mL甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V)到250 mL具塞锥形瓶中, 室温条件下超声(功率200 W、频率40 kHz)提取10 min, 静置, 合并滤液到25 mL容量瓶中, 定容, 过0.45 μm滤膜, 待测。

2 结果与分析

2.1 提取条件优化

葫芦巴碱和咖啡因易溶于水, 但绿原酸及其7种同分异构体在水中的溶解度比较小。用流动相作为提取溶剂不仅提取完全, 而且干扰组分少, 溶剂干扰小。因此, 本实验选择用流动相作提取溶剂。采用经过日内和日间稳定性测试得到10种成分固定参考值的焙炒咖啡粉为试样, 分别按照1.2.3节所述4种处理方法提取10种成分并测定其含量, 分别计算其提取率。图1表明: 4种提取方式对10种成分的平均提取率超声波提取(95.59%)>热浸提(78.87%)>振荡提取(60.56%)>浸泡过夜(47.22%)。超声波提取具有快速简单、能耗低、提

取完全等优点; 绿原酸在酸性介质(pH 2.0~4.0)中的稳定性较好, 但在较高温度条件下会加速其分子中酯键的水解^[28], 为保证绿原酸在提取过程中不被破坏且提取完全, 本实验采用2次超声波间歇提取作为10种待测化合物的提取方法。目前测定咖啡中的咖啡因和葫芦巴碱含量, 一般加入轻质氧化镁^[29]、磺基水杨酸或者醋酸锌+亚铁氰化钾作为蛋白沉淀剂。实验发现, 加入蛋白沉淀剂后, 对葫芦巴碱和咖啡因含量影响较小, 但对绿原酸及其同分异构体含量影响比较大, 可能绿原酸不溶于水, 蛋白沉淀剂在沉淀蛋白质过程中, 包裹了绿原酸周围的水不溶性颗粒, 形成了带电大分子胶体, 吸附了绿原酸及其7种同分异构体。所以本实验直接采用甲醇-0.10%磷酸溶液(50:50, V/V)作为提取溶剂, 经0.45 μm水相滤膜过滤后直接上机测定。



1. 葫芦巴碱; 2. 5-咖啡酰奎宁酸; 3. 咖啡因; 4. 绿原酸; 5. 4-咖啡酰奎宁酸; 6. 1,3-二咖啡酰奎宁酸; 7. 1,5-二咖啡酰奎宁酸; 8. 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 9. 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 10. 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

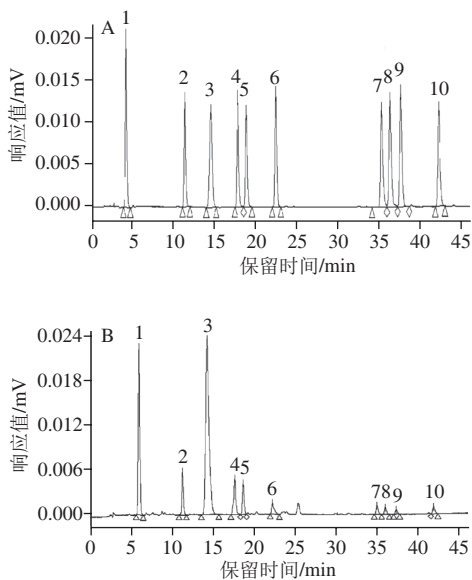
图1 不同提取方法的比较

Fig. 1 Comparison of different extraction methods

2.2 流动相的优化

葫芦巴碱为极性的水溶性酸, 在反相C₁₈柱上有弱的保留。为了提高葫芦巴碱在反相C₁₈柱上的保留, 需要在流动相中添加酸、缓冲盐或者离子对试剂^[11]。绿原酸的同分异构体含多个酚羟基, 溶液呈酸性, 碱性条件易被氧化, 流动相中添加适当的酸性成分, 不仅能防止拖尾改善峰形, 还能抑制其水解和氧化褐变。目前测定绿原酸、咖啡因和葫芦巴碱的流动相有乙腈-磷酸溶液、乙腈-甲酸溶液、甲醇-冰乙酸溶液和甲醇-磷酸溶液等。结果表明: 1) 采用乙腈-磷酸溶液和乙腈-甲酸溶液作为流动相, 流动相中乙腈的比例对8种绿原酸同分异构体的保留行为影响很大, 无论怎么调整乙腈比例, 很难实现1,5-二咖啡酰奎宁酸和3,4-二咖啡酰奎宁酸分离; 2) 采用甲醇-冰乙酸溶液作为流动相, 葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸6种化合物分离效果良好, 但是1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸保留时间延长, 分离效果不好, 峰形差; 3) 采用甲醇-磷酸溶液作为流动相, 10种化合物对磷酸选择性良好, 该色谱条件下, 目标化合物与其他杂峰分离度良

好; 4) 进一步比较甲醇-0.10%磷酸溶液、甲醇-0.20%磷酸溶液和甲醇-0.30%磷酸溶液对10种化合物色谱分离行为的影响, 结果表明, 改变流动相的pH值对葫芦巴碱、咖啡因和绿原酸8种同分异构体的保留时间影响较小, 综合考虑各被测成分的分离效果及色谱峰峰形, 最终确定甲醇-0.10%磷酸溶液结合梯度洗脱程序, 能保证10种待测化合物的完全分离, 基线比较平滑, 10种化合物混合标准溶液和速溶咖啡空白样品的色谱图见图2。



1. 葫芦巴碱; 2. 5-咖啡酰奎宁酸; 3. 咖啡因; 4. 绿原酸; 5. 4-咖啡酰奎宁酸; 6. 1,3-二咖啡酰奎宁酸; 7. 1,5-二咖啡酰奎宁酸; 8. 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 9. 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 10. 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

图2 标准品(A)和速溶咖啡空白样品(B)高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of standards (A) and blank instant coffee (B)

2.3 检测波长的选择

通过配制一定质量浓度的标准溶液, 确定葫芦巴碱和咖啡因的最大吸收波长为254 nm, 5-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸的最大吸收波长320 nm。由于绿原酸的8种同分异构体与葫芦巴碱和咖啡因的最大吸收波长相差比较大, 在波长320 nm处, 低质量浓度的葫芦巴碱和咖啡因紫外吸收很低, 故采用紫外双波长同时检测模式进行分析测定。因分析的10种化合物中, 绿原酸的同分异构体居多, 选择320 nm作为测定的第1检测波长, 5-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和4,5-二咖啡酰奎宁酸也具有较大的吸收, 检测灵敏度足以达到分析要求。以葫芦巴碱和咖啡因的最大吸收波长254 nm作为第2检测波长对葫芦巴碱和咖啡因进行检测。紫外双波长检测技术保证各组分的

含量差别和检测灵敏度, 实现同一色谱条件下不同性质化合物的同时测定和准确定量。

2.4 线性范围、检出限和定量限测定结果

用流动相配制葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸质量浓度均为0.05、0.10、0.50、1.0、2.0、5.0 mg/L和10.0 mg/L的混合标准溶液。在优化后的测定条件下进行测定, 分别以峰目标化合物的峰面积(y)对目标化合物的质量浓度(x)做工作曲线, 葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸在0.05~10.0 mg/L范围内有良好的线性关系, 满足测定的要求。方法的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限见表1。10种化合物在0.10~100.0 mg/L范围内具有良好的线性, 相关系数(r) ≥ 0.999 , 检出限为0.05~0.10 mg/kg, 定量限为0.16~0.28 mg/kg。

表1 线性范围、线性回归方程和相关系数
Table 1 Linear ranges, linear regression equations and correlation coefficients for 10 compounds

分析物	线性范围/(mg/L)	线性方程	相关系数(r)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
葫芦巴碱	0.10~100.0	$y=436.726x-50.137$	0.999 7	0.07	0.20
5-咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=34.056x-26.138$	0.999 8	0.10	0.25
咖啡因	0.10~100.0	$y=42.115x-52.345$	0.999 6	0.05	0.18
绿原酸	0.10~100.0	$y=40.209x-46.487$	0.999 4	0.08	0.23
4-咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=34.139x-41.970$	0.999 3	0.09	0.28
1,3-二咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=41.309x-51.609$	0.999 2	0.07	0.22
1,5-二咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=44.157x-52.428$	0.999 3	0.07	0.20
3,4-二咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=49.367x-63.173$	0.999 1	0.06	0.19
3,5-二咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=50.708x-54.607$	0.999 5	0.05	0.16
4,5-二咖啡酰奎宁酸	0.10~100.0	$y=46.215x-56.620$	0.999 4	0.06	0.20

2.5 回收率与精密度实验结果

表2 方法的回收率和精密度($n=5$)
Table 2 Recovery and precision (RSD) of the method ($n=5$)

分析物	添加量/(mg/kg)	测得量/(mg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
葫芦巴碱	20 40 100	16.14 42.13 106.4	80.70 105.33 106.4	5.67 6.22 4.57
5-咖啡酰奎宁酸	20 40 100	18.63 35.14 112.7	93.15 87.85 112.7	9.10 4.93 5.23
咖啡因	20 40 100	17.32 37.68 94.5	86.60 94.20 94.50	7.34 5.59 6.28
绿原酸	20 40 100	16.60 35.30 85.27	83.00 88.25 85.27	8.26 5.12 3.63
4-咖啡酰奎宁酸	20 40 100	16.00 32.30 113.8	80.00 80.75 113.8	5.66 4.53 6.58
1,3-二咖啡酰奎宁酸	20 40 100	17.93 44.20 99.27	89.67 110.5 99.27	6.08 5.38 6.21
1,5-二咖啡酰奎宁酸	20 40 100	18.23 36.83 106.5	91.17 92.08 106.5	6.96 7.06 4.34
3,4-二咖啡酰奎宁酸	20 40 100	21.20 35.07 83.80	106.0 87.67 83.80	7.57 4.29 6.60
3,5-二咖啡酰奎宁酸	20 40 100	16.80 37.97 85.13	84.00 94.92 85.13	8.66 3.98 5.57
4,5-二咖啡酰奎宁酸	20 40 100	19.57 35.47 95.87	97.83 88.67 95.87	6.99 4.39 5.98

注: 表2测得量为实际测定值减去样品空白含量的值。

对已知10种成分含量的速溶咖啡粉样品进行低、中、高3种不同质量分数(20、40 mg/kg和100 mg/kg)的加标回收实验,每个添加水平做5组平行实验。表2结果表明,10种化合物的回收率为80.00%~113.8%,相对标准偏差为3.63%~9.10%。

2.6 样品测定结果

对收集的3份咖啡及咖啡制品样品,分别测定葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸10种化合物的含量,结果见表3。结果表明,咖啡及咖啡制品中均能检测出10种化合物,生咖啡豆中的10种化合物含量高于焙炒咖啡豆,速溶咖啡粉的含量最低;速溶咖啡粉和焙炒咖啡豆中咖啡因含量较高,生咖啡豆中绿原酸含量较高,咖啡因含量次之。

表3 咖啡及咖啡制品中10种成分的质量分数
Table 3 Contents of 10 components in coffee and processed coffee products
mg/100 g

种类	速溶咖啡粉	焙炒咖啡豆	生咖啡豆
葫芦巴碱	133.25	205.12	960.22
5-咖啡酰奎宁酸	25.58	120.21	636.68
咖啡因	824.15	1 430.2	1 120.5
绿原酸	27.28	171.41	2 747.9
4-咖啡酰奎宁酸	24.59	123.23	874.38
1,3-二咖啡酰奎宁酸	13.37	11.23	34.5
1,5-二咖啡酰奎宁酸	10.49	18.43	198.04
3,4-二咖啡酰奎宁酸	10.11	13.08	183.83
3,5-二咖啡酰奎宁酸	7.92	4.56	26.432
4,5-二咖啡酰奎宁酸	10.19	14.7	168.64

3 结论

建立了生咖啡豆、焙炒咖啡豆、速溶咖啡粉等咖啡及咖啡制品中葫芦巴碱、5-咖啡酰奎宁酸、咖啡因、绿原酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸10种化合物高效液相色谱-紫外双波长测定方法。在保证各化合物充分分离前提下,为缩短分析时间,在Shiseido CAPCELL PAK MG II C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm)上,以甲醇-0.10%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,选择254 nm和320 nm双波长进行目标化合物的检测。10种化合物在0.10~100.0 mg/L范围内具有良好的线性关系,相关系数(r)≥0.999,检出限为0.05~0.10 mg/kg,定量限为0.16~0.28 mg/kg。在20、40、100 mg/kg添加量的加标回收率为80.00%~113.8%,相对标准偏差在3.63%~9.10%之间。采用一次提取和色谱分离双波长进行10种不同性质化合物含量的测定,咖啡及咖啡制品中均能检测出10种化合物,生咖啡豆中的10种化合物含量高于焙炒咖

啡豆,速溶咖啡粉的含量最低;速溶咖啡粉和焙炒咖啡豆中咖啡因含量较高,生咖啡豆中绿原酸含量较高,咖啡因含量次之。本方法具有操作简便、灵敏度高、选择性好、试剂用量少等优点。

参考文献:

- [1] AKIYAMA M, MURAKAMI K, HIRANO Y, et al. Characterization of headspace aroma compounds of freshly brewed arabica coffees and studies on a characteristic aroma compound of ethiopian coffee[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(5): 335-346. DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00752.x.
- [2] PRIFTIS A, STAGOS D, KONSTANTINOPOULOS K, et al. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods[J]. Molecular Medicine Reports, 2015, 12: 7293-7302. DOI:10.3892/mmr.2015.4377.
- [3] KOSHIRO Y, JACKSON M C, KATAHIRA R, et al. Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of coffea arabica and coffee canephora plants[J]. Z Naturforsch C, 2007, 62c: 731-742. DOI:10.1515/znc-2007-9-1017.
- [4] 蔡荣华, 张晓芳, 杜精, 等. 超高效液相色谱-紫外检测法同时测定绿咖啡豆提取物中的绿原酸和咖啡因含量[J]. 中国食品添加剂, 2014(2): 225-228. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2014.02.034.
- [5] WANG Zhihua, LI Xiaoliang, ZHEN Saijing, et al. The important role of quinic acid in the formation of phenolic compounds from pyrolysis of chlorogenic acid[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2013, 114(3): 1231-1238. DOI:10.1007/s10973-013-3142-z.
- [6] 张晓霞, 韦万兴, 王小芬, 等. 绿咖啡豆的抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2014, 39(8): 220-225. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2014.08.049.
- [7] 杨剖舟, 翟晓娜, 杜秉健, 等. 咖啡中功能性成分分离检测技术及安全性评价[J]. 食品科学, 2014, 35(3): 243-252. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201403049.
- [8] RYBAK M E, PAO C I, PFEIFFER C M. Determination of urine caffeine and its metabolites by use of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: estimating dietary caffeine exposure and metabolic phenotyping in population studies[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(3): 771-784. DOI:10.1007/s00216-013-7506-9.
- [9] 吕文佳, 刘云, 杨剖舟, 等. 咖啡主要烘焙风味物质的形成及变化规律[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 394-400. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.03.077.
- [10] ASHIHARA H, LUDWIG I A, KATAHIRA R, et al. Trigonelline and related nicotinic acid metabolites: occurrence, biosynthesis, taxonomic considerations, and their roles in planta and in human health[J]. Phytochemistry Reviews, 2015, 14(5): 765-798. DOI:10.1007/s11101-014-9375-z.
- [11] 刘宏程, 黎其万, 邵金良, 等. 超声波萃取-高效液相色谱测定咖啡粉和速溶咖啡中的葫芦巴碱[J]. 色谱, 2012, 29(11): 1103-1106. DOI:10.3724/SP.J.1123.2011.01103.
- [12] 吕文佳, 翟晓娜, 杨剖舟, 等. 不同烘焙强度对云南咖啡主要挥发香气成分的影响[J]. 食品科学技术学报, 2015, 33(3): 13-21. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2015.03.004.
- [13] 周斌, 任洪涛. 烘焙时间对云南小粒咖啡挥发性成分影响的研究[J]. 现代食品科技, 2015, 35(1): 236-244. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.041.
- [14] 胡荣锁, 初众, 谷凤林, 等. 海南主要地域生咖啡豆挥发性化学成分对比研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(2): 548-553. DOI:10.3964/j.issn.1000-0593(2013)02-0548-06.

- [15] 彭贵龙, 周光明, 秦红英, 等. HPLC法同时测定24种花中的5种活性成分含量[J]. 分析试验室, 2014, 33(6): 646-650. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2014.0151.
- [16] 董丽丽, 李敏, 于玲, 等. 拟反相色谱法测定儿童巧克力食品中的咖啡因含量[J]. 现代食品科技, 2013, 29(7): 1730-1733; 1729. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2013.07.020.
- [17] 王伟, 季晓晖, 李秀峰, 等. HPLC法同时测定茶叶中多酚-咖啡因和维生素C[J]. 分析试验室, 2014, 33(12): 1443-1446. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2014.0335.
- [18] 张兰, 刘远环, 何聿, 等. 毛细管电泳-电化学检测法用于中药石韦中绿原酸和槲皮素的同时测定[J]. 分析测试技术与仪器, 2015, 11(1): 22-27. DOI:10.3969/j.issn.1006-3757.2005.01.006.
- [19] 陈立新, 江帆, 党丽敏, 等. 茶叶和饮料中咖啡因的快速电化学测定[J]. 食品科学, 2014, 35(20): 220-223. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201420044.
- [20] 张盼伟, 赵高峰, 周怀东, 等. 超声波萃取-高效液相色谱-串联质谱同时测定沉积物中10种PPCPs化合物[J]. 中国环境监测, 2014, 30(1): 138-143. DOI:10.3969/j.issn.1002-6002.2014.01.028.
- [21] 梁慧, 朱伟健, 袁智泉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法对疵痧凉茶中18种活性成分的定量分析[J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 558-563. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2015.05.010.
- [22] ALARCÓN-FLORES M I, ROMERO-GONZÁLEZ R, VIDAL J L M, et al. Determination of phenolic compounds in Artichoke, Garlic and Spinach by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(10): 2095-2106. DOI:10.1007/s12161-014-9852-4.
- [23] 高海荣, 陈秀丽, 杨玉珍, 等. 超声萃取-紫外分光法快速测定茶叶中咖啡因[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(1): 73-76. DOI:10.3969/j.issn.1005-6521.2015.08.020.
- [24] 李文伟. 云南咖啡产业发展现状及产业提升对策[J]. 热带农业科技, 2009, 32(4): 19-22. DOI:10.3969/j.issn.1672-450X.2009.04.007.
- [25] 黄家雄, 吕玉兰, 程金焕, 等. 不同海拔对小粒种咖啡品质影响的研究[J]. 热带农业科学, 2012, 32(8): 4-7. DOI:10.3969/j.issn.1009-2196.2012.08.002.
- [26] 李锦红, 周华, 张洪波, 等. 纬度对云南咖啡质量的影响研究[J]. 热带农业科学, 2011, 31(10): 101-104. DOI:10.3969/j.issn.1009-2196.2011.10.024.
- [27] 杨旸, 左艳秀, 毕晓菲. 云南小粒咖啡荫蔽栽培模式优势及措施[J]. 中国热带农业, 2015(2): 37-38; 23. DOI:10.3969/j.issn.1673-0658.2015.02.011.
- [28] 董丽, 孙祥德, 李琴. 高效液相色谱双波长检测法测定维C银翘片中4种组分的含量[J]. 色谱, 2010, 28(2): 204-208.
- [29] 胡双芳, 卫亚西, 邢精精, 等. 咖啡豆的化学组分差异与感官品质的相关性分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 125-129; 134. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2013.24.057.