

咖啡真实性鉴别技术研究进展

江丰^{1,2,3*}, 吴婉琴^{1,2,3}, 黎星^{1,2,3}, 朱晓玲^{1,2,3}, 张菊^{1,2,3}

[1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075; 2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 武汉 430075; 3. 国家市场监督管理总局重点实验室(动物源性食品中重点化学危害物检测技术), 武汉 430075]

摘要: 咖啡作为世界上人们最喜爱的饮品之一, 具有广阔的消费市场, 需求量巨大。但由于干旱和农作物疾病的影响, 近年来巴西、非洲等咖啡主要产地的咖啡产量显著下降。咖啡豆的资源紧缺和高利润导致咖啡真实性问题逐渐成为全球关注的热点。咖啡中的物种掺假、品种掺假和地理来源标示虚假是3种比较常见的真实性问题。本文综述了国内外研究者关于咖啡真实性鉴别技术的研究进展, 包括光谱检测技术、色谱/质谱检测技术、分子生物学检测技术和多种手段联合技术, 探讨了不同检测技术的优缺点, 并对该领域分析技术未来的发展趋势进行展望, 以期能为咖啡的真实性问题的解决提供资料参考和依据。

关键词: 咖啡; 真实性; 鉴别技术; 光谱; 色谱/质谱; 分子生物学

Research progress of coffee adulteration identification technology

JIANG Feng^{1,2,3*}, WU Wan-Qin^{1,2,3}, LI Xing^{1,2,3}, ZHU Xiao-Ling^{1,2,3}, ZHANG Ju^{1,2,3}

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China; 2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China; 3. Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Wuhan 430075, China)

ABSTRACT: Coffee, as one of the world's favourite beverages, has a broad consumer market and huge demand. However, due to drought and crop diseases, coffee production in Brazil, Africa and other major coffee-producing regions has declined significantly in recent years. The scarcity of resources and high profits of coffee beans have led to the issue of coffee authenticity gradually becoming a hotspot of global concern. Species adulteration, varietal adulteration and false geographical origin labelling in coffee are 3 kinds of relatively common authenticity problems. This paper reviewed the research progress of domestic and foreign researchers on coffee authenticity identification techniques, including spectroscopic detection techniques, chromatography/mass spectrometry detection techniques, molecular biology detection techniques and multi-means combined techniques, discussed the advantages and disadvantages of different detection techniques, and looked forward to the future development trend of analytical techniques in this field, with a view to providing information reference and basis for solving the authenticity problem of coffee.

KEY WORDS: coffee; authenticity; identification techniques; spectroscopy; chromatography/mass spectrometry; molecular biology

基金项目: 湖北省市场监督管理局科技计划项目(Hbscjj-KJ2021002)

Fund: Supported by the Hubei Provincial Market Supervision Administration Science and Technology Program Project (Hbscjj-KJ2021002)

*通信作者: 江丰, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 349136833@qq.com

*Corresponding author: JIANG Feng, Master, Senior Engineer, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, No.8, Pharmacovigilance 2nd Road, Donghu New Technology Development Zone, Wuhan 430075, China. E-mail: 349136833@qq.com

0 引言

咖啡作为饮料具有悠久的历史,与茶叶、可可并称为世界三大饮料,在国际贸易中其交易量是仅次于石油的原料产品。全球咖啡产量在 522.34~954.28 万 t,总体呈上升趋势,年平均增长率为 2.39%^[1]。近年来,中国咖啡产业快速发展,2022 年中国咖啡产业规模为 2007 亿元,预计 2025 年产业规模将达到 3693 亿元^[2]。从消费量角度来看,相对于咖啡消费成熟国家,中国作为咖啡消费的新兴力量,消费量以每年 20% 以上的速度增长,远高于发达国家年均 3% 左右的增长速度,中国将成为世界咖啡消费大国之一^[3]。

由于干旱和农作物疾病的影响,近年来巴西等咖啡主要产地的咖啡产量显著下降,咖啡豆的短缺问题越来越突出。在供不应求的情况下,市场上咖啡的掺杂掺假违法行为逐渐增多,手段也越来越多样化,有品种、地理来源的虚假宣称,也有玉米、大麦、菊苣、小麦、红糖、大豆和黑麦等廉价的原料的掺入^[4]。如巴西作为世界最大的咖啡生产国,由巴西咖啡工业协会(Associação Brasileira da Indústria de Café, ABIC)通过对 2400 个品牌的咖啡样品进行研究分析发现,其中有 583 个品牌被发现掺杂了果壳、玉米、黑麦、种子、红糖等掺假物,尽管这些成分对身体不会造成伤害,但他们会影响产品质量和口感,损害消费者利益^[5]。欧盟发布有关“食品安全与食品掺假”调查报告,列出 10 大易掺假食品名单,咖啡位列第七,这表明咖啡掺假已在行业中普遍存在^[6]。

目前国内外有很多学者已关注对咖啡真实性鉴别技术开发研究,但采用的技术各异,本文针对光谱检测技术、色谱/质谱检测技术、分子生物学检测技术和多种手段

联合技术进行了综述,并对该领域分析技术未来的发展趋势进行展望,以期对咖啡的真实性问题的解决提供资料参考和依据。

1 咖啡真实性鉴别技术

目前,用于咖啡真实性的鉴别技术主要包括以下 4 种技术(见表 1): (1)以成像、红外光谱和核磁共振技术为代表的光谱检测技术,主要是对咖啡表面形态、颜色以及其成分的化学键及相应官能团进行分析; (2)以不同色谱、质谱为代表的色谱/质谱检测技术,主要是对咖啡的特定成分或标志物以及各种代谢物进行检测分析; (3)以聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)指纹图谱等为代表的分子生物学检测技术,主要对咖啡中的核酸进行检测分析; (4)以光谱和色谱/质谱技术中的两种或多种技术联合的技术,主要是从咖啡的元素组成、代谢物、化合物稳定同位素等不同角度进行分析。这些技术目前分别可用于咖啡的物种掺假、品种掺假和地理来源标示虚假。

1.1 光谱检测技术

1.1.1 成像技术

光谱成像技术能够区分各种基质中的化学成分、表面形态和颜色,具有快速、无损的特点,而且无需样品制备或使用专业实验室设施和危险化学品,这些优势意味着这种技术具有用于食品真实性鉴别的潜力^[36]。

应用于咖啡真实性鉴别的成像技术有光学显微镜成像和多光谱成像(multispectral imaging, MSI)。PRADANA-LÓPEZ 等^[7]基于卷积神经网络(convolutional neural networks, CNN)的算法,对不同类型咖啡(阿拉比卡咖啡和罗布斯塔

表 1 咖啡真实性鉴别技术应用情况
Table 1 Application of coffee authenticity identification technology

技术类别	主要技术	鉴别对象	鉴别类型	参考文献
光谱检测技术	成像技术	表面形态和颜色、物质化学键及相应官能团	①②	[7-8]
	红外光谱技术	物质化学键及相应官能团	①	[9-11]
	核磁共振技术	代谢物	①②	[12-16]
色谱/质谱检测技术	气相色谱-质谱技术	代谢物(风味)	②	[17-18]
	液相色谱和液相色谱-质谱技术	代谢物	①②	[19-22]
	离子色谱技术	代谢物(糖类)	①	[23-25]
分子生物学检测技术	稳定同位素质谱技术	稳定同位素	③	[26]
	实时定量荧光 PCR	核酸	①②	[27-28]
	DNA 条形码技术		①②	[29-30]
多种手段联合技术	光谱+光谱技术	表面形态和颜色、物质化学键及相应官能团	①②	[31]
	光谱+色谱/质谱技术	元素组成、代谢物、稳定同位素	①②③	[32-33]
	色谱/质谱+色谱/质谱技术	代谢物、稳定同位素	①②③	[34-35]

注: ①物种掺假; ②品种掺假; ③地理来源。

咖啡)的光学图像进行分类,建立的模型能够对不同类型的咖啡粉、菊苣和大麦进行分类,误差低于 1.0%。此项技术可检测出重量从 5.0%到 0.5%的掺假物,误差低于 1.4%。刘慧智等^[8]利用数码显微镜,对不同来源咖啡及常见掺假物巴西莓果粉、大麦粉、黑玉米粉的水溶液进行观察,可以明显区分掺假物和咖啡的形态,并且可以分别鉴别出掺入 10%黑玉米、10%大麦、5%巴西莓果粉的咖啡粉。MIHAILIOVA 等^[37]将 MSI 作为一种快速筛选阿拉比卡咖啡豆真伪的手段,其利用正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)对烘焙阿拉比卡咖啡豆和罗布斯塔咖啡豆中选取的光谱和形态特征建立模型。模型对测试数据集中两种咖啡豆的分类正确率达到了 100%,并且能够成功预测阿拉比卡与罗布斯塔咖啡豆的掺假程度。

到目前为止,光谱成像技术用于咖啡真实性鉴别的报道大多还处于实验室研究阶段,还缺乏相关研究证明模型在实际场景中应用的适用性。其次,光谱成像技术会生成大量的光谱数据,如何从冗余的光谱信息中提取出咖啡和掺假物的特征数据并建立合理的预测模型,将成为未来此项技术能否应用于咖啡真实性鉴别的关键。

1.1.2 红外光谱技术

红外光谱(infrared spectrometry, IR)是快速鉴定掺假物使用最广泛的技术之一。与传统方法相比,它的优势包括前处理简单、分析时间短。尽管咖啡产品的 IR 很复杂,但结合化学计量学分析技术后,也广泛应用于咖啡真实性鉴别^[38]。

陈秀明等^[9]利用 IR 技术结合掺杂物筛查(adulterant screen)算法,建立咖啡掺假快速鉴别模型,最低可识别咖啡中掺入 2%的巴西莓果粉及 5%的大麦。奚星林等^[10]利用衰减全反射 IR 以及便携式衰减全反射 IR 采集了咖啡、黑玉米、大麦和巴西莓果粉的红外漫反射光谱,然后用 OPUS 光谱软件建模,结果显示利用该模型可最低识别咖啡中 10%的黑玉米、10%的大麦和 5%的巴西莓果粉掺假量。CHAKRAVARTULA 等^[11]评估了 CNN、偏最小二乘法(partial least squares, PLS)和区间偏最小二乘法(interval partial least squares, iPLS)在傅立叶变换近红外光谱中定量检测咖啡中掺入菊苣、大麦和玉米的可行性。结果显示 CNN 算法总体上表现优异,可与 PLS、iPLS 相媲美,性能优异($R^2 > 0.98$),能够用于咖啡掺假的定量测定。

基于 IR 技术,在食品真实性鉴别方面已经开展了较多的研究,但是咖啡与大麦、玉米等掺假物中到底是哪些化合物及其基因影响了模型的判别还不够清晰,并且咖啡及掺假物的采集时间、地理位置、加工方式及程度等因素会不会影响光谱图,进而影响模型对品种的判断还有待进一步的考察。

1.1.3 核磁共振技术

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)是有机物

结构分析的强有力工具,与液相色谱、气相色谱法等传统分析方法相比,具有高通量、重现性好、操作简便、结构信息丰富等优点,对咖啡的整体分析具有明显优势^[39]。

DEFERNEZ 等^[12]和 GUNNING 等^[13-14]分别使用高场(600 M)和低场(60 M) $^1\text{H-NMR}$ 光谱鉴别咖啡真伪。其采用简单的氯仿萃取法,从研磨烘焙咖啡中提取亲脂部分,然后对样品中的 16-*O*-甲基咖啡醇(16-*O*-methyl-cafestol, 16-OMC)进行定量分析,用来区分罗布斯塔咖啡豆和阿拉比卡咖啡豆,最低可检测出阿拉比卡咖啡中掺入 1%~2%的罗布斯塔咖啡。FREITAS 等^[15]通过常规固态 ^1H 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱区分不同的咖啡类型(阿拉比卡/罗布斯塔),具有非破坏性,分析速度快($^1\text{H-NMR}$ 约 20 min, $^{13}\text{C-NMR}$ 约 1.5 h)的优势。MILANI 等^[16]开发一种 $^1\text{H-NMR}$ 与主成分分析(principal component analysis, PCA)相结合的方法,以实现咖啡掺假样品的识别和对大麦、玉米、咖啡壳、大豆、大米、小麦 6 种不同掺假物的定量,其最低检测限为 0.31%~0.86%。

NMR 是代谢组学指纹分析中常用的工具之一,能够定量识别和检测咖啡和掺假物中的代谢成分,这些特点使其在咖啡真实性鉴别中得以应用。然而, NMR 技术相对复杂,需要具有相关专业知识的人员进行操作,并且 NMR 设备的价格相对较高,这将对所建立的咖啡真实性鉴别方法的推广带来一定限制。

1.1.4 其他光谱技术

除以上光谱技术外,还有同步前表面荧光光谱(synchronous front-face fluorescence spectroscopy, SFFFS)、电感耦合等离子体发射光谱(inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, ICP-OES)、X 射线荧光光谱(X-ray fluorescence spectrometry, XRF)等技术。

谢婧雅^[40]实现了基于 SFFFS 和偏最小二乘回归相结合的咖啡粉中掺入烘焙后大豆粉和玉米粉的快速无损测定,定量分析所建立模型的决定系数(R^2)在 0.904~0.952 范围内,所有的均方根误差均不超过 4%。掺入烘焙后玉米粉和大豆粉的相对预测误差分别为 20.1%和 17.3%。相应的预测偏差分别为 3.5 和 3.9。MOHAMMED 等^[41]对也门 8 个主要咖啡生产省份的 16 个咖啡样品采用 ICP-OES 进行了元素分析。结果发现也门咖啡中的钙含量(5800 $\mu\text{g/g}$)明显高于埃塞俄比亚咖啡(1000 $\mu\text{g/g}$),故认为可以用钙含量来区分也门咖啡和埃塞俄比亚咖啡。WORKU 等^[42]基于 XRF 的多元素数据溯源绿色阿拉比卡咖啡豆样品的地理来源。其对埃塞俄比亚 4 个咖啡产区和 3 个主要产区的咖啡样品进行线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA),总体分类准确率分别为 86%和 80%。

SFFFS、ICP-OES 和 XRF 等光谱技术应用于咖啡真实性鉴别还处于研究初期,掺假物分类的准确率还有待进一步提升。且咖啡及掺假物中各元素含量容易受种植环境

的影响,故想通过元素含量的差异来实现掺假物的鉴别还需结合其他检测手段。

1.2 色谱/质谱检测技术

1.2.1 气相色谱-质谱技术

顶空固相微萃取气相色谱-质谱法(headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, HS-SPME/GC-MS)广泛运用于咖啡香气成分的特征,这主要是基于咖啡中含有呋喃、吡啶、噻吩、吡咯、萜烯、醛类和酚类等 800 多种香气成分^[43]。此技术能高效、简便、准确、灵敏地对咖啡的挥发性成分进行定量和定性分析,为咖啡的真实性鉴别提供了较好的手段。

ONGO 等^[17]通过 HS-SPME/GC-MS 对菲律宾不同地区种植的咖啡豆进行分析,鉴定出了 47 种主要化合物,再经 PCA 分析,结果表明醋酸、糠醛、5-甲基糠醛、2-甲酰基吡咯、麦芽酚、4-乙基愈创木酚和苯酚 7 种关键的挥发性代谢物可用于区分阿拉比卡咖啡和罗布斯塔咖啡。CAPORASO 等^[18]也采用 HS-SPME/GC-MS 对从 13 个国家采集的 25 批阿拉比卡和罗布斯塔咖啡豆样本进行了分析,结果显示在不同批次中,烘焙咖啡中 50 种挥发性化合物的变异性很高,其中变化最大的是 2,3-丁二醇、3-乙基吡啶和己醛。此外,通过隐含狄利克雷分布和多元线性回归对阿拉比卡咖啡豆和罗布斯塔咖啡豆地理来源建立了模型,可以分别获得 99.5%和 90.8%的准确率。

目前研究中大多使用的是一维气相色谱对咖啡和掺假物中的风味组分进行分析,能够分离鉴定的风味组分不超过 100 种,未来可以引入二维气相来提高分离能力,通过鉴定出更多的风味组分来识别咖啡掺假物。

1.2.2 液相色谱和液相色谱-质谱技术

液相色谱和液相色谱-质谱技术在食品真实性鉴别中的应用有了较大发展,从鉴别类型上看,目前已应用于物种及品种、产地及品质鉴别方面^[44]。

NUNEZ 等^[19-20]基于高效液相色谱-紫外检测(high performance liquid chromatography-ultraviolet spectrometry, HPLC-UV)和高效液相色谱-荧光检测(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FLD)指纹图谱的非目标策略,完成速溶咖啡、速溶低咖啡因咖啡和菊苣的分类和鉴定,并通过偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)检测和量化咖啡样品中的掺假水平,最终证实非靶向 HPLC-UV 和 HPLC-FLD 指纹分析策略都适合用于评估咖啡的完整性和真实性。CHEAH 等^[21]开发了一种高效液相色谱结合非目标分析的咖啡掺假鉴别方法。其将液态咖啡直接注入高效液相色谱仪,无需进行样品制备和目标分析物鉴定,然后通过 PCA 分析,便可以将咖啡与掺假咖啡(大豆、绿豆)区分开来。该方法的检测限为 5%。TAVARES 等^[22]通过 HPLC-FLD 检测咖啡中的生育酚来鉴别是否掺入了玉

米。其通过对提取的脂质进行分析,然后通过 PCA、LDA 等化学计量学分析,最终确定生育酚可以作为掺入玉米的特征标志物,最低识别量为 5%。

MIAO 等^[45]结合超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱技术、非靶向代谢组学和指纹图谱法分析了全球 18 个产区咖啡豆的代谢物成分差异,并结合 PCA 和 OPLS-DA 模型,确定了与咖啡豆品种和地理产地显著相关的 10 种特征代谢物。SERVILLO 等^[46]通过高效液相色谱-质谱法对罗布斯塔咖啡豆和阿拉比卡咖啡豆进行分析,结果显示高水苏碱可以作为阿拉比卡咖啡豆和罗布斯塔咖啡豆掺假鉴别的标志物。CAI 等^[47]采用超高效液相色谱-质谱法对咖啡粉进行寡糖分析,确定了 17 种寡糖成分可以作为识别咖啡粉中大豆和大米的标记物,最低掺假检出含量低至 5%。SILVA 等^[48]利用液相色谱-离子淌度-四极杆/飞行时间串联质谱法对阿拉比卡和罗布斯塔咖啡豆的脂质进行了分析,通过 PCA、PLS-DA 和聚类分析揭示了两种咖啡脂质组成之间的差异,并对 15 个不同类别的约 180 种脂质进行了注释。

液相色谱和液相色谱-质谱技术能够对咖啡及掺假物中绝大多数化合物进行检测,但对化合物的鉴定还是受限于小分子数据库的完善程度,相信随着数据库的不断完善,会有更多灵敏度高、特异性强的标志物被鉴定出来用于咖啡真实性的鉴别。

1.2.3 离子色谱技术

由于咖啡及其掺假物中含有的糖类主要有甘露醇、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖等,国内外许多学者通过离子色谱技术研究咖啡及其制品中寡糖含量进行掺伪识别^[49]。

潘丙珍等^[23-24]采用高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(high performance anion exchange-integral pulse, HPAEC-PAD)测定烘焙咖啡豆及其掺假物中糖类标记物,结果表明阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖和果糖这 5 种糖可以作为鉴别咖啡中是否掺入蓝莓粉、黑玉米和大麦的标志物,且咖啡中掺入 5%黑玉米、5%大麦和 10%莓果粉时均能被识别,准确率达到 93.3%。PAULI 等^[25]通过 HPAEC-PAD 测定纯烘焙咖啡豆和掺假咖啡豆的特征物,通过主成分分析和线性判别分析,结果显示葡萄糖和果糖含量可分别被视为小麦和大豆掺假的标记物,并且所建立的模型能有效识别和预测不同的混合物比例。

离子色谱技术采用糖类标记物的方法对咖啡掺假物进行鉴别,但这种方法目前仅适用于鉴别与咖啡糖类组分含量差异较大且只加入一种掺假物的情况,未来可与其他方法联合使用。

1.2.4 稳定同位素质谱技术

稳定同位素质谱技术(stable isotope ratio mass spectrometry, IRMS)可以检测样品中目标元素稳定同位素的丰度(以原

子百分计的同位素的相对含量), 是近年来新兴的一种判断食品掺假和真实性检测的技术, 其具有灵敏度高、检测限低的特点, 有着广阔的应用前景^[50]。

PENG 等^[26]使用 IRMS 对巴西不同产地使用有机($n=25$)和传统($n=42$)系统生产的 67 种咖啡进行了稳定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{18}\text{O}$ 、 $\delta^2\text{H}$ 和 $\delta^{15}\text{N}$)进行测定, 数据通过 LDA、k-近邻分析法(k-nearest neighbors algorithm, k-NN)和支持向量机(support vector machine, SVM)分析, 结果表明根据 C 稳定同位素比值($\delta^{13}\text{C}$; $p=0.204$)无法区分有机和传统栽培咖啡, 但有机咖啡的 N 稳定同位素比值($\delta^{15}\text{N}$; $p=0.0006$)明显高于传统咖啡。同时, 其还考察不同化学计量学分析方法对不同地域生产的咖啡的分类情况, SVM 对圣保罗生产的 75%咖啡进行了正确分类, 而 LDA 则对米纳斯吉拉斯州生产的 71%的咖啡进行了正确分类。

咖啡和掺假物的稳定同位素比值与种植区的水、种植方式、气候和地表地质相关, 目前该技术仅用于咖啡豆地理位置的掺假鉴别, 判别的正确度还有待进一步提升。

1.3 分子生物学检测技术

近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 基于 DNA 的物种鉴别方法, 如 PCR 技术等, 已发展成为分析化学技术的有效补充方法, 它具有极高的灵敏度、分辨率与特异性, 越来越多地应用于食品掺伪鉴别中。

在运用 PCR 技术进行咖啡真实性鉴别方面, 梁颖婕等^[27]通过对咖啡基因信息的检索分析, 根据咖啡的黄苷甲基转移酶(xanthosine methyltransferase 1, XMT1)基因序列设计了一组咖啡特异性的引物与探针, 建立咖啡物种特异性实时荧光 PCR 检测方法, 该方法能快速检测出咖啡物种特异性, 定性检测体系对咖啡 DNA 的检测灵敏度为 0.1 ng/ μL , 特异性和稳定性良好。FERREIRA 等^[28]开发一种基于实时 PCR 的方法, 可用于检测商业烘焙咖啡和可溶咖啡中的大麦、玉米和大米掺假物, 该方法对大麦、玉米和大米 DNA 的灵敏度可至 0.6 pg、14 pg 和 16 pg。

在运用 DNA 条形码技术进行咖啡真实性鉴别方面, UNCU 等^[29]通过对叶绿体 *trnH-psbA* 基因间距的 PCR-毛细管电泳分析, 可成功区分阿拉比卡咖啡及其常见的玉米、大豆、大米、小麦和大麦等掺假物, 在对混合物进行检测时, 仅通过 DNA 条形码扩增和毛细管电泳分离就能成功检测出低至 1%的掺假物。BOSMALI 等^[30]开发了一种基于核标记 DNA 条形码结合高分辨率熔融(barcode DNA-high resolution melting, Bar-HRM)方法, 该方法可直接从已冲泡的咖啡中对其原料(阿拉比卡或罗布斯塔咖啡)进行鉴别。COMBES 等^[51]开发了一种基于 DNA 的咖啡品种鉴定方法, 可通过对生咖啡和烘焙咖啡产品的 HRM 分析来确定阿拉比卡咖啡和罗布斯塔咖啡的种类, 并可量化它们在混合咖啡中的相对比例。

相比光谱检测技术和色谱/质谱检测技术, 分子生物学检测技术具有特异性强、灵敏度高的优点。但该技术需要以样品中提取的高质量 DNA 为基础, 而咖啡在烘焙等深加工过程中的高温条件可能会使 DNA 严重降解, 最终造成样品无法测定。

1.4 多种手段联合技术

咖啡掺假检测会受到多方面因素影响而导致测量结果出现偏差, 因此, 除上述几类检测方法以外, 研究者还会采取多种检测方法联合使用的策略, 以获得更加可靠的检测数据。

ARAUJO 等^[31]开发了一种近红外光谱和基于化学计量学辅助颜色直方图的分析系统相结合的技术, 在不进行任何样品制备的情况下, 可以直接分析咖啡粉, 将美食咖啡与传统咖啡和高级咖啡区分开来。RODRIGUES 等^[32]应用 IRMS 和元素分析法(elemental analysis, EA)对来自中美洲、太平洋、南美洲、非洲、亚洲和大洋洲 20 个不同产地的 68 个绿咖啡豆样本进行了地理产地鉴别。通过对咖啡豆的同位素组成($\delta^{13}\text{C}$ VPDB、 $\delta^{15}\text{N}$ VAIR、 $\delta^{18}\text{O}$ VSMOW)和元素组成(碳和氮的百分比)的多元分析, 区分咖啡的地理来源。ASSIS 等^[33]将纸喷雾质谱法、傅里叶变换衰减全反射红外光谱法两种分析技术与中低水平数据融合和 PLS 回归数据处理相结合, 只需对样品进行最少的预处理, 就能进行简单快速的测量, 最终成功预测了罗布斯塔-阿拉伯咖啡混合物的成分。ZAYED 等^[34]利用 NMR 和 GC/MS 对中东地区的市售咖啡产品进行了分析。通过 NMR 鉴定了 18 种代谢物, 通过 GC/MS 鉴定出属于 15 种不同化学类别的 143 种代谢物, 再通过多变量数据分析, 确定出 16-O-甲基咖啡醇、果糖、棕榈酸和硬脂酸 4 种代谢物可以作为鉴别中东地区咖啡品种的标志物。DEMIA NOVÁ 等^[52]利用挥发性物质和水溶性化合物(pH、总抗氧化能力、总多酚含量、咖啡因和绿原酸)来识别来自非洲、南美洲和中美洲的绿色阿拉比卡咖啡豆, 识别准确率分别为 100%和 91.30%。CHYTRY 等^[35]采用粒子诱导 X 射线发射仪(particle-induced X-ray emission analysis, PIXE)、傅立叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和加速器质谱仪-放射性碳(accelerator mass spectrometry- ^{14}C , AMS- ^{14}C)分析了巴西和牙买加咖啡, 通过整合不同技术获得的结果, 可以从元素、化合物官能团和采收时间信息多方面鉴别咖啡的来源或掺伪。李泽林等^[53]通过对比分析两个产地小粒咖啡生豆的多酚、黄酮、多糖等活性成分的含量和过氧化氢酶、脂氧合酶、 β -葡萄糖苷酶、脂肪酶等风味酶活性强弱, 结果显示, 咖啡活性成分和风味酶活性可以作为区分两个产地的指标。

多种技术联合的策略越来越被广泛地应用于咖啡真实性鉴别, 其可以弥补单一鉴别技术上的不足。虽然检测

流程更加复杂,但鉴别的准确度更高,尤其适用于单一鉴别技术无法准确鉴别的情形,未来也将有更多的联合技术被开发出来用于咖啡的真实性鉴别。

2 总结与展望

咖啡真实性的鉴别会受到很多方面的影响,例如掺假物的种类、种植的方式、气候条件等,每种鉴别技术都有其独特的优势和局限性。尽管已经开发了很多光谱检测技术、色谱/质谱检测技术、分子生物学检测技术以及多种手段联合技术来鉴别咖啡真实性,但随着新的掺假物和掺假方式的出现,后续可以进一步研究的方面有: 1)在鉴别咖啡以次充好方面,对于劣质变味的咖啡豆掺入正常咖啡豆的情况进行研究。依据 ISO 3509—2005《咖啡和咖啡制品.词汇》和我国 GB/T 18007—2011《咖啡及其制品 术语》中的规定,变味的咖啡不属于正常咖啡,但目前的研究主要是咖啡的产地和掺假物品种的鉴别,对于正常的咖啡中掺入变味的咖啡关注度较少。2)在物种和品种掺假方面,开展咖啡真实性鉴别检测中的样品前处理净化技术研究。由于咖啡含有较多的咖啡因、糖类、色素等干扰物,进行液相色谱-质谱、核磁共振波谱、稳定同位素比质谱分析时会给定量结果的准确性带来较大影响,但目前大多数研究都是采用常规的前处理技术,缺少针对性的净化方法。此外还可开展基于空间成像技术的咖啡掺假物定量检测研究。已有研究中咖啡掺假物定量检测大多是通过建立数理统计模型来实现,但模型预测的结果很容易受建模时样品的真实性、代表性影响,相关方法推广应用有较大难度。但空间成像技术,如光谱成像技术、质谱成像技术可以通过获取掺假物中标志物的空间分布信息直接从空间的角度进行掺假物的定量检测,未来必将更广泛地应用到咖啡等粉状食品的掺假检测中。3)在咖啡真实性鉴别标准体系构建方面,开展咖啡真实性鉴别系列检测方法研究。目前研究的咖啡真实性鉴别技术较多,但单一的鉴别技术必定无法同时满足品种、地理位置的鉴别,开展光谱检测技术、色谱/质谱检测技术和分子生物学检测技术对于咖啡真实性鉴别的有效性评价,并综合形成涵盖光谱、元素、特征标志物、分子生物学信息的咖啡真实性鉴别标准体系,将为解决咖啡的真实性问题提供重要技术支撑。

参考文献

- [1] 黄家雄, 吕玉兰, 武瑞瑞. 全球咖啡产量、价格变化趋势及相关性分析[J]. 云南农业科技, 2020, (1): 27–29.
HUANG JX, LV YL, WU RR. Correlation analysis between yield and price in coffee industry [J]. Yunnan Agric Sci Technol, 2020, (1): 27–29.
- [2] 周明阳. 天好咖啡加码中国市场[N]. 经济日报, 2023-06-16(004).
ZHOU MY. Tim hortons increases its presence in China [N]. Economic Daily, 2023-06-16(004).
- [3] 钟薇, 李娟, 邱琳. 浅析欧盟和我国咖啡法规标准体系[J]. 中国标准化, 2021, (21): 161–165.
ZHONG W, LI J, QIU L. Coffee regulation and standards systems of the EU and China [J]. China Stand, 2021, (21): 161–165.
- [4] FERREIRA T, GALLUAAI L, PAULIS T, *et al.* Three centuries on the science of coffee authenticity control [J]. Food Res Int, 2021, 149: 110690.
- [5] TOCI AT, FARAH A, PEZZA HR, *et al.* Coffee adulteration: More than two decades of research [J]. Crit Rev Anal Chem, 2016, 46(2): 83–92.
- [6] 王文强, 文豪, 张文, 等. 基于美国药典委 EMA 数据库的全球经济利益驱动型掺假和食品欺诈的分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 804–810.
WANG WQ, WEN H, ZHANG W, *et al.* Analysis of global economically motivated adulteration and food fraud based on the EMA database of the United States Pharmacopoeia [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(3): 804–810.
- [7] PRADANA-LÓPEZ S, PÉREZ-CALABUIG AM, CANCELLA JC, *et al.* Deep transfer learning to verify quality and safety of ground coffee [J]. Food Control, 2021, 122: 107801.
- [8] 刘慧智, 奚星林, 邵仕萍. 掺假咖啡的形态鉴别研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 3129–3133.
LIU HZ, XI XL, SHAO SP. Identification of morphology of adulterated coffee [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(8): 3129–3133.
- [9] 陈秀明, 奚星林, 潘丙珍, 等. 基于近红外光谱技术的咖啡掺假快速鉴别方法[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 253–257, 290.
CHEN XM, XI XL, PAN BZ, *et al.* Study of the rapid identification method of coffee adulteration based on near-infrared spectroscopy [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(10): 253–257, 290.
- [10] 奚星林, 陈秀明, 邵仕萍, 等. 咖啡中掺入黑玉米、大麦和巴西莓果粉的红外鉴别研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(9): 3450–3454.
XI XL, CHEN XM, SHAO SP, *et al.* Identification of coffee blended with black corn, barley and acai berry fruit powder with infrared spectroscopy [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(9): 3450–3454.
- [11] CHAKRAVARTULA SSN, MOSCETTI R, BEDINI G, *et al.* Use of convolutional neural network (CNN) combined with FT-NIR spectroscopy to predict food adulteration: A case study on coffee [J]. Food Control, 2022, 135: 108816.
- [12] DEFERNEZ M, WREN E, WATSON AD, *et al.* Low-field ¹H NMR spectroscopy for distinguishing between arabica and robusta ground roast coffees [J]. Food Chem, 2017, 216: 106–113.
- [13] GUNNING Y, DEFEMEZ M, WATSON AD, *et al.* 16-O-methylcafestol is present in ground roast Arabica coffees: Implications for authenticity testing [J]. Food Chem, 2018, 248: 52–60.
- [14] GUNNING Y, DEFEMEZ M, KEMSLEY EK. Benchtop (60 MHz) proton NMR spectroscopy for quantification of 16-O-methylcafestol in lipophilic extracts of ground roast coffee [J]. MethodsX, 2023, 10: 102132.
- [15] FREITAS JCC, EJAZ M, TOCI AT, *et al.* Solid-state NMR spectroscopy of roasted and ground coffee samples: Evidences for phase heterogeneity and prospects of applications in food screening [J]. Food Chem, 2023, 409: 135317.
- [16] MILANI MI, ROSSINI EL, CATELANI TA, *et al.* Authentication of

- roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach [J]. *Food Control*, 2020, 112: 107104.
- [17] ONGO EA, MONTEVECCHI G, ANTONELLI A, *et al.* Metabolomics fingerprint of Philippine coffee by SPME-GC-MS for geographical and varietal classification [J]. *Food Res Int*, 2020, 134: 109227.
- [18] CAPORASO N, WHIORTH MB, CUI C, *et al.* Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS [J]. *Food Res Int*, 2018, 108: 628–640.
- [19] NUNEZ N, SAURINA J, NÚÑEZ O. Non-targeted HPLC-FLD fingerprinting for the detection and quantitation of adulterated coffee samples by chemometrics [J]. *Food Control*, 2021, 124: 107912.
- [20] NUNEZ N, PONS J, SAURINA J, *et al.* Non-targeted high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection fingerprinting for the classification, authentication, and fraud quantitation of instant coffee and chicory by multivariate chemometric methods [J]. *LWT*, 2021, 147: 111646.
- [21] CHEAH WL, FANG M. HPLC-based chemometric analysis for coffee adulteration [J]. *Foods*, 2020, 9(7): 880.
- [22] TAVARES KM, LIMA AR, NUNES CA, *et al.* Free tocopherols as chemical markers for Arabica coffee adulteration with maize and coffee by-products [J]. *Food Control*, 2016, 70: 318–324.
- [23] 潘丙珍, 奚星林, 陈秀明, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定烘焙咖啡豆及其掺假物中的糖类标记物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(20): 5346–5352.
- PAN BZ, XI XL, CHEN XM, *et al.* Determination of carbohydrate markers in roasted coffee beans and adulterated products by high performance anion exchange chromatography-pulse amperometric detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(20): 5346–5352.
- [24] 潘丙珍, 庞世琦, 陈秀明, 等. 基于主成分分析和判别分析的咖啡掺假鉴别方法研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(11): 267–272.
- PAN BZ, PANG SQ, CHEN XM, *et al.* Study of the identification method of coffee adulteration based on principal component analysis and discriminant analysis [J]. *Food Sci Technol*, 2022, 47(11): 267–272.
- [25] PAULI ED, BARBIERI F, GARCIA PS, *et al.* Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat [J]. *Food Res Int*, 2014, 61: 112–119.
- [26] PENG CY, ZHANG YL, SONG W, *et al.* Characterization of Brazilian coffee based on isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$, and $\delta^{15}\text{N}$) and supervised chemometrics [J]. *Food Chem*, 2019, 297: 124963.
- [27] 梁颖婕, 洗钰茵, 刘婧文, 等. 咖啡特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. *检验检疫学报*, 2019, 29(1): 13–17.
- LIANG YJ, XIAN YY, LIU JW, *et al.* Establishment of real-time fluorescent PCR detection method for coffee species specificity [J]. *J Inspect Quar*, 2019, 29(1): 13–17.
- [28] FERREIRA T, FARAH A, OLIVEIRA TC, *et al.* Using real-time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees [J]. *Food Chem*, 2016, 199: 433–438.
- [29] UNCU AT, UNCU AO. Plastid trnH-psbA intergenic spacer serves as a PCR-based marker to detect common grain adulterants of coffee (*Coffea arabica* L.) [J]. *Food Control*, 2018, 91: 32–39.
- [30] BOSMALI I, LAGIOTIS G, STAVRIDOU E, *et al.* Novel authentication approach for coffee beans and the brewed beverage using a nuclear-based species-specific marker coupled with high resolution melting analysis [J]. *LWT*, 2021, 137: 110336.
- [31] ARAUJO TKL, NOBREGA RO, FEMANDES DDS, *et al.* Non-destructive authentication of gourmet ground roasted coffees using NIR spectroscopy and digital images [J]. *Food Chem*, 2021, 364: 130452.
- [32] RODRIGUES CI, MAIA R, MIRANDA M, *et al.* Stable isotope analysis for green coffee bean: A possible method for geographic origin discrimination [J]. *J Food Compos Anal*, 2009, 22(5): 463–471.
- [33] ASSIS C, PEREIRA HV, AMADOR VS, *et al.* Combining mid infrared spectroscopy and paper spray mass spectrometry in a data fusion model to predict the composition of coffee blends [J]. *Food Chem*, 2019, 281: 71–77.
- [34] ZAYED A, ABDELWARETH A, MOHAMED TA, *et al.* Dissecting coffee seeds metabolome in context of genotype, roasting degree, and blending in the Middle East using NMR and GC/MS techniques [J]. *Food Chem*, 2022, 373(Pt B): 131452.
- [35] CHYTRY P, SOUZA GMS, DEBASTIANI R, *et al.* The potential of accelerator-based techniques as an analytical tool for forensics: The case of coffee [J]. *Forensic Sci Int*, 2022, 335: 111281.
- [36] 熊春晖, 余永新, 焦逊, 等. 高光谱成像技术在农产品无损检测中的应用[J]. *粮油食品科技*, 2023, 31(1): 109–122.
- XIONG CH, SHE YX, JIAO X, *et al.* Application of hyperspectral imaging technology in nondestructive testing of agricultural products [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2023, 31(1): 109–122.
- [37] MIHAILIOVA A, LIEBISCH B, ISLAM MD, *et al.* The use of multispectral imaging for the discrimination of Arabica and Robusta coffee beans [J]. *Food Chem X*, 2022, 14: 100325.
- [38] DURAZZO A, KIEFER J, LUCARINI M, *et al.* Qualitative analysis of traditional Italian dishes: FTIR approach [J]. *Sustainability*, 2018, 10(11): 4112.
- [39] 李玮, 杨红梅, 王浩, 等. 核磁共振氢谱-PCA-SVM 回归法用于稀奶油中植脂奶油掺假定量分析[J]. *中国油脂*, 2020, 45(1): 38–42, 114.
- LI W, YANG HM, WANG H, *et al.* Determination of cream adulterated with non-dairy whip topping using ^1H NMR combined with principal component analysis and support vector machines [J]. *China Oils Fats*, 2020, 45(1): 38–42, 114.
- [40] 谢婧雅. 同步前表面荧光光谱法用于咖啡粉与姜黄粉的掺假检测[D]. 天津: 天津商业大学, 2021.
- XIE JY. Synchronous front-face fluorescence spectroscopy for adulteration determination of coffee and turmeric powders [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2021.
- [41] MOHAMMED F, GUILLAUME D, DOWMAN S, *et al.* An easy way to discriminate Yemeni against Ethiopian coffee [J]. *Microchem J*, 2019, 145: 173–179.
- [42] WORKU M, UPADHAYAY HR, LATRUVE K, *et al.* Differentiating the geographical origin of Ethiopian coffee using XRF- and ICP-based

- multi-element and stable isotope profiling [J]. *Food Chem*, 2019, 290: 295–307.
- [43] 张枝润, 马关润, 杜萍, 等. 不同咖啡品种烘焙豆挥发性成分的 HS-SPME/GC-MS 分析[J]. *热带农业科技*, 2023, 46(2): 18–24, 74.
ZHANG ZR, MA GR, DU P, *et al.* Analysis of volatile organic compounds of roasted coffee beans in different coffee varieties by HS-SPME/GC-MS [J]. *Trop Agric Sci Technol*, 2023, 46(2): 18–24, 74.
- [44] 王冰峰, 徐雷, 徐贞贞, 等. 液相色谱-高分辨质谱技术在食品掺假鉴别研究中的应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(7): 301–310.
WANG BF, XU L, XU ZZ, *et al.* Recent progress in the application of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in the identification of food adulteration: A review [J]. *Food Sci*, 2021, 42(7): 301–310.
- [45] MIAO Y, ZOU Q, WANG Q, *et al.* Evaluation of the physicochemical and metabolite of different region coffee beans by using UHPLC-QE-MS untargeted-metabonomics approaches [J]. *Food Biosci*, 2022, 46: 101561.
- [46] SERVILLO L, GIOVANE A, CASALE R, *et al.* Homostachydrine (pipercolic acid betaine) as authentication marker of roasted blends of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* (*Robusta*) beans [J]. *Food Chem*, 2016, 205: 52–57.
- [47] CAI T, TING H, JIN-LAN Z. Novel identification strategy for ground coffee adulteration based on UPLC-HRMS oligosaccharide profiling [J]. *Food Chem*, 2016, 190: 1046–1049.
- [48] SILVA ACR, GARRETT R, REZENDE CM, *et al.* Lipid characterization of arabica and robusta coffee beans by liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry [J]. *J Food Compos Anal*, 2022, 111: 104587.
- [49] 张涛, 蔡峰, 崔鹤, 等. 离子色谱-质谱联用法检测咖啡豆中的典型单糖和小分子寡糖[J]. *分析仪器*, 2017, (5): 20–25.
ZHANG T, CAI F, CUI H, *et al.* Determination of representative monosaccharide and small molecule oligosaccharides in coffee beans by IC-MS [J]. *Anal Instrum*, 2017, (5): 20–25.
- [50] 李泽, 段斌. 稳定同位素质谱技术在食品掺假检测中的应用[J]. *现代食品*, 2020, (9): 135–137.
LI Z, DUAN B. Application of stable isotope mass spectrometry in detection of food adulteration [J]. *Mod Food*, 2020, (9): 135–137.
- [51] COMBES MC, JOËT T, LASHERMES P. Development of a rapid and efficient DNA-based method to detect and quantify adulterations in coffee (*Arabica* versus *Robusta*) [J]. *Food Control*, 2018, 88: 198–206.
- [52] DEMIANOVÁ A, BOBKOVÁ A, LIDIKOVÁ J, *et al.* Volatiles as chemical markers suitable for identification of the geographical origin of green *Coffea arabica* L [J]. *Food Control*, 2022, 136: 108869.
- [53] 李泽林, 丁媛婧, 赵春燕, 等. 初加工对不同产地小粒咖啡活性成分及风味酶活性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(20): 6645–6652.
LI ZL, DING YJ, ZHAO CY, *et al.* Effects of primary processing on the bioactive ingredients and activities of flavor enzymes in *Coffea arabica* L. from different producing regions [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(20): 6645–6652.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



江 丰, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: 349136833@qq.com