

咖啡苦味特性研究进展

陈钰莹, 孙红波, 宋萧萧, 柴 玉, 王博览, 冷小京*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 食品精准营养与质量控制教育部重点实验室, 功能乳品教育部重点实验室, 北京 100083)

摘 要: 咖啡的苦味可直接影响咖啡品质和消费者对咖啡的接受度。苦味的产生源自味觉细胞的苦味受体家族TAS2Rs对苦味物质的感知。咖啡苦味主要来自生物碱、绿原酸烘焙产物及美拉德反应产物等, 生物碱是咖啡生豆中的主要苦味物质, 绿原酸烘焙产物及美拉德反应产物是烘焙咖啡风味的重要组成成分。目前咖啡中新的苦味物质鉴定主要采用理化仪器分析与感官分析相结合的方式。本文根据苦味产生的生化原因, 归纳了咖啡苦味物质的产生途径、感官特性、理化鉴定方法及苦味对咖啡偏好度产生的影响, 为咖啡产品质量控制及烘焙工艺提升提供参考。

关键词: 咖啡; 苦味; 绿原酸; 美拉德反应; 阈值

Recent Advances in Research the Bitterness of Coffee

CHEN Yuying, SUN Hongbo, SONG Xiaoxiao, CHAI Yu, WANG Bolan, LENG Xiaojing*

(Key Laboratory of Precision Nutrition and Food Quality, Ministry of Education, Key Laboratory of Functional Dairy, Ministry of Education, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The bitterness can directly affect the quality and consumer acceptance of coffee. The bitter taste receptor family (TAS2Rs) from taste cells can perceive bitter substances. The bitterness of coffee is mainly attributed to the presence of alkaloids, as well as the formation of oxidation products of chlorogenic acid and Maillard reaction products during roasting. Alkaloids are the main source of bitter substances in green coffee beans. The oxidation products of caffeoylquinic acid and the Maillard reaction products formed during roasting are important flavor constituents of roasted coffee. At present, combination of instrumental physicochemical analysis and sensory evaluation is mostly used for the identification of new bitter substances found in coffee. This paper presents a review of the formation pathways, sensory characteristics, and physicochemical identification techniques of coffee bitter substances, and the impact of bitterness on the consumer preference for coffee, which will be useful for the quality control of coffee products and optimization of the roasting process.

Keywords: coffee; bitterness; chlorogenic acid; Maillard reaction; threshold

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190423-304

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 09-0285-09

引文格式:

陈钰莹, 孙红波, 宋萧萧, 等. 咖啡苦味特性研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 285-293. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190423-304. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Yuying, SUN Hongbo, SONG Xiaoxiao, et al. Recent advances in research the bitterness of coffee[J]. Food Science, 2020, 41(9): 285-293. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190423-304. <http://www.spkx.net.cn>

咖啡豆是茜草科咖啡属植物的种子, 是一种重要的热带经济作物^[1]。近几十年来, 咖啡的全球消费量每年增长1%~2%^[2]。中国是世界上咖啡消费量增长最快的国家之一, 国内咖啡市场以每年20%的速度扩大, 呈现良好的发展势头与前景。云南和海南为中国咖啡主产地, 全国咖啡种植面积12余万hm², 鲜果产量70多

万t, 总产值达16.24亿元^[3]。咖啡能够流行的原因除其具有提神醒脑的功能外, 主要与其特征香气及特征苦味有关。咖啡的苦味可直接影响消费者对咖啡的接受度^[4]。在人的基本味觉里, 苦味最具有矛盾性, 既易导致人产生不悦甚至排斥的感觉, 被认为是抵御有毒物质的防御机制^[5], 又可参与食品风味的构成, 增强食品

收稿日期: 2019-04-23

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0400800)

第一作者简介: 陈钰莹 (1990—) (ORCID: 0000-0001-6882-1073), 女, 博士研究生, 研究方向为食品胶体化学。

E-mail: chenxuyiaoying@163.com

*通信作者简介: 冷小京 (1966—) (ORCID: 0000-0002-6306-5819), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养微纳载体、食品感官科学和功能性咖啡。E-mail: lengxiaojingcau@163.com

感官吸引力,如咖啡、茶、啤酒和柚子等食品中苦味是受欢迎的^[6]。

咖啡的苦味来源于豆体所含的苦味物质及烘焙过程中形成的苦味化合物。咖啡因、葫芦巴碱、美拉德反应产生的非挥发性杂环化合物,如呋喃衍生物、吡嗪以及2,5-二酮吡嗪等被认为是咖啡苦味的主要贡献者^[7]。然而,研究发现绿原酸(咖啡酰奎宁酸)受热产生的苦味同样具有代表性,如绿原酸内酯化生成的绿原酸内酯^[8]或通过4-乙烯邻苯二酚(4-vinylcatechol, 4-VCA)途径所生成的多羟基苯基林丹类化合物^[9],但目前对绿原酸烘焙产物的苦味物质研究尚不深入。

人体对咖啡味觉特性的认知受多种因素干扰,不仅与人体的苦味生理机制有关,也与理化分析技术和品鉴方法有关。与咖啡挥发性物质的研究相比,目前对咖啡苦味物质的研究偏少,且系统性不足^[8]。本文基于人体味觉的苦味通路特性,从咖啡烘焙条件出发,主要对比了生物碱、绿原酸产物及美拉德反应产物等苦味物质的特性,归纳了咖啡中苦味物质常见的鉴定方法,以期对咖啡产品质量控制及加工工艺的改进提供参考。

1 苦味信号转导通路

人体苦味的感知源自味觉细胞的苦味受体TAS2Rs家族对苦味物质的感知。TAS2Rs是一类由多肽链形成的具有7个跨膜螺旋结构的G蛋白偶联受体^[10]。TAS2Rs通过与苦味物质的结合而激活,经G蛋白变构或促使第二信使环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)浓度降低,导致cAMP离子通道抑制作用解除,或刺激肌醇三磷酸的磷脂酶C β 2合成,引发内质网储存的Ca²⁺释放,使苦味受体细胞去极化,释放神经递质^[11]。此外,升高的Ca²⁺水平也可打开瞬时受体电位阳离子通道TRPM5,导致细胞膜去极化和神经递质释放,向大脑发送苦味信号^[12]。

苦味物质的识别依赖于相关TAS2Rs基因的表达。在TAS2Rs基因家族中,已知的人类苦味受体基因有10个,分别是*hT2R4*、*hT2R16*、*hT2R7*、*hT2R10*、*hT2R14*、*hT2R43*、*hT2R44*、*hT2R38*、*hT2R47*和*hT2R46*^[13],远少于自然界中苦味物质的数量,这意味着人体对苦味类型的识别并不精准。此外,人体对苦味物质识别的过程还会受到多种因素的干扰,如咖啡因,其能被TAS2R7、TAS2R10、TAS2R43、TAS2R46同时识别,是典型的苦味物质。但咖啡因可阻止腺苷与受体结合,提高多巴胺的利用率,兴奋中枢神经,弱化对苦味的排斥反应^[14]。

味觉受体能对苦味物质产生明确生化反应,但苦味信息的整合处理需经脑神经中枢执行。使用功能性磁共振成像技术对灵长类动物单个神经元兴奋性的研究结果显示,味觉信息在味觉通路中的影响遍及孤束

核、丘脑、脑岛、额叶岛盖及眶额皮质尾侧等^[15]。脑岛及额叶岛盖为初级味觉中枢,眶额皮质尾侧为二级味觉中枢^[16]。其中苦味的作用多表现在前额叶背侧皮质、前额叶前皮质腹侧部、前额叶前区、海马旁皮层等的激活^[17]。虽然神经元对味觉刺激的反应具有特异性,但不同的味觉区域在大脑中交汇会导致味觉之间存在影响^[18],使人对苦味认知反应不一致。

2 咖啡中主要苦味物质

咖啡豆分为‘阿拉比卡(Arabica)’、‘罗布斯塔(Robusta)’、‘利比里亚(Liberica)’三大原种,最具有商业价值的是‘阿拉比卡’咖啡豆和‘罗布斯塔’咖啡豆,烘焙后的‘阿拉比卡’咖啡豆比‘罗布斯塔’咖啡豆具有更丰富的香气,而‘罗布斯塔’咖啡豆具有更强的苦味^[19]。云南和海南为中国咖啡主产地,由于气候环境等原因,云南咖啡主要为‘阿拉比卡’咖啡豆,海南兴隆地区主要生产‘罗布斯塔’咖啡豆。

咖啡按照烘焙程度可分为浅度、中度及深度烘焙3种。热风烘焙是常用的咖啡烘焙方式,烘焙时间通常为2~25 min,烘焙温度为200~250 °C,表1显示了特定烘焙温度下,达到某种烘焙强度所需要的时间。咖啡的烘焙程度决定了咖啡中苦味物质的种类及数量^[20]。一般认为随着烘焙强度增加,咖啡的苦味物质不断增多,另外咖啡的研磨程度和冲泡方式也会影响咖啡的苦味程度,目前已知的咖啡中苦味物质主要为生物碱、绿原酸烘焙产物、美拉德反应产物等。

表1 咖啡烘焙强度与温度和时间的关系^[20-22]
Table 1 Relationship between coffee roasting degree and roasting temperature and time^[20-22]

烘焙强度	烘焙温度/°C	烘焙时间/min
浅度	200	—
浅度	220	6.5
中度	220	12~15
深度	220	30~60
浅度	230	4~5
中度	230	6~8
深度	230	18
浅度	240	3~5
中度	240	6
深度	240	11
浅度	250	2.5
中度	250	3.5
深度	250	4.5~5.5

注:—, 200 °C时无论如何延长烘焙时间,烘焙强度均为浅度。

2.1 生物碱

生物碱是一类存在于生物体内的含氮碱性有机化合物,多数具有复杂的含氮杂环,在植物中常与有机酸结合成盐而存在,还有少数以有机酸酯、

糖苷和酰胺的形式存在^[23]。生物碱是咖啡生豆中主要苦味物质来源。咖啡中的生物碱包括咖啡因、葫芦巴碱、可可碱等。咖啡因在‘阿拉比卡’咖啡生豆中的质量分数为0.8%~1.4%，在‘罗布斯塔’咖啡生豆中为1.7%~4.0%^[24]。咖啡生豆中葫芦巴碱质量分数为0.83%~1.13%，可可碱质量分数为0.0048%~0.0094%^[25]，研究发现咖啡因占咖啡生豆苦味强度的30%，葫芦巴碱占1%^[24]。

2.1.1 咖啡因

咖啡因是一种甲基黄嘌呤，具有神经中枢兴奋作用。咖啡因在‘罗布斯塔’咖啡生豆中的含量高于‘阿拉比卡’咖啡。咖啡因的苦味阈值约为500 μmol/L。咖啡因热稳定性强，烘焙后质量不会发生明显改变^[26]，但烘焙过程中水分的蒸发会导致咖啡因含量相对提升，提升水平约为0.002%~0.227%^[27]。咖啡因虽然不是烘焙咖啡主要的苦味贡献者，但作为功能性成分，能明显影响消费者对咖啡的接受度。

2.1.2 葫芦巴碱

葫芦巴碱是经植物体内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸代谢或转化生成的一种生物碱^[23]，具有降血糖、抗肿瘤的作用。葫芦巴碱具有苦涩味，烘焙温度180℃以上时，50%~80%的葫芦巴碱会发生降解。随着烘焙程度增加，‘阿拉比卡’咖啡豆中葫芦巴碱含量降低至0.553%~1.293%，‘罗布斯塔’咖啡豆中降低至0.571%~0.902%^[28]，该降解过程产生了重要化合物——水溶性烟酸（又称尼克酸或VB₃）^[29]和芳香化合物吡啶和吡咯^[30]，对咖啡饮料的质量产生影响。

2.2 绿原酸烘焙产物

绿原酸烘焙产物和美拉德反应产生的苦味物质是烘焙咖啡中主要的苦味物质来源。绿原酸又称咖啡酰奎宁酸（caffeoylquinic acid, CQA），是由咖啡酸和奎宁酸缩合而成的羟基肉桂酸类化合物^[31]。绿原酸在咖啡生豆中的含量很高，质量分数约为6.7%~12%，‘罗布斯塔’咖啡生豆中绿原酸含量比‘阿拉比卡’咖啡生豆高25%左右^[32]。高温烘焙会导致绿原酸的损失。一般烘焙后咖啡豆中的绿原酸质量为咖啡豆干质量的2.7%~3.1%。咖啡中常见的绿原酸单体为5-CQA、diCQA以及阿魏酸酰奎宁酸。其中5-CQA的含量最高，约占到咖啡中总绿原酸含量的72%^[33-34]。

2.2.1 奎宁酸

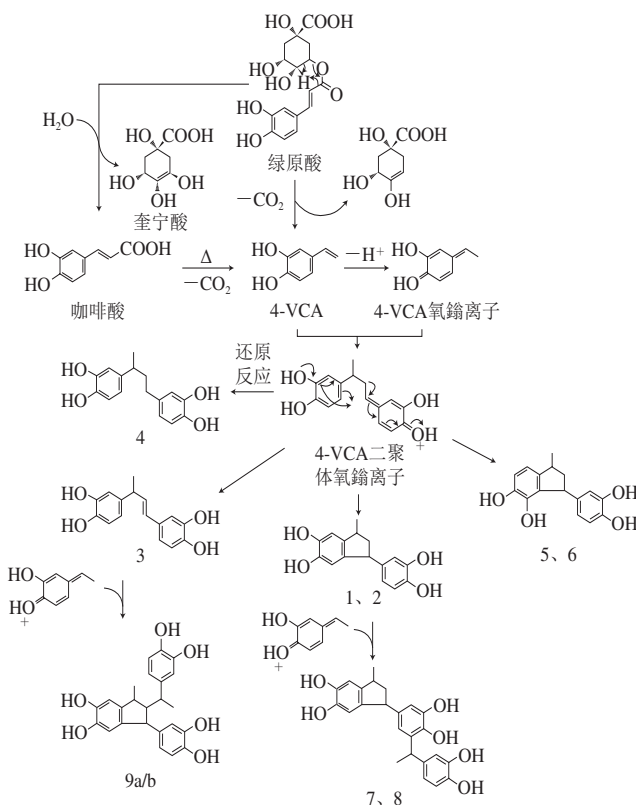
绿原酸受热分解会产生咖啡酸和奎宁酸。‘阿拉比卡’生咖啡豆中奎宁酸质量分数约为0.55%，‘罗布斯塔’生咖啡豆中约为0.35%，中度烘焙咖啡豆中为0.63%~1.16%^[35]，深度烘焙咖啡豆中为0.97%~1.24%^[36]。10 mg/L奎宁酸溶液会呈现出类似阿司匹林的苦涩味^[37]。由于奎宁酸在烘焙过程中其含量

可超过味觉阈值20倍，因此被认为是导致咖啡苦味的原因之一^[38]。

2.2.2 绿原酸内酯

绿原酸加热会发生内酯化反应生成绿原酸内酯。Blumberg等^[9]对比了不同温度（190~280℃）下烘焙6 min咖啡豆中绿原酸内酯生成量的变化，发现在240℃下烘焙的咖啡豆中绿原酸内酯含量最高。当烘焙温度从190℃升高至240℃时，单酰奎宁酸内酯质量浓度从17.5 mg/L增加至174.5 mg/L，而当烘焙温度继续升高至280℃时，单酰奎宁酸内酯质量浓度降低至190℃时的水平。由此可见，绿原酸内酯含量在中度烘焙条件下最高，深度烘焙条件下会发生分解。绿原酸内酯的苦味阈值较低，为9.8~180 μmol/L^[37]，是咖啡中目前发现的最苦的物质。尽管绿原酸内酯在咖啡中的含量很低，但对咖啡质量的影响是显著的^[9,39]。

2.2.3 多羟基苯基林丹



图中化合物1~9具体信息见表2。

图1 多羟基苯基林丹生成途径^[37]

Fig. 1 Route map of reactions leading to the formation of the bitter compounds multiply hydroxylated phenylindanes^[37]

多羟基苯基林丹是绿原酸和咖啡酸通过4-VCA途径生成的一类化合物（表2），具体反应途径如图1所示。绿原酸水解生成咖啡酸和奎宁酸。咖啡酸脱羧反应生成4-VCA^[40]，绿原酸也可以发生synperiplanar消除反应直接

生成4-VCA。4-VCA与其质子化产物4-乙烯邻苯二酚氧鎓离子(4-vinylcatechol-H⁺, 4-VCA-H⁺)二聚生成关键中间体4-VCA二聚体氧鎓离子。

4-VCA二聚体氧鎓离子通过分子内重排生成苦味物质反式-1,3-双(3',4'-二羟基苯基)丁烯(*trans*-1,3-bis(3',4'-dihydroxyphenyl)-1-butene, 3,4-DHP-B)(化合物3)。4-VCA二聚体氧鎓离子经还原产生苦味物质四羟基苯基丁烯(化合物4)。4-VCA二聚体氧鎓离子的不饱和迈克尔系统与其另一个1,2-二羟基苯的邻位发生分子内闭环反应生成4种4-羟基苯基林丹(化合物1、2、5、6)。苦味物质3,4-DHP-B在闭环时与另一分子的4-VCA-H⁺缩合生成苯基林丹(化合物9a和9b)。苯基林丹1和苯基林丹2与4-VCA-H⁺聚合生成4-乙烯基儿茶酚三聚体(化合物7和8)。化合物7、8、9为6-羟基苯基林丹的同分异构体(表2)^[37]。

表2 多羟基苯基林丹的苦味阈值^[37]
Table 2 Human bitter recognition thresholds of multiply hydroxylated phenylindanes^[37]

多羟基苯基林丹	编号	苦味阈值/ ($\mu\text{mol/L}$)
反式-5,6-二羟基-1-甲基-3-(3',4'-二羟基苯基)林丹	1	178
顺式-5,6-二羟基-1-甲基-3-(3',4'-二羟基苯基)林丹	2	148
3,4-DHP-B	3	—
四羟基苯基丁烯	4	—
反式-4,5-二羟基-1-甲基-3-(3',4'-二羟基苯基)林丹	5	45
顺式-4,5-二羟基-1-甲基-3-(3',4'-二羟基苯基)林丹	6	32
反式-5,6-二羟基-1-甲基-3-[3',4'-二羟基-5'-(1-(3'',4'')-二羟基苯基)-1-乙基]苯基]林丹	7	67
顺式-5,6-二羟基-1-甲基-3-[3',4'-二羟基-5'-(1-(3'',4'')-二羟基苯基)-1-乙基]苯基]林丹	8	60
5,6-二羟基-1-甲基-2-[1-(3',4'-二羟基苯基)-1-乙基]-3-(3',4'-二羟基苯基)林丹	9	37

注: —. 化合物3和4为反应中间产物, 苦味阈值未检测。

多羟基苯基林丹具有强烈持久的苦味, 其苦味阈值为32~178 $\mu\text{mol/L}$, 苦味特征类似于深度烘焙的意式浓缩咖啡。与绿原酸内酯不同, 随着烘焙温度升高, 多羟基苯基林丹类化合物总含量不断增加。研究发现当烘焙温度从190 $^{\circ}\text{C}$ 升高至280 $^{\circ}\text{C}$ 时, 多羟基苯基林丹类化合物质量浓度由0 $\mu\text{g/L}$ 增加至452.6 $\mu\text{g/L}$ ^[9]。Mancini等^[41]研究发现多羟基苯基林丹化合物能够抑制 β -淀粉样蛋白和Tau蛋白聚集, 降低阿尔茨海默病和帕金森病的发病风险; Fukuyama等^[42]发现苯基林丹能够降低黄嘌呤氧化酶的活性, 起到抑制痛风的作用。

2.3 美拉德反应产物

咖啡生豆中多糖质量分数为35%~45%, 蛋白质质量分数为12%。‘阿拉比卡’咖啡豆中蔗糖质量分数约10%, ‘罗布斯塔’咖啡豆中约为3%~7%, 具备美拉德反应的发生条件。美拉德反应产物又称类黑精, 是一类结构复杂、棕褐色含氮化合物, 占咖啡豆干质量的25%^[43]。美拉德反应产生的苦味物质主要为哌嗪、呋喃、吡咯类等非挥发性的杂环化合物^[39]。

2.3.1 2,5-二酮哌嗪

2,5-二酮哌嗪类化合物, 又称环二肽, 是食品中常见的苦味物质, 由美拉德反应或多肽受热降解产生。自然界中2,5-二酮哌嗪类化合物一般由L-氨基酸缩合环合形成, 其苦味阈值跨度较大, 为190~1 280 $\mu\text{mol/L}$ ^[7]。在10~50 mg/L 下, 该物质呈现苦涩味、金属味和鲜味。研究发现, 2,5-二酮哌嗪对其他苦味物质如可可碱等具有协同增强的作用^[44]。2,5-二酮哌嗪类化合物的苦味与其环状结构和含有的疏水性氨基酸的数量和种类有关。通常苦味会随着疏水氨基酸数量的增加而增强, Ney^[45]建立了Q值原则, 即以氨基酸链从乙醇相转移到水相所需要的自由能为Q值, 发现在分子质量小于6 000 kDa的多肽中, Q值大于1 400 kcal/mol的多肽为苦味肽, Q值小于1 300 kcal/mol的多肽为非苦味肽。例如, 苯丙氨酸本身带有微弱苦味, 但当其氨基末端和羧基末端分别被乙酰基和乙氧基修饰后, 相应肽的苦味会大大加强^[46]。然而, Q值原则未考虑多肽空间参数对苦味的影响, 苦味与特定氨基酸是否存在及其空间结构有关, 只有当侧链骨架上含有3个以上的碳时才能产生苦味^[47]。另外TAS2Rs空腔壁具有疏水结合区, 苦味肽具有结合位点(binding unit, BU)以及刺激位点(stimulating unit, SU), 只有BU与SU两者同时存在且与TAS2Rs结合时才能产生苦味^[48]。图2为苦味肽与TAS2Rs结合的示意图, 2,5-二酮哌嗪BU和SU之间的距离为0.41 nm, 能够作用于TAS2Rs空腔(直径1.5 nm)的底部, 刺激苦味产生。

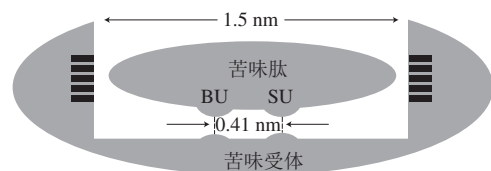


图2 苦味肽与TAS2Rs结合的示意图^[49]

Fig. 2 Schematic diagram of binding of bitter peptide to TAS2Rs^[49]

2.3.2 5-羟甲基糠醛

5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)由焦糖化或美拉德反应生成。果糖或葡萄糖在酸性条件下加热分解脱去三分子水后生成5-HMF; 另外还原糖与氨基酸首先生成Amadori重排产物, Amadori重排产物在1、2位烯醇化, 消去C3位的羟基, 与水生成3-脱氧己酮糖, 最后脱水形成5-HMF^[50]。咖啡豆中5-HMF的含量为0.452~6.27 mg/g ^[51], 苦味阈值为1 280 $\mu\text{mol/L}$ 。绿原酸可通过降低体系pH值和增强己糖脱水促进5-HMF生成^[52]。由于5-HMF在体内的代谢产物磺酸氧甲基糠醛和5-氯甲基糠醛具有致癌性^[53], 并且咖啡中5-HMF含量随烘焙程度加深而增加, 因此, 5-HMF被认为是咖啡中的内源污染物^[54]。

美拉德反应生成的呋喃类化合物苦味阈值为100~537 $\mu\text{mol/L}$, 呋喃衍生物糠醇苦味阈值为190 $\mu\text{mol/L}$, 脯氨酸和碳水化合物形成双吡咯烷酮和吡咯烷酮己糖还原酮, 苦味阈值分别为20 $\mu\text{mol/L}$ 和40 $\mu\text{mol/L}$ ^[55]。此外, 在加热条件下, 美拉德反应产物还可与绿原酸反应产物发生反应, 生成新的苦味化合物。Kreppenhof等^[56]发现绿原酸受热产生的二羟基苯酚/三羟基苯酚能够与糠醇反应生成苦味物质呋喃-2-甲基苯酚, 其苦味阈值为100~537 $\mu\text{mol/L}$ 。

总体来看, 在中度烘焙过程中, 咖啡中苦味物质主要来自绿原酸内酯和美拉德反应产物, 而对于深度烘焙咖啡, 起决定性的苦味物质更多来自苯基林丹类和美拉德反应产物。

3 咖啡苦味物质的鉴定方法

咖啡中苦味物质鉴定方法主要为将理化仪器分析与感官分析相结合的方式。图3为咖啡中新的苦味物质鉴定流程。

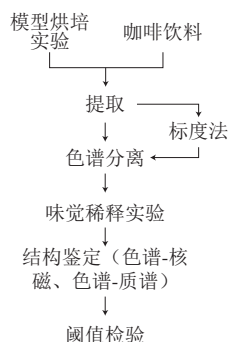


图3 咖啡中新的苦味物质鉴定流程

Fig. 3 Identification process of new bitter substances in roasted coffee

3.1 理化鉴定方法

3.1.1 模型烘焙实验

针对咖啡提取物中苦味物质种类较多, 部分苦味物质含量较低而无法检测分析等问题, 实验过程中以某种苦味物质的假定前体为原料, 模拟咖啡烘焙条件, 将形成的烘焙产物进行分离鉴定, 并与真实咖啡饮料中的苦味物质进行比对。模型烘焙实验有助于判断苦味物质产生的来源和反应途径。Kreppenhof等^[56]将呋喃衍生物(糠醇、呋喃-2-醛和5-羟甲基呋喃-2-醛)与二羟基苯酚、三羟基苯酚分别混合后烘焙, 并用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)及¹D/²D核磁鉴定烘焙产物, 共检测出10种新的苦味化合物, 经对比, 其中4种能够在咖啡饮料中检测出, 因此判断该4种化合物为咖啡中的苦味物质, 并确定该种苦味物质是由美拉德反应产物与绿原酸烘焙产物在加热条件下生成。

3.1.2 仪器分析

液相色谱是咖啡因、葫芦巴碱及绿原酸的主要测定方法^[57]。邱碧丽等^[58]用高效液相色谱同时测定咖啡中绿原酸、葫芦巴碱、奎宁酸和咖啡酸的含量, 绿原酸和咖啡酸的检测波长为330 nm, 葫芦巴碱和奎宁酸检测波长为210 nm, 结果表明, 绿原酸、葫芦巴碱、奎宁酸、咖啡酸在0.499 5~4.995 0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与峰面积线性关系良好(r 为0.999 98~1.000 00), 加标回收率为93.28%~97.46%。Czerwonka等^[59]用反相液相色谱在检测波长285 nm、柱温45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 用体积分数4.4%甲醇-乙酸(10:1, V/V)进行等浓度洗脱, 用 C_{18} 柱检测烘焙咖啡中的5-HMF含量, 受咖啡豆品种、烘焙时间、烘焙温度影响, 不同品牌烘焙咖啡豆中5-HMF含量差异较大, 最低含量为85.9 mg/kg, 最高含量1 574.4 mg/kg, 平均含量为347.6 mg/kg。

质谱是分析天然产物分子结构最灵敏可靠的方法之一。LC-MS是分离、分析复杂有机混合物的有效手段^[29]。然而化合物通过LC-MS分析所得到的质谱图通常只给出分子离子峰及极少的碎片离子峰。MS/MS技术能够对一级质谱选出的离子进行进一步碰撞诱导解离^[60], 提高了检测灵敏度和选择性。Frank等^[61]在多反应监测模式下进行LC-MS/MS检测, 证实了咖啡饮料中3-咖啡酰奎宁、4-咖啡酰奎宁等绿原酸内酯的存在。Kreppenhof等^[56]用LC-MS/MS确定了咖啡饮料中4-呋喃-2-亚甲基苯-1,2-二醇、4-呋喃-2-亚甲基-5-甲基-1,2-二醇和3-呋喃-2-亚甲基-6-甲基-1,2-二醇等化合物为咖啡中新的苦味物质。

高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)技术是一种新型液-液分离技术, 由于不采用固体支持物, 因此被广泛应用于天然产物的分离^[62]。Kaiser等^[63]使用HSCCC法分离出毫克级的绿原酸内酯, 并用一维和二维核磁共振鉴定了3-咖啡酰奎宁、4-咖啡酰奎宁和5-咖啡酰奎宁的结构。张晓霞^[64]采用HSCCC法分离咖啡豆中的绿原酸, 得到最佳分离条件为 V (甲醇): V (乙酸乙酯): m (硫酸铵): V (去离子水)=3.2:3:1:7, 转速800 r/min, 分离温度25 $^{\circ}\text{C}$, 流动相速率2 mL/min, 绿原酸保留时间为236~296 min。

3.2 感官分析法

味觉感官分析是基于评价人员的味觉感官系统, 针对特定样品进行分析型或嗜好型鉴定的方法。该方法以心理物理学为理论依据, 一般有味觉稀释、标度法及阈值检验3类方法。

3.2.1 味觉稀释法

味觉稀释法主要用于确定食品中苦味物质的味觉强度, 该方法常与分离、提纯、鉴定等操作结合, 具体方法如下: 首先将食品中各组分用液相色谱分离、收集并

提纯, 冷冻干燥后将提纯的化合物连续稀释, 建立浓度梯度; 评价员被要求评估味道质量, 用三点检验法分析样品, 将样品与空白样品之间最小区别水平时的稀释倍数定义为苦味稀释因子, 随后对具有较大苦味因子的组分用高效液相色谱、质谱及核磁进行结构鉴定^[65]。Frank等^[37]用高效液相色谱分离咖啡酸烘焙产物, 得到24个分离组分, 用味觉稀释法对该24个组分进行感官评价, 再用半制备反相高效液相色谱将苦味稀释因子最高的8个组分进行分离, 确定咖啡酸烘焙后产物为多羟基苯基林丹类物质。该方法能够从复杂物质中提取到主要苦味物质的味觉特性, 但因分离提纯操作大多需要使用化学试剂^[66], 因此利用此法需严格按照标准操作规范进行。

3.2.2 标度法

标度法是指对不同浓度的溶液做苦味分析, 根据需要可设定一定的标度, 即通过能表述程度的量化词来描述苦味强度^[67]。Frank等^[24]依次用戊烷、乙酸乙酯、氯仿和水提取咖啡成分, 以25 mmol/L的咖啡因作为最强的苦味对照(5分), 用标度法对提取物进行苦味评价, 结果如表3所示。其中咖啡中非挥发性成分苦味强度为4分, 挥发性成分苦味强度为0分, 乙酸乙酯提取物苦味强度为3.5分, 水提取物苦味强度为0分, 因此判断咖啡中苦味物质主要为疏水性非挥发物。与味觉稀释法相比, 标度法较适合于粗提物的感官鉴定。

表3 标度法对咖啡中成分的苦味强度评价结果^[24]
Table 3 Yields of fractions isolated from coffee beverage and their bitterness intensity evaluated by scaling method^[24]

咖啡成分	固形物质量分数/%	苦味强度评分
咖啡饮料	23	4
挥发性成分	—	0
非挥发性成分	—	4
戊烷提取物	0.41	0
乙酸乙酯提取物	2.1	3.5
氯仿提取物	2.21	0.5
水提取物	18.26	0

注: —.未检测到。

3.2.3 阈值检验

阈值检验通常以评价员感知到的样品最低浓度为察觉阈, 并在此基础上确定绝对阈值范围^[68]。常用的确定察觉阈值的方法包括顺序检验法和三点检验法。采用顺序检验法时, 首先让评价者用清水漱口, 然后由测试者用滴管向其舌面快速滴加5滴测试液, 并要求评价者在1 min内作出味觉判断。如果评价者不能识别, 则再用相同温度清水漱口, 增加测试液浓度, 直至察觉苦味。此浓度即为该评价者在此温度下的苦味察觉阈^[69]。采用三点检验法时, 每次同时呈送给评价员3个样品, 其中2个为水, 即空白对照, 第3个为苦味样品。预先告知评价员3个样品中有2个相同, 并要求选出不同的样品。以评价员能识别的苦味最低浓度为该物质的察觉阈。

4 苦味对咖啡偏好度的影响

目前个体对食物的偏好性选择有2种假设性机制: 一种是个体通过经验性行为而习惯某种味道, 进而增加对该种味道的偏好性^[70], 例如, 欧美消费者偏好咖啡饮料, 中国消费者偏好茶饮料; 另一种是个体的联想学习能力会将食物与获取食物后获得的感官快感或功效相结合, 前者称为享乐性机制, 后者称为激励价值机制, 进而增强对该种食物的嗜好性。例如, 吃甜食以后产生的愉悦感为享乐性机制; 有神经兴奋需要或者压力大的人会选择喝更多咖啡为激励价值机制^[71]。另外苦味食品的嗜好性也会受个体基因差异的影响。研究发现咖啡的偏好度受环境因素(61%)和基因因素(39%)共同影响^[72]。对6-N-丙基硫脲嘧啶(6-N-propylthiouracil, PROP)的口腔感知强度是一种基因介导的个体口腔感觉变异指数, PROP敏感者比PROP不敏感者有更强的味觉敏感度。PROP敏感度较高的人群对纯咖啡溶液和咖啡因的偏好度低^[73], 二者呈弱相关性。TAS2R38作为一种TAS2R基因, 通过单核苷酸多样性会产生2种常见的单倍型——PAV和AVI; 对118名60岁以上妇女研究发现, AVI/AVI型受试者比PAV/PAV型受试者饮用咖啡的频率更高^[74]。因此, 对苦味食物的嗜好性可能会受生活习惯、环境、激励价值机制及基因等因素的影响。

中外消费者对于咖啡苦味的嗜好性具有一定差异性。胡双芳等^[75]研究了不同品种咖啡豆的化学组分, 发现咖啡感官评分与苦味物质咖啡因、葫芦巴碱含量呈负相关。翟晓娜等^[76]研究我国青年消费者群体对不同方式处理的咖啡样品的喜好度, 发现糖与奶粉能提高对咖啡的喜好度。Hu Xiaojia等^[77]对每周喝咖啡3次以上、年龄19~65岁的中国和韩国消费者进行调查发现, 咖啡样品苦味越浓消费者越不喜欢。因此, 国内咖啡消费者对苦味与咖啡嗜好的关系可能呈现负相关。Geel等^[78]将南非咖啡消费者分为4种消费群体: 纯咖啡爱好者(23%)、咖啡混合饮料消费者(30%)、普通咖啡消费者(37%)和不严重咖啡消费者(10%), 发现纯咖啡爱好者更喜欢纯咖啡样品的涩味、苦味、烤味、坚果味和浓郁的味道; 咖啡味较低、但甜味较高的速溶咖啡是咖啡混合饮料消费者的首选; 普通咖啡消费者似乎是出于习惯而饮用咖啡, 对咖啡的特殊感官特性关注度较小。生活习惯和饮食文化的差异会影响中外消费者对于咖啡苦味的嗜好性, 而基因差异产生的影响并不清楚, 需进一步探究。

5 结 语

咖啡中苦味物质主要由生物碱、绿原酸烘焙产物以及美拉德反应产物组成。生咖啡豆中咖啡因和葫芦巴碱

为其主要苦味物质。在中度烘焙过程中,咖啡中苦味物质可能主要由绿原酸内酯和美拉德产物组成,而深度烘焙过程中,起决定性的苦味物质可能为多羟基苯基林丹类和美拉德反应产物。目前对咖啡中新的苦味物质的鉴定方法主要为感官分析与仪器鉴定相结合。

咖啡中某种具体的苦味物质对咖啡感官嗜好性的影响尚不清楚。一方面,烘焙产生的苦味物质种类繁多,并非所有的苦味物质都能被精准检测到;另一方面,咖啡因虽然本身具有苦味,但其提神醒脑的功能能够降低人对咖啡苦味的排斥。苦味物质虽然能致人产生不悦,但苦味也是咖啡的重要特征,经验性行为或者激励价值机制能够增加消费者对苦味的喜好度,另外中国消费者对于咖啡选择的偏好性是否受基因因素的影响并不清楚,需要进一步探究。

参考文献:

- [1] 周东. 云南省墨江县小粒咖啡产业发展现状对策[J]. 耕作与栽培, 2017(2): 66-67. DOI:10.13605/j.cnki.52-1065/s.2017.02.028.
- [2] BHUMIRATANA N, ADHIKARI K, CHAMBERS E. Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(10): 2185-2192. DOI:10.1016/j.lwt.2011.07.001.
- [3] 文志华, 毕晓菲, 鲁维艳. 中国咖啡消费趋势浅谈[J]. 农产品加工, 2018(2): 69-70. DOI:10.16693/j.cnki.1671-9646(X).2018.01.047.
- [4] MASI C, DINNELLA C, MONTELEONE E, et al. The impact of individual variations in taste sensitivity on coffee perceptions and preferences[J]. Physiology and Behavior, 2015, 138: 219-226. DOI:10.1016/j.physbeh.2014.10.031.
- [5] MURA E, YAGI M, YOKOTA K, et al. Tolerance of bitter stimuli and attenuation/accumulation of their bitterness in humans[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(9): 1539-1549. DOI:10.1080/09168451.2018.1484273.
- [6] ONG J S, HWANG L D, ZHONG V W, et al. Understanding the role of bitter taste perception in coffee, tea and alcohol consumption through Mendelian randomization[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 16414. DOI:10.1038/s41598-018-34713-z.
- [7] GINZ M, ENGELHARDT U H. Identification of proline-based diketopiperazines in roasted coffee[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3528-3532. DOI:10.1021/jf991256v.
- [8] KRAEHEBUEHL K, PAGE-ZOERKLER N, MAUROUX O, et al. Selective enzymatic hydrolysis of chlorogenic acid lactones in a model system and in a coffee extract. application to reduction of coffee bitterness[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 9-14. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.055.
- [9] BLUMBERG S, FRANK O, HOFMANN T. Quantitative studies on the influence of the bean roasting parameters and hot water percolation on the concentrations of bitter compounds in coffee brew[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(6): 3720-3728. DOI:10.1021/jf9044606.
- [10] DI PIZIO A, NIV M Y. Promiscuity and selectivity of bitter molecules and their receptors[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2015, 23(14): 4082-4091. DOI:10.1016/j.bmc.2015.04.025.
- [11] KOHL S, BEHRENS M, DUNKEL A, et al. Amino acids and peptides activate at least five members of the human bitter taste receptor family[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(1): 53-60. DOI:10.1021/jf303146h.
- [12] 胡玲玲, 施鹏. 苦味受体基因家族功能和演化研究的最新进展[J]. 科学通报, 2009, 54(17): 2472-2482. DOI:10.1360/972009-1142.
- [13] SHI Peng, ZHANG Jianzhi, YANG Hui, et al. Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in mammalian evolution[J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20(5): 805-814. DOI:10.1093/molbev/msg083.
- [14] WATANABE Y, IKEGAYA Y. Caffeine increases hippocampal sharp waves *in vitro*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2017, 40(7): 1111-1115. DOI:10.1248/bpb.b17-00101.
- [15] OGAWA H, WAKITA M, HASEGAWA K, et al. Functional MRI detection of activation in the primary gustatory cortices in humans[J]. Chemical Senses, 2005, 30(7): 583-592. DOI:10.1093/chemse/bji052.
- [16] IANNILLI E, SINGH P B, SCHUSTER B, et al. Taste laterality studied by means of umami and salt stimuli: an fMRI study[J]. Neuroimage, 2012, 60(1): 426-435. DOI:10.1016/j.neuroimage.2011.12.088.
- [17] GRAMLING L, KAPOULEA E, MURPHY C. Taste perception and caffeine consumption: an fMRI study[J]. Nutrients, 2019, 11(1): E34. DOI:10.3390/nu11010034.
- [18] VELDHUIZEN M G, ALBRECHT J, ZELANO C, et al. Identification of human gustatory cortex by activation likelihood estimation[J]. Human Brain Mapping, 2011, 32(12): 2256-2266. DOI:10.3390/nu11010034.
- [19] 李娜, 张富县, 李妙清, 等. 两种萃取方式与两品种咖啡豆对咖啡萃取液香气的影响[J]. 食品科技, 2015, 40(10): 51-56. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2015.10.011.
- [20] WANG Xiaojun, LIM L T. A kinetics and modeling study of coffee roasting under isothermal conditions[J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(3): 621-632. DOI:10.1007/s11947-013-1159-8.
- [21] WANG Xiaojun, LIM L T. Effect of roasting conditions on carbon dioxide degassing behavior in coffee[J]. Food Research International, 2014, 61: 144-151. DOI:10.1007/s11947-013-1159-8.
- [22] FERRAZ M B M, FARAH A, IAMANAKA B T, et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting[J]. Food Control, 2010, 21(6): 872-877. DOI:10.1016/j.foodcont.2009.12.001.
- [23] 刘敏, 蒋跃平, 刘韶. 鱼腥草中生物碱类化学成分及其生物活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 141-145; 133. DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.1.024.
- [24] FRANK O, ZEHENTBAUER G, HOFMANN T. Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds[J]. European Food Research and Technology, 2006, 222(5/6): 492-508. DOI:10.1007/s00217-005-0143-6.
- [25] MEHARI B, REDI-ABSHIRO M, CHANDRAVANSI B S, et al. Simultaneous determination of alkaloids in green coffee beans from Ethiopia: chemometric evaluation of geographical origin[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(6): 1627-1637. DOI:10.1007/s12161-015-0340-2.
- [26] 吕文佳, 刘云, 杨凯舟, 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.
- [27] 张绍龙, 邱碧丽, 刘超, 等. 云南小粒咖啡中咖啡因含量比较分析[J]. 云南化工, 2018, 45(7): 79-81.
- [28] BICHO N C, LEITAO A E, RAMALHO J C, et al. Identification of chemical clusters discriminators of the roast degree in Arabica and Robusta coffee beans[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(2): 303-311. DOI:10.1007/s00217-011-1518-5.
- [29] CUONG T V, 鲁海霞, 郭康权, 等. 咖啡中葫芦巴碱检测方法及其含量变化研究进展[J]. 食品工业, 2015, 36(8): 263-269.

- [30] FARAH A, MONTEIRO M C, CALADO V, et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee[J]. Food Chemistry, 2006, 98(2): 373-380. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.07.032.
- [31] 侯彩平, 韩利文, 张凤, 等. 异绿原酸A的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 72-76. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2017.12.013.
- [32] BICHO N C, LEITAO A E, RAMALHO J C, et al. Identification of chemical clusters discriminators of arabica and robusta green coffee[J]. International Journal of Food Properties, 2013, 16(4): 895-904. DOI:10.1080/10942912.2011.573114.
- [33] CLIFFORD M N, JOHNSTON K L, KNIGHT S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 2900-2911. DOI:10.1021/jf026187q.
- [34] ESQUIVEL P, JIMÉNEZ V M. Functional properties of coffee and coffee by-products[J]. Food Research International, 2012, 46(2): 488-495. DOI:10.1016/j.foodres.2011.05.028.
- [35] WEERS M, BALZER H, BRADBURY A, et al. Analysis of acids in coffee by capillary electrophoresis[C]//Sixteenth International Scientific Symposium on Coffee, Paris, France, April 9-14, 1995: 218-223.
- [36] KAMPMANN B, MAIER H G. The acids of coffee 1. quinic acid[J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, 1982, 175(5): 333-336. DOI:10.1007/BF01136249.
- [37] FRANK O, BLUMBERG S, KUNERT C, et al. Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(5): 1945-1954. DOI:10.1021/jf0632280.
- [38] MAGA J A. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor[J]. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1978, 10(4): 323-372. DOI:10.1080/10408397809527255.
- [39] SHEARER J, FARAH A, DE PAULIS T, et al. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats[J]. Journal of Nutrition, 2003, 133(11): 3529-3532. DOI:10.1093/jn/133.11.3529.
- [40] STADLER R H, WELTI D H, STAMPFLI A A, et al. Thermal decomposition of caffeic acid in model systems: identification of novel tetraoxygenated phenylindan isomers and their stability in aqueous solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(3): 898-905. DOI:10.1021/jf950411c.
- [41] MANCINI R S, WANG Y, WEAVES D F. Phenylindanes in brewed coffee inhibit amyloid-beta and Tau aggregation[J]. Frontiers in Neuroscience, 2018, 12: 735. DOI:10.3389/fnins.2018.00735.
- [42] FUKUYAMA Y, HIDAKA K, MASUDA A, et al. Novel xanthine oxidase (XO) inhibitory phenylindanes produced by thermal reaction of caffeic acid[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2018, 82(10): 1825-1828. DOI:10.1080/09168451.2018.1491287.
- [43] BORRELLI R C, VISCONTI A, MENNELLA C, et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(22): 6527-6533. DOI:10.1021/jf025686o.
- [44] BORTHWICK A D, DA COSTA N C. 2,5-Diketopiperazines in food and beverages: taste and bioactivity[J]. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(4): 718-742. DOI:10.1080/10408398.2014.911142.
- [45] NEY K H. Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition[J]. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, 1971, 147(2): 64-68. DOI:10.1007/BF01879606.
- [46] ISHIBASHI N, SADAMORI K, YAMAMOTO O, et al. Studies on flavored peptides 2. bitterness of phenylalanine-containing and tyrosine-containing peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(12): 3309-3313. DOI:10.1080/00021369.1987.10868574.
- [47] 王知非, 林璐, 孙伟峰, 等. 苦味肽和苦味受体研究进展[J]. 中国调味品, 2016, 41(9): 152-156. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2016.09.034.
- [48] GOODMAN M, TEMUSSI P A. Structure-activity relationship of a bitter diketopiperazine revisited[J]. Biopolymers, 1985, 24(8): 1629-1633. DOI:10.1002/bip.360240815.
- [49] MATOBA T, HATA T. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1972, 36(8): 1423-1431. DOI:10.1002/bip.360240815.
- [50] ROMAN-LESHKOV Y, CHHEDA J N, DUMESIC J A. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose[J]. Science, 2006, 312: 1933-1937. DOI:10.1126/science.1126337.
- [51] WU Sijia, WANG Enting, YUAN Yuan. Detection of furan levels in select Chinese foods by solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry method and dietary exposure estimation of furan in the Chinese population[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 64: 34-40. DOI:10.1016/j.fct.2013.11.012.
- [52] CAI Yun, ZHANG Zhenhua, JIANG Shanshan, et al. Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 268: 1-5. DOI:10.1016/j.jhazmat.2013.12.067.
- [53] HUSOY T, HAUGEN M, MURKOVIC M, et al. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(12): 3697-3702. DOI:10.1016/j.fct.2008.09.048.
- [54] 阚旭辉, 郭红英, 谭兴和, 等. 食品中5-羟甲基糠醛的研究进展[J]. 食品工业, 2017, 38(3): 251-255.
- [55] MOON J K, SHIBAMOTO T. Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(13): 5823-5831. DOI:10.1021/jf901136e.
- [56] KREPPENHOFER S, FRANK O, HOFMANN T. Identification of (furan-2-yl)methylated benzene diols and triols as a novel class of bitter compounds in roasted coffee[J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 441-449. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.008.
- [57] 邵金良, 刘兴勇, 杨东顺, 等. 咖啡及咖啡制品中葫芦巴碱、绿原酸和咖啡因含量比较分析[J]. 山西农业科学, 2016, 44(2): 158-163. DOI:10.3969/j.issn.1003-0174.2018.08.022.
- [58] 邱碧丽, 代丽玲, 刘超, 等. HPLC法同时测定云南小粒咖啡中4种成分的含量[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(34): 173-175. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2018.34.054.
- [59] CZERWONKA M, OPILKA J, TOKARZ A. Evaluation of 5-hydroxymethylfurfural content in non-alcoholic drinks[J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(1): 11-18. DOI:10.1007/s00217-017-2933-z.
- [60] TSIKAS D, ZOERNER A A. Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: a historical retrospect and a discussion[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 964: 79-88. DOI:10.1016/j.jchromb.2014.03.017.
- [61] FRANK O, BLUMBERG S, KRUEMPEL G, et al. Structure determination of 3-O-caffeoyl-epi-gamma-quinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(20): 9581-9585. DOI:10.1021/jf802210a.

- [62] 欧霞, 李劲平, 余志坚, 等. 高速逆流色谱法在天然药物研究中的应用概况[J]. 中南药学, 2014, 12(3): 246-250.
- [63] KAISER N, BIRKHOLZ D, COLOMBAN S, et al. A new method for the preparative isolation of chlorogenic acid lactones from coffee and model roasts of 5-caffeoylquinic acid[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(28): 6937-6941. DOI:10.1021/jf4011356.
- [64] 张晓霞. 绿咖啡豆中绿原酸的提取纯化及其提取物抗氧化活性的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014: 33-37.
- [65] FRANK O, OTTINGER H, HOFMANN T. Characterization of an intense bitter-tasting ^1H , ^4H -quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(1): 231-238. DOI:10.1021/jf0010073.
- [66] 金文苑, 胡新中. 食品中苦味物质检测方法的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(8): 133-140. DOI:10.3969/j.issn.1003-0174.2018.08.022.
- [67] 赵镭, 张璐璐, 史波林, 等. 花椒麻度感官评价自校准线性标度的建立[J]. 中国食品学报, 2015, 15(10): 211-216. DOI:10.16429/j.1009-7848.2015.10.029.
- [68] RYLAND D, GOLDBERG E, ALIANI M. Sensory evaluation techniques for detecting and quantifying bitterness in food and beverages[M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2017: 131-160.
- [69] 高丽娇, 刘佳霖, 程尚, 等. 基于模糊评判的蜂蜜感官评价及阈值分析[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 190-193. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201422036.
- [70] STEIN L J, NAGAI H, NAKAGAWA M, et al. Effects of repeated exposure and health-related information on hedonic evaluation and acceptance of a bitter beverage[J]. *Appetite*, 2003, 40(2): 119-129. DOI:10.1016/S0195-6663(02)00173-3.
- [71] GARCIA-BURGOS D, ZAMORA M C. Exploring the hedonic and incentive properties in preferences for bitter foods via self-reports, facial expressions and instrumental behaviours[J]. *Food Quality and Preference*, 2015, 39: 73-81. DOI:10.1016/j.foodqual.2014.07.003.
- [72] VINK J M, STAPHORSIUS A S, BOOMSMA D I. A genetic analysis of coffee consumption in a sample of dutch twins[J]. *Twin Research and Human Genetics*, 2009, 12(2): 127-131. DOI:10.1375/twin.12.2.127.
- [73] HORIO T. Relationship between PROP taste sensitivity and the preference for bitter food[J]. *Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 2009, 67(1): 15-19. DOI:10.5264/eiyogakuzashi.67.15.
- [74] MIKOLAJCZYK-STECYNA J, MALINOWSKA A M, CHMURZYNSKA A. *TAS2R38* and *CA6* genetic polymorphisms, frequency of bitter food intake, and blood biomarkers among elderly woman[J]. *Appetite*, 2017, 116: 57-64. DOI:10.1016/j.appet.2017.04.029.
- [75] 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.
- [76] 翟晓娜, 白燕冰, 张春月, 等. 青年学生对云南咖啡的感官嗜好性分析研究[J]. 饮料工业, 2013, 16(9): 3-6.
- [77] HU Xiaojia, LEE J. Emotions elicited while drinking coffee: a cross-cultural comparison between Korean and Chinese consumers[J]. *Food Quality and Preference*, 2019, 76: 160-168. DOI:10.1016/j.foodqual.2018.08.020.
- [78] GEEL L, KINNENAR M, DE KOCK H L. Relating consumer preferences to sensory attributes of instant coffee[J]. *Food Quality and Preference*, 2005, 16(3): 237-244. DOI:10.1016/j.foodqual.2004.04.014.