

doi: 10.12452/j.fxcxb.25123001

# 分散固相萃取结合UPLC-MS/MS检测烘焙咖啡中19种化学成分

陈彦龙<sup>1,2</sup>, 吴兴强<sup>2</sup>, 陈保<sup>3</sup>, 智童心<sup>2</sup>, 伍旭东<sup>3</sup>, 仝凯旋<sup>2</sup>, 谢瑜杰<sup>2</sup>,  
史孟杰<sup>2</sup>, 石志红<sup>1</sup>, 张红医<sup>1\*</sup>, 陈辉<sup>2\*</sup>

(1. 河北大学 化学与材料科学学院, 河北 保定 071002; 2. 中国质量检验检疫科学研究院, 北京 100176;  
3. 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), 云南 普洱 665099)

**摘要:** 建立了一种基于分散固相萃取结合超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(d-SPE/UPLC-MS/MS)同时测定烘焙咖啡中19种化学成分的方法。咖啡样品经提取和净化处理后, 以0.01%甲酸水溶液和0.01%甲酸甲醇为流动相, 采用Kinetex PFP(100 mm×3 mm, 2.6 μm)色谱柱可在6 min内实现分离。结果显示, 19种化合物在0.2~5 000 μg/L范围内均呈良好线性关系( $r^2>0.995$ ), 除苹果酸外(LOD为100 μg/L, LOQ为200 μg/L), 其他18种化合物的检出限(LOD)和定量下限(LOQ)分别为0.1~20 μg/L和0.2~50 μg/L。3个浓度水平的加标回收率为73.2%~111%, 相对标准偏差为1.4%~11%。方法成功应用于云南21批不同处理组合(品种×加工方式×烘焙程度)的咖啡样品检测, 并结合主成分分析(PCA)进行统计分析。该方法灵敏且可检测多种成分, 为优质咖啡加工生产提供了理论支撑。

**关键词:** 咖啡; 化学成分; 分散固相萃取; UPLC-MS/MS; 主成分分析

**中图分类号:** O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)05-0970-10

## Detection of 19 Chemical Components in Coffee by Dispersed Solid Phase Extraction Combined with UPLC-MS/MS

CHEN Yan-long<sup>1,2</sup>, WU Xing-qiang<sup>2</sup>, CHEN Bao<sup>3</sup>, ZHI Tong-xin<sup>2</sup>, WU Xu-dong<sup>3</sup>, TONG Kai-xuan<sup>2</sup>,  
XIE Yu-jie<sup>2</sup>, SHI Meng-jie<sup>2</sup>, SHI Zhi-hong<sup>1</sup>, ZHANG Hong-yi<sup>1\*</sup>, CHEN Hui<sup>2\*</sup>

(1. College of Chemistry and Materials Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. China Academy of Quality and Inspection & Testing, Beijing 100176, China; 3. Technology Innovation Center of Coffee Quality Base and Industry Services for State Market Regulation, Pu'er 665099, China)

**Abstract:** A detection method based on dispersive solid phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (d-SPE/UPLC-MS/MS) was established for the simultaneous determination of 19 chemical components in roasted coffee. This method compared the effects of solvent type, feed-to-solvent ratio, solvent pH value, ascorbic acid concentration, ultrasonication time, and the type and amount of adsorbent used as the packing material for sample purification. The optimal experimental conditions selected were a solid-liquid ratio of 1 : 10, with 70% ethanol aqueous solution at pH 2 as the extraction solvent, the ascorbic acid concentration was 5 mg/mL, ultrasound time of 60 minutes, and purification packing consisting of 60 mg octadecylsilane (C<sub>18</sub>), 30 mg diatomaceous earth (DE), and 20 mg primary secondary amine (PSA). Using a 0.01% formic acid aqueous solution and a 0.01% formic acid methanol as the mobile phase, separation was achieved within 6 minutes using a Kinetex PFP column (100 mm×3 mm, 2.6 μm). The validation results demonstrated an excellent linear relationship for all 19 compounds across the concentration range of 0.2~5 000 μg/L ( $r^2>0.995$ ). The verification results show that, with the exception of malic acid (LOD is 100 μg/L; LOQ is 200 μg/L), the limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for the other 18 compounds range from 0.1 to 20 μg/L and 0.2 to 50 μg/L, respective-

收稿日期: 2025-12-30; 修回日期: 2026-03-10

基金项目: 中国质检院基本科研业务费项目(2024JK005); 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)开放课题(CXZX202501)

\* 通讯作者: 张红医, 博士, 教授, 研究方向: 分离科学及食品安全, E-mail: hyzhang@hbu.edu.cn  
陈辉, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品质量安全检测, E-mail: ciqhuichen@163.com

网络首发日期: 2026-03-24

ly. The recoveries for spiked samples at three concentration levels ranged from 73.2% to 111%, with relative standard deviations ranging from 1.4% to 11%. This method was applied to the analysis of 21 batches coffee samples from Yunnan with different processing combinations (variety×processing method×roasting degree), and combined with principal component analysis (PCA) for statistical analysis. The results indicated that among the measured chemical components, Yellow Bourbon has the highest total sum, in addition, the content of the majority of phenolic acids contained in coffee beans tends to decrease gradually as the degree of roasting increases. For the part of flavonoids, which mainly include catechin and epicatechin, tends to increase steadily with the degree of roasting. This research not only provides a specific technical method for detecting chemical components in Yunnan coffee but also offers reliable theoretical support for the processing procedures and production practices of high-quality coffee.

**Key words:** coffee; chemical components; dispersed solid phase extraction; UPLC-MS/MS; principal component analysis

咖啡作为世界三大饮品之一,原产于非洲中北部的埃塞俄比亚,于19世纪末引入中国<sup>[1]</sup>。2024年中国咖啡产量达15.23万吨,其中云南总产量15.02万吨,占全国的98.62%<sup>[2-3]</sup>。云南种植的咖啡超过90%为小粒咖啡(阿拉比卡),因其优异的风味和口感而受到消费者的青睐<sup>[4]</sup>。咖啡含有多种化学成分,如生物碱类的咖啡因、酚酸类的绿原酸和阿魏酸、黄酮类的槲皮素等<sup>[5]</sup>。近年来,咖啡化学成分研究持续增加,有研究报道咖啡因具有镇痛和增强记忆效果,并能降低阿尔茨海默病患病风险<sup>[6]</sup>;酚酸类成分具有抗氧化、抗炎等作用<sup>[7]</sup>;黄酮类成分具有抗氧化、抗肿瘤等功能<sup>[8-9]</sup>;咖啡提取物对某些癌症具有潜在治疗作用,并能降低II型糖尿病患病风险<sup>[10]</sup>。

咖啡豆的传统初加工方式包括日晒、水洗和蜜处理3种<sup>[11]</sup>,经烘焙后成为商品化咖啡豆。咖啡中的化学成分受加工方式影响,Arruda等<sup>[11]</sup>研究发现巴西咖啡豆经水洗处理后,葫芦巴碱和绿原酸的含量较高;Duarte等<sup>[12]</sup>对比了水洗和蜜处理两种加工方式,发现水洗方式下巴西咖啡中绿原酸和葫芦巴碱的含量显著更高,与Arruda等<sup>[11]</sup>研究结果一致。烘焙程度对咖啡化学成分的影响同样显著,Cwиковá等<sup>[13]</sup>研究表明咖啡烘焙程度的增加与绿原酸含量呈负相关;Wu等<sup>[14]</sup>也指出绿原酸由于热不稳定性,会随烘焙程度的增加降解成不同的化合物。尽管现有研究表明咖啡中的化学成分(如绿原酸等)受品种、加工方式及烘焙程度等因素影响,然而对不同处理组合(品种×加工方式×烘焙程度)下咖啡中化学成分变化仍缺乏系统研究。

咖啡化学成分的常用检测方法包括分光光度法<sup>[15]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[16]</sup>和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[17]</sup>。HPLC-MS/MS可同时检测多组分、灵敏度高且定量精准,在化学成分检测中具有优势。复杂基质的主要净化方法包括固相萃取(SPE)和分散固相萃取(d-SPE),其中d-SPE具有溶剂用量少、净化时间短等优点。Nicácio等<sup>[18]</sup>测定3种芥菜籽中酚类和黄酮类成分时,通过优化确定硅藻土、Strata-X-A和N-丙基乙二胺作为d-SPE吸附剂;Sun等<sup>[19]</sup>测定铁皮石斛中17种黄酮类成分时,发现C<sub>18</sub>吸附剂对黄酮吸附弱,能减少目标物损失。

本研究采用d-SPE结合UPLC-MS/MS建立了咖啡中19种化学成分(生物碱、酚酸类、黄酮和有机酸)的检测方法,以评价云南咖啡在不同处理组合(品种×加工方式×烘焙程度)下的成分变化。并通过主成分分析(PCA)区分不同处理组合,考察其对咖啡化学成分的影响。该研究为云南咖啡化学成分测定提供了更灵敏的技术手段,并为优质咖啡的加工与生产提供了理论支持。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与设备

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪配有 Xevo TQ-S cronos 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司);KQ-500B 超声波清洗器(中国昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);Allegra X-30R 离心机(美国 Beckman Coulter 公司);MS204S 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 化学品与试剂

19种化合物分析标准品(纯度均大于97%,天津阿尔塔科技有限公司)。甲酸(质谱级,美国

Honeywell 公司), 甲醇(色谱级和质谱级, 美国 Thermo Fisher 公司), 37% 盐酸、无水乙醇(分析纯)、十八烷基键合硅胶(C<sub>18</sub>)、N-丙基乙二胺(PSA)、硅藻土(DE)(上海安谱实验科技股份有限公司)。

### 1.3 标准溶液的配制

用甲醇制备质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备溶液。准确移取 12 种化学成分的标准储备溶液于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀配制成 20 mg/L 低含量化学成分的混合标准储备液; 浓度为基质本底含量的 7 种高含量化学成分混合标准储备液配制同上。上述溶液置于 4 °C 密闭棕色容量瓶中可稳定保存 3 个月, 使用时稀释成所需浓度的工作储备液。

### 1.4 样品制备

所有样品均采自云南省, 包括 3 种阿拉比卡咖啡(卡蒂姆、黄波旁、萨奇姆)、3 种加工方式(水洗、日晒、蜜处理)和 3 种烘焙程度(浅度、中度、深度), 共制备 21 个批次, 由于条件限制, 蜜处理只涉及卡蒂姆品种, 样品清单见表 1。所有样品经研磨处理后过 24 目筛, 分装于密封袋中, 置于 -20 °C 低温保存。

表 1 21 批次咖啡样品采集清单

Table 1 List of 21 batches of collected coffee samples

No.	Variety	Processing method	Roasting degree	No.	Variety	Processing method	Roasting degree
1	卡蒂姆	水洗	浅度	12	黄波旁	水洗	深度
2	卡蒂姆	水洗	中度	13	黄波旁	日晒	浅度
3	卡蒂姆	水洗	深度	14	黄波旁	日晒	中度
4	卡蒂姆	日晒	浅度	15	黄波旁	日晒	深度
5	卡蒂姆	日晒	中度	16	萨奇姆	水洗	浅度
6	卡蒂姆	日晒	深度	17	萨奇姆	水洗	中度
7	卡蒂姆	蜜处理	浅度	18	萨奇姆	水洗	深度
8	卡蒂姆	蜜处理	中度	19	萨奇姆	日晒	浅度
9	卡蒂姆	蜜处理	深度	20	萨奇姆	日晒	中度
10	黄波旁	水洗	浅度	21	萨奇姆	日晒	深度
11	黄波旁	水洗	中度				

### 1.5 前处理方法

冷冻咖啡粉放至室温后, 称取 1 g(精确至 0.01 g)至 50 mL 离心管中, 依次加入 50 mg 抗坏血酸、10 mL 70% 乙醇水溶液(体积比 70 : 30, pH=2)和一颗陶瓷均质子, 在室温下以 40 kHz 超声 60 min(功率 500 W), 离心(4 200 r/min)5 min。取 2 mL 上清液于装有 60 mg C<sub>18</sub>、30 mg DE、20 mg PSA 的 15 mL 离心管中净化, 涡旋 30 s 后以 4 200 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 待测定。用 70% 乙醇水溶液(70 : 30, pH=2)将样品稀释 400 倍后, 过 0.22 μm 滤膜, 以检测含量较高的化合物(如咖啡因、葫芦巴碱和绿原酸); 样品直接通过 0.22 μm 滤膜, 用于分析含量相对较低的化学成分。

### 1.6 仪器分析

**1.6.1 色谱条件** 色谱柱: Kinetex PFP 分析柱(100 mm×3 mm, 2.6 μm); 柱温: 初始温度 30 °C; 进样体积: 2 μL; 流动相: A 为 0.01% 甲酸水溶液, B 为 0.01% 甲酸甲醇; 流速为 0.3 mL/min。梯度洗脱程序: 0~1.5 min, 10%~40% B; 1.5~2 min, 40%~70% B; 2~2.5 min, 70%~80% B; 2.5~6 min, 80% B; 6~6.5 min, 80%~100% B; 6.5~8.5 min, 100% B; 8.5~9 min, 100%~10% B; 9~14 min, 10% B。

**1.6.2 质谱条件** 电喷雾离子源, 正/负离子扫描(ESI+/ESI-), 离子源温度: 150 °C; 电喷雾电压: 2.0 kV; 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂气流速: 800 L/h; 锥孔气流速: 50 L/h; 多反应监测(MRM)模式检测。19 种化合物的分子式和质谱参数见表 2。

### 1.7 方法学验证

在最优条件下, 根据 AOAC 膳食补充剂和植物性食品验证指南<sup>[20]</sup>和 GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》<sup>[21]</sup>对方法学参数进行验证, 包括检出限(LOD)、定量下限(LOQ)、线性范围、正确度、精密度等。通过测定不同质量浓度的标准溶液建立溶剂标准曲线, 并以 3 倍信噪比(S/N=3)和 10 倍信噪比(S/N=10)分别确定 LOD 和 LOQ。使用质控样品(取相同质量的“1.4”中 21 批咖啡样品混合、制粉、过筛获得)进行基质添加实验, 3 个添加水平分别为基质本底含量的 80%、100%、120%(若未检出, 则选择 LOQ 的 80%、100%、120%), 进行 6 次平行测定, 评价方法的正确度和

精密度。

表2 19种化合物的分子式和质谱参数

Table 2 Molecular formulas and mass spectrometry parameters of 19 compounds

No.	Compound	Molecular formula	Retention time/min	Ion pair( <i>m/z</i> )	Collision energy/eV	Cone voltage/V	Polarity
Alkaloid(2)							
1	Trigonelline	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	1.58	137.9/92.0*, 137.9/94.0	19, 19	30	Positive
2	Caffeine	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4.38	195.0/138.0*, 195.0/110.0	19, 23	39	Positive
Phenolic acid(10)							
3	<i>trans</i> -Cinnamic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	5.09	149.0/131.0*, 149.0/103.0	7, 17	20	Positive
4	<i>p</i> -Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	4.65	163.1/119.0*, 163.1/93.1	10, 25	30	Negative
5	Vanillic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4.43	166.9/151.9*, 166.9/109.8	12, 18	35	Negative
6	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4.42	178.9/135.0*, 178.9/106.9	14, 25	25	Negative
7	Quinic acid	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1.43	191.3/84.8*, 191.3/92.8	18, 19	30	Negative
8	Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	4.88	192.8/177.8*, 192.8/134.0	11, 15	25	Negative
9	Chlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	4.20	353.0/150.9*, 353.0/178.5	13, 40	26	Negative
10	Neochlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	3.99	353.0/179.0*, 353.0/191.0	14, 12	40	Negative
11	Isochlorogenic acid A	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	4.45	515.0/353.0*, 515.0/191.0	13, 33	35	Negative
12	Gallic acid	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	3.47	169.0/125.0*, 169.0/50.7	12, 29	30	Negative
Flavonoids(6)							
13	(-)-Epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	4.29	289.0/125.0*, 289.0/109.0	27, 24	46	Negative
14	(+)-Catechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	4.14	289.0/125.0*, 289.0/109.0	30, 18	15	Negative
15	Quercetin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	5.87	301.0/150.9*, 301.0/178.5	21, 17	35	Negative
16	Quercitrin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	4.87	447.0/300.5*, 447.0/150.9	24, 37	20	Negative
17	Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	4.65	609.1/300.0*, 609.1/270.9	36, 59	27	Negative
18	Hyperoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	4.70	463.0/301.0*, 463.0/271.0	23, 30	27	Negative
Organic acid(1)							
19	Malic acid	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	1.60	133.0/115.0*, 133.0/71.0	10, 14	20	Negative

\*: quantitative ions

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器分析条件的优化

通过优化锥孔电压和碰撞能量获得19种目标化合物最高响应信号的离子对,选择响应最强的两个子离子分别作为定量离子和定性离子。19种化合物同时在动态MRM模式下分析,咖啡因、葫芦巴碱和反式肉桂酸的前体离子为正离子模式的质子化分子[M+H]<sup>+</sup>;其他化合物为负离子模式的去质子分子[M-H]<sup>-</sup>。在MRM模式下,以1 mg/L混合标准溶液考察了水/乙腈、水/甲醇两种流动相体系中添加甲酸与不添加甲酸时化合物的出峰行为。结果显示,水相和有机相中均加入0.01%甲酸可显著改善绿原酸和新绿原酸的峰形,所有目标化合物的响应值和峰形达到最优。绿原酸因含有羧基和羟基,加入甲酸可提高离子化效率,但甲酸浓度过高会影响目标化合物与固定相间的相互作用<sup>[22]</sup>。因此采用0.01%甲酸水溶液/0.01%甲酸甲醇作为流动相。在优化条件下,19种化学成分混合标准溶液的总离子流图见图1。

### 2.2 样品前处理优化

根据预实验,咖啡中19种化学成分按含量分为7种高含量化合物(>10 mg/kg):咖啡因、葫芦巴碱、绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、奎宁酸和苹果酸;12种低含量化合物(<10 mg/kg):反式肉桂酸、对香豆酸、香草酸、阿魏酸、咖啡酸、没食子酸、(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素、槲皮素、槲皮苷、金丝桃苷和芦丁。以“累积峰面积标准化”值<sup>[23]</sup>或基质加标回收率(低含量化合物回收率为70%~120%,高含量化合物为90%~105%)为评价指标,对样品前处理条件进行优化。低含量化合物添加水

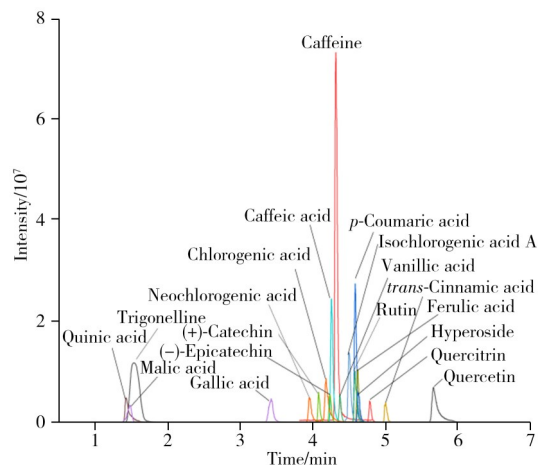


图1 19种化学成分标准溶液的总离子流图(TIC)  
Fig. 1 Total ion chromatogram of standard solution of 19 chemical components

平为 2.5 mg/kg, 高含量化合物为基基本含量的 1 倍浓度。

**2.2.1 提取溶剂及 pH 值优化** 比较了甲醇、乙醇、70%乙醇水溶液和 70%甲醇水溶液 4 种溶剂对 19 种目标化合物的提取效果。结果显示, 以 70%乙醇水溶液为提取溶剂时, 所有化合物的回收率均符合要求。因此, 选择 70%乙醇水溶液进行后续实验。随后评估了不同料液比下 70%乙醇水溶液的提取性能。结果表明, 当料液比为 1:10 时, 19 种化合物的回收率均在 70%~120% 之间。因此, 选择料液比为 1:10。

由于部分化学成分易在不同 pH 环境中降解(如酚类和黄酮类化合物<sup>[24-25]</sup>), 本研究以 1 mol/L 盐酸作为 pH 调节剂, 考察了提取溶剂 pH 值对提取性能的影响。图 2A 结果显示, pH 值为 2 时黄酮类化合物的含量显著提高, 所有化合物的回收率均符合要求, 且酚酸类和有机酸类的归一化响应较未调节 pH 值组更高。因此, 选择 pH 值为 2。

**2.2.2 抗坏血酸用量及超声时间优化** 抗坏血酸凭借其强还原性可防止样品中酚酸降解<sup>[26]</sup>。本研究评估了抗坏血酸添加浓度(0~10 mg/mL)对 19 种化合物回收率及峰面积的影响。结果显示, 抗坏血酸添加浓度为 5 mg/mL 时, 酚酸类和黄酮类化合物的峰面积较不添加组明显提高, 且达到最大值, 所有化合物的回收率均符合要求。因此, 选择 5 mg/mL 抗坏血酸为最佳浓度。

超声通过破坏细胞壁结构提高提取效率, 研究发现超声时间显著影响植物化学成分的提取效率<sup>[27]</sup>。本研究考察了超声时间对 19 种化学成分提取效率的影响。结果显示, 超声 30 min 时, 反式肉桂酸的回收率偏低(<70%), 延长至 90 或 120 min 时, 黄酮类化合物的含量下降, 可能因超声时间过长导致黄酮类化合物降解, 这与 Zhou 等<sup>[28]</sup>的结果类似。超声 60 min 时提取效果最佳, 所有化合物的回收率均符合要求, 因此选择超声时间为 60 min。

**2.2.3 净化填料的优化** C<sub>18</sub> 可去除非极性基质成分和油脂, PSA 可吸附脂肪酸和糖类, 而 DE 能吸附糖类、氨基酸和色素。以 C<sub>18</sub>、DE 和 PSA 作为净化填料, 考察了其用量对 19 种化学成分峰面积和回收率的影响。结果表明, 加入 60 mg C<sub>18</sub> 时酚酸类的峰面积最高(图 2B); 加入 30 mg DE 时生物碱、酚酸类和黄酮类的峰面积提高(图 2C); 加入 20 mg PSA 时酚酸类和黄酮类的峰面积最大(图 2D)。虽然净化填料对回收率无显著影响, 但相比于未净化样品, 咖啡中酚酸和黄酮类等重要化合物的含量提升。因此, 选用 60 mg C<sub>18</sub>、30 mg DE 和 20 mg PSA 作为净化填料。

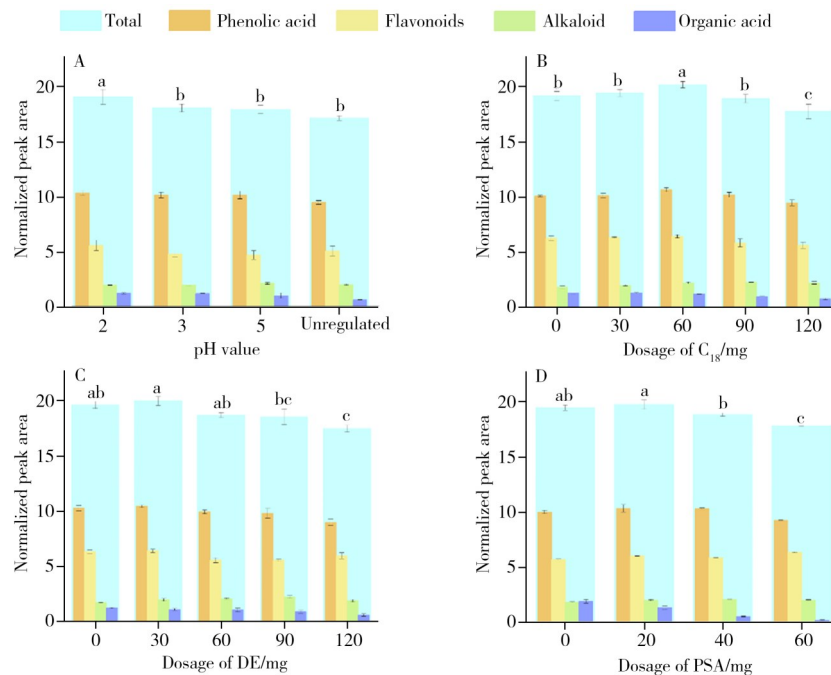


图 2 pH 值(A)、C<sub>18</sub>(B)、DE(C)和 PSA(D)对四类化合物归一化峰面积值的影响( $n=3$ )

Fig. 2 The effects of pH value(A), C<sub>18</sub>(B), DE(C) and PSA(D) on the normalized peak area values of four types of compounds( $n=3$ )

a, b, c are significance letters

### 2.3 方法学验证

基质效应(ME)反映共提取化合物对分析物信号的影响,计算公式为:ME=(基质加标峰面积-基质空白峰面积/溶剂峰面积)×100%<sup>[5]</sup>。ME=100%表示无基质效应,ME>100%为基质增强效应,ME<100%为基质抑制效应。本研究中7种高含量化合物的ME为86.6%~116%,基质效应可忽略,且仅新绿原酸和异绿原酸A表现出基质增强效应;12种低含量化合物的ME为6.09%~20.6%,表现为基质抑制效应。因此,采用基质匹配标准溶液以降低基质效应的影响。

在最佳条件下,验证了所建方法的线性范围、检出限和定量下限。如表3所示,所有化合物在0.2~5 000 μg/L范围内线性关系良好,相关系数( $r^2$ )均大于0.995。除苹果酸外(LOD为100 μg/L, LOQ为200 μg/L),其他18种化合物的LOD为0.1~20 μg/L, LOQ为0.2~50 μg/L。

表3 19种化学成分的线性关系、检出限和定量下限

Table 3 Linear relations, LODs, and LOQs of 19 chemical compounds

No.	Compound	Linear range/(μg·L <sup>-1</sup> )	$r^2$	LOD/(μg·L <sup>-1</sup> )	LOQ/(μg·L <sup>-1</sup> )
1	Trigonelline	0.2~5 000	0.996 2	0.1	0.2
2	Caffeine	5~5 000	0.997 6	2	5
3	<i>trans</i> -Cinnamic acid	10~5 000	0.997 1	5	10
4	<i>p</i> -Coumaric acid	5~5 000	0.996 7	2	5
5	Vanillic acid	2~5 000	0.995 2	1	2
6	Caffeic acid	10~5 000	0.999 0	5	10
7	Quinic acid	50~5 000	0.999 4	20	50
8	Ferulic acid	2~5 000	0.997 0	1	2
9	Chlorogenic acid	20~5 000	0.999 8	10	20
10	Neochlorogenic acid	20~5 000	0.999 0	10	20
11	Isochlorogenic acid A	20~5 000	0.996 1	10	20
12	Gallic acid	10~2 000	0.997 5	5	10
13	(-)-Epicatechin	10~5 000	0.998 5	5	10
14	(+)-Catechin	5~5 000	0.999 4	2	5
15	Quercetin	5~2 000	0.997 4	2	5
16	Quercitrin	5~5 000	0.998 1	2	5
17	Hyperside	5~5 000	0.998 5	2	5
18	Rutin	2~5 000	0.996 4	1	2
19	Malic acid	200~5 000	0.995 1	100	200

通过基质添加实验评价方法的正确度和精密度,分别在质控样品基质本底含量的80%、100%、120%(若未检出,则选择LOQ的80%、100%、120%)3个添加水平下计算目标化合物的回收率和相对标准偏差(RSD)。由表4可见,3个水平的回收率为73.2%~111%,RSD为1.4%~11%。通过在1天内和连续3天内重复分析6次来验证方法日内、日间精密度,结果以RSD展示,日内精密度RSD为1.8%~8.6%,日间精密度RSD为2.3%~12%。

表4 19种化学成分的回收率、日内精密度及日间精密度( $n=6$ )

Table 4 Recoveries and intra-day precision, inter-day precision for 19 chemical compounds( $n=6$ )

No.	Compound	Original/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Added/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Measured/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Recovery/%	RSD/%	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%
1	Trigonelline	5 964.18	4 771.34	10 696.40	99.2	2.4	2.9	4.6
			5 964.18	11 702.31	96.2	3.7		
			7 157.01	13 353.79	103	4.1		
2	Caffeine	10 183.46	8 146.77	18 225.14	98.7	2.5	3.5	2.3
			11 786.16	22 198.28	101	2.1		
			14 143.39	23 942.16	97.3	3.1		
3	<i>trans</i> -Cinnamic acid	1.05	0.84	1.87	98.7	3.4	4.0	5.7
			1.05	1.99	99.7	5.7		
			1.25	2.33	111	7.3		
4	<i>p</i> -Coumaric acid	0.64	0.51	1.10	88.6	2.6	4.5	7.8
			0.64	1.23	97.9	4.4		
			0.77	1.33	94.7	5.0		
5	Vanillic acid	3.85	3.08	6.78	95.5	4.8	7.0	8.2
			3.85	7.93	102	5.9		
			4.61	9.06	110	6.8		

(续表 4)

No.	Compound	Original/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Added/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Measured/(mg·kg <sup>-1</sup> )	Recovery/%	RSD/%	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%
6	Caffeic acid	7.45	5.96	12.65	87.2	8.2	2.6	6.7
			7.45	14.56	95.4	7.1		
			8.94	15.17	86.4	4.9		
7	Quinic acid	1 619.71	1 295.77	2 816.74	92.3	4.5	1.9	4.0
			1 619.71	3 276.53	92.9	4.5		
			1 943.65	3 669.63	97.7	1.4		
8	Ferulic acid	4.88	3.90	8.42	90.7	3.6	6.2	9.8
			4.88	8.97	81.0	3.7		
			5.85	9.97	84.5	2.9		
9	Chlorogenic acid	6 679.58	5 343.67	11 899.27	97.7	2.7	1.8	4.9
			6 679.58	13 856.85	102	2.8		
			8 015.50	14 960.32	99.5	3.5		
10	Neochlorogenic acid	3 256.03	2 604.83	5 713.17	94.3	3.2	2.4	3.8
			3 256.03	6 146.16	92.3	4.2		
			3 907.24	6 955.74	97.7	3.5		
11	Isochlorogenic acid A	209.27	167.41	382.94	104	4.4	3.0	2.6
			209.27	435.46	106	2.5		
			251.12	473.19	104	4.1		
12	Gallic acid	0.18	0.14	0.29	78.4	7.8	7.6	12
			0.18	0.36	84.3	4.1		
			0.21	0.40	88.0	7.1		
13	(-)-Epicatechin	5.39	4.31	9.09	85.7	8.6	5.1	11
			5.39	10.10	81.6	4.9		
			6.47	11.63	91.6	7.4		
14	(+) -Catechin	6.74	5.39	10.68	73.2	5.3	3.8	6.2
			6.74	12.51	89.3	2.3		
			8.09	14.28	96.2	9.5		
15	Quercetin	-	4.00	3.71	92.7	4.1	6.7	9.1
			5.00	4.80	96.0	5.1		
			6.00	5.47	91.2	5.8		
16	Quercitrin	-	4.00	3.06	76.5	3.1	4.3	7.1
			5.00	4.12	82.4	6.5		
			6.00	5.45	90.8	10		
17	Hyperoside	-	4.00	3.10	77.5	11	8.6	9.2
			5.00	3.80	76.0	9.5		
			6.00	5.02	83.6	7.6		
18	Rutin	-	1.60	1.40	87.5	4.7	6.5	8.9
			2.00	1.92	95.8	7.8		
			2.40	2.29	95.5	6.7		
19	Malic acid	495.62	396.50	898.94	101	4.0	2.0	3.8
			495.62	995.35	97.7	3.5		
			594.74	1 067.91	93.6	4.2		

\*: not detected, the spiked levels were 0.8, 1, and 1.2 times LOQ

## 2.4 与其他方法的比较

将本方法与其他文献报道的方法进行比较。如表 5 所示, 绿原酸、没食子酸、香草酸和反式肉桂酸对比 Angeloni 等<sup>[29]</sup>报道的方法, 本方法具有更低的定量下限, 且前处理时间更短, 效率更高。此外, 本方法的 LOD 和 LOQ 显著低于 Rodrigues<sup>[30]</sup>和 Santanatoglia 等<sup>[16]</sup>报道的方法。本研究黄酮类化合物(如芦丁、槲皮素等)的 LOQ 与 Mustafa 等<sup>[5]</sup>和 Santanatoglia 等<sup>[31]</sup>的方法相近, 但本方法前处理更简便, 分析化合物种类更多。综上, 本方法对部分化合物表现出更高的灵敏度, 平均回收率良好, 且可同时检测咖啡中生物碱、酚酸、黄酮和有机酸, 具有独特优势。

## 2.5 不同品种咖啡豆化学成分分析

采用本方法对云南咖啡不同处理组合(品种×加工方式×烘焙程度)的样品进行化学成分检测, 归一化含量热图见图 3。结果显示, 黄波旁×日晒×浅度烘焙的化学成分总含量最高, 且其绿原酸含量高于其他品种。但方差分析(ANOVA)事后检验表明, 不同品种间的绿原酸、葫芦巴碱、奎宁酸、咖啡酸及

对香豆酸含量均无统计学显著差异。在差异显著的成分中, 萨奇姆的咖啡因和反式肉桂酸含量显著高于黄波旁和卡蒂姆( $p < 0.05$ )。对于新绿原酸、异绿原酸A、阿魏酸、儿茶素和表儿茶素含量, 萨奇姆与黄波旁均显著高于卡蒂姆( $p < 0.05$ )。此外, 黄波旁的没食子酸和香草酸含量也显著高于其他两个品种( $p < 0.05$ )。综上所述, 本研究中萨奇姆的咖啡因等部分关键化学成分含量显著较高, 而黄波旁则在化学成分总含量及部分特定酚酸(如没食子酸、香草酸)上表现出优势。

表5 与文献报道的咖啡化学成分测定方法比较

Table 5 Comparison with reported methods for the determination of chemical components in coffee

Method	Instrument	Compounds	LOD /( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	LOQ /( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Recovery/%	Ref.
Acid hydrolysis(90 min)	HPLC-MS/MS	Rutin, Hyperoside, Quercitrin, Quercetin	0.2~1.7	1~5	78.7~86.0	[5]
SPE	HPLC-DAD	Chlorogenic acid, <i>trans</i> -Cinnamic acid, Neochlorogenic acid, Trigonelline, Caffeine, <i>p</i> -Coumaric acid	180~240	600~800	41.7~98.6	[30]
UAE(120 min)	HPLC-MS/MS	Chlorogenic acid, Vanillic acid, Gallic acid, <i>trans</i> -Cinnamic acid	20~50	50~200	91.0~101.2	[29]
Carrez solution	HPLC-DAD	Chlorogenic acid, Neochlorogenic acid, Trigonelline, Caffeine, <i>p</i> -Coumaric acid, Caffeic acid	10~3 770	40~11 420	90.0~104.0	[16]
Acid hydrolysis(90 min)	HPLC-MS/MS	Rutin, Hyperoside, Quercitrin, Quercetin	0.64~1.09	1.94~3.27	76.0~95.0	[31]
UAE-d-SPE	UPLC-MS/MS	Alkaloid(2), Phenolic acid(10), Flavonoids(6), Organic acid(1)	0.1~20*	0.2~50*	73.2~111	This work

\*: LOD of malic acid is 100  $\mu\text{g/L}$ , and LOQ is 200  $\mu\text{g/L}$

## 2.6 不同加工方式咖啡豆的化学成分分析

本研究比较了不同加工方式对咖啡豆化学成分的影响。总体而言, 儿茶素、奎宁酸、反式肉桂酸和香草酸的含量在水洗和日晒两种加工方式中均呈现显著差异( $p < 0.05$ )。以卡蒂姆品种为例, 水洗处理的苹果酸含量显著高于其他加工方式, 该结果与Happyana等<sup>[32]</sup>的研究一致。然而, 对于绿原酸与新绿原酸, 尽管水洗处理的含量最高, 但3种加工方式之间均无显著性差异( $p > 0.05$ )。综合图3分析, 水洗处理在卡蒂姆品种中表现出更优潜力; 黄波旁品种的特征性成分则在日晒处理下总含量更高; 而萨奇姆品种对水洗和日晒方式均表现出广泛适应性。以上发现与部分既往研究中“水洗法普遍最优”的结论不同, 推测可能与本研究采用的咖啡豆品种、地理来源不同有关。

## 2.7 不同烘焙方式咖啡豆的化学成分分析

在不同烘焙程度下, 绿原酸、新绿原酸、异绿原酸A、葫芦巴碱、咖啡酸和对香豆酸的含量均存在显著差异( $p < 0.05$ )。大部分酚酸类成分(如绿原酸及其衍生物)和葫芦巴碱的含量均随烘焙程度加深而显著降低, 与文献<sup>[13,33]</sup>研究结果一致。此外, 随烘焙程度增加, 黄酮类化合物逐渐增加, 且深烘焙的咖啡中黄酮类含量最高, 烘焙程度对咖啡因含量无显著影响, 这与文献<sup>[34-35]</sup>研究结果一致。绿原酸及其衍生物是咖啡的主要化学成分, 具有抗氧化、抗炎和抗肿瘤等生物活性<sup>[36-37]</sup>; 葫芦巴碱作为含量仅次于咖啡因的生物碱, 也具有抗炎和抗氧化的作用, 二者均为咖啡苦味来源的化合物<sup>[38]</sup>。

## 2.8 主成分分析

在21批次样品中共检出15种化学成分, 为分析不同处理组合对咖啡化学成分的影响及差异, 进行了主成分分析(PCA)。不同品种、加工方式下21批样品未能良好的分离聚类, PCA得分图如图4所示, 不同处理组合的咖啡在不同烘焙条件下得到明显区分, PC1与PC2共解释了95.71%的差异性, 其中PC1主要由绿原酸和新绿原酸(特征向量: 0.876和0.377)贡献, 表明绿原酸和新绿原酸可能是区分不同烘焙程度的标志物。从图4可见, 随着烘焙程度增加, 绿原酸和新绿原酸逐渐降解, 分布向第二象

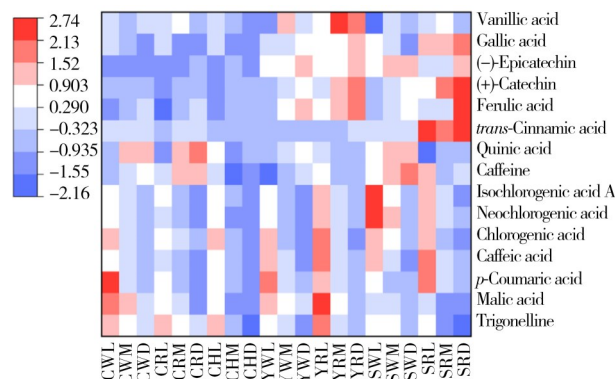


图3 21批次样品的检出化合物归一化含量热图  
Fig. 3 Normalized content heatmap of detected compounds in batch 21 samples

C stands for Catimor, Y stands for Yellow Bourbon, S stands for Sarchimor, W stands for washed processing, R stands for dry processing, H stands for honey processing, and L, M, and D correspond to light, medium, and dark roasts, respectively

限移动。PC2 主要由咖啡因(特征向量:  $-0.961$ )贡献, 由于咖啡因在不同烘焙程度下差异不显著, 各点之间纵坐标离散程度不大。

### 3 结论

本研究建立了烘焙咖啡中 19 种化学成分的定量分析方法, 并应用于 21 批云南咖啡样品检测。不同品种、不同加工方式及不同烘焙程度下的咖啡化学成分含量分析结果显示, 咖啡中酚酸类化合物含量大多随烘焙程度增加而下降, 部分黄酮类化合物(儿茶素和表儿茶素)含量随烘焙程度提升而增加。热图对比分析发现, 卡蒂姆品种在水洗处理下表现出更优潜力; 黄波旁品种在日晒处理下化学成分含量更高; 萨奇姆品种则对水洗和日晒两种方式均表现出广泛适应性。PCA 结果显示, 绿原酸和新绿原酸可能是区分不同咖啡烘焙程度的标志物。本研究可为我国咖啡质量评价和加工工艺优化提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] Mussatto S I, Machado E M S, Martins S, Teixeira J A. *Food Bioprocess Technol.*, **2011**, 4(5): 661–672.
- [2] Ran G W. *Kunming Daily*(冉光雯. 昆明日报), 2025–10–17(004).
- [3] Huang J X, Lü Y L, Luo X P, Zhang X F, Hu F G, Li Y N, Li W R. *Trop. Agric. Sci. Technol.* (黄家雄, 吕玉兰, 罗心平, 张晓芳, 胡发广, 李亚男, 李维锐. 热带农业科技), **2025**, 48(4): 44–48.
- [4] Freitas V V, Borges L L R, Vidigal M C T R, Santos M H, Stringheta P C. *Trends Food Sci. Technol.*, **2024**, 146: 104411.
- [5] Mustafa A M, Abouelenein D, Angeloni S, Maggi F, Navarini L, Sagratini G, Santanatoglia A, Torregiani E, Vittori S, Caprioli G. *Foods*, **2022**, 11(19): 3033.
- [6] Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M, Leboucher A, Demeyer D, Carrier S, Schneider M, Hamdane M, Müller C E, Buée L, Blum D. *Neurobiol. Aging*, **2014**, 35(9): 2079–2090.
- [7] Mohamed A I, Erukainure O L, Salau V F, Islam M S. *Diabetes Metab. Syndr.: Clin. Res. Rev.*, **2024**, 18(7): 103075.
- [8] Caddeo C, Gabriele M, Fernández-Busquets X, Valenti D, Fadda A M, Pucci L, Manconi M. *Int. J. Pharm.*, **2019**, 565: 64–69.
- [9] Cao Q Q, Fu Y Q, Liu Y Y, Qin Y M, Chen J X, Yin J F, Xu Y Q. *Food Chem.*, **2022**, 378: 132129.
- [10] Montenegro J, dos Santos L S, de Souza R G G, Lima L G B, Mattos D S, Viana B P P B, da Fonseca Bastos A C S, Muzzi L, Conte-Júnior C A, Gimba E R P, Freitas-Silva O, Teodoro A J. *Food Res. Int.*, **2021**, 140: 110014.
- [11] Arruda N P, Hovell A M C, Rezende C M, Freitas S P, Couri S, Bizzo H R. *Quím. Nova*, **2012**, 35(10): 2044–2051.
- [12] Duarte G S, Pereira A A, Farah A. *Food Chem.*, **2010**, 118(3): 851–855.
- [13] Cwiková O, Komprda T, Šottníková V, Svoboda Z, Simonová J, Slováček J, Jüzl M. *Foods*, **2022**, 11(20): 3295.
- [14] Wu H J, Gu J Y, BK A, Nawaz M A, Barrow C J, Dunshea F R, Suleria H A R. *Food Biosci.*, **2022**, 46: 101373.
- [15] Navarra G, Moschetti M, Guarrasi V, Mangione M R, Militello V, Leone M. *J. Chem.*, **2017**, 2017: 6435086.
- [16] Santanatoglia A, Angeloni S, Fiorito M, Fioretti L, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Caprioli G. *J. Food Compos. Anal.*, **2024**, 125: 105732.
- [17] Angeloni S, Navarini L, Khamitova G, Maggi F, Sagratini G, Vittori S, Caprioli G. *Food Chem.*, **2020**, 325: 126924.
- [18] Nicácio A E, Rodrigues C A, Visentainer J V, Maldaner L. *Food Chem.*, **2021**, 340: 128162.
- [19] Sun F T, Xu Z L, Xu X Y, Gao Y, Zhu Z Y, Han X Y, Zhang C R, Tang T, Wang Q, Sheng Q, Zhao X P. *Arab. J. Chem.*, **2024**, 17(9): 105911.
- [20] Latimer G W. Appendix K Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals Official Methods of Analysis of AOAC International, 22nd Edition. New York, **2023**.
- [21] GB 5009.295–2023. National Food Safety Standard—General Rules for Validation of Chemical Analysis Methods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 化学分析方法验证通则. 中华人民共和国国家标准).
- [22] Li S N, Tian M L, Row K H. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11(5): 2229–2240.
- [23] Tat L, Comuzzo P, Stolfo I, Battistutta F. *Food Chem.*, **2005**, 93(2): 361–369.

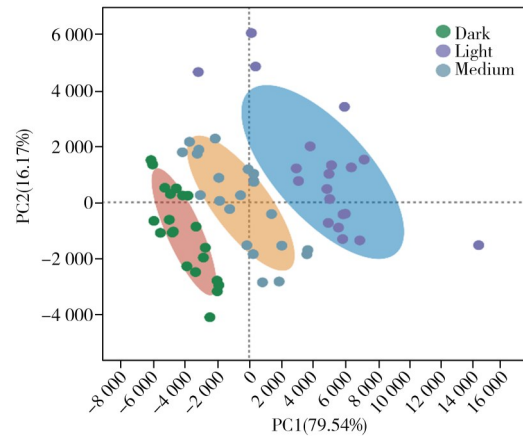


图 4 3 个品种咖啡在浅度、中度和深度烘焙程度下的 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of three coffee varieties at light, medium, and dark roasting degrees

- [24] Pasquet P L, Julien D D, Zhao M, Villain G M, Trébouet D. *Food Biosci.*, **2024**, 57: 103586.
- [25] Bhatia N K, Raj Tomar V, Ishika, Kishor S, Deep S. *J. Mol. Liq.*, **2022**, 366: 120236.
- [26] Tříška J, Vrchotová N, Strohalm J, Houška M, Kovářiková E, Novotná P, Bednář J, Pavela R. *Foods*, **2025**, 14 (13): 2165.
- [27] Chemat F, Rombaut N, Sicaire A G, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier A S, Abert-Vian M. *Ultrason. Sonochem.*, **2017**, 34: 540–560.
- [28] Zhou J, Zhang L C, Li Q P, Jin W F, Chen W Y, Han J, Zhang Y Y. *Molecules*, **2018**, 24(1): 112.
- [29] Angeloni S, Nzekoue F K, Navarini L, Sagratini G, Torregiani E, Vittori S, Caprioli G. *J. Mass Spectrom.*, **2020**, 55 (11): e4519.
- [30] Rodrigues P N, Bragagnolo N. *J. Food Compos. Anal.*, **2013**, 32(2): 105–115.
- [31] Santanatoglia A, Navarini L, Angeloni S, Caprioli G. *Food Chem.*, **2025**, 473: 143035.
- [32] Happyana N, Diniresna A, Pratiwi A, Hakim E H. *J. Food Meas. Charact.*, **2024**, 18(4): 2587–2597.
- [33] Rusinek R, Dobrzański B Jr, Gawrysiak-Witulska M, Siger A, Zytek A, Karami H, Umar A, Lipa T, Gancarz M. *Int. Agrophys.*, **2024**, 38(1): 31–42.
- [34] Grzelczyk J, Fiurasek P, Kakkar A, Budryn G. *Food Chem.*, **2022**, 387: 132888.
- [35] Król K, Gantner M, Tatarak A, Hallmann E. *Eur. Food Res. Technol.*, **2020**, 246(1): 33–39.
- [36] Vamanu E, Gatea F, Pelinescu D R. *Foods*, **2020**, 9(9): 1281.
- [37] Wang L, Pan X Q, Jiang L S, Chu Y, Gao S, Jiang X Y, Zhang Y H, Chen Y, Luo S J, Peng C. *Front. Nutr.*, **2022**, 9: 943911.
- [38] Makiso M U, Tola Y B, Ogah O, Endale F L. *Food Sci. Nutr.*, **2024**, 12(2): 734–764.

(责任编辑: 丁 岩)