

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Кубанский государственный университет»

На правах рукописи



ТИЩЕНКО ЕКАТЕРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РАСТВОРИМОГО КОФЕ ПО СУММАРНЫМ  
ПОКАЗАТЕЛЯМ И СОДЕРЖАНИЮ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ  
КОМПОНЕНТОВ**

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
Цюпка Татьяна Григорьевна  
доктор химических наук, профессор

Краснодар 2018

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Литературный обзор .....	10
1.1 Химический состав кофейного зерна.....	10
1.2 Преобразования компонентного состава зеленого кофе в процессе производства растворимого кофе .....	16
1.3 Методы определения биологически активных компонентов растворимого кофе .....	23
1.3.1 Методы определения кофеина в кофе.....	23
1.3.2 Методы определения хлорогеновых кислот в кофе .....	30
1.4 «Технологические» компоненты растворимого кофе и методы их определения .....	37
1.4.1 Формирование меланоидинов на высокотемпературных этапах производства кофе и оценка их содержания .....	37
1.4.2 Методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах	39
1.5 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования	50
2 Экспериментальная часть.....	52
2.1 Реактивы, материалы и оборудование .....	52
2.2 Методики определения биологически активных веществ (БАВ) в растворимом кофе .....	55
2.2.1 Определение БАВ в растворимом кофе методом ВЭЖХ-УФ-МС ..	55
2.2.2 Определение БАВ методом КЗЭ-УФ .....	57
2.2.3 Определение железовосстанавливающей способности (ЖВС) растворимого кофе .....	61
2.2.4 Определение индекса обжарки .....	65
3 Обсуждение результатов .....	66
3.1 Разработка подхода к выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качество растворимого кофе .....	66

3.2 Изучение химического состава и создание визуального образа растворимого кофе .....	73
3.2.1 ВЭЖХ-УФ-МС-анализ растворимого кофе .....	73
3.2.1.1 Качественный анализ химического состава растворимого кофе	74
3.2.1.2 Определение кофеина, 5- и 3-О-кофеилхинных кислот в различных коммерческих образцах растворимого кофе .....	80
3.2.2 Применение хроматографического профиля для оценки качества растворимого кофе .....	82
3.3 Определение соединений фенольной природы в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза .....	86
3.3.1 Электрофоретическое разделение фенольных соединений растворимого кофе .....	87
3.3.2 Суммарное определение кофеилхинных кислот в растворимом кофе методом КЗЭ. Оценка правильности определения КХК.....	89
3.3.3 Обоснование «технологической» природы образования катехола в растворимом кофе .....	93
3.4 Определение никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца.....	96
3.4.1 Оптимизация условий определения никотиновой кислоты .....	96
3.4.2 Определение никотиновой кислоты в различных коммерческих образцах растворимого кофе.....	102
3.5 Определение суммарных показателей, характеризующих качество растворимого кофе .....	103
3.5.1 Оценка железовосстанавливающей способности образцов растворимого кофе .....	103
3.5.2 Определение индекса обжарки для образцов растворимого кофе .	111
3.6 Установление взаимосвязей между потенциальными показателями качества растворимого кофе .....	113

3.6.1 Корреляционный анализ массива данных .....	113
3.6.2 Применение метода множественной линейной регрессии к массиву данных .....	115
ВЫВОДЫ .....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	121
ПРИЛОЖЕНИЕ МУ 08-47/411 Методика (метод) измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца.....	140

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Растворимый кофе является широко потребляемым напитком благодаря экспрессности приготовления, натуральности, полезности, а также приближенности его органолептических свойств к свойствам исходного сырья.

Существующая оценка качества растворимого кофе основана преимущественно на контроле показателей безопасности и органолептических характеристик продукта. Из физико-химических показателей регламентированы содержания кофеина (характеристика степени натуральности), глюкозы и ксилозы (критерии обнаружения фальсификации), которые в большей степени характеризуют исходное сырье.

Изучению изменений состава зеленого и жареного кофе от различных, в том числе и технологических факторов, уделяется большое внимание, в то время как индивидуальный состав растворимого кофе (РК) изучен недостаточно.

Качество растворимого кофе, являющегося высушенным водным экстрактом молотого жареного кофе, зависит не только от сохранившихся в готовом продукте водорастворимых соединений («природных»), но и образовавшихся в процессе производства растворимого кофе компонентов («технологических»). Более того, внедрение новых технологий может приводить к существенному изменению состава продукта, например, разрушению некоторых биологически активных веществ. К сожалению, нередко на рынке оказывается и фальсифицированная продукция. Поэтому важно не только выявить компоненты (маркеры) растворимого кофе, содержание которых может изменяться в зависимости от состава сырья, технологии производства и существенно влиять на качество продукта, но и разработать простые, надежные и достаточно чувствительные методики их количественного определения в РК.

Общий алгоритм выявления и отбора обобщенных и индивидуальных показателей, характеризующих качество продукта, пока не разработан. Определенным решением такой проблемы может являться разработка и реализация подхода к отбору индивидуальных веществ-маркеров растворимого кофе для аналитического контроля и проведения химической экспертизы <sup>1</sup>.

**Целью настоящей диссертационной работы** является обоснование, выбор индивидуальных и обобщенных показателей качества растворимого кофе, разработка методик их определения и изучение взаимосвязей между предложенными показателями.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Обоснование подхода к выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качество растворимого кофе.

2. Изучение компонентного состава (биологически активных соединений) растворимого кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) и масс-спектрометрическим (МС) детектированием.

3. Разработка методик ВЭЖХ-УФ определения состава растворимого кофе, позволяющих проводить оценку его качества по содержаниям веществ-маркеров и решать классификационные задачи в ходе экспертизы.

4. Разработка методик одновременного электрофоретического определения минорных и мажорных компонентов фенольной природы в растворимом кофе.

5. Исследование и установление взаимосвязей между содержаниями индивидуальных веществ-маркеров, а также обобщенными показателями качества растворимого кофе по данным анализа образцов различных производителей.

---

<sup>1</sup> Работа выполнена в рамках проекта Госзадания Минобрнауки РФ (№ 4.2612.2017/ПЧ), и гранта РФФИ (№ 17-03-01254) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр», уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

**Научная новизна.** Предложен подход по выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качество растворимого кофе, с учетом их физико-химических свойств и изменения компонентного состава продукта в ходе технологического процесса переработки исходного сырья. Выбраны вещества-маркеры качества растворимого кофе: кофеилхинные кислоты, кофеин, катехол и никотиновая кислота.

Предложена методика одновременного определения катехола и суммарного содержания кофеилхинных кислот в кофе методом капиллярного зонного электрофореза с УФ-детектированием (КЗЭ-УФ).

Разработана методика определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом КЗЭ-УФ с использованием стэкинга с большим объемом образца и обращением полярности (*LVSS*), обеспечивающая *on-line* концентрирование аналита с фактором эффективности концентрирования 70.

**Практическая значимость.** Предложены условия одновременного электрофоретического определения катехола и суммарного содержания кофеилхинных кислот, содержащихся в кофе на разных концентрационных уровнях.

Разработана методика (метод) измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца (свидетельство № 08-47/411.01.00143-2013.2018 от 25.09.2018 г., выдано ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»).

Разработанные методики могут быть применены в контрольно-аналитических лабораториях предприятий пищевой промышленности и других организаций.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Методический подход по выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качества растворимого кофе.

2. Результаты установления компонентного состава растворимого кофе и определение кофеина, 5-*O*- и 3-*O*-кофеилхинных кислот методом ВЭЖХ-УФ-МС.

3. Результаты классификации растворимого кофе по происхождению на основе данных ВЭЖХ-УФ-хроматограмм и создания визуального образа этого продукта с применением хемометрических подходов.

4. Методика одновременного определения катехола и суммарного содержания кофеилхинных кислот в кофе методом КЗЭ. Экспериментальное подтверждение «технологической» природы катехола в кофе.

5. Результаты оптимизации условий разделения и *on-line* концентрирования никотиновой кислоты при ее определении методом КЗЭ-УФ с применением стэкинга с большим объемом образца и обращением полярности.

6. Взаимосвязи между суммарными показателями (железовосстанавливающая способность, индекс обжарки) и индивидуальными веществами-маркерами, характеризующими качество растворимого кофе (КХК, 5-*O*-КХКХ, 3-*O*-КХК, катехол, никотиновая кислота).

**Публикации и апробация работы.** Результаты диссертации опубликованы в 3 статьях и 7 тезисах докладов. Результаты исследований докладывались на следующих научных мероприятиях: II Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием (г. Краснодар, 2015 г.), Четвертая, Пятая и Шестая Республиканские научные конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ» (г. Минск, 2015, 2017, 2018 гг.), III Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (г. Краснодар, 2017 г.), Третий съезд аналитиков



России (г. Москва, 2017 г.), V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (г. Краснодар, 2018 г.).

**Степень достоверности** результатов настоящей работы подтверждается удовлетворительной воспроизводимостью и правильностью аналитических результатов, их соответствием с литературными данными, а также согласованностью результатов, полученных при использовании нескольких независимых методов исследования.

**Личный вклад автора** в научную работу состоит в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов, практической апробации результатов и формулировке защищаемых положений и выводов.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 23 рисунка, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждений полученных результатов, общих выводов, списка применяемых в работе сокращений и списка цитируемой литературы из 171 наименования.

## 1 Литературный обзор

Растение, впервые найденное в провинции *Kefa* в VI веке пастухами из Абисинии (Эфиопия), получило название, соответствующее месту открытия – «кофе». С тех пор приготовленный из кофейных зерен напиток является одним из широко потребляемых продуктов во всем мире благодаря приятному вкусу и уникальному аромату, а также ряду полезных свойств. Существует более пятисот различных видов кофе, однако коммерческое значение имеют два основных: Арабика и Робуста [1]. В годовом отчете Международной организации кофе (*ISO – International Coffee Organization*) за 2017 год отмечается, что в мировом производстве доля кофе вида Арабика составляет 61 %, а доля кофе вида Робуста – 39 % [2].

В Россию поступают зеленые кофейные зерна из разных стран, из них производится жареный и растворимый кофе. Примерно 60 % поступающего сырья приходится на растворимый кофе. С целью привлечения большого количества потребителей и удовлетворения их потребностей производство этого продукта постоянно совершенствуется: внедряются современные технологии, разрабатываются новые рецептуры. При этом важно осуществление надлежащего контроля качества не только применяемого сырья, но и готового продукта. В связи с этим актуальным является изучение химического состава кофейных зерен, рассмотрение возможных изменений, происходящих с соединениями в процессе производства растворимого кофе, а также методов определения компонентов наиболее важных для оценки качества растворимого кофе.

### 1.1 Химический состав кофейного зерна

Химический состав кофе весьма разнообразен. Согласно различным исследованиям, его состав образуют порядка 2000-3000 компонентов [3].

Свойства основных соединений кофейных зерен и произведенных из них продуктов, а также их содержания в кофе обобщены в работах [3-6].

К нелетучим компонентам зеленых кофейных зерен, главным образом, относятся углеводы, волокна, протеины, свободные аминокислоты, липиды, минералы, органические, в том числе хлорогеновые, кислоты, кофеин, тригонеллин и дитерпены. В следовых количествах содержатся теofilлин и теобромин [4].

Группа летучих компонентов зеленых зерен включает около ста соединений, преимущественно это: спирты, эфиры, углеводороды и альдегиды. Идентифицированы также кетоны, пирозины, фураны и некоторые серосодержащие соединения [4].

В диссертационной работе особое внимание уделено рассмотрению экстрактивных веществ зеленых зерен, так как именно эти компоненты формируют состав жареного и растворимого кофе. В различных видах и сортах зеленого кофе содержание экстрактивных веществ неодинаково: высший сорт кофе вида Арабика содержит 19-20 %, а второй сорт вида Робуста – 27-29 % экстрактивных веществ. Их количество зависит от места и условий произрастания кофейного дерева, а также от способа первичной переработки зерен. К экстрактивным соединениям сырого кофе относят алкалоиды, полифенольные соединения, моно - и дисахара, липиды, белки, органические кислоты, аминокислоты, минеральные элементы и некоторые другие вещества, содержащиеся в небольшом количестве [7].

*Алкалоиды.* Основными алкалоидами кофе являются метилксантины и тригонеллин. Метилксантины – это пуриновые алкалоиды, к которым относятся кофеин (1,3,7-триметилксантин), теofilлин (1,3-диметилксантин) и теобромин (3,7-диметилксантин).

Кофеин – наиболее распространенный алкалоид, содержание которого в зеленых зернах варьируется в пределах 7-40 мг/г, что в сотни раз превышает содержание теобромина и теofilлина [8].

Вторым наиболее распространенным алкалоидом является тригонеллин (N-метил-метилпиридиний-3-карбоксилат). Этот алкалоид содержится в таких продуктах как ячмень, кукуруза, лук, горох, соя и томаты, однако, именно кофе считается основным его источником поступления в организм человека с продуктами растительного происхождения [9]. Содержание тригонеллина в зеленых зернах составляет 6.3-9.0 мкг/г [10].

Обнаружены в небольших количествах *O*(2),1,9-триметилмочевая, 1,3,7,9-тетраметилмочевая и *O*(2),1,7,9-тетраметилмочевая кислоты, из которых последняя характерна для кофе вида Робуста [6].

Содержание алкалоидов в зеленом кофе зависит от таких факторов как видовые и сортовые особенности зерна, их зрелость, методы обработки кофейных ягод (ферментация, промывка, сушка, хранение) и климатические условия [9].

*Полифенольные соединения.* Полифенольные соединения в зеленых зернах представлены преимущественно семейством хлорогеновых кислот (ХГК). Они представляют собой сложные эфиры, образованные одной или несколькими коричневыми кислотами и хинной кислотой (1L-1(OH)-3,4/5-тетрагидроксициклогексанкарбоновой кислотой), имеющей в положениях  $C_1$  и  $C_3$  аксиальные, а в  $C_4$  и  $C_5$  экваториальные гидроксилы [11]. В зависимости от вида, числа и положения кислотных остатков ХГК подразделяются на следующие группы: моноэфиры хинной кислоты (кофеилхинная – КХК, кумароилхинная – КуХК, ферулоилхинная – ФХК кислоты); диэфиры, три- и тетраэфиры кофейной кислоты (цикориевая, дикофеилхинная кислота – диКХК), смешанные эфиры различных оксикоричных кислот [12].

ХГК встречаются и в других растениях: листьях стевии, цветках одуванчика, семенах подсолнечника, плодах черники [13] и рябины [14], яблоках, вишне [11], но наибольшее количество и разнообразие их изомерных форм найдено именно в кофе. Идентификации хлорогеновых кислот и их производных в зеленом кофе посвящен ряд работ [15-18].

Из всего многообразия этих сложных эфиров (около 45 различных кислот [19]) в зеленых кофейных зернах в существенном количестве содержатся лишь некоторые группы соединений. Около 80 % от общего содержания ХГК составляют три позиционных изомера кофеилхинной кислоты (5-*O*-КХК, 4-*O*-КХК и 3-*O*-КХК), 10 % – три позиционных изомера ферулоилхинной кислоты (5-*O*-ФХК, 4-*O*-ФХК и 3-*O*-ФХК) и 8 % – изомеры дикофеилхинной кислоты [20, 21]. В меньшем количестве содержатся кумароилхинные (КуХК) и кофеилферулоилхинные (КФХК) кислоты, последняя группа состоит, по меньшей мере, из шести позиционных изомеров [6]. Основные группы хлорогеновых кислот представлены на рисунке 1.

Основным изомером ХГК в кофе является 5-*O*-кофеилхинная кислота (50-75 % от содержания КХК), имеющая также название «хлорогеновая кислота» [4, 11, 14, 22]. Однако это название применяют также и для ее энантиомера – 3-*O*-кофеилхинной кислоты, что на сегодняшний день является ошибочным. Во избежание неоднозначного толкования в наименованиях изомеров кофеилхинных кислот, авторами многих работ [11, 23-25] рекомендовано применять термин «хлорогеновая кислота» только к семейству кислот, а для индивидуальных изомеров использовать нумерацию углеродов в циклогексановом кольце хинной кислоты против часовой стрелки, как рекомендовано ИЮПАК [26].

Общее содержание ХГК в зеленом кофе может варьироваться в зависимости от видовых и сортовых особенностей, степени созревания кофейных зерен, в меньшей степени от методов ведения сельского хозяйства, климата и почвы [21]. Известно, что содержание этих кислот в кофе вида Робуста и Арабика различно и составляет 7.0-14.4 и 4.0-8.4 % соответственно [4].

В зеленых кофейных зернах гидроксикоричные кислоты присутствуют и в свободной форме. Содержания кофейной (КК) и феруловой кислот (ФК) в кофе достигают концентраций порядка 1.1 г/кг, *o*- и *n*- кумаровых – 0.3 г/кг.

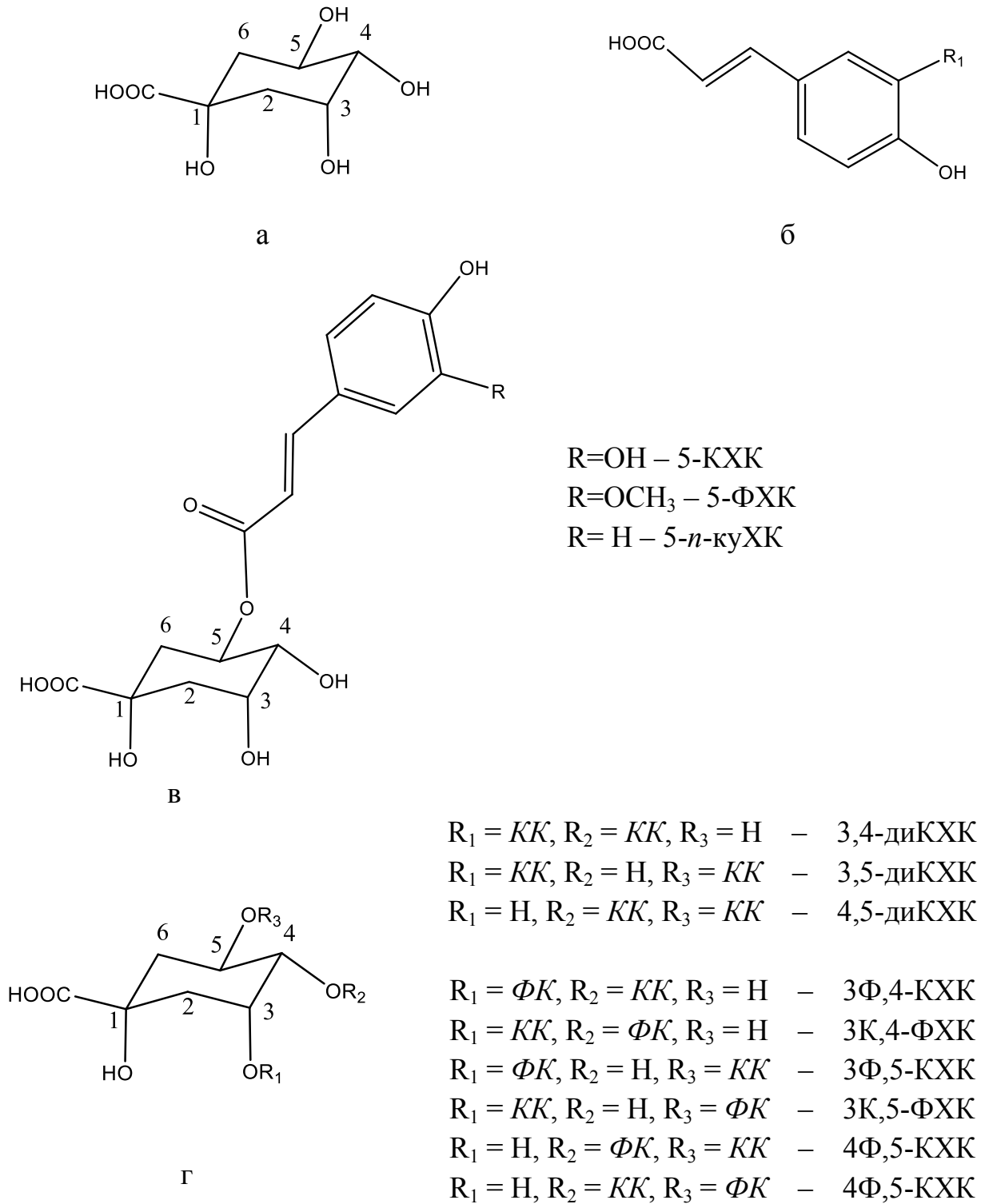


Рисунок 1 – Основные группы хлорогеновых кислот и связанные с ними компоненты: хинная кислота (а), гидроксикоричная кислота (б), моноэфир хинной и гидроксикоричных кислот (5-изомеры) (в), диэфиры хинной и кофейной кислот, смешанные эфиры (г)

В кофе вида Робуста обнаружены 3,4-диметоксикоричная и 3,4,5-триметоксикоричная кислоты в концентрациях 0.4 г/кг и 0.7 г/кг соответственно [27].

*Другие важные компоненты кофе.* Углеводы являются основными компонентами зеленого кофе, содержание которых составляет до 50% от массы зерна. Важную роль для формирования аромата и цвета напитка играет сахароза. Содержание этого дисахарида в зеленых зернах вида Арабика составляет около 9 %, а в кофе вида Робуста – в два раза меньшее количество. Присутствуют в кофейных зернах и другие углеводы: глюкоза, фруктоза, манноза, арабиноза, галактоманны, арабиногалактаны [4].

Для разных видов кофе характерно определенное соотношение между содержаниями аминокислот. Аланин – характерная аминокислота зеленых зерен с содержанием в среднем 1200 мкг/г. Концентрация аспарагина в кофе примерно в два раза меньше. Фенилаланин (170 мг/кг), валин (125 мг/кг), тиразин (100 мг/кг) являются наиболее термостабильными аминокислотами. Известно, что Робуста имеет более богатый по сравнению с Арабикой аминокислотный состав [28, 29].

Зеленые кофейные зерна содержат большое многообразие низкомолекулярных алифатических кислот: лимонная, яблочная, малеиновая, уксусная, щавелевая, фумаровая, янтарная и др. Для кофе разных видов и сортов наблюдается существенное различие в кислотном составе. Показано, что кислотность зеленого кофе различных видов и сортов составляет 2.4-4.0 градуса Тернера. При длительном (3-5 лет) хранении зеленого кофе в нормальных условиях его кислотность возрастает незначительно [7].

Витаминный состав зеленых зерен определяется следующими микрокомпонентами: тиамин (В<sub>1</sub>), рибофлавин (В<sub>2</sub>), пантотеновая кислота (В<sub>5</sub>), никотиновая кислота (РР, В<sub>3</sub>), пиридоксин (В<sub>6</sub>), витамин В<sub>12</sub> (цианкобаламин) и токоферол (Е) [7].

## 1.2 Преобразования компонентного состава зеленого кофе в процессе производства растворимого кофе

Процесс производства растворимого кофе состоит из нескольких основных этапов (рисунок 2). Наиболее важными с точки зрения формирования органолептических и полезных свойств продукта, являются выбор сырья, обжаривание зерен, экстракция водорастворимых компонентов и сушка экстракта.



Рисунок 2 – Основные этапы процесса производства растворимого кофе



*Выбор сырья.* Для производства растворимого кофе используют зеленый кофе видов Арабика и Робуста. Напиток из зерен кофе Арабика имеет нежный приятный вкус с тонким кофейным ароматом [7], поэтому использование таких зерен в качестве сырья для производства растворимого кофе обеспечивает наилучшие органолептические характеристики готового продукта.

Зерна кофе Робуста содержит большее количество экстрактивных веществ, в том числе биологически активных соединений, таких как хлорогеновые и гидроксикоричные кислоты, кофеин, тригонеллин [4, 9, 27, 30]. Поэтому эти зерна часто используют в кофейной смеси для производства растворимого кофе, что обеспечивает полноту тела напитка (одну из сенсорных характеристик напитка). Значительное содержание этого вида кофе в смеси может придать напитку грубый и резкий вкус [4, 7].

Однако важно отметить, что в жареном и растворимом кофе, произведенном из зерен кофе вида Арабика, уровень хлорогеновых кислот и тригонеллина выше по сравнению с уровнем этих компонентов в кофе вида Робуста [31-33]. Это объясняется тем, что зерна Робусты имеют менее плотную структуру и при воздействии температуры в водной среде их матрица быстро разрушается, высвобождая биологически активные компоненты. Неустойчивые соединения подвергаются влиянию производственных факторов и частично деградируют. Напротив, кофейные зерна Арабика имеют более плотную структуру, такая матрица в большей степени сохраняет компоненты от разрушений.

*Обжаривание зерен.* Несмотря на собственный умеренный аромат зеленых кофейных зерен, желательный аромат кофе формируется на этапе обжаривания. Растворимый кофе могут производить из светлообжаренных, среднеобжаренных, темнообжаренных и высшей степени обжаривания кофейных зерен, а также их различных смесей.

Термическая обработка кофейных зерен инициирует протекание ряда биохимических, физических и химических превращений, наиболее очевидным

из которых является изменение цвета зерна от зеленого до коричневого, появление кофейного аромата. Характерным является также увеличение объема зерен [7].

Вода является сильным активатором всех биохимических и физико-химических процессов, протекающих при обжаривании кофе. Постепенное увеличение температуры в процессе обжаривания зерен обеспечивает удаление при 80-160 °С свободной, а затем при 200-225 °С адсорбционной (прочно связанной с матрицей кофе) воды. Это процессы приводят к потере массы зерен на 5 и 20 % соответственно [7]. Поэтому со степенью обжарки кофе, характеризующейся временем и температурой обжаривания кофейных зерен [30-39], связывают не только изменение цвета, но и уменьшение массы кофейных зерен.

Таким образом, обжаривание сырых зерен кофе осуществляют при температуре 170-220 °С в течение 14-16 мин, включая стадию предварительной подсушки, до получения легко разламывающихся зерен коричневого цвета с выраженным кофейным ароматом [7].

От кинетики процесса обжарки зависят общая кислотность, величина рН и экстрактивность кофе. Авторами работы [40] с учетом этих показателей были выявлены оптимальные условия обжаривания кофе, обеспечивающие получение высокоэкстрактивного полуфабриката: температура – 200-220 °С и время обжаривания – 13-16 минут.

Отмечено [40], что при температуре 210-215 °С проницаемость клеток и тканей зерна резко увеличивается, что обеспечивает получение экстрактов с высоким содержанием экстрактивных веществ – 36 %, минимальным уровнем рН 5.0-5.1 и общей кислотностью 7.5. При высокой температуре и длительном времени обжаривания кофе растет количество угара, что приводит к большему расходу сырья, неприятному вкусу горечи напитка, разрушению биологически активных веществ.

Изучено также влияние температуры обжаривания зерен на величину рН [37]. Показано, что на начальных этапах обжаривания кофе величина рН снижается, а затем, при температуре выше 220 °С, увеличивается, что связано с образованием из моносахаров, сахарозы, и полисахаридов летучих и нелетучих кислот: муравьиной, уксусной, молочной, щавелевой и лимонной [7, 40].

На ранних стадиях обжаривания происходит распад термически менее устойчивых компонентов: свободных аминокислот, пептидов, моносахаров, тригонеллина и фенольных соединений. По мере повышения температуры начинают разлагаться белки, полисахариды и липиды [7].

Из алкалоидов существенным изменениям подвергается тригонеллин, который разрушается с образованием никотиновой кислоты, ее метилового эфира, пиридина и 3-метилпиридина, участвующих в образовании аромата жареного кофе [7, 9].

В работе [10] показано, в процессе обжаривания зерен (15 минут при 220 °С) происходит уменьшение содержания тригонеллина примерно на 35 %. Применение температуры 240 °С оказывает более существенное влияние на этот компонент и степень его деградации достигает уже 90 %. При таких температурах содержание никотиновой кислоты в испытуемых образцах увеличивалось в 3-7 раз.

Кофеин достаточно устойчив к влиянию температур обжаривания зерен, его содержание в кофе уменьшается на 10-15 % [7].

Значительный вклад в формирование аромата кофе вносят образующиеся в процессе обжаривания гетероциклические летучие компоненты: пирролы, фураны, тиофены, тиазолы, оксазолы, имидазолы, пиразины [41]. Однако применение высоких температур вызывает параллельное протекание нежелательных реакций, в результате которых образуются различные канцерогены: акриламид и 5-гидроксиметил-фурфурол [29, 42].

На этом этапе производственного процесса фенольные соединения претерпевают значительные изменения в количественном и качественном

отношении. Эти компоненты вступают в реакции окисления, дегидратации, диспропорционирования, гидролиза, дегидрирования, омыления и радикального формирования [40].

Показано, что кофеилхинные кислоты (КХК) в светлообжаренном, среднеобжаренном и темнообжаренном кофе разрушаются примерно на 19, 45 и 67 % соответственно [7, 30, 31]. Продуктами распада являются хинная кислота и лактоны кофеилхинных кислот, в незначительном количестве найдена и кофейная кислота [43].

Хлорогеновые кислоты могут подвергаться изомеризации. Так из 5-*O*-кофеилхинной кислоты образуется 4- и 3-*O*-кофеилхинные кислоты [20].

Присутствующая в кофейных зернах влага обеспечивает реакцию гидролиза хлорогеновых кислот с образованием хинной и коричной кислот [7]. В работе [43] отмечено, что наиболее распространенная из группы коричных кислот – кофейная кислота – содержится в жареном кофе в незначительном количестве, что связано с ее окислением или полимеризацией.

Показано, что в светлообжаренных зернах (225 °С, 3 мин) ХГК присутствует в наибольшем количестве по сравнению с образцами более интенсивного обжаривания, найдены также феруловая, ванилиновая и кофейная кислоты. Для среднеобжаренных образцов (233 °С, 3 мин) наблюдается разрушение кофейной и образование ванилиновой кислот. При наиболее интенсивном обжаривании (240 °С, 3 мин) образуется также катехол [30].

Образование катехола как из кофейной, так и из хинной частей кофеилхинной кислоты в процессе обжаривания кофе подтверждено также в работе [44].

Изучено влияния температуры на поведение кофейной, хинной и хлорогеновой кислот в модельных растворах [45]. Так, хинная кислота может образовывать фуриловый спирт (карамельный аромат), пиризин (обожженный, жареный аромат), 2,5-диметилфуран (эфирный аромат). Фенол (лекарственный

запах) – также потенциальный продукт химических превращений хинной кислоты, образующийся в малом количестве – 13-141 мкг/г. Пиридин может образовываться как из хинной, так и из кофейной кислоты. 4-этилкатехол (грубый, резиновый запах) образуется в концентрациях 20-300 мкг/г преимущественно из кофейной кислоты. Бензойная кислота может быть продуктом термических реакций всех трех кислот, а также феруловой.

Аминокислоты белка взаимодействуют с углеводами, образуя в результате реакции Майяра высокомолекулярные полимерные соединения – меланоидины, которые придают коричневый цвет продукту. Эти соединения могут проявлять антиоксидантные свойства [30, 35, 46-48].

*Процесс экстракции* водорастворимых соединений из подготовленных зерен проводится последовательно в несколько стадий. Экстракционные батареи состоят из 6-8 соединенных последовательно колонн. Очищенную от солей кальция и магния вода поступает под давлением 1.5 МПа через нагреватель в экстракционные батареи [7].

На первой стадии экстракция проводится при постепенном повышении температуры воды от 95 до 100 °С. Подача ее осуществляется через колонну с наиболее «истощенным» кофе, а далее через свежую порцию. В выходящем из колонны экстракте содержание водорастворимых веществ составляет 20-26 % в зависимости от температуры экстрагирования, вида и сорта кофе [7].

На последней стадии процесса экстракции (170-180 °С) происходит разложение нерастворимых в воде высокомолекулярных углеводов с образованием растворимых в воде редуцирующих сахаров, пентоз и других углеводов, а также переход белковых веществ в растворимые формы. При этом благодаря гидролизу гемицеллюлозы, клетчатки и других веществ выход водорастворимых экстрактивных веществ может достигать максимального уровня – 40-45%. Выходящий из колонны экстракт фильтруют, охлаждают и подают на сушку [7].

В работе [49] изучено влияние особенностей экстракции на содержание компонентов кофе. Кофеилхинные кислоты экстрагируются водой из кофе быстрее, чем дикофеилхинные кислоты, что связано наличием у последних большего количества гидроксильных групп, способных взаимодействовать с меланоидинами.

Показано [7, 33], что в процессе экстракции горячей водой из жареных зерен извлекаются биологически активные компоненты в следующей последовательности: свободные кофеилхинные кислоты, связанные с меланоидинами фенольные соединения и меланоидины. Задержка выхода последних обусловлена более сложной полимерной структурой.

Давление способствует увеличению скорости экстракции биологически активных веществ кофе. Однако для темнообжаренного кофе интенсификация процесса экстракции практически не влияет на извлечение биологически активных веществ, что связано со значительным разрушением матрицы кофе и слабым их удерживанием в структуре зерна [31].

Применение высоких температур 170-180 °С и давления в процессе экстракции приводит к деградации полифенолов [49] и ухудшению вкусовых свойств. Для сохранения или улучшения органолептических характеристик разработаны новые способы сохранения [50] и улучшения аромата [51, 52], вкуса [52] кофе.

В процессе экстракции возможно высвобождение значительного количества галактозы и маннозы в результате гидролиза нерастворимых комплексов арабиногалактана и галактоманнана с пищевыми волокнами [53].

Таким образом, наиболее значимые изменения индивидуального состава кофе наблюдаются при обжаривании зеленых зерен, а последующий процесс экстракции формирует состав свойственный растворимому кофе.

## 1.3 Методы определения биологически активных компонентов растворимого кофе

### 1.3.1 Методы определения кофеина в кофе

Кофеин является основным метилксантином кофе и широко известен своей способностью оказывать стимулирующее воздействие на центральную нервную систему [1].

Влияние на организм человека кофеина при потреблении кофе изучается на протяжении нескольких десятилетий. Выводы этих работ неоднозначны и часто противоречивы. В результате проведения критического анализа такого рода исследований за последние два десятилетия, авторами работы [54] сделаны выводы, что потребление кофе оказывает благоприятное влияние на организм человека, предотвращая развитие ряда хронических заболеваний: сердечно-сосудистых, неврологических, связанных с нарушением метаболизма, а также рака.

В работе [53] подчеркнуто, что отрицательные эффекты, связанные с потреблением кофеина, вероятно, уменьшаются или компенсируются положительным влиянием хлорогеновых кислот.

Одним из признанных показателей качества зеленого (ЗК), молотого жареного (ЖК) и растворимого кофе (РК) является содержание кофеина, поэтому разработке методик его определения уделяется большое влияние (таблица 1).

Первоначально для определения кофеина в кофе использовали гравиметрический метод [55]. Для этого экстракцию анализа из пробы проводили водой или этанолом, экстракт очищали добавлением оксида магния, затем определяемый компонент экстрагировали хлороформом, выпаривали экстракт, взвешивали сухой остаток и рассчитывали количество кофеина в продукте. Описанная методика достаточно трудоемкая и дает

завышенные результаты анализа [56]. В настоящее время практически не используется.

Таблица 1 – Методы определение кофеина в разных типах кофе

Тип кофе	Метод анализа	Содержание, мг/г	Источник
ЗК	Спектрофотометрия (УФ-Вид)	9.7-15.3	[8, 9]
	Фурье-ИК-спектроскопия	15.0	[8]
	Флуоресцентная спектроскопия	5.2	[8]
	Ближняя ИК-спектроскопия	15.0	[8]
	Проточно-инжекционный анализ-УФ-спектроскопия	4.0-4.2	[57]
	ВЭЖХ-УФ	7.5	[58]
ЖК	Спектрофотометрия (УФ-Вид)	15.4	[59]
	Проточно-инжекционный анализ-ИК-Фурье-спектроскопия	17.5-20.0	[60]
	Проточно-инжекционный анализ-УФ-спектроскопия	6.4-9.4	[57]
	Вольтамперометрия	5.9-10.8	[61, 62]
	Капиллярный электрофорез	12.7-19.8	[63, 64]
	Мицеллярная электрокинетическая хроматография	19.8	[65]
	ВЭЖХ-УФ	10-23	[34, 59, 63, 66-68]
РК	Спектрофотометрия (УФ-Вид)	38-61	[56, 59, 69, 70]
	Проточно-инжекционный анализ-ИК-Фурье-спектроскопия	39.1	[60]
	Капиллярный электрофорез	29.5-41.8	[63]
	Мицеллярная электрокинетическая хроматография	30.8-35.9	[65]
	Газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием	26.8	[71]
	ВЭЖХ-УФ	28.0-58.2	[31, 59, 63, 67, 68, 72-74]



К числу простых и экспрессных методик определения кофеина можно отнести спектрофотометрические. Предварительно водный экстракт кофе обрабатывают оксидом магния и гексацианоферратом (II) калия для удаления тригонеллина и других мешающих компонентов пробы. Полученный раствор отфильтровывают и проводят измерение оптической плотности фильтрата при 272 нм [56]. Недостатком данной методики также является получение завышенных результатов вследствие влияния фенольных соединений, поглощающих свет при аналитической длине волны. Для решения этой проблемы предложено использовать в качестве экстрагента хлороформ, который обеспечивает избирательное извлечение кофеина из пробы [75]. Это приводит к уменьшению погрешности определения.

Методика, регламентированная в ГОСТ Р 51182-98 «Кофепродукты. Методика выполнения измерений массовой доли кофеина» основана на фотометрическом определении массовой доли кофеина в растворе, полученном после экстрагирования кофеина из продукта органическим растворителем с последующим окислением кофеина в тетраметилпурпуровую кислоту [76]. Недостатком этого метода является многостадийность, трудоемкость, длительность анализа, а также низкая воспроизводимость полученных результатов.

На сегодняшний день контрольным методом определения кофеина является метод, основанный на экстракции аммиачным раствором кофеина из пробы кофе с последующим очищением экстракта диэтиловым эфиром на двух хроматографических колонках (в щелочной и кислой среде), элюированием кофеина хлороформом и спектрофотометрическом измерением элюата в УФ области на длине волны с максимальной оптической плотностью [77]. Методика характеризуется широкой повторяемостью, воспроизводимостью, специфичностью, легкостью в использовании и быстротой исполнения, что позволило рекомендовать ее в качестве контрольной. К недостаткам методики относят высокую чувствительность к изменениям в процессе применения

метода, что обуславливает строгое соблюдение требований при его выполнении [77].

Развитие спектрофотометрических методик определения кофеина направлены на автоматизацию пробоподготовки и повышение избирательности метода. Так, Frizzarin M.N. и др. предложен полностью автоматизированный спектрофотометрический способ определения кофеина в различных типах кофе с применением дисперсионной жидко-жидкостной микроэкстракции дихлорметаном [70]. Выделение кофеина из матрицы кофе проводится без предварительной обработки образца. Разработанная методика рекомендована для рутинного анализа, так как к основным ее преимуществам относят экспрессность, простоту выполнения, чувствительность (предел обнаружения 0.46 мг/л), избирательность и низкую стоимость единичного анализа.

Применение проточно-инжекционного анализа кофеина в кофе методом инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (ПИА-ИК-Фурье) позволило не только автоматизировать процедуру определения рассматриваемого компонента, но и сделать ее более безопасной за счет проведения экстракции в закрытой системе, а также сократить объем используемого хлороформа до 30 мл (сравнение со стандартизованной методикой, 50 мл), включая расход растворителя на анализ стандартных растворов кофеина [60].

Разработанные электрохимические методы определения кофеина в кофе характеризуются высокой чувствительностью. Так, известен способ определения кофеина [78], заключающийся в экстракции аналита хлороформом, выпаривании экстракта до сухого остатка, растворении его в соляной кислоте с последующим амперометрическим определением по реакции окисления кофеина до тетраметилпурпуровой кислоты раствором фотогенерированного йода в присутствии смеси сенсibilизаторов. Убыль окислителя восполняется последующим облучением светом поглотительного раствора. Чувствительность определения кофеина составляет 0.022 мкг.

Методика определения не требует дорогостоящих реактивов и оборудования, проста в исполнении.

Вольтамперометрический метод с использованием модифицированного лигнином [62] или 4-амино-3-гидрокси-1-нафталинсульфоновой кислотой [61] электрода позволяет проводить определение кофеина в экстрактах жареного кофе с низкими пределами детектирования  $8.37 \cdot 10^{-8}$  моль/л и  $6.7 \cdot 10^{-8}$  моль/л соответственно, что составляет уровень определения примерно 10 мкг/г.

Методом капиллярного зонного электрофореза определение нейтрального соединения – кофеина затруднено, так как его миграция наблюдается совместно с другими нейтральными молекулами. Добавлением в рабочий буферный раствор 3,4-диметоксикоричной кислоты позволяет достичь разделения кофеина с мешающими спектрофотометрическому детектированию компонентами: теофиллином и теобромином. Это объясняется образованием отрицательно заряженного комплекса кислоты с аналитом. Предел детектирования кофеина в кофе в этом случае составляет 0.8 мг/г [63].

Разделение кофеина не только с теобромином и теофиллином, но и с параксантином и 1,3,7-метилмочевой кислотой за 120 секунд [79] возможно методом мицеллярной электрокинетической хроматографией (МЭКХ) с добавлением в буферный электролит додецилсульфата натрия. Известно также одновременное определение мажорного компонента кофе – кофеина одновременно с минорным – пироглутаматом в кофе методом МЭКХ [65].

Одним из наиболее эффективных методов определения кофеина (КФ) в кофе является хроматографический (таблица 2). Наряду с методами газовой хроматографии [71, 80], хроматографии низкого давления [55И], широкое развитие в области определения этого компонента получили методики на основе обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

Таблица 2 – Хроматографическое определение кофеина в различных образцах кофе

Объект анализа	Аналит	Метод	Пробоподготовка	Колонка / стационарная фаза	Состав элюента; скорость потока, мл/мин	Детектирование	Источник
1	2	3	4	5	6	7	8
ЖК, РК	КФ, ТБ, ТФ	ХНД	Очистка пробы кофе оксидом магния, фильтрация	Chromolith RP-18e (10 мм×4 мкм)	Ацетонитрил: вода (2:98); 0.85	УФ, 273 нм	[67]
РК	КФ, 5-О-КХК	ВЭЖХ	Водная экстракция, фильтрация	Spherisorb ODS2 (250 мм × 4,6 мм×5 мкм)	А: 5% уксусная к-та, Б: ацетонитрил; 0.7	УФ, 272 нм	[31]
ЖК, РК	КФ, ТБ, ТФ	ВЭЖХ	Водная экстракция, фильтрация	Bondesil C18 (150 мм × 4 мм×5 мкм)	Метанол: вода: уксусная к-та (20:75:5); 0.7	УФ, 273 нм	[81]
РК	КФ, ТР, ТФ, НК, ХГК	ВЭЖХ	Ультразвуковая экстракция, центрифугирование, фильтрация	Inert Sustain C18 (150 мм×4.6 мм)	0.1% фосфорная кислота, 4 мМ октансульфонат, 15% метанол; 1	УФ, 220 нм	[72]
ЖК	КФ	ЖХ	Водная экстракция, центрифугирование, фильтрация	Pharmacia Biotech Mono S (50 мм×5 мм × 10 мкм)	А: 0.025 М р-р ацетата натрия (рН 6.8), Б: 0.025 М ацетата натрия (рН 6.8): ацетонитрил (70:30)	УФ, 280 нм	[74]
ЖК	КФ, ТР, НК	ВЭЖХ	Водная экстракция, разбавление пробы элюентом, центрифугирование	Gemini C18 110 A (250 мм×3 мм×5 мкм)	А: 0.3% водный р-р муравьиной кислоты, Б: метанол; 0.4	УФ, 270 нм	[83]

1	2	3	4	5	6	7	8
ЖК	КФ, изомеры ХГК	ВЭЖХ	Экстракция водой, очистка реактивами Кареза I и II, 10 % водным р-ром метанола, центрифугирование, фильтрация	Accucore C18 (150 мм×4.6 мм× 2,6 мкм)	А: 20 мМ буферного р-ра КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> , 1% р-р фосфорной к-ты, Б: ацетонитрил, 1% р-р фосфорной к-ты	УФ, 272 нм	[73]
ЖК	КФ	ВЭЖХ	Водная экстракция, фильтрация	NUCLEODUR C 18 Gravity (250 мм×3.8 мм × 5 мкм)	Ацетонитрил: ацетатный буферный р-р (25:80) и метанол: фосфатный буферный р-р (20:75); 0.6	УФ, 272 нм	[82]
ЖК	КФ, изомеры ХГК	ВЭЖХ	Водная экстракция, очистка пробы реактивами Кареза I и II, метанолом, центрифугирование, фильтрация	Zorbax Eclipse XDB C-18 (150 мм×4.6 мм × 5 мкм)	А: 10 мМ уксусная к-та, Б: метанол; 1	УФ, 276 нм	[66]
ЖК, РК	КФ	ВЭЖХ	Водная экстракция, центрифугирование, очистка пробы реактивами Кареза I и II, лед.уксусной к-той	Rexchrom ODS S5100	Метанол: вода (60:40); 1	УФ, 272 нм	[68]

Сокращения: КФ – кофеин, ТБ – теобромин, ТФ – теофиллин, ТР – тригонеллин, НК – никотиновая кислота, ХГК – хлорогеновая кислота

Хроматографическому определению кофеина в кофе, как правило, предшествует простая пробоподготовка, включающая экстракцию горячей водой, фильтрацию водного экстракта и разбавление пробы [31, 81, 82], ее центрифугирование [72, 74, 83].

Иногда подготовка пробы включает этапы очистки экстракта с оксидом магния [67] или реактивами Кареза для осаждения полимерных соединений.

Применяют реактивы Кареза при одновременном определении кофеина с изомерами хлорогеновых кислот [66, 68, 73]. Различные варианты экстракции биологически активных компонентов, в том числе кофеина, представлены в работе [5].

Обзор литературы показал, что наиболее распространенным, перспективным и широко используемым в контрольно-аналитических лабораториях является метод ВЭЖХ (таблица 2). Для разделения кофеина с компонентами матрицы кофе в качестве неподвижных фаз применяют сорбенты с привитыми октадецильными (C18) группами [72, 73, 81, 82], а в качестве подвижных – подкисленные смеси: вода-ацетонитрил [31, 67, 74] или вода-метанол [66, 68, 81, 83]. Детектирование проводят в УФ области примерно при  $\lambda=270$  нм. Одновременно с кофеином определяют другие компоненты кофе: теобромин [67, 81], теofilлин [67, 72], тригонеллин [72, 83], никотиновую [72, 83] и хлорогеновые кислоты [31, 66, 72, 73].

### 1.3.2 Методы определения хлорогеновых кислот в кофе

Кофе – напиток растительного происхождения и, как уже отмечалось, имеет в своем составе полифенольные соединения. Эти компоненты могут проявлять различные свойства, в частности антиоксидантные. Это обусловлено их способностью нейтрализовать образующиеся в процессе жизнедеятельности активные формы кислорода, избыток которых влечет за собой усиленное окислительное повреждение ДНК, липидов и белков, что в конечном

итоге приводит к возникновению серьезных патологических заболеваний [13, 84]. Stalmach A. и др. [20] показали, что практически все изомеры хлорогеновых кислот (ХГК), выделенные из зеленого и жареного кофе, проявляют антиоксидантные свойства и в сумме обеспечивают порядка 41 и 68 % от общей антиоксидантной емкости кофе соответственно.

Помимо пищевой ценности важность данных компонентов с точки зрения качества кофе обусловлена их влиянием на органолептические свойства продукта. Известно, что данные кислоты обуславливают терпкость напитка, участвуют в формировании его цвета и аромата [4].

На сегодняшний день известно большое количество методик определения хлорогеновых кислот в зеленом, жареном и растворимом кофе (таблица 3).

Таблица 3 – Методы определения хлорогеновых кислот в кофе

Метод	Аналит	Объект анализа	Источник
Йодометрическое титрование	ХГК	ЗК, ЖК	[86]
Спектрофотометрический	ХГК	ЗК, ЖК	[86, 87]
УФ-Вид спектроскопия	ХГК	ЗК, ЖК	[88]
Вольтамперометрический	ХГК	ЖК, РК	[89-93]
Дифференциально-импульсная полярография	ХГК	РК	[93]
ЯМР-спектроскопия	изомеры КХК	ЗК	[94]
КЗЭ	3-КХК	РК	[30, 46]
МЭКХ	ХГК	ЖК, РК	[89, 95]
	изомеры КХК	ЗК	[96]
ВЭЖХ	изомеры ХГК	ЖК, РК	[22, 25, 66, 68, 96-98]
Высокоэффективная гель-фильтрационная хроматография	ХГК	ЗК	[99]

В основе их лежат различные методы аналитической химии, позволяющие определить как суммарное содержание ХГК, так и количество индивидуального изомера кислоты в пробе.

Одним из простых методов определения ХГК в кофе является спектрофотометрический. В работе [100] проведен сравнительный анализ применяемых в данном методе реагентов, выявлены их преимущества и недостатки. Отмечено, что метапериодат натрия эквивалентно реагирует практически со всеми изомерами ХГК (98%), включая КХК, ФХК, диКХК и КФХК. Мешающее влияние на их определение не оказывают другие компоненты кофе фенольной и не фенольной природы. С применением боратного и молибдатного реагентов возможно определение суммарного содержания КХК и диКХК, поскольку эти реагенты не чувствительны к ФХК.

Автор работы [100] подчеркивает, что спектрофотометрический метод с применением трех вышеописанных реагентов дает завышенные результаты примерно на 37%. Это связано с тем, что реагенты взаимодействуют с фенольной частью молекулы ХГК и поэтому каждая молекула диКХК определяется как две молекулы КХК.

Для определения хлорогеновой кислоты в жареном кофе Mooges R.G. и др. [87] разработана спектрофотометрическая методика, основанная на измерении при  $\lambda = (325 \pm 5)$  нм оптических плотностей водных экстрактов кофе до и после осаждения ХГК насыщенным раствором ацетата свинца с последующим определением концентрации аналита по градуировочному графику, построенному относительно 5-О-КХК. Осаждение ХГК с реагентом протекает при 0 °С в перемешиваемом растворе в течение часа [86, 87].

Предложено определение ХГК в зеленом и жареном кофе методом УФ-видимой спектроскопии, основанное на измерении оптической плотности экстракта кофе при 324 нм, после экстракции кофеина из пробы дихлорметаном [88]. Сравнивая результаты, полученные методами УФ-видимой спектроскопии и ВЭЖХ, авторы этой работы подчеркивают, что по



сравнению с последним, разрабатываемый метод имеет несколько завышенные данные, что может быть объяснено влиянием других водорастворимых компонентов кофе на аналитический сигнал аналита.

Очевидно, что описанные выше методы не предполагают определение отдельных изомеров ХГК, в данном случае аналитический сигнал формируется под влиянием нескольких групп изомеров.

Большое количество работ посвящено определению изомеров ХГК и их производных в зеленом [15, 16, 97, 101], жареном [25, 43, 68, 101] и растворимом [22, 43, 68, 125] кофе. Наиболее распространенным методом для решения данных задач является ВЭЖХ с УФ- и МС-детектированием (таблица 4).

Подготовка образцов растворимого кофе перед ВЭЖХ анализом включает этапы растворения пробы в горячей воде [25, 68] или водно-метанольном растворе [22, 85, 102], очистки экстракта от полимерных соединений реактивами Кареза [22, 25, 68, 102] и обязательную фильтрацию пробы перед введением в хроматограф.

Для разделения изомеров методом обращено-фазовой ВЭЖХ в качестве неподвижных фаз используют сорбенты с привитыми октадецильными (C18) группами [16, 25, 101], а в качестве подвижных – смеси: вода-ацетонитрил, чаще вода-метанол. Для подавления ионизации аналитов и предотвращения их взаимодействия с сорбентом элюент подкисляют растворами уксусной [43], фосфорной [16, 103] или лимонной [68, 101, 104, 105] кислотами. Детектирование изомеров ХГК осуществляют спектрофотометрически [22, 68, 101] или масс-спектрометрически [25]. В последнем случае для подкисления элюента целесообразно использование муравьиной кислоты [25, 106] – достаточно нейтрального соединения по отношению к ионной оптике и другим узлам хроматографа и масс-спектрометра [107].

Таблица 4 – ВЭЖХ определение хлорогеновых и других фенольных кислот в растворимом кофе [107]

Аналит	Колонка	Элюент	Детектирование	Время анализа, мин	Источник
ХГК, ГК, КК, КрК, мКрК, ФК, КТХ	Nucleosil-100 C8 (125 мм×4.6 мм×5 мкм)	А: 1% фосфорная к-та в воде; Б: 1% фосфорная к-та в ацетонитриле	УФ-Вид	13	[103]
ХГК, КК	Kinetex C18, 2.6 мкм, 100 А°, 100 × 4.6 мм)	А: 1% фосфорная к-та в воде; Б: 1% фосфорная к-та в ацетонитриле	УФ	5	[109]
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 5-ФХК, 4-ФХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	Zorbax SB C18 (2,1×100 мм×1.8 мкм)	А: 0.1% уксусная к-та в воде, Б: 0.1% уксусная к-та в ацетонитриле	МС <sup>3</sup>	60	[25]
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 5-ФХК, 4-ФХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	Rechrom ODS S5100	А: 10 мМ лимонная к-та, Б: MeOH	УФ-Вид	-	[68]
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 5-ФХК, 4-ФХК, 3-ФХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	Spherisorb 5-ODS (250×5 мм)	А: 0.01 М цитрат натрия, Б: MeOH	УФ-Вид	45	[22]
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	Zorbax Eclipse XDB C18 (150×4.6 мм×5 мкм)	А: 10 мМ лимонная к-та, Б: MeOH	УФ-Вид	85	[101]
3-КХЛ, 4-КХЛ	C18 (ODS)-Hypersil (250×4.6 мм× 5 мкм)	А: 2% уксусная к-та в воде, Б: MeOH (75:25)	УФ-МС	20	[43]

Сокращения: ГК – галловая кислота, КК – кофейная кислота, КрК – коричная кислота, ФК – феруловая кислота, мКрК – метоксикоричная кислота, КТХ – катехин, КФ – кофеин, КХЛ – лактон кофеилхинной кислоты

Для количественной оценки содержаний ХГК в растворимом кофе применяют различные подходы, заключающиеся в определении индивидуальных изомеров [22, 68, 85], основного изомера – 5-О-КХК [31, 98, 103, 108-110], суммы КХК [11] и общего содержания ХГК [98, 108].

Ввиду большого многообразия ХГК, идентифицированных в кофе, а также малой доступности их стандартных веществ, определение индивидуальных изомеров в продукте редко проводят с использованием всего набора стандартных веществ [85]. Содержание кислоты чаще определяют относительно основного представителя данного семейства – 5-О-КХК с учетом молярных коэффициентов экстинкции  $\varepsilon$  каждого изомера (таблица 5)

Таблица 5 – Способы расчета содержаний изомеров хлорогеновых кислот в кофе

Способ расчета содержания аналита	Аналит	Объект анализа	Источник
$S_x$ относительно $S_i$ (стандарта соответствующего изомера)	изомеры ХГК	РК	[85]
$S_x$ относительно $S_{5-O-KHK}$ с учетом значений $\varepsilon_i$ каждого изомера	изомеры ХГК	РК	[22, 68]
		ЖК	[19, 105, 112]
$S_x$ относительно $S_{5-O-KHK}$	изомеры КХК	РК	[25, 111]
	изомеры р-КуХК	ЖК	[19, 25]
$S_x$ относительно $S_{5-O-KHK}$ с учетом среднего значения $\varepsilon$ трех изомеров 3-, 4- и 5-О-ФХК	1-О-ФХК	ЖК	[19]
Общая $S_x$ (при 320 нм) относительно $S_{5-O-KHK}$	ХГК	РК	[108]
		ЖК	[98]

Содержание индивидуальных изомеров ХГК, а также их суммарное содержание в растворимом кофе представлены в таблицах 6 и 7 соответственно. Изомеры ХГК по убыванию их содержания в продукте образуют следующий ряд: 5-КХК > 4-КХК > 3-КХК > 5-ФХК > 4-ФХК [25]. В меньшем количестве в

растворимом кофе содержатся диКХК и в сумме составляют до 6 % от общего содержания ХГК, что примерно на 4 % больше данного соотношения для жареного кофе [25].

Таблица 6 – ВЭЖХ-УФ определение основных изомеров ХГК в коммерческих образцах растворимого кофе

Название изомера ХГК	Содержание изомера ХГК (мг/г) согласно литературным источникам			
	[68]	[85]	[22]	[102]
5-КХК	4.0-15.8	40.6	10.4-35.0	2.4-17.8
4-КХК	3.5-13.6	12.4	8.1-22.5	1.9-15.5
3-КХК	4.1-13.6	10.2	7.0-18.9	1.9-14.4
5-ФХК	1.0-2.5	7.9	2.7-8.2	"н.д."-0.8
4-ФХК	2.4-5.6	2.2	3.4-7.6	0.2-4.8
3-ФХК	-	-	1.5-3.5	0.2-2.7
3,4-диКХК	0.6-1.8	5.7	0.7-3.9	"н.д."-1.2
3,5-диКХК	0.3-1.7	4	0.6-2.9	"н.д."-0.8
4,5-диКХК	"н.д.*"-1.6	5.8	0.2-4.8	"н.д."-0.8

\* н.д. – не найдено

Таблица 7 – Содержание ХГК в образцах растворимого кофе

Метод	Содержание ХГК, мг/г	Источник
Дифференциально-импульсная полярография	20.0-66.2	[93]
Вольтамперометрия	21.2-66.4	[93]
ВЭЖХ-УФ	15.8-107.3	[22, 68, 85, 108, 109]

Таким образом, определение индивидуальных изомеров ХГК проводится методом ВЭЖХ-УФ и/или МС, в то время как для суммарного содержания наиболее пригодны электрохимические и спектрофотометрические методы.

## 1.4 «Технологические» компоненты растворимого кофе и методы их определения

### 1.4.1 Формирование меланоидинов на высокотемпературных этапах производства кофе и оценка их содержания

Обжаривание кофейных зерен является неотъемлемым этапом производства растворимого кофе. Происходящие физические и химические изменения в зеленом зерне приводят к получению продукта с принципиально новыми свойствами. Наиболее очевидным является изменение цвета кофейных зерен от зеленого до различных коричневых оттенков. Это происходит в результате протекания реакций Майяра и карамелизации в процессе термического воздействия на углеводы и аминокислоты, содержащиеся в зеленом зерне. Образующиеся при этом высокомолекулярные соединения – меланоидины (меланоидиновые пигменты или полимеры) обуславливают не только коричневый цвет кофе, но и его вкусовые характеристики, а также пищевую ценность продукта [30, 113].

Известно, что увеличение длительности обжаривания продукта приводит к формированию большего количества высокомолекулярных (ВМ) меланоидинов [48]. Они имеют более интенсивный коричневый цвет по сравнению с низкомолекулярными (НМ) соединениями данной группы. В жареном кофе содержится порядка 60 % меланоидинов с атомной единицей массы, превышающей 12-14 кДа [114].

Структура меланоидинов окончательно не изучена. В работах [115, 116] детально описаны способы приготовления водных и безводных модельных систем меланоидинов, факторы, влияющие на их химический состав и свойства, а также охарактеризованы полученные фундаментальные структуры.

Известны три теории формирования высокомолекулярных меланоидинов [114].

Кратко, по одной из теорий, ВМ меланоидины формируются на более поздних стадиях реакции Майяра путем полимеризации промежуточных НМ продуктов: фуранов, пирролов, пиролопиролов и / или их производных.

Согласно второй теории, меланоидиновые пигменты содержат в своей структуре пирролы, имидазолы и их азотосодержащие производные. Атомы азота этих соединений связаны с фурановыми подструктурами, образующимися при нагревании углеводов, а также с белками через amino- и гуанидино-группы аминокислот.

Известно также (третья теория), что в основе структуры меланоидинов лежит углеродный скелет, с которым связаны аминосоединения, образующие боковые разветвления. В водных средах скелет пигмента формируется за счет альдольной конденсации высокорекреационных дикарбонильных соединений, а в безводных протекает реакция трансгликозилирования.

При производстве продуктов с низким содержанием влаги, к числу которого относится жареный кофе, образование меланоидинов обычно протекает при температуре более 150 °С в течение времени не превышающего 2 часа. В этих условиях олиго- и полисахариды в основном реагируют восстанавливающим концом как целые молекулы. Дополнительные боковые цепи для создания ВМ меланоидинов могут быть образованы с помощью реакции трансгликозилирования и реакции взаимодействия сахаров или их продуктов деградации с аминосоединениями. В состав структуры меланоидинов кофе включены и другие компоненты, например, фенольные соединения, в частности хлорогеновые кислоты, и арабиногалактан [114].

В процессе производства пищевых продуктов для оптимизации параметров процесса обжаривания важно определение меланоидинов. Однако неоднозначность и многообразие образующихся структур этих полимеров обуславливает трудность определения их индивидуальных форм. В основном применяют методы определения группы меланоидинов с одинаковыми свойствами.

Так, меланоидины кофе, имеющие массу в диапазоне 12-14 кДа, отделяют от других соединений с помощью диализной мембраны, имеющей соответствующие размеры пор. Удержанную массу полимеров, приведенную к 100 грамм массы пробы, рассматривают как содержание меланоидинов в жареном кофе [31]. Известно, что *методом ультрафильтрации* возможно выделение «чистых» меланоидинов с массой больше 10 кДа [46].

К недостаткам рассмотренных способов определения меланоидинов можно отнести низкую селективность, поскольку в общую массу определяемых компонентов вносят вклад и другие ВМ соединения кофе, например полипептидные молекулы.

Наличие в структуре меланоидинов хромофорных групп обуславливает возможность их определения *спектрофотометрическим методом*. Поскольку структуры этих компонентов настолько разнообразны, а их хромофорные системы поглощают свет практически во всем диапазоне видимого спектра, то в качестве аналитической длины волны используют ту, в которой не поглощают другие компоненты кофе. Основываясь на этом факте, при определении меланоидинов в кофе используют длину волны 420 нм, а полученное значение оптической плотности раствора жареного кофе называют индексом обжаривания [30, 33, 34, 66, 117, 118]. Считается [34, 117, 118], что этот показатель характеризует степень развития реакции карамелизации и Майяра, а его значение пропорционально количеству образованных меланоидинов в кофе.

#### 1.4.2 Методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах

*Никотиновая кислота как компонент пищевых продуктов.* Среди групп органических соединений, присутствующих в продуктах питания, важное место занимают витамины. Попадая в организм человека даже в незначительном количестве, эти соединения участвуют в жизненно важных процессах функционирования организма.

Никотиновая кислота (3-пиридинкарбоновая кислота, рисунок 3) относится к водорастворимым витаминам группы В. Эта кислота и ее амид – никотинамид (НА) являются основными формами витамина В<sub>3</sub> (ниацина) [119]. Данный витамин способен стимулировать кровообращение и мозговую деятельность, а также принимать участие в обмене аминокислот, белков, углеводов и жиров. Ниацин используют при лечении различных заболеваний [120, 121].

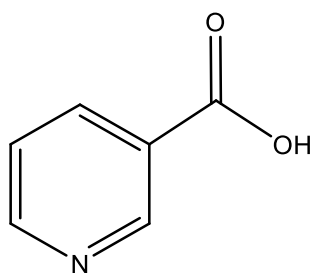


Рисунок 3 – Структурная формула никотиновой кислоты

НК содержится как в продуктах животного происхождения [122, 123], так и растительного: картофель, морковь, томаты [120], фрукты [123], злаки, орехи, семена подсолнечника [122], фасоль [124] и др. Однако содержание ее свободной (биодоступной) формы в этих продуктах невелико. Известно, что в пищевых продуктах животного происхождения преобладающей формой витамина является никотинамид, а в продуктах растительного происхождения – никотиновая кислота. Эти формы витамина связаны с полисахаридами, пептидами и гликопептидами, содержащимися в продукте. Известно также, что НА и НК в растительном и животном сырье в основном находятся в форме коферментов: никотинамидадениннуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) [125].

Важно отметить, что в некоторых исследованиях в образцах зеленого кофе НК найдена в малых количествах [6, 126-128], а в других данное соединение не было обнаружено [129, 130].



Perrone D. и др. [129] показали, что в отличие от зеленых зерен, НК содержится во всех проанализированных образцах жареного кофе. Выявлено, что ее содержание не зависит от видовых особенностей зерна [128], однако сильно варьируется в зависимости от цвета образца [129]. Темный кофе содержит примерно в 3 раза больше НК, чем светлый. Максимальное содержание данного компонента было найдено в образцах растворимого кофе [129].

Потемнение кофейного зерна происходит во время его обжаривания. Как известно, предшественником НК в кофе является термически нестабильный тригонеллин [128]. Исследованы зависимости содержаний НК и тригонеллина в зернах от времени и температуры их обжаривания [10, 127, 131]. С увеличением значений обоих параметров уменьшается содержание тригонеллина в образцах и возрастает концентрация НК. Авторы работы [131] выявили оптимальные условия обжаривания зерен, при которых возможно формирование максимального количества НК в продукте.

Хорошая растворимость в горячей воде и термическая стабильность НК в растворах способствуют ее сохранению в процессе производственной экстракции молотых жареных зерен и накоплению в эквивалентном количестве в растворимом кофе [6].

В работе [131] показано, что содержания НК в образцах растворимого кофе, произведенного с использованием различных технологий (высушивание распылением или сублимацией), в среднем одинаковы. Кроме того отмечено, что между содержаниями тригонеллина и НК в испытываемых образцах существует обратно пропорциональная зависимость.

В кофе обнаружены производные НК: никотинамид [127, 131, 132] и метилникотинат [127]. Содержание НА в жареном кофе практически не зависит от времени и температуры его обжаривания и несколько раз ниже концентрационного уровня НК [127]. Так установлено [131], что в среднем отношение содержаний НК к НА в образцах растворимом кофе составляет

около шести. Метилникотинат найден в некоторых образцах молотого кофе лишь в следовых количествах [127].

Необходимо отметить, что никотиновая кислота, являясь основным источником ниацина в кофе, содержится в нем преимущественно в свободной форме и поэтому обладает высокой биодоступностью [6, 127, 129]. В среднем порция напитка, приготовленная из 10 г жареного кофе, содержит до 2 мг НК, что составляет 12-17 % от суточной нормы потребления ниацина для мужчин [6].

*Методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах.* Одними из первых методов определения ниацина в объектах животного и растительного происхождения были спектрофотометрический и микробиологический [133], позднее широкое развитие получили хроматографические и электрофоретические методы.

*Микробиологический метод.* В 1941 году Snell E.C. и Wright L.D. разработали микробиологический метод определения ниацина в растительном и животном сырье [134]. В качестве тест-организма использовали *Lactobacillus arabinosus*, для которого ниацин является специфическим стимулятором роста. В этом случае количественной мерой ниацина являются характеристики роста микроорганизма, находящегося в такой питательной среде. Бактерии *Lactobacillus arabinosus* обладают одинаковой активностью по отношению к НК, никотинуриновой кислоте, НА и их нуклеотидным формам, т.е. с применением этих тест-организмов определяется суммарное содержание всех находящихся в растворе форм ниацина. Определению не мешают тригонеллин, пиколиновая и изоникотиновая кислоты, к которым бактерии *Lactobacillus arabinosus* нейтральны [133].

Определение витаминов группы В в различных пищевых продуктах долгое время проводилось с применением другой группы микроорганизмов – *L. Plantarum* (8014) по утвержденной методике [135].

Микробиологический метод успешно применен для определения ниацина в образцах зеленого и жареного молотого кофе разных видов и сортов [131, 136].

Несмотря на высокую чувствительность определения, данный метод имеет такие недостатки как длительность выполнения анализа и неудовлетворительная воспроизводимость результатов [137, 138].

*Спектрофотометрический метод.* Спектрофотометрические методики широко используются для определения суммарного содержания витамина РР (связанной и свободной форм никотиновой кислоты) в муке, хлебе и хлебобулочных изделиях [139], продуктах переработки плодов и овощей [140]. Метод основан на освобождении витамина РР путем гидролиза, очистке гидролизата от мешающих определению веществ, количественном получении окрашенного глутаминового альдегида, интенсивность окраски которого измеряется фотометрически [140].

Для определения общего содержания никотиновой кислоты в образцах зеленого и жареного кофе применяют спектрофотометрическим методом. В основе методики [128] лежит реакция взаимодействия НК с карбонитридным бромидом в присутствии *n*-аминоацетофенона с образованием соединения желтого цвета. Поскольку в реакцию с реагентом могут вступать и другие компоненты матрицы, например пиридин, образующий с реагентом окрашенное в красный цвет соединение, авторами предложена предварительная процедура очистки экстракта с применением активированного угля. Данная методика является менее чувствительной по сравнению с микробиологической и весьма трудоемкой, а также предполагает использование вредных для здоровья реактивов и проведение дополнительных операций по очистке экстракта кофе от мешающих компонентов [6, 128, 138].

Трудоемкая пробоподготовка образцов, необходимость удаления мешающих компонентов и сложность выделения необходимой для определения

формы аналита ограничивает дальнейшее развитие и широкое применение спектрофотометрического метода определения НК в кофе.

В последние годы для определения НК в пищевых продуктах широко используют хроматографические [126, 127, 129, 130, 137] и электрофоретические [122-125, 141] методы анализа.

*Способы подготовки проб для хроматографического и электрофоретического определения никотиновой кислоты.* Поскольку ниацин в пищевых продуктах может находиться в разных формах, авторы многих работ уделяют особое внимание проведению пробоподготовки с целью высвобождения никотиновой кислоты для дальнейшего ее определения хроматографическими или электрофоретическими методами.

Благодаря относительной стабильности ниацина для подготовки проб мясной, рыбной, молочной продукции, различных видов орехов, круп, некоторых овощей и фруктов возможно проведение гидролиза [121, 123, 125, 142, 143]. Считается, что кислотный и ферментативный гидролиз способствуют высвобождению биологически активных форм витамина, в то время как щелочной применяют для получения данных об общем уровне ниацина в продукте [123, 125, 143].

Очистку экстракта от гидрофобных компонентов пробы проводят с применением сорбентов с привитыми октадецильными группами C18. Дальнейшее концентрирование НК в пробе осуществляют на катионообменной колонке [122, 123].

Извлечение НК из черной фасоли проводят путем выдерживания пробы в водно-метанольном растворе в течение 24 часов с последующей фильтрацией экстракта [124].

В отличие от описанных ниже способов пробоподготовки некоторых объектов растительного происхождения, для кофе проведение гидролиза не является обязательной процедурой. Так, в работе [6] описаны результаты сравнительного анализа содержаний НК, полученных с проведением гидролиза

компонентов пробы и без проведения данной процедуры. Согласно полученным данным, проведение гидролиза пробы нецелесообразно, т.к. НК в кофе содержится преимущественно в свободной форме.

В изученной литературе, посвященной анализу образцов зеленого, жареного молотого и растворимого кофе, описанные способы подготовки образцов чаще всего включают экстракцию НК горячей водой [10, 111, 126, 129, 144], иногда водным раствором метанола [72]. Возможна очистка экстракта от мажорных фенольных компонентов пробы осаждением с основным раствором ацетата свинца [129].

Для определения НК и ее производных в кофе методами ЖХ-МС/МС и изотопного разбавления к навеске пробы с мечеными изотопами аналитов добавляли раствор соляной кислоты, перемешивали около 10 мин при 60 °С, затем фильтровали и очищали экстракт на картридже RP18 SPE [127].

Liu H. и др. для извлечения НК из образцов зеленого, жареного и растворимого кофе вида Арабика из Юньнань применили метод микроволновой экстракции. Коэффициент корреляции между содержаниями НК, полученными с применением экстракции горячей водой и микроволновой экстракции, были близки к единице. Величина степени извлечения НК для испытываемых образцов составила 89.3 – 101.2 % [130].

*Хроматографические методы.* Среди хроматографических методов для определения НК в кофе широко применяют метод ВЭЖХ с УФ- и / или масс-спектрометрическим детектированием [10, 83, 126, 127, 129, 130, 144] (таблица 8). Определение НК этими методами характеризуется низкими пределами детектирования аналита (около 18 нг/мл) [129] и высокой точностью результатов анализа (коэффициент вариации 3.9 %), однако требуется использование таких токсичных органических растворителей как метанол [111, 126, 127, 129].

Таблица 8 – ВЭЖХ определение никотиновой кислоты в кофе

Аналит	Объект анализа	Пробоподготовка	Колонка / стационарная фаза	Состав элюента; скорость потока, мл/мин	Детектирование	Диапазон / нижняя граница определения, мг/л	Предел обнаружения, мг/л	Источник
НК, КФ, ТР, сахароза	ЗК, ЖК, РК	Водная экстракция, очистка экстракта основным ацетатам свинца, мембранная фильтрация	Spherisorb S5 ODS2 Microbore (150×2.0 мм, 5 мкм)	А: 0.3 % р-р НСООН, Б: MeOH; 2	УФ, МС	0.05-27.5	0.0185	[129]
НК, КФ, ТР	ЗК, ЖК	Водная экстракция, фильтрация через бумажный фильтр	Spherisorb ODS2 (250 × 4.6 мм; 5 мкм)	А: 0.01 М фосфатный буферный р-р (рН 4.0), Б: MeOH; 1	УФ	0.10-500	-	[126]
НК, НА, ТР, метил никонинат	ЗК, ЖК	Экстракция р-ром соляной кислоты, фильтрация, очистка экстракта от липофильных соединений и меланоидинов	Synergi Fusion RP80 (150 × 2.5 мм, 4 мкм)	А: 0.1% р-р НСООН в MeOH, 5 мМ ацетата аммония; Б: 0.1% р-р НСООН в воде, 5 мМ ацетата аммония; 0.35	МС/МС	-	-	[127]
НК, ТР, КФ	ЗК, ЖК, РК	Микроволновая экстракция, фильтрация	РАН C18 (250×4.6 мм, 5 мкм) и Bondapak NH2 (300 ×3.9 мм, 5 мкм)	А: 0.02М Н <sub>3</sub> РО <sub>3</sub> , Б – MeOH (70:30)	УФ	0.2	0.02	[130]
НК, ТР	ЗК, ЖК, РК	Водная экстракция, фильтрация	Luna (250 × 4.6 мм, 5 мкм), фенил-гексил	А: 0.3 % муравьино-формиатный буферный р-р (рН 2.4); Б: MeOH; 1	УФ, МС	1.19-15	0.064	[111]

Сокращения: НК – никотиновая кислота, ТР – тригонеллин, КФ – кофеин, НА – никотинамид

Для определения НК в кофе применяют хроматографические колонки, заполненные октадецилсиланом (ODS) [126, 129], иногда фенилгексиллом [111]. В качестве элюента используют водно-метанольную смесь в разных соотношениях. Для подавления ионизации НК элюент подкисляют муравьиной, фосфорной кислотами или буферными растворами на их основе (таблица 8). Спектрофотометрическое детектирование никотиновой кислоты в зеленом, жареном и растворимом кофе проводят в УФ-области при  $\lambda = 254$  нм. Для увеличения надежности детектирования этого микрокомпонента в пробе проводят дополнительное масс-спектрометрическое детектирование [111, 127, 129]. Методом ВЭЖХ возможно одновременно с никотиновой кислотой проводить определение и других компонентов кофе: тригонеллина, кофеина, сахарозы.

*Электрофоретические методы.* Известно большое количество методик определения НК в различных пищевых продуктах методами КЗЭ или МЭКХ, некоторые из них представлены в таблице 9. Разделение НК с компонентами матрицы проводят в немодифицированном кварцевом капилляре, на анодном конце которого осуществляется ввод пробы. Использование нейтральных [122, 123] или щелочных [141, 143] электролитов создает условия для ионизации кислоты и миграции ее анионов к области детектирования. Диодно-матричный детектор регистрирует поглощение никотиновой кислотой УФ-излучения при 254 нм. Введение органических модификаторов: ацетонитрила [122, 123, 124], изопропанола [143] позволяет повысить разрешение между пиками НК и компонентов матрицы.

Применение электрофоретических методов в анализе пищевых продуктов для определения микрокомпонентов, к числу которых относится НК, не является частой практикой ввиду низкой концентрационной чувствительности метода (нижний предел определения 700 мкг/л [124]) по сравнению с ВЭЖХ (нижний предел определения 50 мкг/л [129]).

Содержание НК и НА в зеленом, жареном молотом и растворимом кофе, полученное различными методами, представлено в таблице 10 .

Таблица 9 – Электрофоретическое определение НК в различных продуктах

Объект анализа	Метод	Капилляр	U, кВ	t, °C	Состав буферного раствора	Детектирование	Источник
Дрожжевые спреды	КЗЭ	75 (66) см × 75 мкм	20	30	0.02 М Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 0.02 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 9.2	УФ, 254 нм	[141]
Злаки, мясо, рыба, дрожжи, орехи, арахисовое масло, семена подсолнечника	КЗЭ	50 см × 75 мкм	20	30	15% CH <sub>3</sub> CN 85% 0.02 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.02 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0	УФ, 254 нм	[122]
Бобы и чечевица	МЭКХ	77 (70) см × 75 мкм	30	25 или 30	20% изопропанол 80% 0.015 М ДДСН, 0.02М Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , pH 9.2	УФ, 254 нм	[143]
Мясо, рыба, фрукты, овощи	КЗЭ	64,5 (56) см × 50 мкм	25	28	7.5% CH <sub>3</sub> CN, 92.5% 0.02 М, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.02 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.0	УФ, 254 нм	[123]
Черная фасоль	КЗЭ	59 (50) см × 75 мкм	20	28	0.02 М Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , 20% CH <sub>3</sub> CN	УФ, 254 нм	[124]

Таблица 10 – Содержание никотиновой кислоты и никотинамида в различных образцах кофе

Объект анализа	Метод	Содержание, мкг/г продукта (*мкг/г сух.экстракта)	Источник
1	2	3	4
<i>Никотиновая кислота</i>			
ЗК	спектрофотометрический	16 - 44	[128]
	микробиологический	6 - 17	[131, 136]
	ВЭЖХ	не обнаружено	[111, 129, 130]
		7	[127]
		25 - 28	[126]
ЖК	спектрофотометрический	95 - 263	[128]
	микробиологический	27 - 327	[131, 136, 145, 146]



Продолжение таблицы 10

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
	ВЭЖХ	46 - 304	[111, 126, 127, 129, 132]
		487 - 1338*	[118]
РК	микробиологический	93 - 623	[131]
	ВЭЖХ	342 - 363	[129]
		< 100	[130]
		406 - 438	[118]
		233-531	[72]
		1014	[111]
<i>Никотинамид</i>			
ЗК	ВЭЖХ	0.7	[127]
ЖК	микробиологический	4.8 – 8.4	[131]
	ВЭЖХ	2 - 4	[127]
		27	[132]
РК	микробиологический	40 - 83	[131]

Как видно из таблицы 10, в наибольшем количестве НК содержится в растворимом кофе, в то время как ее содержание в зеленом кофе относительно невелико.

## 1.5 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Состав кофе весьма многообразен. Особое внимание исследователей привлекает определение содержания биологически активных веществ, таких как алкалоиды и фенольные соединения в различных видах и сортах зеленого, жареного, в меньшей степени растворимого кофе.

Рассмотрение особенностей изменения компонентного состава кофе на основных этапах производства растворимого кофе позволили сделать вывод, что обжаривание зерен – это наиболее важный процесс, поскольку влечет за собой как разрушение некоторых «природных» компонентов зерен: хлорогеновых кислот, тригонеллина, так и инициирует образование других соединений, условно называемых компонентами «технологического» происхождения: меланоидинов, ароматических и низкомолекулярных фенольных соединений. Отмечено, что некоторые компоненты этой группы не только обуславливают органолептические характеристики продукта, но и обеспечивают некоторые полезные свойства продукта. Поскольку их содержание варьируется от условий производства, использование компонентов «технологического» происхождения в качестве веществ-маркеров может являться эффективным для целей оценки качества растворимого кофе.

Существующая система оценки качества растворимого кофе, в основе которой из физико-химических показателей используется только содержание «природных» компонентов сырья (кофеина и углеводов), не может быть должным образом чувствительной к технологическим особенностям производства данного продукта.

Анализ существующих методов определения биологически активных компонентов кофе показал, что спектрофотометрические методы для анализа индивидуальных соединений являются менее эффективными, их использование удобно при суммарном определении группы веществ со схожими свойствами, например меланоидинами, фенольными соединениями, антиоксидантами. Широкое распространение приобретают методы разделения, такие как

высокоэффективная жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез. Идентификацию различных изомерных форм хлорогеновых кислот (важных для оценки качества компонентов) проводят с использованием большого числа стандартных веществ, чаще с применением многостадийной масс-спектрометрической идентификацией аналитов. Это усложняет анализ, увеличивает его длительность и делает малопригодным для экспресс-оценки качества растворимого кофе.

На основе проведенного литературного обзора по составу биологически активных компонентов растворимого кофе и методов их определения сформирована цель данного диссертационного исследования – обоснование, выбор индивидуальных и обобщенных показателей качества растворимого кофе, разработка методик их определения и изучение взаимосвязей между предложенными показателями.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Обоснование подхода к выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качество растворимого кофе.

2. Изучение компонентного состава (биологически активных соединений) растворимого кофе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым (УФ) и масс-спектрометрическим (МС) детектированием.

3. Разработка методик ВЭЖХ-УФ определения состава растворимого кофе, позволяющих проводить оценку его качества по содержаниям веществ-маркеров и решать классификационные задачи в ходе экспертизы.

4. Разработка методик одновременного электрофоретического определения минорных и мажорных компонентов фенольной природы в растворимом кофе.

5. Исследование и установление взаимосвязей между содержаниями индивидуальных веществ-маркеров, а также обобщенными показателями качества растворимого кофе по данным анализа образцов различных производителей.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Реактивы, материалы и оборудование

- хроматограф LC-20 Shimadzu Prominence (Shimadzu, Япония), состоящий из дегазатора DGU-20A5, насоса LC20AD, автоматического дозатора SIL-20A, термостата колонок CTO-20AC, спектрофотометрического детектора на основе диодной матрицы SPD-M20A; квадрупольного масс-детектора LCMS 2010EV (газ-распылитель и газ-осушитель – азот);
- генератор азота (Dominic Hunter, Великобритания);
- аналитическая колонка Zorbax SB-C18 150 × 2.1 мм, 5 мкм (Agilent, США) с предохранительной колонкой Zorbax SB-C18 20 × 2 мм, 5 мкм (Agilent, США);
- система капиллярного электрофореза Agilent <sup>3D</sup>CE G1600A, оснащенная диодно-матричным детектором, автосамплером, системой контроля температуры (Agilent Technologies, США);
- кварцевый немодифицированный капилляр с эффективной длиной 52 см (общая длина 60.5 см) и внутренним диаметром 50 мкм, с уширенной световой частью (×3) (Agilent Technologies, США);
- кварцевый немодифицированный капилляр с эффективной длиной 56 см (общая длина 64.5 см) и внутренним диаметром 50 мкм (Agilent Technologies, США);
- спектрофотометр Agilent 8453 с диодной матрицей (Agilent Technologies, США)
- спектрофотометр LEKI SS2107 (LEKI Instruments, Финляндия);
- кювета кварцевая номинальной толщиной поглощающего слоя 10 мм по ГОСТ 12083-78;
- кюветы стеклянные номинальной толщиной поглощающего слоя 10 и 20 мм по ГОСТ 12083-78;
- центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия);

- электроплитка бытовая «Искорка», Вятка;
- весы лабораторные ЗЛГ «ВСП-210g» №П357;
- весы лабораторные ВЛР-200 2 класса точности, ТУ 25-06-1131-75;
- иономер «Эксперт – 001»;
- стеклянный электрод для измерения pH;
- магнитная мешалка (Leki, Финляндия);
- одноканальные механические дозаторы с варьируемым объемом дозирования 20-200, 100-1000 мкл (Biohitproline, Финляндия);
- фильтры шприцевые 0.20 мкм (Chromafil Xtra, PTFE-20/25);
- бумага фильтровальная лабораторная «Белая лента» по ГОСТ 12026-76, Россия;
- аппарат для дистилляции воды МРТУ 42-2028-62;
- колбы мерные вместимостью 10, 25, 50, 100, 250 мл по ГОСТ 1770-74, Россия;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 и 25 мл по ГОСТ 20292-74, Россия;
- стаканы химические вместимостью 50, 100 мл по ГОСТ 1770-74, Россия;
- виалы на 1.5 мл из темного и прозрачного стекла («Chromacoll TD», Великобритания) с закручивающимися крышками для хроматографического анализа;
- виалы на 1 и 1.5 мл пропиленовые и стеклянные (Agilent, США) с полиуретановыми крышками для электрофоретического анализа;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, х.ч. по ГОСТ 4172-76;
- натрий фосфорнокислый однозамещенный 2- водный, х.ч. по ГОСТ 245-76;
- соляная кислота (о.с.ч., ХимМед, Россия) по ГОСТ 14261–77;
- спирт этиловый (ректификованный, высшей очистки, 95–96%);
- железоаммонийные квасцы, ТУ 6-09-53559-97;

- *o*-фенантролин 1-водный, имп.;
- борная кислота ( $\geq 99,8\%$ ), никотиновая кислота ( $\geq 98\%$ ), *транс*-феруловая кислота ( $\geq 96\%$ ) (Sigma-Aldrich);
- натрия гидроксид по ГОСТ 4328-77 (х.ч.), метанол (х.ч.), муравьиная кислота (85%) (Вектон, Россия);
- 3,4-дигидроксибензойная (протокатеховая) кислота ( $\geq 96\%$ , Merck);
- ванилиновая кислота ( $\geq 97\%$ , Fluka);
- кофеин (хч, Лабтех);
- хлорогеновая кислота<sup>2</sup> ( $\geq 95\%$ , Aldrich);
- неохлорогеновая кислота<sup>3</sup> ( $\geq 98\%$ , Sigma);
- катехол ( $\geq 99\%$ ), 3,4-дигидроксикоричная (кофейная) кислота и ( $\geq 99\%$ ), галловая кислота ( $\geq 98$ ) (Acros Organics);
- кислота аскорбиновая, имп.;
- кислота мочева, имп.;
- теофиллин, имп.;
- фенилаланин, имп.;
- тирозин, имп.;
- глюкоза моногидрат, х.ч., ГОСТ 975-88;
- сахароза, х.ч., ГОСТ 5883-75;
- вода для лабораторного анализа 2-ой степени чистоты по ГОСТ Р 52501-2005;
- образцы натурального растворимого кофе разных коммерческих наименований;
- образцы натурального растворимого кофе «Nescafe Gold» и «Nescafe Classic» разных партий (ООО «Нестле Кубань», Россия);
- зерна зеленого и жареного кофе Робуста (Вьетнам) разной степени обжаривания: сильной – СТп 80, средней – СТп 100 и слабой – СТп 120, где

---

<sup>2</sup> в дальнейшем по тексту работы использовали название 5-О-кофеилхинная кислота

<sup>3</sup> в дальнейшем по тексту работы использовали название 3-О-кофеилхинная кислота

СТn (Color Test number) – эмпирическая величина, характеризующая степень обжаривания кофе (ООО «Нестле Кубань», Россия).

## 2.2 Методики определения биологически активных веществ (БАВ) в растворимом кофе

### 2.2.1 Определение БАВ в растворимом кофе методом ВЭЖХ-УФ-МС

#### Приготовление растворов

*0.1 % раствор муравьиной кислоты (элюент А).* 0.5 мл муравьиной кислоты вносят в колбу вместимостью 500 мл, добавляют бидистиллированную воду до метки.

*Основной раствор индивидуального биологически активного вещества (БАВ: 5-О-кофеилхинной кислоты, 3-О-кофеилхинной кислоты или кофеина) с концентрацией 1000 мкг/мл.* Навеску ( $0.02500 \pm 0.00025$ ) г стандартного вещества переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют метанол, перемешивают до полного растворения вещества и доводят объем до метки метанолом.

*Градуировочная смесь №1 с концентрацией индивидуального БАВ 200 мкг/мл.* По 2 мл каждого основного раствора БАВ (1000 мкг/мл) переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем доводят до метки бидистиллированной водой.

*Серия градуировочных смесей № 2-7 с концентрациями индивидуальных БАВ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 мкг/мл* готовят путем последовательного разбавления бидистиллированной водой смеси с большей концентрацией в 2 раза, начиная с градуировочной смеси № 1.

*Раствор растворимого кофе с содержанием 5 г продукта на 100 мл воды.* Навеску продукта массой 0.5 г переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 80-90 мл горячей бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения, охлаждают и доводят объем до метки водой.

Все растворы перед анализом фильтруют через фильтр с диаметром пор 0.20 мкм.

#### Условия определения аналитов

*Условия хроматографического разделения [107].* Хроматографирование осуществлялось в обращено-фазовом режиме со скоростью потока подвижной фазы 0.35 мл/мин и при температуре термостата колонок, равной 40°C. В качестве подвижной фазы использовали 0.1 %-ный водный раствор муравьиной кислоты (А) и метанол (Б). Разделение проводили в режиме градиентного элюирования: 0-2 минут 0-2 % Б; 2-20 минут 2-20 % Б; 20-27 минут 20-40 % Б; 27-34 минут 40-90 % Б; 34-36 минут 90 % Б; 36-40 минут 0 % Б. Объем вводимой пробы 5 мкл. Продолжительность анализа составила 40 минут.

*Условия масс-спектрометрической идентификации компонентов кофе [107].* Масс-спектры получали методом ионизации электрораспылением в режиме регистрации отрицательных  $[M-H]^-$  и положительных  $[M+H]^+$  ионов с частотой сканирования 2000 а.е.м./с. Для режима регистрации отрицательных ионов напряжение интерфейса (-3.5 кВ), температура линии десольватации – 200 °С. Для режима регистрации положительных ионов напряжение интерфейса – 4.5 кВ, температура линии десольватации – 250 °С. В обоих режимах регистрации напряжение детектора равнялась 2.0 кВ, скорость потока азота-осушителя – 1.5 л/мин. Детектирование масс проводили в диапазоне 100 – 650 Да.

Расчет содержания индивидуального изомера КХК проводили относительно 5-О-КХК по формуле:

$$C_x = \frac{\varepsilon_5 \cdot M_x \cdot S_x}{\varepsilon_x \cdot M_5 \cdot a_5},$$

где  $\varepsilon_5$  и  $\varepsilon_x$  – молярные коэффициенты поглощения 5-О-КХК и искомого изомера, л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>;  $M_5$  и  $M_x$  – молярные массы 5-О-КХК и искомого изомера, г·моль<sup>-1</sup>;  $S_x$  – площадь пика искомого изомера, mAU·s;  $a_5$  – коэффициент наклона градуировочной прямой, построенной по 5-О-КХК.



Величины  $\varepsilon$  взяты из литературных данных [22] и составляли для 3-О-КХК, 4-О-КХК и 5-О-КХК 1.80, 1.84 и 1.95 л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> соответственно. Для других изомеров КХК расчет содержаний проводили, используя усредненное значение приведенных величин (1.86 л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>).

## 2.2.2 Определение БАВ методом КЗЭ-УФ

### Приготовление растворов

*Раствор борной кислоты с концентрацией 200 мМ.* На аналитических весах взвешивают 1.23660 г борной кислоты с погрешностью 0.00025 г, навеску переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют бидистиллированную воду, перемешивают до полного растворения вещества и доводят объем до метки водой.

*Раствор гидроксида натрия с концентрацией 0.1 М.* На аналитических весах взвешивают 0.40 г гидроксида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

*Буферные растворы с концентрациями 10-70 мМ и рН 9.0-9.6.* Для приготовления буферного раствора с концентрацией 10, 30, 40, 50, 60 или 70 мМ в пластиковый стакан вместимостью 50 мл переносят соответственно 2.5, 7.5, 10, 12.5, 15 или 17 мл раствора борной кислоты (200 мМ), добавляют бидистиллированную воду примерно до объема 45 мл, затем доводят рН раствором гидроксида натрия (0.1 М) до соответствующего значения (9.0-9.6), переносят полученный раствор в колбу вместимостью 50 мл и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

*Основной раствор индивидуального БАВ (катехол или никотиновая кислота) с концентрацией 500 мкг/мл.* Навеску (0.05000±0.00025) г стандартного вещества переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют бидистиллированную воду, перемешивают до полного растворения вещества и доводят объем до метки водой.

*Промежуточный раствор индивидуального БАВ (катехол или никотиновая кислота) с концентрацией 100 мкг/мл. Готовят путем разбавления в 5 раз основного раствора БАВ с концентрацией 500 мкг/мл.*

*Основной раствор индивидуального БАВ (5-О-КХК или 3-О-КХК) с концентрацией 1000 мкг/мл. Готовят, как описано для метода ВЭЖХ-УФ-МС, в качестве растворителя используют бидистиллированную воду.*

*Градуировочная смесь № 1 с концентрациями БАВ: 200 мкг/мл (5-О-КХК), 200 мкг/мл (3-О-КХК) и 16 мкг/мл катехола. В мерную колбу вместимостью 10 мл добавляют основные растворов БАВ: по 2 мл растворов КХК (1000 мкг/мл) и 1.6 мл раствора катехола (100 мкг/мл), объем доводят до метки бидистиллированной водой.*

*Градуировочная смесь № 2 с концентрациями БАВ: 160 мкг/мл (5-О-КХК), 160 мкг/мл (3-О-КХК) и 8 мкг/мл катехола. В мерную колбу вместимостью 10 мл добавляют основные растворов БАВ: по 1.6 мл растворов КХК (1000 мкг/мл) и 0.8 мл раствора катехола (100 мкг/мл), объем доводят до метки бидистиллированной водой.*

*Градуировочные смеси №3-5 с концентрациями БАВ: 80, 40, 20 мкг/мл (5-О-КХК), 80,40,20 мкг/мл (3-О-КХК) и 4, 2, 1 мкг/мл катехола, соответственно, готовят путем последовательного разбавления бидистиллированной водой смеси с большей концентрацией в 2 раза, начиная с градуировочной смеси № 2.*

*Раствор растворимого кофе с содержанием 2-8 г продукта на 100 мл воды. Для определения БАВ в растворимом кофе методом КЗЭ к навеске продукта массой 0.2-0.8 г переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 80-90 мл горячей бидистиллированной воды, перемешивают до полного растворения, охлаждают и доводят объем до метки водой.*

Для определения никотиновой кислоты методом КЗЭ с применением стэкинга с большим объемом образца раствор растворимого кофе с содержанием 5 г на 100 мл воды разбавляют в 12.5 раз бидистиллированной водой.

*Экстракт молотого жареного кофе.* К навеске продукта массой 10.0 г добавляют в 80-90 мл бидистиллированной воды, кипятят смесь на водяной бане в течение 5 мин, экстракт охлаждают, пропускают через бумажный фильтр, затем доводят объем до 100 мл водой.

Все растворы перед вводом в капилляр фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.20 мкм и центрифугировали в течение 3 мин (7000 об/мин).

### Условия определения БАВ

Разделение компонентов в образцах кофе и модельных растворах проводили с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent <sup>3D</sup>CE G1600A. Аналитическим сигналом (АС) служила площадь пика (mAU·s) на электрофореграмме. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Chemstation.

*Условия электрофоретического определения кофеилхинных кислот и катехола [147].* Разделение компонентов фенольной природы проводили в кварцевом немодифицированном капилляре (60.5 (52) см × 50 мкм) с уширенной световой частью (×3). В качестве электролита использовали боратный буферный раствор с рН 9.5 и концентрацией 40 мМ. Основные характеристики метода представлены в таблице 11. Содержание КХК и КТ в образцах растворимом кофе определяли методом градуировочного графика. При расчете содержания КХК использовали градуировочный график, построенный относительно 5-О-КХК.

*Условия электрофоретического определения никотиновой кислоты.* Разделение компонентов кофе проводили в кварцевом немодифицированном капилляре (56 см (64.5 см) × 50 мкм). В качестве электролита использовали боратный буферный раствор с рН 9.0 и концентрацией 70 мМ. Основные характеристики метода представлены в таблице 11. Содержание НК в образцах растворимого кофе определяли методом градуировочного графика. Для количественной оценки степени концентрирования использовали фактор

эффективности концентрирования  $SEF$  – *stacking efficiency factor*, рассчитываемый как отношение площади пика НК, полученного при концентрировании (КЗЭ-LVSS) к площади пика, полученного при обычных условиях ввода пробы – 6 секунд (КЗЭ), умноженное на коэффициент разбавления пробы ( $K_{разб} = 12.5$ ).

Таблица 11 – Основные условия для определения БАВ в растворимом кофе методом КЗЭ

Этапы анализа	Параметры метода		Значение параметров метода		
			КЗЭ	КЗЭ	КЗЭ-LVSS
			КТ и ХГК	НК	
Кондиционирование капилляра	Время, мин	0.1 М NaOH	3	3	3
		буферным раствором	3	3	3
Ввод пробы	Время, с		6	6	500
	Давление, мбар		50	50	50
Концентрирование аналита	Время обращения полярности $t_{обр}$ , мин		-	-	4.5 <sup>1</sup> (3.0 <sup>2</sup> )
	Напряжение обращения $U_{обр}$ , кВ		-	-	-10
Разделение	Напряжение $U$ , кВ		+ 25	+ 30	+ 30
	Температура, °С		25	25	25
Детектирование	Длина волны, нм		210 и 325	254	254
Промывка капилляра	Время промывки водой, мин		3	3	3

<sup>1</sup>Значение параметра для водного раствора растворимого кофе

<sup>2</sup>Значение параметра для водного раствора никотиновой кислоты

### 2.2.3 Определение железовосстанавливающей способности (ЖВС) растворимого кофе

#### Приготовление растворов

*Комплексный реагент (0.2 моль/л о-фенатролина и 0.12 моль/л Fe (III)).*

На аналитических весах взвесить 0.49500 г о-фенатролина с погрешностью 0.00025 г, перенести в термостойкий стакан на 150 мл, добавить 50-100 мл дистиллированной воды и растворить при нагревании.

На аналитических весах взвесить 0.72300 г железоаммонийных квасцов с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 250 мл, добавить 0.42 мл концентрированной соляной кислоты и приготовленный раствор о-фенатролина. Полученный раствор довести до метки дистиллированной водой. После приготовления реагент отстаивать не менее 12 часов.

*Стандартный раствор аскорбиновой кислоты (АК) с концентрацией 0.001 моль/л.* Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0.17600 г аскорбиновой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор аскорбиновой кислоты разбавить в 10 раз.

*Стандартный раствор кофейной кислоты (КК) с концентрацией 0.001 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.01802 г кофейной кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки этиловым спиртом.

*Стандартный раствор галловой кислоты (ГК) с концентрацией 0.001 моль/л.* Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0.17010 г галловой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и

довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор галловой кислоты разбавить в 10 раз.

*Стандартный раствор 5-О-кофеилхинной кислоты с концентрацией 0.001 моль/л.* Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0.03540 г хлорогеновой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой.

*Стандартный раствор феруловой кислоты (ФК) с концентрацией 0.001 моль/л.* Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0.19420 г феруловой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавить 50-60 мл дистиллированной воды и растворить при слабом нагревании. После охлаждения раствор довести до метки дистиллированной водой. Полученный раствор феруловой кислоты разбавить в 10 раз.

*Стандартный раствор ванилиновой кислоты (ВК) с концентрацией 0.001 моль/л.* Приготовление раствора осуществляется в день проведения анализа. На аналитических весах взвесить 0.16815 г ванилиновой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор ванилиновой кислоты разбавить в 10 раз.

*Стандартный раствор кверцетина (КВ) с концентрацией 0.001 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.03383 г дигидрокверцетина с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки этиловым спиртом.

*Стандартный раствор катехола (КТ) с концентрацией 0.001 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.11011 г катехола с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор разбавить в 10 раз.

*Стандартный раствор протокатеховой кислоты (ПКК) с концентрацией 0.001 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.15410 г

протокатеховой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор разбавить в 10 раз.

*Стандартный раствор фенилаланина с концентрацией 0.01 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.04130 г фенилаланина с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл и довести объем до метки дистиллированной водой.

*Стандартный раствор тирозина с концентрацией 0.01 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.04530 г тирозина с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавить 5-10 мл дистиллированной воды, 1 мл концентрированной соляной кислоты и довести объем до метки дистиллированной водой.

*Стандартный раствор никотиновой кислоты с концентрацией 0.0001 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.03080 г никотиновой кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 25 мл и довести объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор разбавить в 100 раз.

*Стандартный раствор теофиллина с концентрацией 0.01 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.180165 г теофиллина с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой.

*Стандартный раствор мочевиной кислоты с концентрацией 0.0004 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.01680 г мочевиной кислоты с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 250 мл, добавить 150 мл дистиллированной воды, растворить при нагревании. После охлаждения довести объем до метки дистиллированной водой.

*Стандартный раствор сахарозы с концентрацией 0.01 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.3423 г сахарозы с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой.

*Стандартный раствор глюкозы с концентрацией 0.01 моль/л.* На аналитических весах взвесить 0.19815 г моногидрата глюкозы с погрешностью 0.00025 г, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл и довести объем до метки дистиллированной водой.

*Градуировочные растворы.* В шесть мерных колб вместимостью 100 мл поместить приблизительно 50 мл дистиллированной воды, внести последовательно 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0 мл стандартного раствора антиоксиданта с концентрацией 0.001 моль/л. В каждую колбу добавить 2 мл комплексного реагента. Объемы растворов довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать. Градуировочные концентрации соответственно равны 0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 и 10.0 мкмоль/л.

*Основной раствор растворимого кофе.* Навеску аналитической пробы растворимого кофе массой 2.00 г поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, прилить приблизительно 50 мл горячей дистиллированной воды, тщательно перемешать, охладить, довести объем дистиллированной водой до метки и разбавить полученный раствор кофе в 10 раз [148].

#### Определение ЖВС растворимого кофе

В мерную колбу вместимостью 100 мл поместить приблизительно 50 мл дистиллированной воды, добавить 2 мл комплексного реагента и 4 мл исследуемого основного раствора кофе. Аналогично приготовить холостую пробу без добавления пробы кофе. Объемы растворов довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Для развития окраски полученные реакционные смеси перед регистрацией аналитического сигнала (АС) выдерживали в течение 60 мин. Измерение оптической плотности окрашенного раствора проводили на спектрофотометре LEKI при  $\lambda = 490$  нм в кювете с толщиной 20 мм. Раствор, содержащий компоненты индикаторной системы в тех же концентрациях, что и при проведении реакции с восстановителями, служил раствором сравнения. Расчет величины ЖВС проводили по предварительно построенному в



диапазоне 1.0-6.0 мкмоль /л градуировочному графику с учетом разбавления пробы. В качестве вещества-стандарта использовали ГК. Полученные значения величин ЖВС выражали в мкмоль ГК/г. Выбор галловой кислоты в качестве вещества-стандарта обусловлен общепринятой практикой расчета величины АОА многих пищевых продуктов, в том числе и кофе [36, 149].

Показано, что в течение 1 часа после приготовления раствора растворимого кофе, а также при выдерживании его при температуре 95 °С в течение 30 мин величина ЖВС кофе растворимого не изменяется [148].

#### 2.2.4 Определение индекса обжарки

Спектры поглощения приготовленных растворов кофе (2 г продукта в 100 мл бидистиллированной воды) регистрировали после их разбавления в 100 раз в диапазоне длин волн 210-600 нм на спектрофотометре Agilent 8453 с диодной матрицей, в кварцевой кювете толщиной 10 мм. Раствором сравнения служила бидистиллированная вода. Значения оптической плотности (А) измеряли с шагом 1 нм. При повторных измерениях оптической плотности одного и того же раствора при  $0.2 < A < 0.8$  величина  $S_r$  не превышает 0.005 (n=5). При фотометрировании повторно приготовленных растворов  $S_r$  возрастает до 0.02-0.05 [148].

Полученные спектры поглощения растворов кофе можно использовать для определения индекса обжарки, который равен величине оптической плотности при  $\lambda=420$  нм [148].

### 3 Обсуждение результатов

#### 3.1 Разработка подхода к выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качество растворимого кофе

На сегодняшний день организация производства высококачественных пищевкусных продуктов невозможна без эффективного контроля качества сырья и технологического процесса его промышленной переработки. Желание производителя удовлетворить постоянно растущие требования потребителей влечет за собой создание новых технологий, рецептур и увеличение ассортимента выпускаемой продукции.

Так, готовый продукт в процессе производства приобретает определенные, присущие только ему свойства, в частности вкус и аромат, что обусловлено составом. При этом информативности существующих методов контроля пищевкусного продукта может быть недостаточно для точной и надежной оценки его качества.

Это обуславливает необходимость создания эффективных комплексных подходов к оценке качества пищевого продукта, основанных на взаимосвязи между его составом и свойствами.

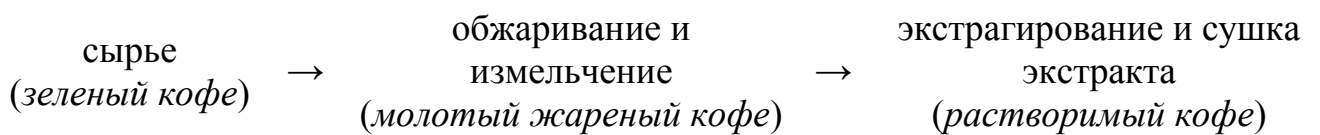
Компонентный состав напитка из молотого жареного кофе формируется на стадии обжаривания и зависит от условий технологического процесса и сырья. При производстве растворимого напитка этапы экстрагирования обжаренного кофе и сушка отфильтрованного экстракта накладывают дополнительные высокотемпературные воздействия на компоненты кофе. Эти вещества, с одной стороны, концентрируются в готовом продукте, а с другой, могут претерпевать дополнительные изменения: гидролиз, деградацию, изомеризацию, лактонизацию.

Одной из целей производителей растворимого кофе является попытка добиться сохранения и, если это возможно, восстановления свойств молотого кофе. Простейшим примером является сублимационная сушка, которая за счет

использования низкой температуры и вакуума способствует сохранению составных компонентов экстракта.

В изученной на данный момент литературе в основном представлены работы, посвященные изучению показателей качества молотого жареного кофе. В работах подчеркивается, что современные технологии производства позволяют сохранить видовые и сортовые особенности кофейного зерна в готовом продукте, и, следовательно, возникает возможность оценить вариабельность состава молотого кофе от таких факторов как вид, сорт, место и условия обработки сырья. Для растворимого кофе такие работы малочисленны, при этом исследования проведены на образцах, приготовленных в лабораторных условиях из определенного сорта кофе. Полученная таким образом информация носит ограниченный характер. Для коммерческих образцов характерно купажирование разных видов кофе и специальные производственные технологии, которые могут привести как к различию, так и нивелированию значений некоторых показателей качества.

При разработке подхода к выявлению и отбору веществ-маркеров, характеризующих качество растворимого кофе, опирались на особенности постадийного формирования его состава в процессе производства:



Например, на стадии обжаривания зеленых кофейных зерен хлорогеновые кислоты частично деградируют, образуя низкомолекулярные фенольные соединения, которые переходят в водный экстракт, концентрируясь в готовом продукте.

*Подход к выявлению и отбору веществ-маркеров качества растворимого кофе* базируется на оценке изменения характеристик кофе при переходе от сырья к готовому продукту с учетом физико-химических свойств компонентов

и влияния факторов технологического процесса, приводящих к этим изменениям.

*Теоретические аспекты.* Растворимый кофе (РК) является высушенным водным экстрактом молотого жареного кофе (ЖК). С учетом того, что в процессе производства растворимого кофе из жареных молотых зерен экстрагируется 40-45 % водорастворимых веществ, нами было предложено рассчитать степень концентрирования для компонента ( $K$ ), как отношение его содержания в растворимом кофе к содержанию в жареном, и в зависимости от ее значения проводить выбор веществ-маркеров.

*Экспериментальные аспекты.* Состав растворимого кофе зависит от компонентов экстрагируемого сырья и используемых технологий производства. Проведен сопоставительный анализ литературных данных о компонентном составе жареного и растворимого кофе и выделены некоторые компоненты, содержания которых в рассматриваемых продуктах существенно различаются, что может быть обусловлено влиянием технологических факторов производства кофе (таблица 12).

Таблица 12 – Сопоставительный анализ некоторых компонентов жареного и растворимого кофе

Компоненты кофе	Содержание компонентов, мг/г		Компоненты кофе	Содержание компонентов, мг/г	
	ЖК	РК		ЖК	РК
Кофеин	8-21	27-47	5-О-кофеилхинная кислота	0.2-21	4-41
Тригонеллин	2-12	8-10	3-О-кофеилхинная кислота	1.5-6.0	4-19
Теобромин	0.11	0.09-0.17	Изолимонная кислота	1.3	18.3
Меланоидины	250	30-50	Пироглутаминовая кислота	0.85	8.8
Кафеол	0.56-1.07	0.06-0.16	Фурановая кислота	0.15	0.50
Кафестол	0.57-1.08	0.06-0.16	Хинная кислота	8-10	44
Сахароза	16-60	0.0-5.5	Никотиновая кислота	0.03-0.31	0.09-1.01

Так, кофеин (КФ) является термоустойчивым алкалоидом, он практически не деградирует в процессе обжаривания зерен, концентрируется на этапе экстрагирования и сохраняется на этапе высушивания. Рассчитанный из литературных данных коэффициент концентрирования кофеина в среднем составляет 2.5 (рисунок 4, а)

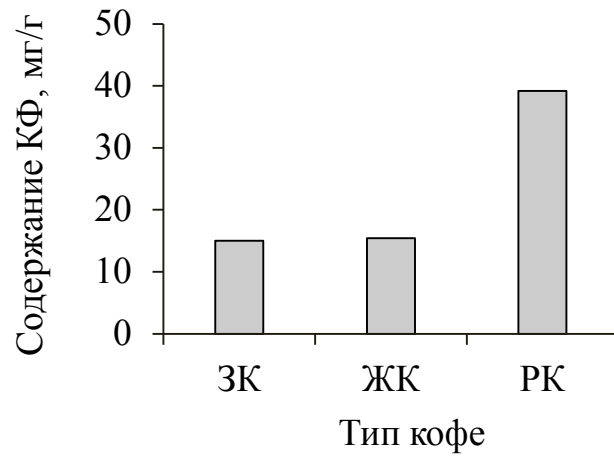
В отличие от кофеина, тригонеллин не является термически устойчивым компонентом и разрушается в процессе обжаривания кофе в среднем на 90 %, образуя одну из форм витамина В<sub>3</sub> – никотиновую кислоту (НК). В этом случае рассчитанный коэффициент концентрирования этой кислоты равен 3.2. То есть ее накопление в продукте возможно не только в процессе обжаривания зерен, но также и на других высокотемпературных этапах производства (рисунок 4, б).

Хлорогеновые кислоты также весьма чувствительны к высокотемпературным процессам производства и подвергаются деградации до низкомолекулярных гидроксифенолов, например, катехола. Возможно протекание реакций гидролиза, лактонизации и изомеризации. Так, в процессе обжаривания 5-*O*-кофеилхинная кислота частично изомеризуется в 3-*O*- и 4-*O*-кофеилхинные кислоты (рисунок 4, в).

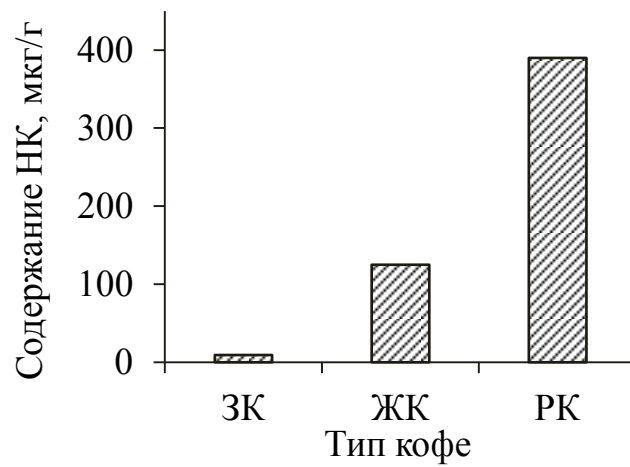
Рассчитанные коэффициенты концентрирования для изомеров кофеилхинных кислот (КХК) составили величину, отличную от 2.5, что свидетельствует о зависимости их содержания в растворимом кофе не только от вида и сорта зерен, но и технологических особенностей производства продукта.

Таким образом, *сущность подхода* заключается в следующем. Для соединений, не претерпевающих изменений в процессе экстракции и сушки, рассчитанная степень концентрирования близка к 2.5, при отклонении в ту или иную сторону можно предположить влияние технологических процессов на формируемый состав продукта.

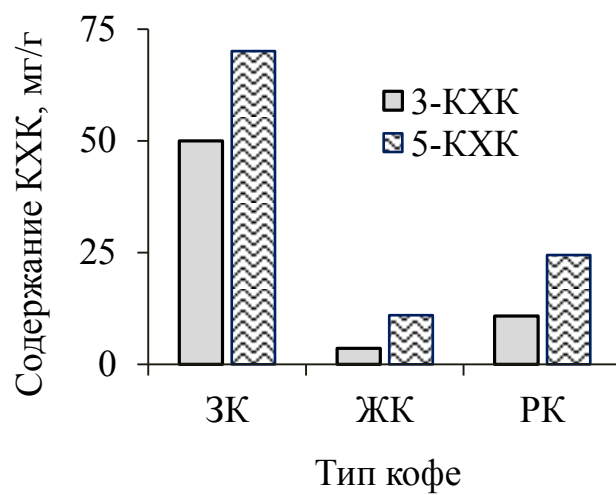
Исходя из этого, были выделены потенциальные вещества-маркеры качества растворимого кофе (таблица 13).



а



б



в

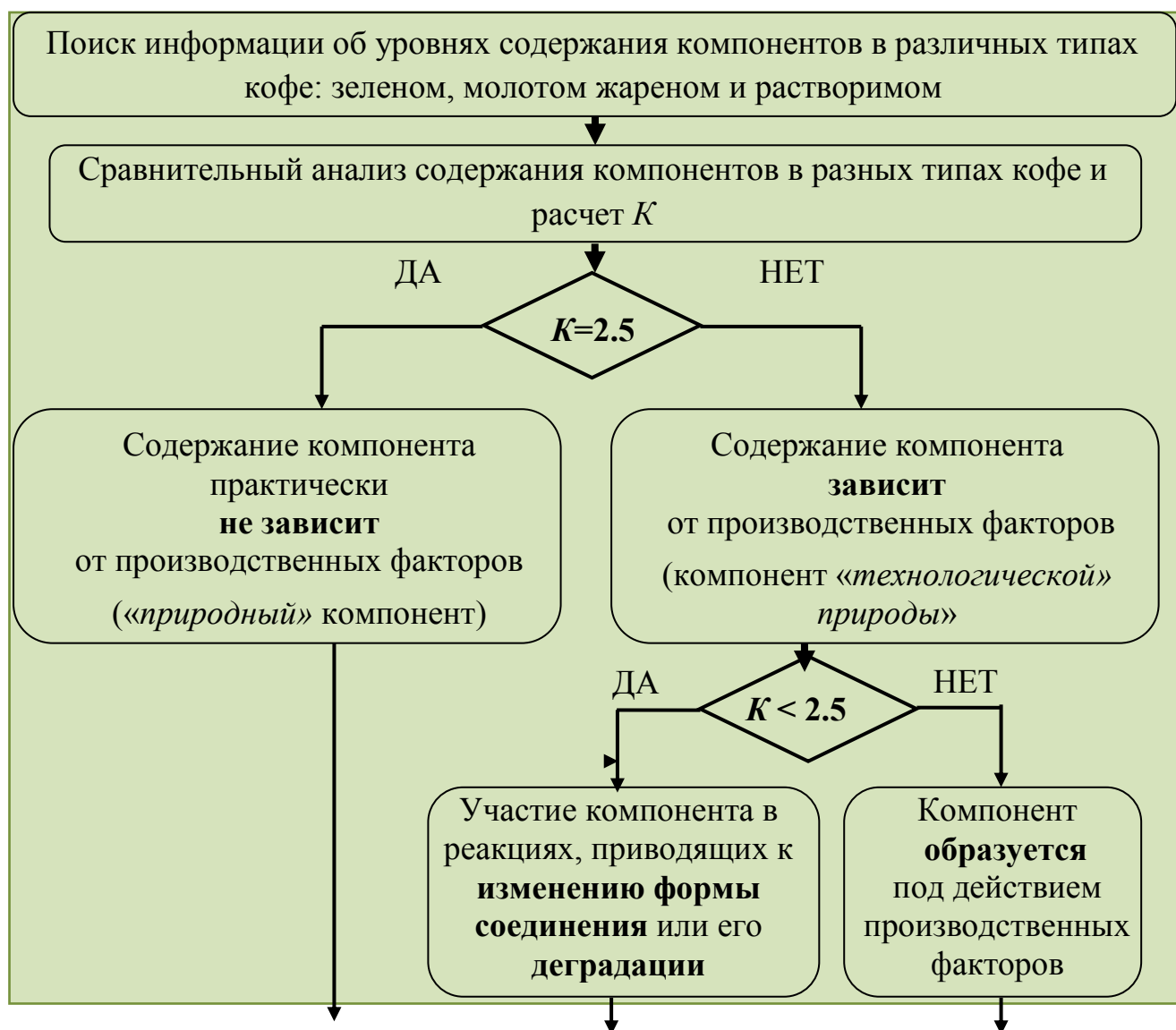
Рисунок 4 – Содержания кофеина (а), никотиновой (б), 3-*O*-кофеилхинной и 5-*O*-кофеилхинной кислот (в) в зеленом (ЗК), жареном (ЖК) и растворимом (РК) кофе

Таблица 13 – Рассчитанные коэффициенты концентрирования компонентов кофе

Потенциальные вещества-маркеры	Содержание, мг/г		Коэффициент концентрирования компонента $K$
	ЖК	РК	
<i>Кофеин</i>	15	37	2.5
<i>5-О-кофеилхинная кислота</i>	11	24	2.2
<i>3-О-кофеилхинная кислота</i>	4.0	12.0	3.0
<i>Никотиновая кислота</i>	0.17	0.55	3.2
<i>Меланоидины</i>	250	40	0.2
Тригонеллин	7	9	1.3
Пироглутаминовая кислота	0.9	8.8	104
Фумаровая кислота	0.2	1.1	54
Янтарная кислота	0.2	0.8	4.4
Малеиновая кислота	0.1	0.5	4.5
Изолимонная кислота	1.3	18.3	141
Лимонная кислота	1.1	144	1.4
Фурановая кислота	0.2	0.5	3.3
Хинная кислота	9.4	44.0	4.7

Из перечня выявленных потенциальных веществ-маркеров растворимого кофе, на наш взгляд, наибольший интерес представляют те, которые относятся к биологически активным веществам, так как их содержание в растворимом кофе обуславливает пищевую ценность продукта. По этому принципу отобраны следующие вещества-маркеры: кофеин ( $K=2.5$ ) – соединение, характеризующее качество сырья; никотиновая кислота ( $K=3.2$ ) и меланоидины ( $K=0.2$ ) – компоненты «технологической» природы, а также 3-О-кофеилхинная ( $K=3.0$ ) и 5-О-кофеилхинная ( $K=2.2$ ) кислоты – соединения, характеризующие как качество сырья, так и технологические особенности производства растворимого кофе. Таким образом, предложен алгоритм выявления и отбора веществ-маркеров качества растворимого кофе, схематично представленный на рисунке 5.

## 1. ВЫЯВЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ-МАРКЕРОВ КАЧЕСТВА РАСТВОРИМОГО КОФЕ



## 2. ОТБОР ВЕЩЕСТВ-МАРКЕРОВ КАЧЕСТВА РАСТВОРИМОГО КОФЕ

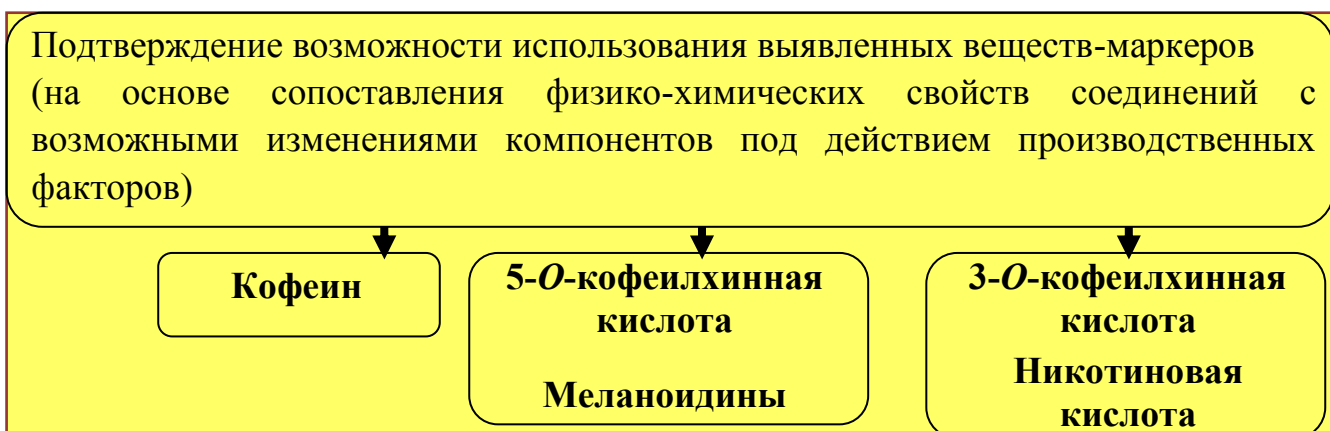


Рисунок 5 – Алгоритм выявления и отбора веществ-маркеров качества растворимого кофе



Для создания системы показателей качества растворимого кофе актуальным является как разработка методик их определения, так и установление взаимосвязей между ними.

## 3.2 Изучение химического состава и создание визуального образа растворимого кофе

### 3.2.1 ВЭЖХ-УФ-МС-анализ растворимого кофе

Хроматографическое определение органических соединений в объектах растительного происхождения является непростой аналитической задачей, для успешного решения которой необходимо эффективное разделение целевых компонентов, а также проведение их достоверной идентификации.

Для подбора режима элюирования проводилось предварительное разделение модельной смеси, состоящей из некоторых целевых аналитов: основных изомеров ХГК (3-О-КХК, 5-О-КХК) и кофеина, а также других фенольных соединений, содержащихся в растворимом кофе (3,4-дигидроксibenзойная (протокатеховая) кислота, феруловая, 3,4-дигидроксикоричная (кофейная), ванилиновая, галловая кислоты и катехол). Хроматографическое разделение проводили в водно-метанольной среде, с добавлением муравьиной кислоты (0.1%) для подавления диссоциации аналитов. В случае последующего МС-детектирования использование этой кислоты в составе элюента предпочтительно в виду образования меньшего числа аддуктов в процессе ионизации пробы. Подобранная программа градиентного элюирования позволила разделить исследуемую модельную смесь, состоящую из девяти соединений. Время выхода целевых компонентов составило 12.0 и 18.9, 21.9 мин для 3-О-КХК, 5-О-КХК и кофеина соответственно [107].

### 3.2.1.1 Качественный анализ химического состава растворимого кофе

В выбранных условиях проводили разделение и идентификацию компонентов растворимого кофе [107]. Анализ полученной хроматограммы (рисунок 6) совместно со спектрами разделенных компонентов показал, что большое количество компонентов детектируется при 325 нм, максимумы поглощения которых характерны для гидроксикоричных кислот и их производных. На основании соответствия спектральных характеристик, времен удерживания аналитов и стандартных веществ были идентифицированы мажорные компоненты – основные изомеры КХК – 5-О-КХК, 3-О-КХК. Детектирование разделенных компонентов кофе при 270 нм позволило одновременно получить аналитический сигнал, соответствующий кофеину ( $\lambda_{\max} = 272$  нм).

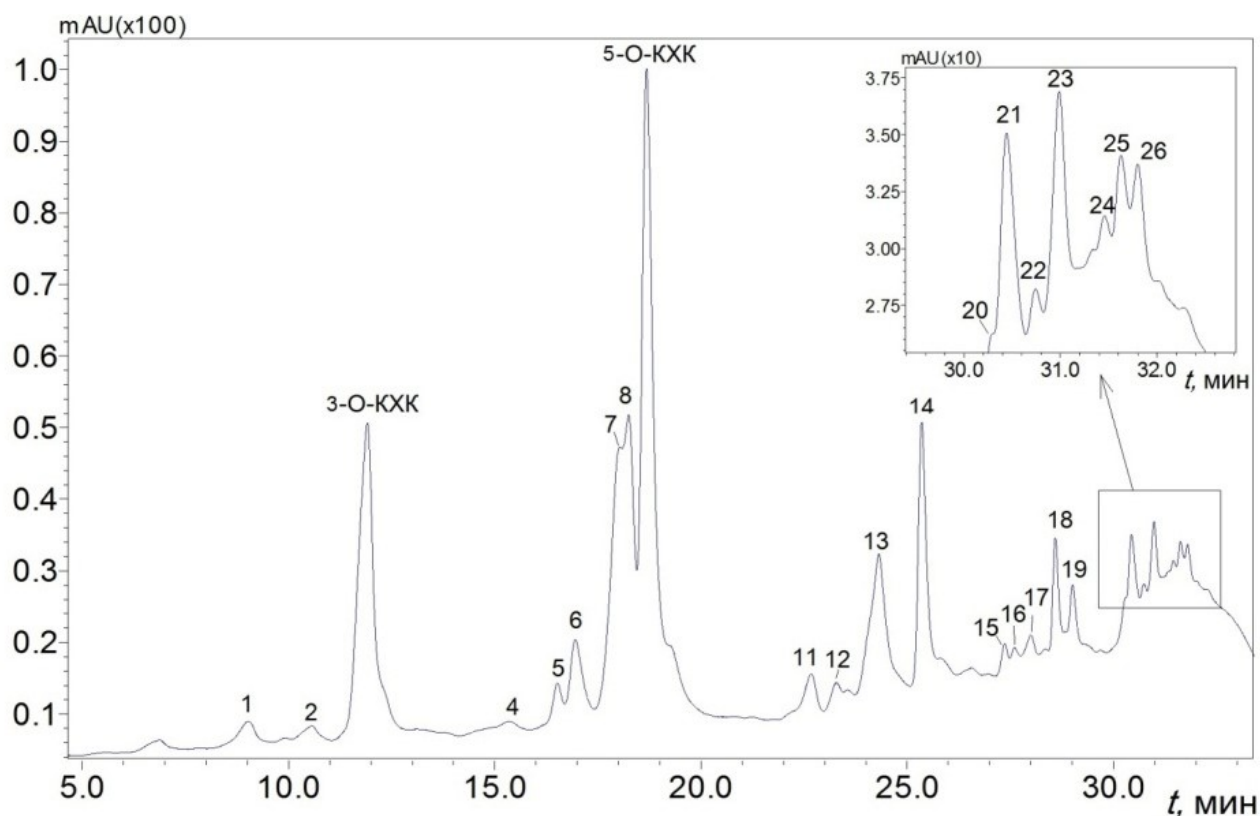


Рисунок 6 – Хроматограмма раствора растворимого кофе «Grand Classic»  
(325 нм)

Дополнительно проводилось масс-спектрометрическое подтверждение идентифицированных пиков путем получения масс-спектров для 5-О-КХК ( $M_r = 354$  г/моль), 3-О-КХК ( $M_r = 354$  г/моль) и кофеина ( $M_r = 194$  г/моль). В режиме регистрации положительных ионов на соответствующих МС-спектрах наблюдаются протонированные молекулярные ионы  $[M+H]^+$  с  $m/z = 355$ , 355 и 195. В режиме регистрации отрицательных ионов чувствительность определения КХК ( $m/z = 353$ ) значительно выше, что позволяет добиться большей чувствительности определения для соединений фенольной природы, ввиду их склонности к отщеплению протона, в то время как идентификацию кофеина проводили в режиме регистрации положительных ионов [107].

Компоненты растворимого кофе, для которых отсутствовали стандартные вещества, идентифицировали сопоставлением полученных характеристик МС- и УФ-спектров с соответствующими характеристиками, описанными в литературе. По результатам ВЭЖХ-МС анализа в образцах растворимого кофе были найдены следующие основные группы изомеров ХГК: кофеилхинные, ферулоилхинные, дикофеилхинные кислоты и их лактоны, а также некоторые другие хлорогеновые кислоты и их производные [107].

*Изомеры кофеилхинных кислот и их лактоны.* Помимо двух мажорных кофеилхинных кислот, идентифицированных как 3-О-КХК и 5-О-КХК, в растворимом кофе найдено еще четыре хроматографических пика (1, 5, 6, 8), масс-спектры которых содержат интенсивный ион с  $m/z = 353$ , что указывает на наличие других изомеров КХК в составе кофе. Наибольший из вышеперечисленных пик 8 ( $t_{уд} = 18.2$  мин) может относиться к 4-О-КХК. Согласно литературным данным [97] этот компонент является третьим, наиболее распространенным изомером кофеилхинной кислоты. Это связано с тем, что именно в  $C_5$ ,  $C_3$  и  $C_4$  положениях циклогексанового кольца хинной кислоты расположены легко этерифицируемые кофейной кислотой гидроксильные группы. Пики 1, 5 и 6 могут относиться к продуктам цис-изомеризации или рацемизации хинной кислоты [19, 107].

Производство растворимого кофе сопровождается термической обработкой зеленых зерен. В процессе их обжаривания около 10 % всех ХГК трансформируются в соответствующие лактоны (хинидины) путем отщепления от них молекулы воды с образованием внутримолекулярной эфирной связи между 1 и 5 углеродом в циклогексановом кольце хинной кислоты [43, 112]. Найдено, что 3- и 4-кофеил-1,5-хинидины содержатся в жареном кофе [43, 112, 150]. Нами идентифицированы два подобных компонента, содержащих на масс-спектре основной ион, величина  $m/z$  которого равна 335, что на восемнадцать единиц меньше соответствующей характеристики, полученной для КХК. Таким образом, пики 11 и 12 были отнесены к лактонам кофеилхинных кислот [107].

*Изомеры ферулоилхинных кислот и их лактоны.* Масс-спектры компонентов 7, 13 и 14 имеют интенсивный ион с  $m/z = 367$ , что соответствует депротонированному иону ФХК ( $M_r = 368$  г/моль). Компонент 7 плохо разделен с КХК на ВЭЖХ-УФ-хроматограмме (рисунок 6) и потому его идентификация была бы затруднительна без МС-анализа (рисунок 7).

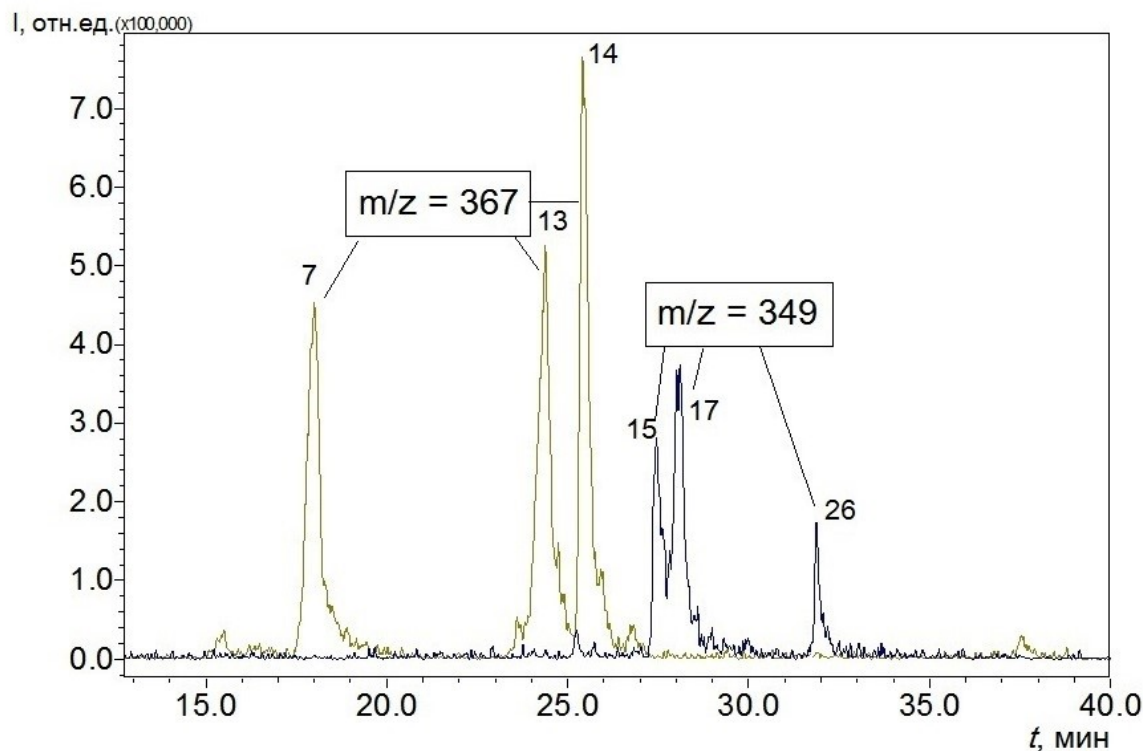


Рисунок 7 – Хроматограммы раствора растворимого кофе в режиме сканирования по выделенным ионам  $m/z$  367 и  $m/z$  349

В наших исследованиях найдены три компонента (пики 15, 17 и 26), элюируемые после феруроилхинных кислот и имеющих на МС-спектре сигнал, соответствующий одинаковой величине  $m/z$ , равной 349 (рисунок 7). В некоторых работах в кофе были идентифицированы компоненты с соответствующей относительной молекулярной массой. К ним относились как лактоны 3-ФХК и 4-ФХК [15, 105, 118], так и конъюгаты кумаровой кислоты и триптофана [118, 151]. В наших исследованиях два компонента (пики 15 и 17), имеющих весьма схожие хроматографические ( $t_{15} = 27.4$  мин,  $t_{17} = 28.0$  мин) и спектральные ( $\lambda_{1, 15} = 251$  нм и  $\lambda_{2, 15} = 326$  нм;  $\lambda_{1, 17} = 252$  нм и  $\lambda_{2, 17} = 327$  нм) характеристики, последние из которых согласуются с литературными данными [118], были отнесены к лактонам ФХК. Сильно удерживаемый компонент (пик 26) может являться кумароил-триптофаном [151]. Однако однозначное отнесение рассматриваемых пиков к этим соединениям возможно с проведением их МС<sup>n</sup> – фрагментации.

*Изомеры дикофеилхинных кислот и их лактоны.* В процессе депротонирования компонентов растворимого кофе, последовательно элюируемых в виде трех пиков 18, 19 и 21, на полученном масс-спектре наблюдается интенсивный ион с  $m/z = 515$ . В работе [25] компоненты с соответствующими массами были идентифицированы в растворимом кофе как 3,4-, 3,5- и 4,5- диКХК [107].

Образование внутримолекулярной эфирной связи в молекуле хинной кислоты, что характерно для лактонов, не затруднено даже в случае, если ее С<sub>3</sub> и С<sub>4</sub> положения уже этерифицированы двумя молекулами кофейной кислоты. Дикофеилхинные лактоны являются неотъемлемой частью компонентного состава жареного кофе [105], некоторые из них сохраняются в процессе производства растворимого кофе. Пик 24 ( $m/z = 497$ ) на представленной хроматограмме (рисунок 5) может соответствовать одному из лактонов диКХК [107].

*Другие хлорогеновые кислоты и их производные.* Разнообразие ХГК в кофе весьма велико. Помимо выше идентифицированных представителей этой

группы описано наличие нескольких десятков минорные кислот, общее содержание которых в кофе не превышает 1 % [18, 19, 97].

В результате ВЭЖХ-МС анализа некоторых образцов растворимого кофе, например, образца с наименованием «Арабика», изготовленного ЗАО «Московская кофейня на паяхъ», найден компонент с относительной молекулярной массой, равной 338 г/моль ( $t = 15.0$  мин), который может являться кумароилхинной кислотой [118]. Опираясь на литературные данные, можно сделать предположение, что компонент, соответствующий пику 23 и имеющий на масс-спектре ион с  $m/z = 365$  (рисунок 8), относится к кофеилтриптофану [19].

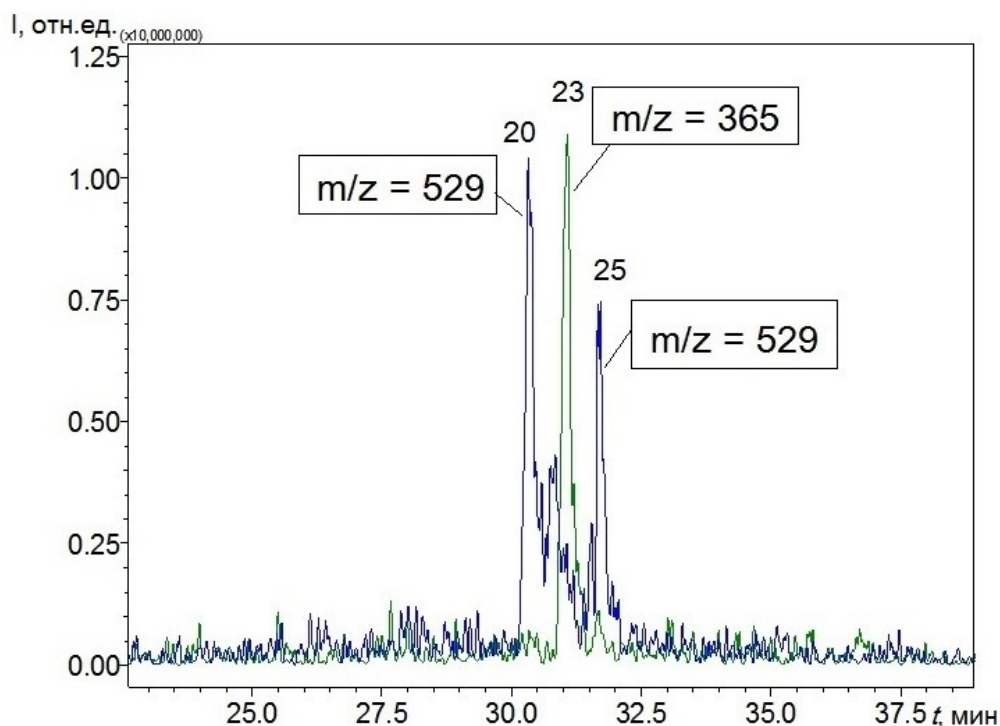


Рисунок 8 – Хроматограммы раствора растворимого кофе в режиме сканирования по выделенным ионам  $m/z = 365$  и  $m/z = 529$

Известно, что при производстве растворимого кофе к основному сырью возможно добавление зерен кофе вида Робуста для увеличения степени экстрактивности [7, 118]. Характерной особенностью этого вида кофе является содержание в нем ферулоил-кофеилхинных кислот [11]. В наших образцах

найлены компоненты (пики 20 и 25,  $m/z = 529$ ), которые могут соответствовать изомерам таких смешанных ХГК (рисунок 8).

Таким образом, проведена идентификация, разделенных методом ВЭЖХ компонентов растворимого кофе и обобщенные идентификационные параметры для основных компонентов представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты идентификации некоторых компонентов растворимого кофе

Класс соединений	Соединение	№ пика	Идентификационные параметры			
			$t_{уд}$ , мин	$\lambda_{max}$ , нм	$m/z$	
Алкалоиды	Кофеин	10	21.2	272	195	
Хлорогеновые кислоты	КХК	изомер	1	9.1	327	353
		3-О-КХК	3	11.9	234, 298, 325	353
		изомер	5	16.5	246, 269, 327	353
		изомер	6	16.9	244, 298, 326	353
		4-О-КХК	8	18.2	243, 297, 326	353
		5-О-КХК	9	18.7	242, 297, 326	353
	ФХК	изомер	7	18.0	243, 293, 326	367
		изомер	13	24.3	246, 294, 327	367
		изомер	14	25.3	245, 293, 326	367
	диКХК	изомер	18	28.6	247, 292, 326	515
		изомер	19	29.0	249, 291, 327	515
		изомер	21	30.4	248, 291, 327	515
	ФКХК	изомер	20	30.1	252, 281	529
		изомер	25	31.7	253, 281	529
Лактоны хлорогеновых кислот	лактон КХК	изомер	11	22.7	275, 327	335
		изомер	12	23.2	277, 327	335
	лактон ФХК	изомер	15	27.4	251, 283, 326	349
		изомер	17	28.0	252, 283, 327	349
	лактон диКХК	изомер	24	31.4	249, 283, 325	497
Производные хлорогеновых кислот	Кофеил-триптофан	23	31,0	248, 283	365	

### 3.2.1.2 Определение кофеина, 5- и 3-*O*-кофеилхинных кислот в различных коммерческих образцах растворимого кофе

Анализ литературных данных показал, что содержание ХГК в растворимом кофе зависит не только от исходного сырья, но и технологии производства, а также соблюдения техно

логического режима [25, 32, 97]. Принимая во внимание, что ХГК, как и кофеин, являются широко известными биологически активными веществами, содержание этих кислот в продукте может быть перспективным для оценки качества растворимого кофе [107].

Для определения содержаний 3-*O*-КХК, 5-*O*-КХК и кофеина в образцах растворимого кофе для соответствующих веществ получены градуировочные зависимости, коэффициенты корреляции которых имели значения не ниже 0.99. Определение этих компонентов проводили в диапазонах 0.65-40 мг/г [107]. Погрешность определения аналитов в модельных растворах, рассчитанная на основе данных, полученных методом «введено-найдено», не превышала 5 %.

Проведен анализ образцов растворимого кофе различных коммерческих наименований, результаты представлены в таблице 15 [107].

Содержание кофеина в испытуемых образцах (1-13) варьируется в диапазоне 23.5-42.4 мг/г. В среднем его массовая доля составляет 3.0 %, что согласуется с литературными данными [59, 67, 68]. Наименьшее значение этого показателя – 2.4 % получено для образца 1, однако оно не выходит за границы установленной нормы для растворимого кофе (не менее 2.3 %) [152]. Содержание 5-*O*-КХК в образцах в 1.5-2 раза выше, чем содержание 3-*O*-КХК. Значения этих компонентов варьируются в диапазонах 5.3-23.0 и 3.4-11.6 мг/г соответственно [107].

В растворе образца гранулированного кофе наименования «Красная цена. Classic» отмечено наличие нерастворимых в воде частиц. Массовая доля кофеина в этом образце составила величину 1.5 %, что в 1.5 раза ниже установленной ГОСТ 32776-2014 нормы для этого продукта [152]. Поэтому



данный образец был отнесен нами к продукту ненадлежащего качества. Необходимо отметить, что содержание 5-О-КХК и 3-О-КХК в образце гранулированного кофе наименования «Красная цена. Classic» минимально по сравнению с другими образцами [107].

Таблица 15 – Результаты ВЭЖХ-УФ определения содержаний изомеров кофеилхинных кислот и кофеина в растворимом кофе

№ п/п	Наименование образца растворимого кофе	Содержание компонентов, мг/г		
		3-О-КХК	5-О-КХК	кофеин
1	Московская кофейня на паяхъ. Арабика	11.6 ± 0.7	23.0 ± 1.7	23.5 ± 1.5
2	Nescafe Classic	9.1 ± 0.5	14.9 ± 1.2	42.4 ± 1.1
3	Москофе продукт. Московский	8.4 ± 0.6	13.2 ± 1.1	34.8 ± 2.0
4	Egoiste Private	7.5 ± 0.3	12.4 ± 1.0	28.0 ± 0.9
5	Cafe Pele	6.6 ± 0.4	11.4 ± 0.8	31.1 ± 1.9
6	Жардин Колумбия Меделлин	7.1 ± 0.5	10.1 ± 0.9	37.0 ± 2.0
7	Жардин Гватемала Атитлан	6.9 ± 0.3	9.8 ± 0.7	33.1 ± 1.3
8	Московская кофейня на паяхъ. Коломбо	5.6 ± 0.3	9.0 ± 0.8	31.9 ± 0.9
9	Nescafe Gold	6.0 ± 0.4	8.9 ± 0.9	34.9 ± 1.2
10	Nescafe Classic CREMA	5.4 ± 0.3	7.8 ± 0.5	40.2 ± 1.5
11	Bourbon Select-A-Vantage. Jamaica	4.0 ± 0.4	6.3 ± 0.6	35.6 ± 0.9
12	Жардин Кения Килиманджаро	3.8 ± 0.3	6.0 ± 0.7	28.2 ± 1.4
13	Якобс Монарх	3.4 ± 0.3	5.3 ± 0.5	25.1 ± 1.1
14	Красная цена. Classic. Гранулированный	1.64 ± 0.11	2.91 ± 0.10	14.8 ± 0.5

Стоит отметить, что в образце «Nescafe Classic CREMA» сумма содержаний 5-О-КХК и 3-О-КХК (24.0 мг/г) примерно в два раза меньше

аналогичной величины для образца «Nescafe Classic» (13.2 мг/г). Существенное различие в значениях содержаний КХК наблюдаются для образцов растворимого кофе, произведенных одной компанией, но с применением зерен разного географического происхождения. Так, образцы сублимированного кофе «Жардин Гватемала» и «Жардин Колумбия» в среднем содержат 7.0 и 10.0 мг/г 3-О-КХК и 5-О-КХК соответственно. В то время как для образца «Жардин Килиманджаро» эти значения составляют 3.8 мг/г для 3-О-КХК и 6.0 мг/г для 5-О-КХК [107].

Таким образом, проведены ВЭЖХ разделение и идентификация мажорных компонентов растворимого кофе (кофеин, 3-О-КХК и 5-О-КХК) с использованием спектральных и масс-спектрометрических характеристик. Отнесение минорных компонентов к другим изомерам ХГК, их лактонам и конъюгатам производных коричной кислоты и триптофана осуществлено на основе установления соответствия найденных значений  $m/z$  депротонированных ионов литературным данным [107].

Определены содержания 3-О-КХК, 5-О-КХК и кофеина в различных образцах растворимого кофе, которые варьировались в диапазонах 3.4-11.6, 5.3-23.0 и 23.5-42.4 мг/г соответственно. Показано, что содержание КХК в растворимом кофе может являться полезным показателем качества данного продукта [107].

### 3.2.2 Применение хроматографического профиля для оценки качества растворимого кофе

Получение информации о содержаниях всех возможных изомеров ХГК в растворимом кофе является процессом трудоемким, длительным, требующим большого числа стандартных веществ. В нашей работе применен хемометрический подход, позволяющий получить полезную для оценки качества продукта информацию на основе данных, полученных из ВЭЖХ-УФ-хроматограмм.

Рассмотрение ВЭЖХ-УФ-хроматограмм двадцати четырех образцов растворимого кофе разных коммерческих наименований позволило выявить наличие двадцати шести характерных пиков, количественная характеристика которых – площадь пика – служила основой для формирования массива данных. Его статистическая обработка включала проведение t-теста на равенство средних или дисперсионного анализа для выявления статистически значимых переменных с последующей классификацией образцов по рассматриваемому признаку методом главных компонент.

С применением этого хемометрического подхода рассмотрено *влияние географического происхождения кофейных зерен на компонентный состав растворимого кофе*. Принято допущение, что доступная информация для потребителей является верной. Проанализированы образцы кофе «Жардин», «Максимум» и «Московская кофейня на паяхъ», изготовленные из зерен вида Арабика разного географического происхождения. На основе площадей восьми статистически значимых (по данным дисперсионного анализа,  $p < 0.05$ ) пиков удалось выделить в отдельные группы образцы кофе Арабика из Кении, Гватемалы, Мексики, Бразилии и Колумбии (рисунок 9).

Важно отметить, что последнюю группу составили образцы, изготовленные разными производителями. На образцах растворимого кофе из Кении отмечено, что образцы с истекшим сроком годности не попадают в соответствующую им группу по происхождению [153].

Данный подход позволил установить, что *технология высушивания* образца не оказывает статистически значимого влияния на компонентный состав растворимого кофе (рисунок 10) [153].

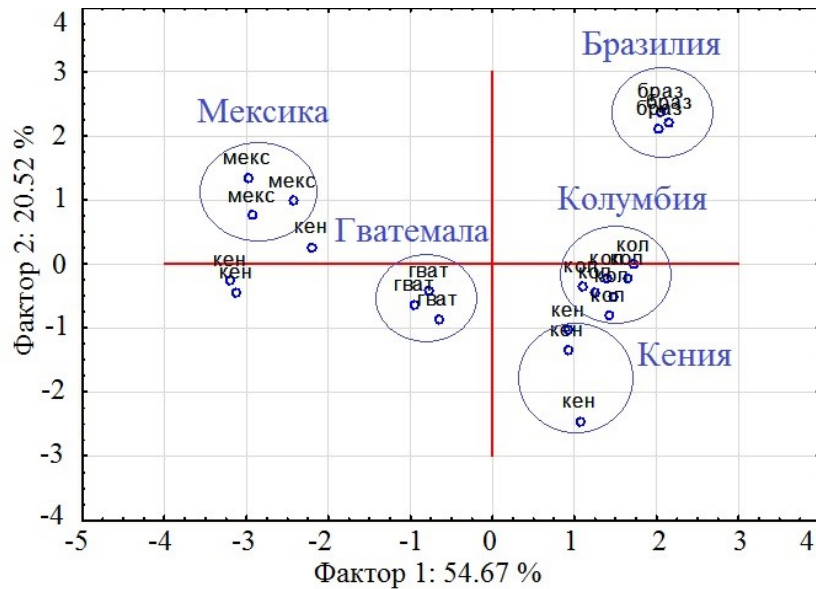


Рисунок 9 – Проекция наблюдений на факторную плоскость образцов для группирующей переменной – происхождение

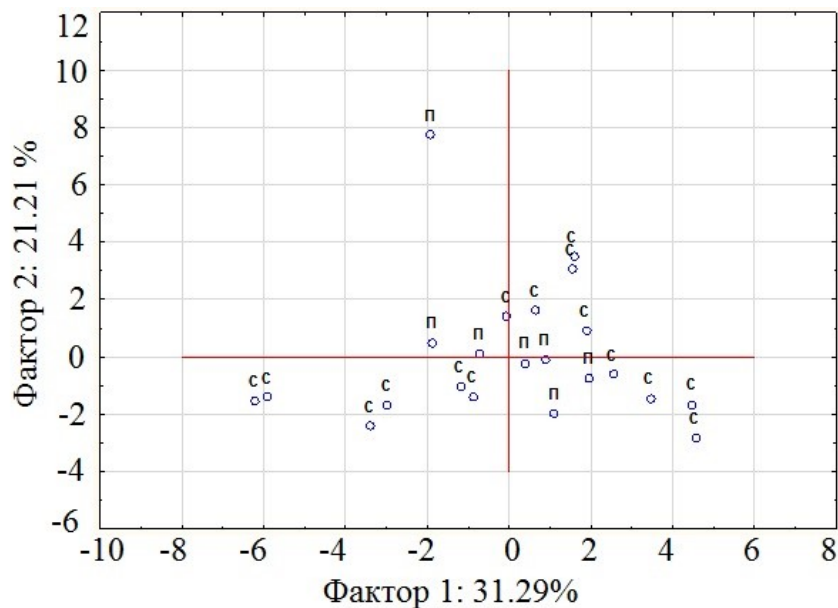


Рисунок 10 – Проекция наблюдений на факторную плоскость образцов для группирующей переменной – технология, где «с» – сублимационная сушка, «п» – сушка распылением

Принимая во внимание, что при оценке качества продукта необходимо опираться не только на содержания компонентов, но и на соотношения между содержаниями некоторых соединений, был получен также массив на основе соотношения площадей пиков ВЭЖХ-УФ-хроматограмм растворимого кофе

(общий вид хроматограмм и нумерация пиков представлены на рисунке 6). Эти данные послужили основой для *создания визуального образа* продукта.

Статистический анализ массивов данных позволил выявить двенадцать характерных для кофе Арабика соотношений площадей пиков ( $p < 0.10$ ), из которых выделены шесть невязимосвязанных переменных:  $S_{12}/S_{17}$ ,  $S_3/S_{19}$ ,  $S_{12}/S_2$ ,  $S_9/S_{11}$ ,  $S_3/S_2$ ,  $S_9/S_{19}$  ( $p < 0.05$ ). На их основе построены лепестковые диаграммы (рисунок 11) [153].

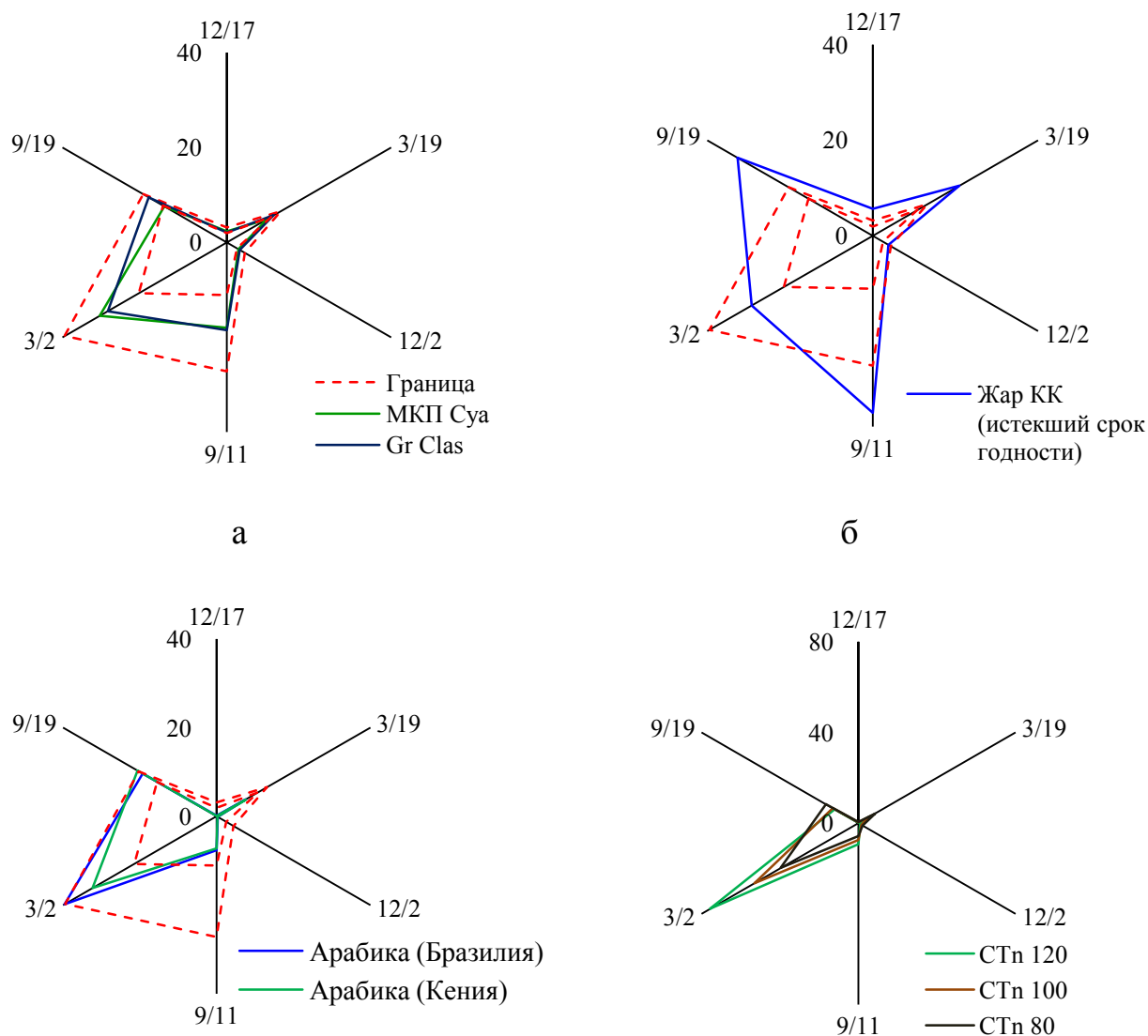


Рисунок 11 – Образы для образцов растворимого кофе пригодного к употреблению (а) и с истекшим сроком годности (б), жареного кофе разного происхождения (в) и жареного кофе Робуста слабой (СТn 120), средней (СТn 100) и сильной (СТn 80) степени обжаривания (г)

Анализ построенных образов для образцов молотого жареного и растворимого кофе позволил выявить следующие особенности:

1. Для большинства проанализированных образцов растворимого кофе выявлена типичность построенных образов. Статистическая обработка результатов позволила установить верхнюю и нижнюю границы изменения соотношений выделенных пиков. Показано, что пригодные к употреблению образцы попадают в установленный визуальный образ (рисунок 11, а). Образцы с истекшим сроком годности имеют несколько иной образ: наблюдается увеличение соотношения  $S_9/S_{11}$  (площадей пиков 5-О-кофеилхинной кислоты и лактона кофеилхинной кислоты) в среднем в 2.5 раза (рисунок 11, б).

2. Образы для образцов молотого жареного кофе из Бразилии и Кении отличаются от образа для растворимого кофе Арабика по соотношениям  $S_9/S_{11}$ ,  $S_{12}/S_2$ ,  $S_{12}/S_{17}$  (рисунок 11, в).

3. Для образцов молотого кофе с увеличением степени их обжаривания наблюдаются увеличение соотношения  $S_3/S_2$  в диапазоне значений от 1.5 до 2.5 раз (рисунок 11, г), т.е. соотношение  $S_3/S_2$  зависит от степени обжаривания сырья при производстве кофе [153].

Таким образом, использование визуального образа, полученного на основе отношений площадей пиков на ВЭЖХ-УФ-хроматограммах, может быть весьма эффективным для экспресс-оценки качества растворимого кофе.

### 3.3 Определение соединений фенольной природы в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза

Для определения ионогенных и полярных биологически активных веществ наряду с методом ВЭЖХ применяется альтернативный ему метод капиллярного электрофореза (КЭ), главными достоинствами которого является выигрыш в эффективности разделения, более простая процедура пробоподготовки и малый расход реагентов.

### 3.3.1 Электрофоретическое разделение фенольных соединений растворимого кофе

Одновременное определение кофеилхинных кислот (КХК) и катехола (КТ) проводили методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) в среде боратного буфера. Использование этого буфера в качестве электролита повышает селективность разделения определяемых соединений фенольной природы и других компонентов пробы за счет образования отрицательно заряженного комплекса между борат-ионом и фенольным соединением, содержащем ортогидрокси-группы [154, 155].

Варьирование величин рН (9.3-9.6) и концентрации буфера  $C_{\text{буф}}$  (30-70 мМ), а также напряжения в системе  $U$  (20-30 кВ) в ходе электрофоретического анализа водного раствора растворимого кофе показало, что увеличение значений изучаемых параметров приводит к улучшению разрешения между пиками аналитов и компонентами матрицы. Пик катехола, детектируемый при 210 нм с разрешением  $R > 2$ , наблюдается на электрофореграмме образца, полученной с применением буферной системы с рН 9.5 и концентрацией 40 мМ при напряжении равном 25 кВ. Важно отметить, что в этих условиях на электрофореграмме пробы кофе при 324 нм детектируются два основных пика, соответствующие по временам миграции и спектральным характеристикам двум мажорным изомерам ХГК – 5-О-КХК и 3-О-КХК [147].

При выборе количества вводимой в капилляр пробы руководствовались соблюдением условий: проба должна быть приготовлена таким образом, чтобы не возникала трудность при ее фильтрации, а величина площади пика минорного компонента – КТ должна быть достаточна для его определения. Варьируя массу навески кофе в диапазоне 0.2-0.8 г (на 100 мл воды), а время ввода пробы от 2 до 10 секунд при постоянном давлении 50 мбар, выбрали в качестве оптимальных следующие значения параметров: 0.6 г и

6 с (рисунок 12). Полученные в выбранных условиях электрофореграммы раствора растворимого кофе представлены на рисунке 13.

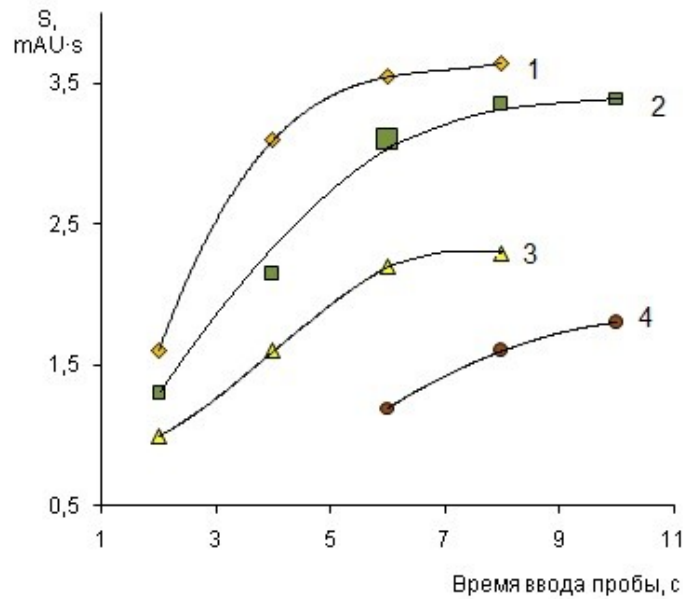


Рисунок 12 – Зависимости площади пика катехола от времени ввода пробы для растворов с содержанием растворимого кофе 0.8 (1), 0.6 (2), 0,4 (3) и 0.2 (4) г на 100 мл бидистиллированной воды

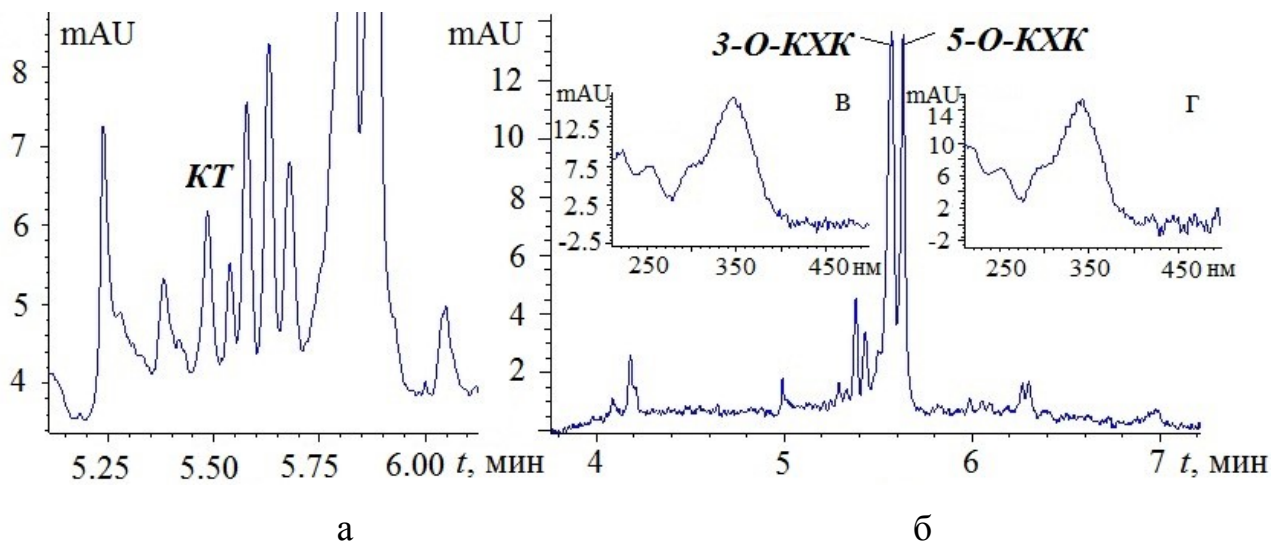


Рисунок 13 – Электрофореграммы раствора растворимого кофе «Nescafe Classic», зарегистрированные при длине волны 210 (а) и 324 (б) нм и спектры, соответствующие 3-О-КХК (в) и 5-О-КХК (г)

условия: проба: раствор 0.6 г кофе в 100 мл воды; ввод пробы: 6 с×50 мбар; электролит: боратный буферный раствор 40 мМ, рН 9.5; условия разделения: U = +25 кВ, t = 25 °С



Для оценки содержания КТ в пробе получена градуировочная зависимость в диапазоне от 1 до 16 мкг/мл, коэффициент корреляции составил величину 0.99. Оценку правильности определения КТ проводили методом «введено-найденно» на модельных растворах и образце растворимого кофе. Относительная погрешность в обоих случаях не превышала 8 % (таблица 16) [147].

Таблица 16 – Оценка правильности электрофоретического определения катехола

Проба	Концентрация добавки, мкг/мл		δ, %
	введено	найденно	
Модельный раствор	1.8	1.7	5.6
	3.0	2.9	3.3
	15.0	14.2	5.3
Растворимый кофе	2.6	2.4	7.7
	3.2	3.0	6.3
	3.6	3.8	5.6

### 3.3.2 Суммарное определение кофеилхинных кислот в растворимом кофе методом КЗЭ. Оценка правильности определения КХК

Кофеилхинные кислоты в растворимом кофе содержатся преимущественно в форме трех изомеров: 5-О-КХК, 3-О-КХК и 4-О-КХК [22, 25, 156], а их содержание по отношению к хлорогеновым кислотам в среднем составляет 27, 16 и 15 % соответственно [25]. В выбранных нами условиях одновременного определения катехола и кофеилхинных кислот последняя группа детектируется в виде двух пиков. На электрофореграмме раствора кофе (рисунок 13, б) не найдено других сигналов, соответствующих по спектральным характеристикам стандартам этих кислот. Увеличение

концентрации буфера приводит к незначительному расщеплению первого пика КХК, что дает основание предположить возможность миграции 4-О-КХК в одной зоне с 3-О-КХК. Поскольку окончательного разделения этих изомеров в рамках КЗЭ достичь не удалось, то рассмотрели возможность определения КХК по суммарной площади двух пиков, регистрируемых на электрофореграмме при времени 5.58 и 5.62 минуты (рисунок 13, б).

Из литературных данных известно, что коэффициенты экстинкции ( $\epsilon$ ) для 3-О-КХК, 4-О-КХК и 5-О-КХК имеют близкие значения [22]. Из построенных зависимостей АС от концентрации индивидуальных изомеров 5-О-КХК, 3-О-КХК и их смеси в соотношении 1:1 видно, что тангенсы наклона графиков отличаются незначительно и равны 0.50, 0.52 и 0.51 соответственно (рисунок 14). Поэтому расчет суммарного содержания КХК в растворимом кофе проводили относительно преобладающего изомера в продукте – 5-О-КХК [147].

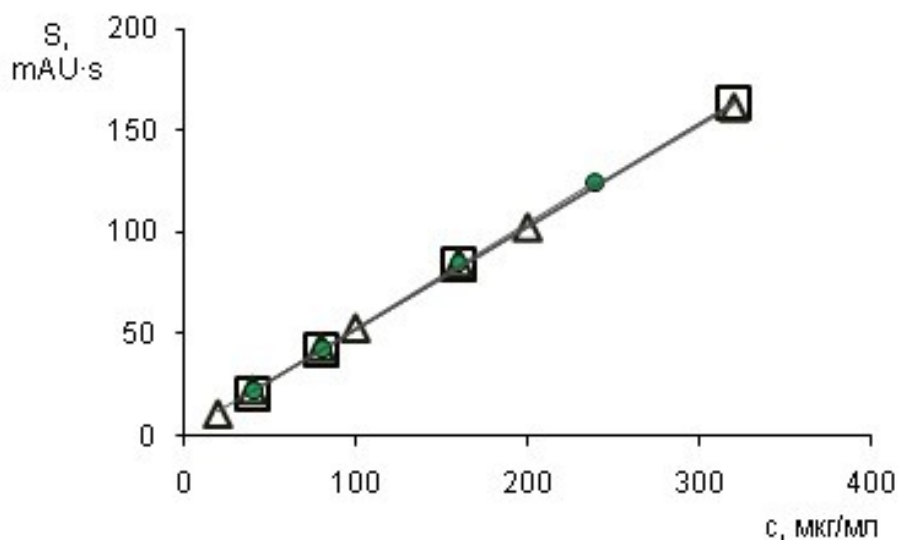


Рисунок 14 – Зависимости площади пика от концентрации 3-О-КХК (●), 5-О-КХК (Δ) и их смеси (□)

Оценка правильности определения КХК на модельных растворах и растворах растворимого кофе с введенной добавкой изомеров КХК в разных

соотношения показала, что относительная погрешность определения в обоих случаях не превышала 7 % (таблица 17).

Таблица 17 – Оценка правильности электрофоретического определения суммарного содержания кофеилхинных кислот

Проба	Концентрация добавки, мкг/мл			δ, %
	3- <i>O</i> -КХК	5- <i>O</i> -КХК	3- <i>O</i> -КХК + 5- <i>O</i> -КХК	
	введено		найдено	
Модельный раствор	40	40	85	6.5
	40	60	102	2.0
	20	40	59	1.5
	40	20	62	3.3
Растворимый кофе	40	40	85	6.5
	80	80	156	2.7
	120	120	245	2.0

Правильность электрофоретического определения суммарного содержания КХК в растворимом кофе проводили также с применением референтного метода, в качестве которого был выбран метод ВЭЖХ-УФ-МС. Его выбор обусловлен возможностью эффективного разделения большого числа изомеров ХГК и их надежной идентификацией.

Методом ВЭЖХ-УФ-МС, по описанной ранее методике, проанализировано несколько образцов растворимого кофе. В каждом из них идентифицировано три мажорных изомера КХК: 5-*O*-КХК, 4-*O*-КХК и 3-*O*-КХК и три минорных. Расчет содержания индивидуальных изомеров в кофе проводили относительно 5-*O*-КХК (как и в методе КЗЭ) с учетом коэффициентов экстинкции кислот, взятых из литературных данных [22]. Как показано в работе [157], использование стандарта 5-*O*-КХК для хроматографического определения других изомеров хлорогеновых кислот не приводит к возникновению существенной ошибки определения 4-*O*-КХК и 3-*O*-КХК в образцах зеленого кофе [147].

Проведен сопоставительный анализ суммарного содержания КХК, полученного методом КЗЭ, и суммы содержаний трех мажорных изомеров, рассчитанной по данным ВЭЖХ-УФ анализа (таблица 18), предполагая, что по разработанной нами методике суммарный сигнал формируется только под действием этих кислот. В этом случае, для всех образцов получили значения содержаний, завышенные в среднем на 9 % относительно суммы концентраций трех изомеров. Как видно из таблицы 18, минорные КХК составляют в среднем 11% от содержания всех рассматриваемых изомеров. Электрофоретическое поведение мажорных и минорных КХК, вероятно, не существенно отличается, что может приводить к формированию суммарного электрофоретического сигнала. Аналогичное сравнение данных, полученных по расчетам с использованием суммы содержаний шести изомеров (определение ВЭЖХ-УФ), показало, что расхождение между сравниваемыми величинами в среднем составляет 4 %. Вероятно, формируемый сигнал может считаться суммарным [147].

Таблица 18 – Результаты определений КХК в образцах растворимого кофе различными методами

Наименование образца	ВЭЖХ		КЗЭ		
	Сумма содержаний КХК, мг/г		Суммарное содержание КХК, мг/г	δ, % относительно	
	трех изомеров (C <sub>3</sub> )	шести изомеров (C <sub>6</sub> )		C <sub>3</sub>	C <sub>6</sub>
Якобс Монарх	11.7	13.7	13.3 ± 0,8	13.7	2.9
GrandClassic	19.4	22.1	21.0 ± 1,1	8.2	5.0
Жардин Колумбия Меделлин	21.7	25.3	23.7 ± 1,6	9,2	6.3
Московская кофейня на паяхъ. Арабика	52.6	56.5	54.8 ± 2,3	4.3	3.0

Таким образом, суммарное содержание кофеилхинных кислот, полученное электрофоретическим методом с учетом погрешности определения

( $\pm 6\%$ ), соответствует сумме содержаний шести изомеров КХК, рассчитанной по данным ВЭЖХ-УФ анализа [147].

### 3.3.3 Обоснование «технологической» природы образования катехола в растворимом кофе

Кофеилхинные кислоты и катехол относятся к классу фенольных компонентов, однако, «природа» их возникновения в растворимом кофе различна. Источник КХК – зеленые зерна, температурное воздействие на которые вызывает частичное разрушение этих компонентов на низкомолекулярные соединения. При этом возможно образование КТ как из хинной, так и из кофейной частей КХК [44]. Известно, что КТ может также образовываться в результате реакции Майяра [44], формирующей в процессе обжаривания зерен высокомолекулярные коричневые полимеры – меланоидины [114]. Для обоснования «технологической» природы образования КТ в образцах кофе определены содержания КХК и КТ электрофоретическим методом, а также индекс обжарки, который, как известно [34, 118], характеризует содержание меланоидинов в продукте.

Предварительно проведен электрофоретический анализ на содержание КХК и КТ в образцах молотого зеленого и жареного кофе разной степени обжаривания: слабой (СТп 120), средней (СТп 100) и сильной (СТп 80). Показано (рисунок 15), что содержание КХК в образцах кофе значительно уменьшается в зависимости от степени обжаривания. Для сильно обжаренных образцов уровень деградации этих кислот достигает 70 %. Обратная картина наблюдается для КТ, который не был обнаружен в зеленом и слабо обжаренном кофе, в то время как его значительное количество определено в образце со степенью обжаривания СТп 80. Таким образом, с увеличением степени обжаривания кофе происходит уменьшение содержания КХК и увеличение количества КТ в образцах жареного молотого кофе [147, 158].

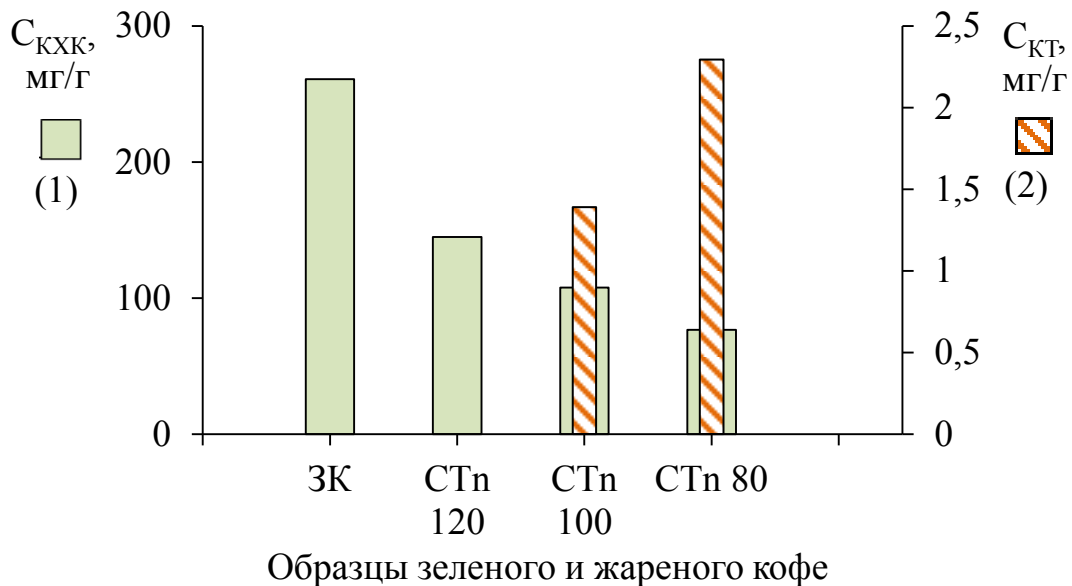


Рисунок 15 – Содержания КХК (1) и КТ (2) в образцах молотого кофе слабой (СТn 120), средней (СТn 100) и сильной (СТn 80) степени обжаривания

Экстрагируемые в процессе производства растворимого кофе из молотых жареных зерен компоненты концентрируются во время высушивания экстракта. Дополнительные температурные воздействия на этапах экстракции и сушки могут также оказывать влияние на содержание изучаемых компонентов в готовом продукте. Анализ данных, полученных в результате электрофоретического определения ХГК и КТ в образцах порошкообразного, гранулированного и сублимированного растворимого кофе, показал, что их содержания варьируются в диапазонах 9-55 и 0.40-0.85 мг/г соответственно (рисунок 16) [159].

Способ высушивания кофейного экстракта (распыление, агломерация, сублимация), вероятно, не оказывает существенного влияния на содержание этих компонентов. Однако видно, что образцы с низким содержанием кислот имеют высокое содержание КТ, в то время как в образце «Арабика» (Московская кофейня на паяхъ), содержащем максимальное количество КХК, этот компонент не был обнаружен. То есть, между содержаниями КХК и КТ в образцах растворимого кофе наблюдается отрицательная корреляция ( $r_{расч} = 0.78$ ;  $r_{табл} = 0.40$ ;  $n = 24$ ). Наоборот, положительная корреляция ( $r_{расч} = 0,73$ ;  $r_{табл} = 0.50$ ;  $n = 16$ ) установлена между КТ и индексом обжарки [107]. Таким образом,

производственные факторы, вероятнее всего – параметры обжаривания зерен, оказывают существенное влияние на содержание КТ, поэтому данный компонент может служить показателем качества растворимого кофе, характеризующим технологические особенности его производства [147, 158].

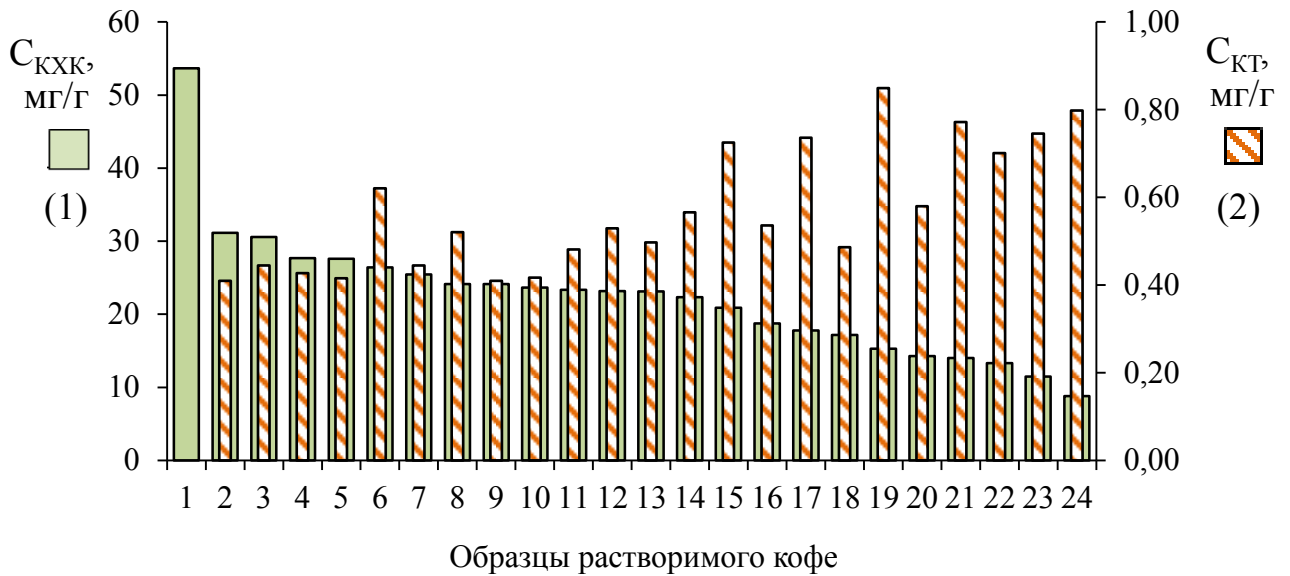


Рисунок 16 – Содержания КХК (1) и КТ (2) в образцах растворимого кофе

Таким образом, выбраны условия одновременного определения катехола и кофеилхинных кислот в образцах растворимого кофе методом КЗЭ. Анализ данных показал, что суммарное содержание кофеилхинных кислот, полученное электрофоретическим методом, и сумма содержаний шести изомеров КХК, рассчитанная по данным ВЭЖХ-УФ анализа, согласуются. Это подтверждает возможность определения суммарного содержания КХК по разработанной методике [147].

Таким образом, определены содержания КХК и КТ в различных образцах растворимого кофе, которые варьируются в диапазонах 9-55 и 0,40-0,85 мг/г соответственно. Показано, что с увеличением степени обжаривания кофе наблюдается изменение содержания компонентов в образцах жареного молотого кофе: уменьшение КХК и увеличение КТ. Для образцов растворимого кофе установлена обратная корреляция ( $r_{\text{расч}} = 0,78$ ;  $r_{\text{табл}} = 0,40$ ;  $n = 24$ ) между

содержаниями КХК и КТ, а также положительная корреляция ( $r_{\text{расч}} = 0.73$ ;  $r_{\text{табл}} = 0.51$ ;  $n = 15$ ) между содержанием КТ и индексом обжарки кофе. Это в совокупности подтверждает «технологическую» природу образования катехола в растворимом кофе.

### 3.4 Определение никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца

В кофе содержатся относительно стабильные к термическим воздействиям соединения (например, кофеин), так и малоустойчивые компоненты. Известно, что тригонеллин практически полностью разрушается в процессе обжаривания кофе, образуя одну из форм витамина В<sub>3</sub> – никотиновую кислоту (НК). В отличие от большинства продуктов растительного происхождения, в которых она связана с другими соединениями: полисахаридами, пептидами и гликопептидами, в растворимом кофе НК как микрокомпонент находится преимущественно в свободной форме. Методом ВЭЖХ эта кислота определяется одновременно с другими компонентами: тригонеллином, сахарозой и др. Низкое содержание НК в растворимом кофе не позволяет проводить прямое определение методом КЗЭ. Нами была рассмотрена возможность внутрикапиллярного *on-line* концентрирования НК для ее определения в растворимом кофе методом КЗЭ. Для этапа концентрирования выбран вариант стэкинга с большим объемом образца и переключением полярности (*large volume sample stacking, LVSS*) [160].

#### 3.4.1 Оптимизация условий определения никотиновой кислоты

Проведение стэкинга с большим объемом образца в методе капиллярного зонного электрофореза возможно в условиях, когда направления движения



аналита и электроосмотического потока (ЭОП) противоположны. Исходя из этого, для определения никотиновой кислоты (НК) в растворимом кофе данным методом, выбран режим положительной полярности, при котором электрод на входном конце капилляра выступает в роли анода, а в качестве электролита применены буферные системы с  $\text{pH} > 7$ , создающие условия для ионизации кислоты и возникновению направленного к катоду ЭОП, транспортирующего аналит к детектору.

Оптимизацию условий метода КЗЭ-*LVSS* проводили с использованием раствора растворимого кофе в следующей последовательности:

– выбор условий, обеспечивающих удовлетворительное разрешение между сигналами НК и матрицы как методом КЗЭ, так и КЗЭ-*LVSS* (тип буферного раствора, его концентрация  $C_{\text{буф}}$  и  $\text{pH}$ , напряжение  $U$  в системе);

– оптимизация параметров *on-line* концентрирования при определении НК методом КЗЭ-*LVSS* (время ввода пробы  $t_{\text{ввод}}$ , время обращения полярности  $t_{\text{обр}}$ , напряжение обращения  $U_{\text{обр}}$  и масса навески кофе).

На первом этапе (метод КЗЭ без стадии концентрирования), апробированы фосфатный ( $\text{pH} 7.0$ ) и боратный ( $\text{pH} 9.2$ ) буферные растворы (40 мМ). Было установлено, что разрешающая способность выше, а время анализа в 1,5 раза меньше в боратном буферном растворе по сравнению с фосфатным. Поэтому боратный буферный раствор выбран для дальнейших исследований (рисунок 17).

При варьировании концентрации раствора боратного буфера (10-70 мМ) и величины его  $\text{pH}$  (8.0-9.5) выделены буферные растворы, с применением которых на электрофореграммах анализируемой пробы удалось идентифицировать пик НК. Однако площади полученных сигналов оказались в ряде случаев недостаточны для их обработки, что привело к необходимости увеличения вводимого в капилляр объема пробы и концентрирования аналита.

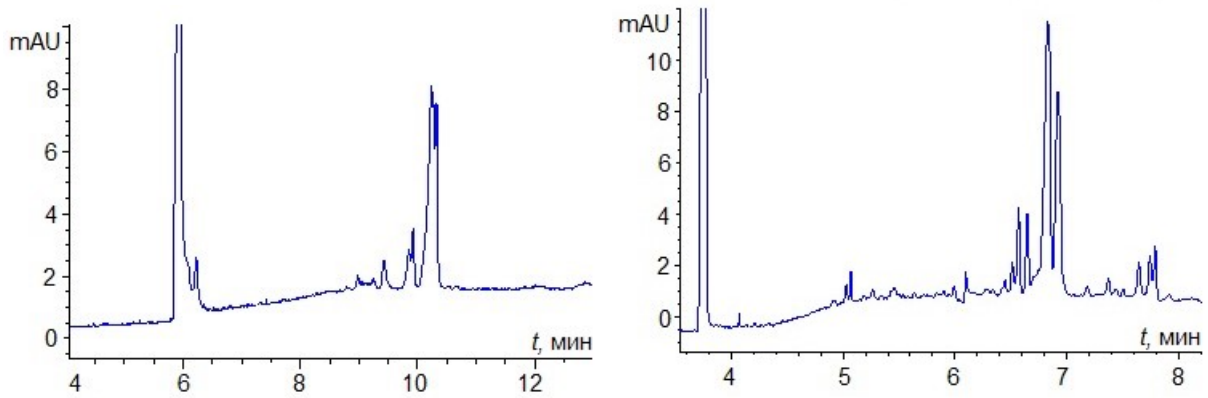


Рисунок 17 – Электрофореграммы раствора растворимого кофе «Индийский» производства «Москофе», полученные с применением различных буферных растворов: 1– фосфатного (рН 7.0, 40 мМ) и 2 – боратного (рН 9.2, 40 мМ)

При введении разбавленной пробы в течение 90 с возрастает количество анионов НК в капилляре по сравнению со временем ввода 6 с (КЗЭ), а последующее наложение отрицательного напряжения  $U_{обр}$  на входной конец капилляра приводит к обращению электроосмотического потока, что обеспечивает удаление матрицы из системы и концентрирование НК. В этих условиях наблюдается увеличение АС примерно в 7 раз.

Установлено, что наилучшее разрешение ( $R > 2$ ) достигается в буферном растворе с концентрацией 70 мМ и рН 9.0 (рисунок 18). Дальнейшее увеличение его концентрации нецелесообразно, т.к. наблюдается увеличение шума базовой линии.

Установлено, что увеличение  $U$  от +20 до +30 кВ не приводит к существенному изменению значений параметра разрешения и площади пика НК, однако сокращает время миграции НК на 3 минуты, что послужило решающим фактором при выборе оптимального значения напряжения +30 кВ.

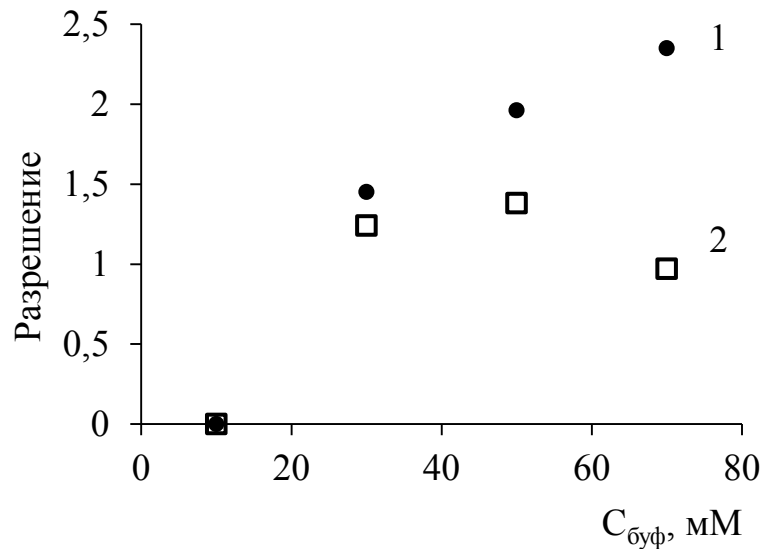


Рисунок 18 – Зависимости разрешения пиков НК и компонента пробы от концентрации буферного раствора при pH 9.0 (1) и 9.5 (2)

На втором этапе, при оптимизации условий *on-line* концентрирования НК, изучено влияние времени ввода пробы  $t_{\text{ввод}}$  и напряжения обращения полярности  $U_{\text{обр}}$  на время миграции НК и величину площади ее пика. Предварительно рассмотрено влияние времени обращения на величину формируемого сигнала при одновременном контроле силы тока ( $I$ ) в системе. Окончание процессов удаления матрицы и концентрирования аналита контролируется достижением значения  $I/I_0$  величины 85-99 % (где  $I_0$  – значения тока в капилляре, полностью заполненном рабочим буфером). Для фиксированных параметров  $t_{\text{ввод}} = 500$  с и  $U_{\text{обр}} = -10$  кВ эти условия достигаются при времени обращения 4.0-5.0 минут (рисунок 19).

В этом случае площадь пика НК практически не изменяется ( $\approx 2.0$  mAU·s). При уменьшении  $t_{\text{обр}}$  наблюдается неудовлетворительное разрешение пиков, а при увеличении  $t_{\text{обр}}$  – удаление аналита из капилляра.

Аналогичным образом проведен эксперимент в условиях варьирования времени ввода пробы (400, 500, 600 секунд) и напряжения обращения полярности (-5, -10, -15 кВ). Из приведенных данных видно (таблица 19), что к увеличению величины АС приводит уменьшение напряжения  $U_{\text{обр}}$  и увеличение времени ввода пробы в капилляр. Однако одновременно с этим наблюдается

увеличение времени миграции НК. Поэтому в качестве оптимальных параметров стэкинга выбраны время ввода 500 с (при 50 мбар) и напряжение обращения полярности -10 кВ (время обращения 4.5 минуты). В этих условиях площадь пика линейно возрастает при увеличении массы навески от 0.02 до 0.06 г/100 мл воды.

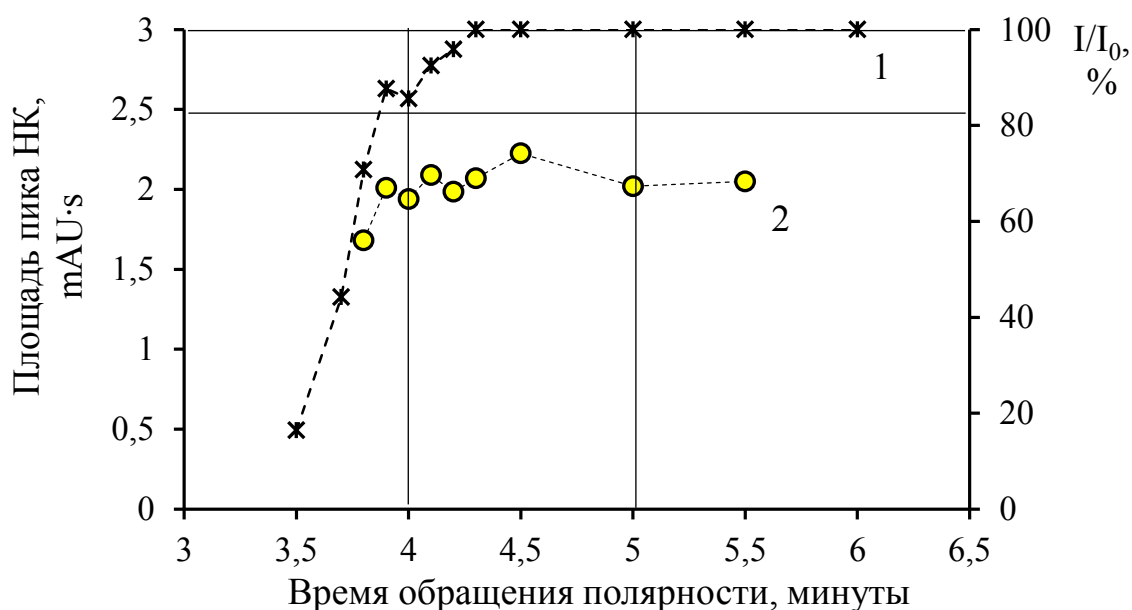


Рисунок 19 – Зависимости отношения величин  $I$  к  $I_0$  (1) и площади пика НК (2) от времени обращения полярности (проба: 0.3 г на 100 мл воды,  $t_{\text{ввод}} = 500$  с,  $U_{\text{обр}} = -10$  кВ,  $U = +30$  кВ,  $\lambda = 254$  нм)

Таблица 19– Влияние времени ввода пробы и напряжения обращения полярности на площадь пика НК

Напряжение обращения, кВ	Площадь пика НК при времени ввода ( $t_{\text{ввода}}$ , с), mAU·s		
	400	500	600
- 5	1.9	2.6	2.8
- 10	1.6	2.0	2.4
- 15	1.4	1.5	1.5

Электрофореграммы растворов растворимого кофе, полученные методом КЗЭ и КЗЭ-*LVSS*, представлены на рисунке 20. В результате применения стэкинга с большим объемом образца фактор эффективности концентрирования

НК (рассчитанный для пробы с содержанием образца 0.04 г на 100 мл воды) составляет 70.

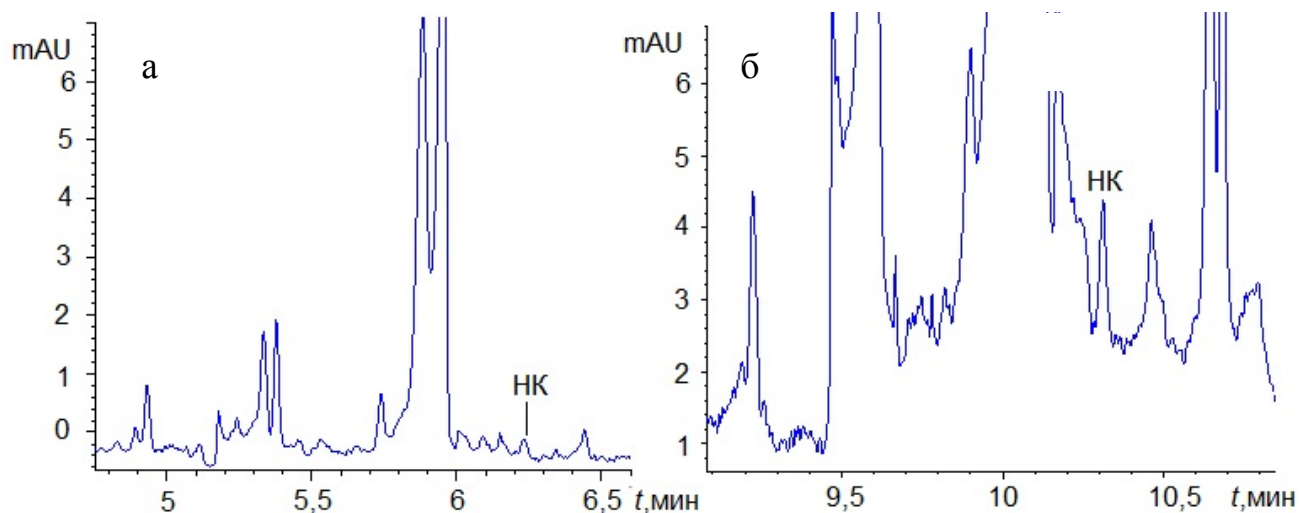


Рисунок 20 – Электрофореграммы растворов растворимого кофе «Индийский» производства «Москофе продукт» 5 г (а) и 0.04 г (б) 100 мл воды, полученные методом КЗЭ (а) и КЗЭ-*LVSS* (б)

Предлагаемая методика прошла метрологическую аттестацию [161]. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Диапазон измерений, относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности, при доверительной вероятности  $P=0,95$

Диапазон измерений, (массовая концентрация), мкг/г	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r, \%$	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), $\sigma_{Rл}, \%$	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности $P=0.95$ ), $\pm\delta, \%$
От 250 до 2500 включ.	4	7	14

### 3.4.2 Определение никотиновой кислоты в различных коммерческих образцах растворимого кофе

Разработанная методика определения никотиновой кислоты методом КЗЭ-*LVSS* апробирована на различных образцах растворимого кофе. Установлено (таблица 21), что содержание НК в образцах варьируются в диапазоне 250-750 мкг/г [162].

Таблица 21 – Содержания никотиновой кислоты в некоторых образцах растворимого кофе

№ п/п	Образец	Содержание, мг/г
1	Московская кофейня на паяхъ. Арабика	250 ± 35
2	Москофе продукт. Индийский	407 ± 57
3	Якобс Монарх	413 ± 58
4	Чибо Голд Селекшн	414 ± 58
5	Чибо Эксклюзив	432 ± 61
6	Черная карта Голд	512 ± 72
7	Жардин Колумбия Меделлин	512 ± 72
8	Жокей Триумф	547 ± 77
9	Жардин Кения Килиманджаро	561 ± 79
10	Максвелл Хаус	571 ± 80
11	Migel Classic. Гранулированный	568 ± 79
12	Fresco Arabica Solo	751 ± 105

Отмечено, что в образце «Fresco Arabica Solo» с маркировкой «темная обжарка» концентрация НК примерно в 1.5 раза больше по сравнению с другими образцами. Это, вероятно, обусловлено образованием никотиновой кислоты на высокотемпературных этапах производства растворимого кофе.

### 3.5 Определение суммарных показателей, характеризующих качество растворимого кофе

О качестве готового продукта можно судить как по содержанию в нем индивидуальных соединений, так и по интегральным показателям. С точки зрения оценки качества растворимого кофе важным является определение не только биологически активных компонентов в кофе, как например, полифенолов, которые могут проявлять антиоксидантную активность, а также соединений, формирующих органолептические свойства продукта – меланоидинов.

#### 3.5.1 Оценка железовосстанавливающей способности образцов растворимого кофе

Пищевая ценность растворимого кофе обусловлена содержанием в нем соединений фенольной природы. Эти компоненты обладают антиоксидантными свойствами и способны предотвращать окислительные процессы в организме человека, препятствуя развитию различных заболеваний. В растворимом кофе к антиоксидантам (АО) относят хлорогеновые, кофейную, феруловую кислоты, катехол, меланоидины и некоторые другие соединения. Для определения суммарного содержания восстановителей органической природы в продукте применен метод FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) с использованием индикаторной системы  $0.12 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ Fe (III)} - 0.20 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ } o\text{-фенантролин}$  основанный на способности антиоксидантов восстанавливать ион трехвалентного железа [163].

### 3.5.1.1 Изучение взаимодействия индивидуальных компонентов с индикаторной системой *Fe (III)* – *o*-фенантролин

Железовосстанавливающая способность пищевого продукта, как интегральный показатель, обусловлена действием широкого спектра восстановителей органической природы. Донорные свойства фенольным соединениям обеспечивают гидроксильные группы бензольного кольца. Содержания в кофе биоактивных веществ, проявляющих антиоксидантные свойства, колеблются от нескольких до сотых долей процентов (таблица 22) [148].

Таблица 22 – «Потенциальные антиоксиданты» и их содержание в растворимом кофе

Компонент кофе	Содержание, %	Источник
Хлорогеновая кислота	1.5-6.5	[68]
Кофейная кислота	0.08-0.10	[144]
Феруловая кислота	0.08-0.09	[144]
Галловая кислота	0.08-0.14	[144]
Катехин	0.06-0.08	[144]
Кофеин	1.8-4.8	[68, 59]

Необходимо отметить, что некоторые из этих соединений (таблица 22) считаются «потенциальными антиоксидантами» [148]. Так, вещества, относящиеся к группе метилксантинов – кофеин, теобромин и теофиллин, в структурах молекул которых отсутствуют донорные – ОН-группы, не вступают в реакции окисления-восстановления с индикаторными системами, содержащими окисленную форму железа (*Fe(III)*). Однако в процессе пищеварения они образуют метаболиты, проявляющие антиоксидантные свойства. Методами ORAC и ABTS подтверждены антиоксидантные свойства метилмочевых кислот, являющихся метаболитами кофеина [164].



Кроме того, антиоксидантные свойства могут проявляться в зависимости от формы, в которой соединение находится в реакционной среде. Например, наличие электроно-донорных заместителей в  $C_8$ -положении пуриновой группы обуславливает антиоксидантные свойства мочевой кислоты, находящейся в енольной форме, в то время как кето-форма такими свойствами обладать не может [165].

Таким образом, необходимо выделить круг веществ фенольной природы, входящих в состав кофе, способных вступать в реакцию с индикаторной системой  $Fe(III) - o$ -фенантролин (*o-Phen*), и охарактеризовать их железовосстанавливающую способность [148].

При изучении ЖВС индивидуальных веществ фенольной природы (кверцетин (КВ), 5-О-кофеилхинная (5-О-КХК), кофейная (КК), галловая (ГК), протокатеховая (ПКК), феруловая (ФК), ванилиновая (ВК), мочевая (МК) кислоты, катехол (КТ), тирозин (Тир), фенилаланин (Фен)) их вводили в реакцию с индикаторной системой и регистрировали аналитической сигнал (оптическую плотность), обусловленный протеканием редокс-реакции с образованием окрашенного комплекса восстановленной формы  $Fe(II)$  с *o-Phen*. В условиях проведения эксперимента градуировочные зависимости для всех исследованных веществ линейны в широком диапазоне концентраций (от 1.0 до 10 мкмоль/л) с различающимися коэффициентами чувствительности (рисунок 21).

По полученным градуировочным графикам можно определить концентрацию индивидуального АО в модельном растворе с погрешностью, не превышающей 5%. Пределы обнаружения индивидуальных АО различаются, но во всех случаях близки к 0.3 мкмоль/л [148].

Чувствительность определения разных АО снижается в ряду  $KB > GK > ПКК \approx 5-O-KXK > KK > КТ \approx МК > ФК > ВК$ . Приведенный «ряд активности антиоксидантов» согласуется с рядом, полученным ранее в работе [166] и связан со стехиометрией реакций и разной скоростью взаимодействия антиоксидантов с окислителем. Установлено, что чувствительность

определения протокатеховой, 5-*O*-КХК и кофейной кислот с применяемой индикаторной системой изменяется незначительно (0.068, 0.062 и 0.054 соответственно), но отличается от чувствительности определения галловой кислоты (0.097). ЖВС ванилиновой кислоты (3-монOMETИЛОВЫЙ эфир протокатеховой кислоты) приблизительно в 5 раз ниже, чем протокатеховой кислоты и в 7 раз ниже галловой. Аминокислоты (тирозин, фенилаланин), взаимодействующие в системах ORAC и ABTS [167], не проявили ЖВС с индикаторной системой *Fe* (III) – *o*-Phen [148].

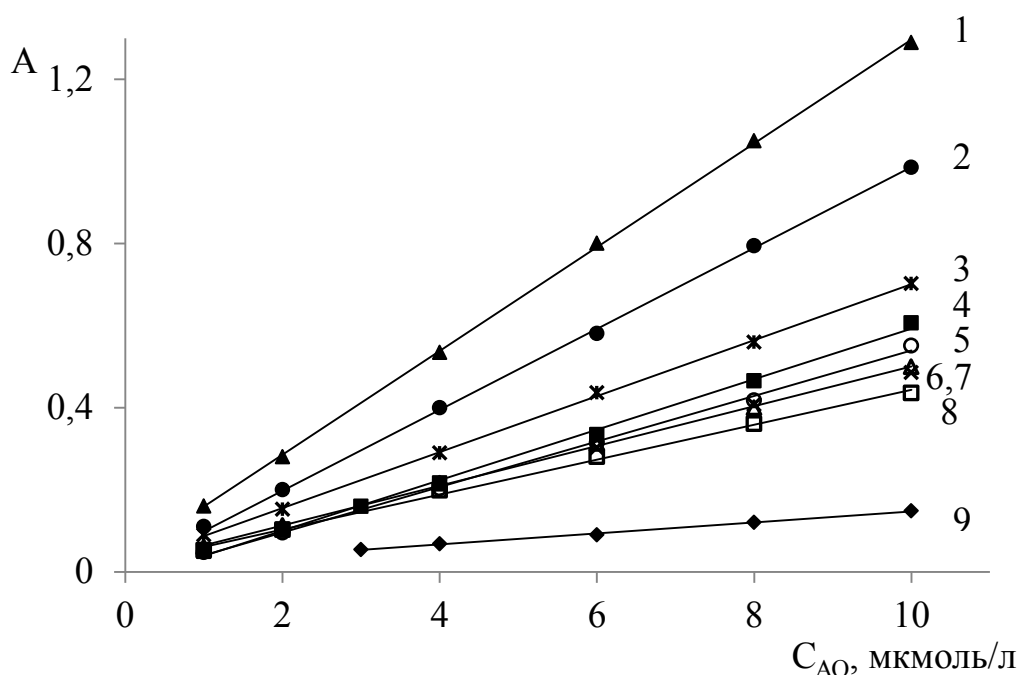


Рисунок 21 – «Веер градуировочных графиков» для определения концентраций (мкмоль/л) антиоксидантов: 1 – KB, 2 – ГК, 3 – ПКК, 4 – 5-*O*-КХК, 5 – КК, 6 – МК, 7 – КТ, 8 – ФК, 9 – BK

### 3.5.1.2 Оценка величины железовосстанавливающей способности образцов кофе

С учетом результатов, полученных для индивидуальных антиоксидантов, были проведены оптимизация условий определения и оценка ЖВС образцов молотого жареного и растворимого кофе.

Показано, что введение верификационного компонента (аликвоты пробы растворимого кофе) в растворы при построении градуировочного графика по веществу-стандарту (ГК) практически не изменяет величину тангенса угла наклона, что свидетельствует об отсутствии влияния матрицы продукта на величину ЖВС. С другой стороны, большое содержание антиоксидантов в анализируемом объекте может оказать влияние на правильность определения ЖВС, что приводит к необходимости оптимизации объема пробы, вводимой в реакцию с индикаторной системой. При оптимизации стремились максимизировать аналитический сигнал при  $\lambda_{max}$  в условиях сохранения его пропорционального возрастания при увеличении объема пробы, вводимой в реакцию с индикаторной системой, и минимизировать разброс результатов в параллельных опытах. Установлено, что при введении в реакцию от 1.0 до 5.0 мл пробы, предварительно разбавленной в соотношении (1:100), наблюдается линейное возрастание аналитического сигнала. Определение целесообразно проводить при введении 2.0-4.0 мл образца в указанном разбавлении на 100 мл реакционной смеси (рисунок 22). С учетом установленных условий разбавления исходного раствора кофе и его объема, вводимого в реакцию, оценена ЖВС образцов кофе [148].

Для обеспечения возможности проведения статистически обоснованного сравнения полученных результатов анализ проводили по следующей схеме: от каждого образца кофе отбирали три пробы, оценку ЖВС каждой из которых проводили в трех параллельных определениях. Проанализировано растворимое кофе 15 наименований разных торговых марок. Относительное стандартное отклонение единичного определения ( $S_r$ ) составляло не более 0.01; относительное стандартное отклонение для выборки – не более 0.03.

Анализ полученных усредненных величин ЖВС для кофе, представленных образцами нескольких партий продукта, показывает, что относительное отклонение среднего значения ЖВС для отдельного образца от усредненного значения ЖВС для всех образцов партий одного наименования не превышало 10 % (таблица 23) [148].

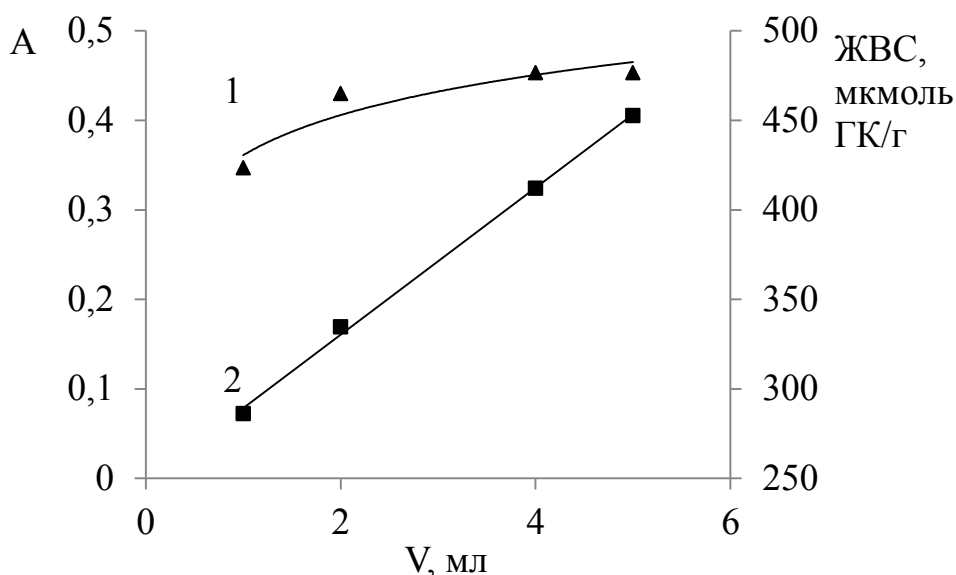


Рисунок 22 – Зависимость величины ЖВС (1) и аналитического сигнала (2) от объема пробы кофе, вводимой в реакцию

Таблица 23 – Усредненные значения ЖВС растворимого кофе некоторых наименований разных партий

Наименование	Шифр партии образца	ЖВС, мкмоль ГК/г	W, %	Усредненное значение ЖВС, мкмоль ГК/г	$ \Delta , %$
Нескафе Классик	NC 2	410	1.0	$400 \pm 24$	2.0
	NC 5	397	1.2		1.3
	NC 7	392	0.77		2.5
	NC 8	400	0.34		0.56
Нескафе Gold	NG1	335	0.75	$334 \pm 18$	0.3
	NG4	341	1.1		2.1
	NG5	327	0.25		2.1
	NG6	334	0.54		0
Якобс Монарх	JM 5	383	0.63	$389 \pm 35$	1.5
	JM 6	398	0.71		1.8
	JM 7	398	1.7		1.8
	JM 8	377	1.1		3.1
Московская кофейня на паяхъ. Суаре	МКП С 1	413	1.7	$409 \pm 32$	1.0
	МКП С 2	378	1.3		7.6
	МКП С 3	401	0.82		2.0
	МКП С 4	443	2.6		8.3

Для образцов кофе Нескафе Gold и Нескафе Classic, представленных достаточным количеством партий продукта ( $n_{\text{пт}}=9$ ;  $m_{\text{нк}}=10$ ), были получены массивы данных. Результаты проверяли на однородность по критерию Фишера и на равенство средних по t-тесту. Сравнение величин ЖВС, полученных для образцов Нескафе Gold и Нескафе Classic, показало, что различие средних статистически значимо ( $t_{\text{расч}}=8.46$ ;  $t_{\text{крит}}=1.78$  при  $\alpha =0.05$ ). Принимая во внимание, что кофе этих наименований изготовлены по различным технологиям, можно ожидать чувствительность изучаемого показателя к некоторым особенностям производства растворимого кофе [148, 168].

Значения величин ЖВС для некоторых проанализированных образцов кофе сведены в таблицу 24. Как видно, исследуемые образцы, относящиеся к разным видам продукции, имеют неперекрывающиеся диапазоны значений величины ЖВС, составляющие 360-420, 280-330 и 145-160 мкмольГК/г для растворимого, «молотого в растворимом» и молотого жареного кофе, соответственно [148].

Величина ЖВС кофе Нескафе Грин несколько отличается от величин ЖВС других образцов растворимого кофе и составляет 441 мкмоль ГК/г. Это, вероятно, связано с тем, что при производстве данного продукта используется смесь жареных и зеленых зерен и из последних могут извлекаться неразрушенные термической обработкой полифенольные соединения, вносящие дополнительный вклад в величину ЖВС. Таким образом, образцы растворимого кофе, кроме образца Нескафе Грин, имеют значения, отличающиеся от среднего в пределах 13 % [148].

Для образцов кофе Жардин Колумбия Меделлин ( $383\pm 31$ ) и Жардин Кения Килиманджаро ( $458\pm 37$ ), изготовленных из разных сортов кофе, различие средних величин ЖВС растворимого кофе существенно. В то время как для образцов кофе Колумбо, Суаре и Арабика (производитель ЗАО «Московская кофейня на паяхъ») величины ЖВС близки.

Согласно рекламе производителей кофе, продукт, изготовленный по технологии "молотый в растворимом", отличается богатым вкусом и ароматом.

Однако, как показали наши исследования, ЖВС таких образцов кофе в среднем на 25 % ниже, чем ЖВС растворимого кофе [148].

Таблица 24 – Усредненные величины ЖВС растворимого и молотого жареного кофе

Наименование кофе	ЖВС, мкмоль ГК/г	Наименование кофе	ЖВС, мкмоль ГК/г
<i>Растворимый</i>		Жардин Колумбия Меделлин*	383 ± 31
Нескафе Грин	441 ± 35	Чибо Эксклюзив	386 ± 31
Черная карта Голд*	406 ± 32	Нескафе Голд	334 ± 27
Жокей Триумф	407 ± 32	<i>"Молотый в растворимом"</i>	
Московская кофейня на паяхъ. Колумбо*	379 ± 30	ItalianoEspresso	330 ± 26
Московская кофейня на паяхъ. Суаре*	409 ± 32	Bourbon Espresso	290 ± 23
Якобс Монарх*	389 ± 30	Якобс Монарх Millicano	278 ± 21
Нескафе Монтего	421 ± 34	<i>Молотый жареный</i>	
Московская кофейня на паяхъ. Арабика*	390 ± 30	Жокей Триумф	159 ± 13
Нескафе Классик*	400 ± 32	Чибо Эксклюзив	154 ± 13
Café Crème Grande Reserva	374 ± 30	Якобс Монарх	144 ± 12

\* – приведены усредненные значения ЖВС по нескольким партиям кофе; погрешность определения приписана согласно МВИ [169].

Значение величин ЖВС образцов растворимого кофе «Якобс Монарх» и «Жокей Триумф» в среднем в 2.7 раза превышает значение этих величин для образцов молотого жареного кофе, что приблизительно соответствует максимальной степени экстрагирования водорастворимых компонентов из молотых жареных зерен (40-45 %) [7].

Таким образом, проведенные исследования показали, что ЖВС растворимого кофе является показателем чувствительным к используемому сырью (сорт кофе) и технологии изготовления и колеблется в диапазоне 360 – 420 мкмоль ГК/г [148].

### 3.5.2 Определение индекса обжарки для образцов растворимого кофе

Важным этапом в процессе производства многих пищевых продуктов является термическая обработка сырья. Так, под действием температуры кофейные зерна, имеющие кислый и терпкий вкус, древесный аромат, приобретают характерные жареному кофе органолептические свойства. Это связано с разрушением некоторых фенольных кислот, образованием ароматических веществ и коричневых полимерных соединений – меланоидинов.

Для оценки содержания меланоидинов в растворимом кофе, образующихся в результате реакции Майяра и карамелизации, использовали индекс обжарки – значение оптической плотности раствора кофе при длине волны  $\lambda=420$  нм. За счет сложной системы сопряженных связей в их структуре этих компоненты способны поглощать свет в широкой области видимого спектра. Выбор длины волны для спектрофотометрического определения индекса обжарки обусловлен отсутствием влияния других компонентов кофе (кофеин, фенольные кислоты и другие) в формируемый аналитический сигнал [96И].

Анализ различных образцов растворимого кофе показал, что индекс обжарки варьируется в диапазоне 0.95-0.175 со средним значением 0.130 (таблица 25).

Для образцов растворимого кофе одного наименования и разных партий получены одинаковые с учетом погрешности определения значения индекса обжарки, что характеризует стабильность технологических процессов производства данного продукта.

Показано, что образец «Fresco Arabica Solo» с маркировкой «темная обжарка» имеет максимальный индекс обжарки, а для образца с маркировкой «золотистая обжарка» получено одно из низких значений этого показателя. Стоит отметить, что образец «Nescafe Green», произведенный из смеси

обжаренных и зеленых зерен кофе также характеризуется не высоким по отношению к остальным образцам индексом обжарки.

Таблица 25 – Значение индекса обжарки для некоторых образцов растворимого кофе

№ п/п	Наименование образца	Шифр партии образца	Индекс обжарки
1	Fresco Arabica Solo	1	0.172 ± 0.011
2	Якобс Монарх	8	0.166 ± 0,009
3		5	0.163 ± 0.009
4		11	0.153 ± 0.008
5	Максвелл Хаус	1	0.149 ± 0.005
6	Каждый день. Порошкообразный	1	0.148 ± 0.008
7	То что надо. Гранулированный	1	0.147 ± 0.010
8	Жокей Триумф	1	0.143 ± 0.008
9		2	0.128 ± 0.007
10	Нескафе Голд		0.141 ± 0.010
11	Московская кофейня на паяхъ. Суаре	2	0.126 ± 0.003
12		3	0.123 ± 0.004
13	Migel Classic. Гранулированный	1	0.125 ± 0.002
14	Nescafe Classic	7	0.123 ± 0.007
15	Москофе продукт. Индийский	1	0.122 ± 0.003
16	Жардин Колумбия Меделлин	5	0.110 ± 0.003
17	Чибо Эксклюзив	1	0.109 ± 0.004
18		3	0.107 ± 0.006
19		2	0.099 ± 0.005
20	Московская кофейня на паяхъ. Арабика	1	0.103 ± 0.002
21	Nescafe Green	1	0.100 ± 0.002
22	Черная карта Голд	5	0.099 ± 0.003
23	Nescafe Espresso	1	0.096 ± 0.002



### 3.6 Установление взаимосвязей между потенциальными показателями качества растворимого кофе

Для разработки системы показателей качества растворимого кофе важен не только выбор веществ-маркеров качества продукта, но и установление взаимосвязей между ними, что является весьма существенным для выявления фальсификации и доказательства подлинности продукта.

Нами рассмотрены некоторые теоретические взаимосвязи между потенциальными показателями качества, получены их значения в различных коммерческих образцах растворимого кофе и на основе этих массивов данных с применением методов математической статистики подтверждены существующие взаимосвязи.

#### 3.6.1 Корреляционный анализ массива данных

На первом этапе проведен корреляционный анализ массивов данных и определена теснота (сила) связи между потенциальными показателями качества растворимого кофе (рисунок 23).

Описанный нами выше подход позволяет выявить и отобрать вещества-маркеры, чувствительные к технологическим особенностям производства кофе. Основным технологическим процессом, в наибольшей степени обуславливающим изменение содержания компонентов в растворимом кофе – является обжаривание зерен.

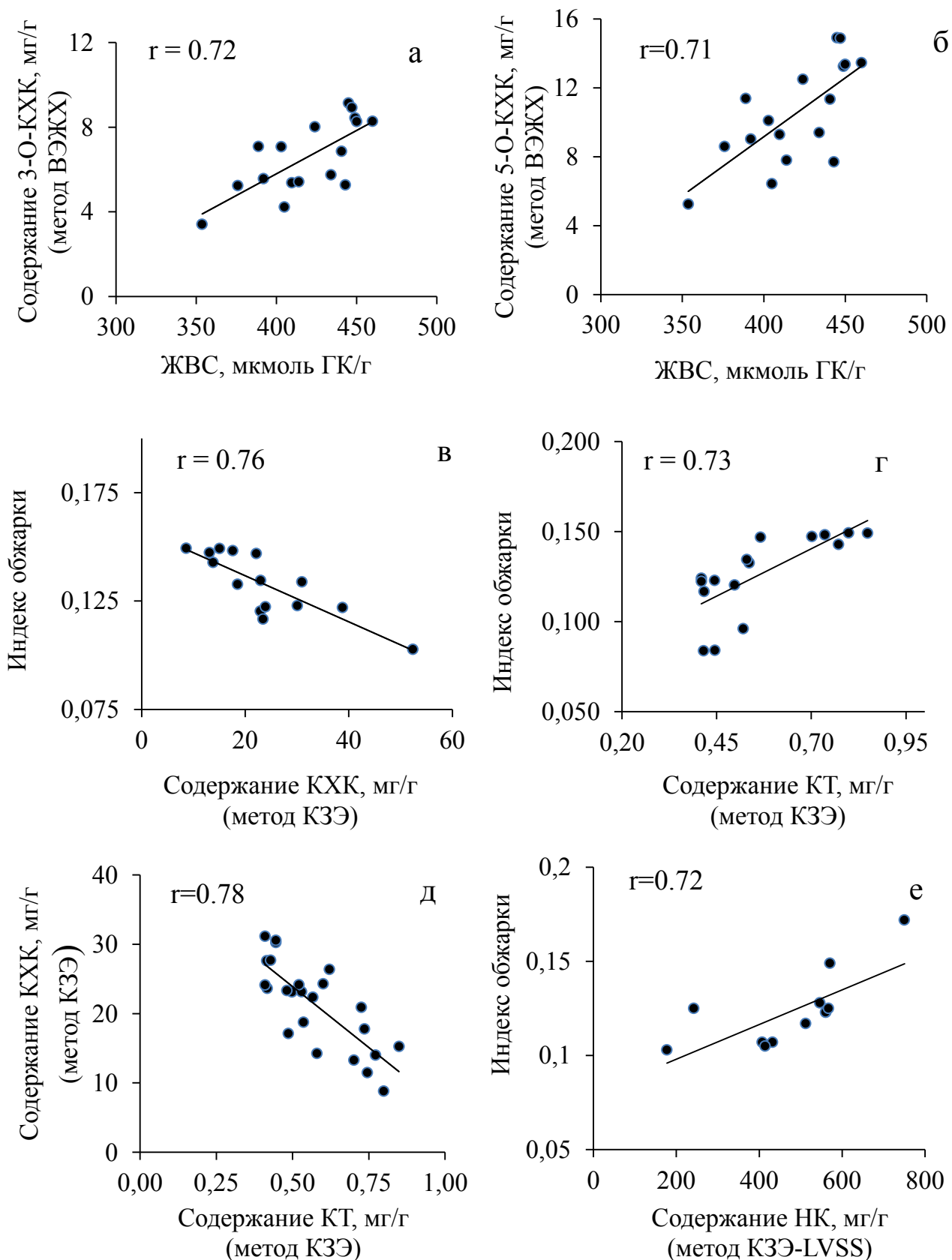


Рисунок 23– Установленные корреляционные зависимости между величиной ЖВС и содержанием КХК (а, б); индексом обжарки и содержаниями КХК (в) и КТ (г); содержаниями КХК и КТ (д); индексом обжарки и содержанием НК

Под действием высоких температур протекает ряд сложных взаимодействий между углеводами и аминосоединениями (реакция Майяра и карамелизация), в результате которых формируются коричневые полимеры – меланоидины. Одновременно с этим часть фенольных соединений, основными из которых в кофе являются кофеилхиновые кислоты (рисунок 23, а, б), подвергается деградации (рисунок 23 в). Продуктами этой реакции могут являться низкомолекулярные гидроксифенолы, основным из представителей которых является катехол (КТ) (рисунок 23, г, д). В процессе обжаривания зерен изменению подвергаются и малоустойчивые алкалоиды, например, тригонеллин, разрушающийся с образованием никотиновой кислоты (рисунок 23, е).

Таким образом, с помощью корреляционного анализа удалось установить существенные корреляции (при уровне статистической значимости  $p=0.05$ ): положительные между величиной ЖВС и содержанием 5-*O*-КХК ( $r_{\text{расч}}=0.71$ ;  $r_{\text{табл}}=0.48$ ;  $n=17$ ), 3-*O*-КХК ( $r_{\text{расч}}=0.72$ ;  $r_{\text{табл}}=0.48$ ;  $n=17$ ), индексом обжарки и содержанием НК ( $r_{\text{расч}}=0.72$ ;  $r_{\text{табл}}=0.58$ ;  $n=12$ ), КТ ( $r_{\text{расч}}=0.73$ ;  $r_{\text{табл}}=0.50$ ;  $n=16$ ); отрицательные между индексом обжарки и содержаниями КХК ( $r_{\text{расч}}=0.81$ ;  $r_{\text{табл}}=0.53$ ;  $n=14$ ); содержаниями КХК и КТ ( $r_{\text{расч}}=0.78$ ;  $r_{\text{табл}}=0.40$ ;  $n=24$ ) [147, 148, 170, 171].

### 3.6.2 Применение метода множественной линейной регрессии к массиву данных

Ввиду наличия теоретически выявленных и практически подтвержденных разнообразных взаимосвязей между предложенными показателями, рассмотрена возможность установления степени влияния содержания индивидуальных компонентов на величину индекса обжарки. Для этих целей применен метод множественной линейной регрессии.

Так как предварительная статистическая обработка массива данных подтвердила наличие мультиколлинеарности между изучаемыми показателями,

для получения уравнения множественной регрессии нами применен метод гребневой регрессии с пошаговым включением.

Данным методом установлена степень влияния содержания индивидуальных компонентов: катехола, кофеилхинных кислот или изомера 3-О-кофеилхинной кислоты, никотиновой кислоты на величину индекса обжарки и получить соответствующие уравнения:

$$\text{Индекс обжарки} = 0,084 \cdot C_{\text{КТ}} + 0,001 \cdot C_{\text{КХК}} + 0,062 \cdot C_{\text{НК}} + 0,037$$

$$\text{Индекс обжарки} = 0,108 \cdot C_{\text{КТ}} + 0,003 \cdot C_{\text{3-О-КХК}} + 0,052$$

Содержание кофеина в растворимом кофе, как признанный показатель качества этого продукта, является связующим звеном между существующей и разрабатываемой системами оценок качества кофе, поскольку значение его содержания подтверждает качество анализируемого продукта.

Таким образом, предложенные взаимосвязанные показатели: содержание КХК, КТ, НК, ЖВС и индекс обжарки – могут лечь в основу новой, наиболее чувствительной к технологическим особенностям производства системы оценки качества растворимого кофе.

## ВЫВОДЫ

1. Предложен методический подход к отбору и выявлению веществ-маркеров качества растворимого кофе, базирующийся на оценке изменения характеристик кофе при переходе от сырья к готовому продукту с учетом физико-химических свойств компонентов и влияния факторов технологического процесса, приводящих к этим изменениям. Получены данные о качественном и количественном составе РК, выявлены вещества-маркеры, содержания которых являются показателями качества РК: кофеилхинные кислоты (КХК), в частности 5-О-КХКХ, 3-О-КХК, кофеин, катехол, никотиновая кислота.

2. Изучен качественный состав растворимого кофе методом ВЭЖХ-УФ-МС. Показано, что к мажорным компонентам кофе относятся кофеин, изомеры кофеилхинные и ферулоилхинные кислоты, а к минорным – некоторые изомеры КХК, дикофеилхинные кислоты, лактоны хлорогеновых кислот, смешанные кофеил-ферулоилхинные кислоты, кофеил-триптофан. Определены содержания 5-О-КХКХ, 3-О-КХК и кофеина в кофе.

3. Показана возможность использования данных ВЭЖХ-УФ-хроматограмм для классификации образцов растворимого кофе по их происхождению. На основе полученных данных о соотношении площадей некоторых характеристических пиков, на примере растворимого кофе Арабика, создан «визуальный образ» исследуемого продукта, позволяющий выявить образцы растворимого кофе с истекшим сроком годности.

4. Показана возможность экспрессного определения кофеилхинных кислот одновременно с катехолом в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза. Доказано, что суммарное содержание КХК, определяемое по разработанной методике, соответствует сумме содержаний ее изомеров. Обоснована «технологическая» природа катехола в продукте.

5. Показано, что определение никотиновой кислоты методом КЗЭ-УФ с применением процедуры *on-line* концентрирования позволяет достичь фактора

эффективности концентрирования аналита 70. Разработана «Методика (метод) измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца» (МУ 08-47/411), позволяющая проводить определение в диапазоне 250-2500 мкг/г. Метрологические характеристики методики:  $\sigma_r = 4 \%$ ,  $\sigma_{RЛ} = 7 \%$ ,  $\pm\delta = 14 \%$ .

6. Исследованы взаимосвязи между выбранными веществами-маркерами, и суммарными показателями, характеризующими качество растворимого кофе. Установлены (при уровне статистической значимости  $p=0.05$ ) положительные корреляции между величиной ЖВС и содержанием 5-О-КХК ( $r_{расч}=0.71$ ;  $r_{табл}=0.48$ ;  $n=17$ ), ЖВС – 3-О-КХК ( $r_{расч}=0.72$ ;  $r_{табл}=0.48$ ;  $n=17$ ); индексом обжарки и содержанием НК ( $r_{расч}=0.72$ ;  $r_{табл}=0.58$ ;  $n=12$ ), индексом обжарки – КТ ( $r_{расч}=0.73$ ;  $r_{табл}=0.50$ ;  $n=16$ ), а также отрицательные корреляции между индексом обжарки и содержаниями КХК ( $r_{расч}=0.81$ ;  $r_{табл}=0.53$ ;  $n=14$ ); содержаниями КХК и КТ ( $r_{расч}=0.78$ ;  $r_{табл}=0.40$ ;  $n=24$ ).

Методом множественной линейной регрессии установлена связь между индексом обжарки кофе и содержаниями катехола, кофеилхинных и никотиновой кислот.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 3,4-диКХК – 3,4 – дикофеилхинная кислота;
- 3,4-диКХК – 3,4 – дикофеилхинная кислота;
- 3,5-диКХК – 3,5 – дикофеилхинная кислота;
- 3К,4-ФХК – 3-*O*-кофеил, 4-*O*-ферулоилхинная кислота;
- 3К,5-ФХК – 3-*O*-кофеил, 5-*O*-ферулоилхинная кислота;
- 3-*O*-КХК (3-КХК)– 3-*O*-кофеилхинная кислота;
- 3-*O*-ФХК (3-ФХК) – 3-*O*-ферулоилхинная кислота;
- 3Ф,4-КХК – 3-*O*-феруил, 4-*O*-кофеилхинная кислота;
- 3Ф,5-КХК – 3-*O*-феруил, 5-*O*-кофеилхинная кислота;
- 4К,5-ФХК – 4-*O*-кофеил, 5-*O*-ферулоилхинная кислота;
- 4-*O*-КХК (4-КХК)– 4-*O*-кофеилхинная кислота;
- 4-*O*-ФХК (4-ФХК) – 4-*O*-ферулоилхинная кислота;
- 4Ф,5-КХК – 4-*O*-феруил, 5-*O*-кофеилхинная кислота;
- 5-*O*-КХК (5-КХК) – 5-*O*-кофеилхинная кислота;
- 5-*O*-ФХК (5-ФХК) – 5-*O*-ферулоилхинная кислота;
- АО – антиоксиданты;
- АОА – антиоксидантная активность;
- БАВ – биологически активные вещества;
- ВМ – высокомолекулярный;
- ГК – галловая кислота
- ЖВС – железовосстанавливающая активность;
- ЖК – молотый жареный кофе;
- КЗЭ – капиллярный зонный электрофорез;
- КЗЭ-LVSS – капиллярный зонный электрофорез с применением стэкинга  
с большим объемом образца;
- КК – кофейная кислота;
- КТ – катехол;
- к-та – кислота;

- КрК – коричная кислота;
- КТХ – катехин;
- КуХК – кумароилхинная кислота;
- КФ – кофеин;
- КФХК – кофеил-ферулоихинная кислота;
- КХЛ – лактон кофеилхинной кислоты;
- мКрК – метоксикоричная кислота;
- МС – масс-спектрометрия;
- МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая хроматография;
- НА – никотинамид;
- НК – никотиновая кислота;
- НМ – низкомолекулярный;
- o-Phen* – *o*-фенантролин
- ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
- РК – растворимый кофе;
- р-р – раствор;
- ТБ – теобромин;
- ТР – тригонеллин;
- ТФ – теofilлин;
- ФК – феруловая кислота;
- ХГК – хлорогеновая кислота;
- ХНД – хроматография низкого давления



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeszka-Skowron, M. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee / M. Jeszka-Skowron, A. Zgoła-Grzeskowiak, T. Grzeskowiak // European Food Research and Technology. – 2015. – Vol. 240, № 1. – P. 19–31.
2. Annual Review 2016/17 // International Coffee Organization. – London, United Kingdom, 2017. – 35 p.
3. Yashin, A. Chromatographic methods for coffee analysis: a review / A. Yashin [et al.] // Journal of Food Research. – 2017. – Vol. 6, №. 4. – С. 60–82.
4. Farah, A. Coffee Constituents / A. Farah // Coffee: emerging health effects and disease prevention / ed by Yi-Fang Chu. – 2012. – ch.2. – P. 21–58.
5. Nuhu, A. A. Review Article. Bioactive micronutrients in coffee: recent analytical approaches for characterization and quantification [Электронный ресурс] / A. A. Nuhu // ISRN Nutrition. – 2014. – Vol. 2014. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/384230> (дата обращения 23.08.2018).
6. Coffee: Physiology / ed by R.J. Clarke, R. Macrae. – London: Elsevier applied science, 1988. – Vol. 3. – 373 p.
7. Блинникова, О.М. Товароведение и экспертиза вкусовых товаров: учебное пособие / О. М. Блинникова. – Мичуринск: МичГАУ, 2007. – 234 с.
8. Weldegebreal, B. Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans [Электронный ресурс] / B. Weldegebreal, M. Redi-Abshiro, B. S. Chandravanshi // Chemistry Central Journal. – 2017. – Vol. 11:126. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0356-3>. (дата обращения 23.08.2018).
9. Mehari, B. Simultaneous determination of alkaloids in green coffee beans from Ethiopia: chemometric evaluation of geographical origin / B. Mehari // Food Analytical Methods. – 2016. – Vol. 9, № 6. – P. 1627–1637.

10. Casal, S. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee / S. Casal [et al.] // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 68. – P. 481–485.
11. Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism / M.N. Clifford // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2000. – Vol. 80. – P. 1033–1043.
12. Левицкий, А.П. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология / А.П. Левицкий [и др.] // *Микробиология и биотехнология*. – 2010. – №2. – С. 6–20.
13. Пчелкин, В.П. Природные фенольные и липофильные комплексы хлорогеновой кислоты / В.П. Пчелкин // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2003. – Т. 37, № 1. – С. 27–29.
14. Гостищев, И.А. Каротиноиды, хлорогеновые кислоты и другие природные соединения плодов рябины / И.А. Гостищев [и др.] // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: естественные науки*. – 2010. – Т. 10, № 3. – С. 83–92.
15. Clifford, M.N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids / M.N. Clifford [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – P. 2900–2911.
16. Morishita, H. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry / H. Morishita [et al.] // *Journal of Chromatography*. – 1984. – Vol. 315. – P. 253–260.
17. Clifford, M.N. Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans / M.N. Clifford [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 12. – P. 4095–4101.
18. Clifford, M.N. Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-

dimethoxycinnamoylquinic acids / M.N. Clifford [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 6. – P. 1957–1969.

19. Perrone, D. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars / D. Perrone [et al.] // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 106. – P. 859–867.

20. Stalmach, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee / A. Stalmach [et al.] // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 18, №.1. – P. 253–262.

21. Farah, A. Phenolic compounds in coffee / A. Farah, C. M. Donangelo // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 18, №.1. – P. 12–25.

22. Trugo, L.C. Chlorogenic acid composition of instant coffees / L.C. Trugo, R. Macrae // *Analyst*. – 1984. – Vol. 109. – P.263–266.

23. Kremr, D. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review / D. Kremr // *Quimica Nova*. – 2016. – Vol. 39, № 4. – P. 530–536.

24. Duarte, G.S. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods / G.S. Duarte, A.A. Pereira, A. Farah // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 118. – P. 851–855.

25. Mills, C.E. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee / C.E. Mills [et al.] // *Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 141, №15. – P. 3335–3340.

26. Nomenclature of Cyclitols. Recommendations, 1973 // *Biochemical Journal*. – 1973. – Vol. 153. – P. 23–31.

27. Andrade, P.B. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of seven hydroxy-cinnamic acids in green coffee / P.B. Andrade [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. – 1997. – Vol. 20, №13. – P. 2023–2030.

28. Casal, S. Roast effects on coffee amino acid enantiomers / S. Casal [et al.] // *Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 89. – P. 333–340.

29. Murkovic, M. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee / M. Murkovic, K. Derler // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 2006. – Vol. 69. – P. 25–32.
30. Castillo, M.D. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews / M.D. Castillo [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50. – P. 3698–3703.
31. Vignoli, J.A. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material / J.A. Vignoli [at al.] // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 124. – P. 863–868.
32. Vignoli, J.A. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees / J.A. Vignoli [et al.] // *Food Research International*. – 2014. – Vol. 61. – P. 279–285.
33. Ludwig, I. A. Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method / I. A. Ludwig [et al.] // *Food Research International*. – 2012. – Vol. 48. – P. 57–64.
34. Bravo, J. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds / J. Bravo [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 60. – P. 12565–12573.
35. Nicolìa, M. C. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage / M.C. Nicolìa [et al.] // *Cancer Letters*. – 1997. – Vol. 114. – P. 71–74.
36. Perez-Martinez, M. Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews / M. Perez-Martinez [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58. – P. 2958–2965.
37. Duarte, S.M. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews / S.M. Duarte [et al.] // *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. – 2005. – Vol. 25, № 2. – P. 236–242.
38. Daglia, M. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee / M. Daglia [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48. – P. 1449–1454.

39. Lopez-Galilea, I. Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee / I. Lopez-Galilea [et al.] // *Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 94. – P. 75–80.
40. Степанов, Д. Е. Влияние условий обжарки зерен на качество кофе / Д.Е. Степанов, И.И. Татарченко // *Известия вузов. Пищевая технология*. – 2009. – №4. – С. 121–122.
41. Fuster, M.D. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee / M.D. Fuster [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48. – P. 5600–5603.
42. Pastoriza, S. Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems / S. Pastoriza [et al.] // *LWT - Food Science and Technology*. – 2012. – Vol. 45. – P. 198–203.
43. Bennat, C. HPLC analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee / C. Bennat [et al.] // *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. – 1994. – Vol. 199. – P. 17–21.
44. Muller, C. Quantitative precursor studies on di- and trihydroxybenzene formation during coffee roasting using “in bean” model experiments and stable isotope dilution analysis / C. Muller, R. Lang, T. Hofmann // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 26. – P. 10086–10091.
45. Moon, J.K. Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid / J.K. Moon, T. Shibamoto // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58, № 9. – P. 5465–5470.
46. Delgado-Andrade, C. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews / C. Delgado-Andrade, F.J. Morales // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, № 5. – P. 1403–1407.
47. Delgado-Andrade, C. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods / C. Delgado-Andrade [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, № 20. – P. 7832–7836.

48. Borrelli, R.C. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidinset // R.C. Borrelli [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50, № 22. – P. 6527–6533.

49. Sanchez-Gonzalez, I. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter) / I. Sanchez-Gonzalez [et al.] // *Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 90. – P.133–139.

50. Пат. 2375885 Российская Федерация, МПК А23F5/18. Стеклообразные матрицы для стабилизации кофейного аромата / Греч К., Креенбюль К., Шонман Й.Х., Уббинк Й.Б.; заявитель и патентообладатель Нестек С.А. – № 2007109819/13, заявл. 08.07.2005; опубл. 20.12.2009. – 20 с.: ил.

51. Patent 995913 US; International Class: A23F 5/26 Enzyme-Assisted Soluble Coffee Production / Silver R. S. [et al.]; assignee Kraft Foods Global Brands LLC. – № PTC/US2006/026288, filed: 07.07.2006, date: 02.09.2008. – 17 p.

52. Patent 814457 US; International Class: A23F 5/14 Beverages with enhanced flavors and aromas / Robinson U.A., Da Cruz J.M. – 12973782; assignee Starbucks Corporation. – № USOO8524306B2, filing date 28.12.2012, date: 24.04.2012 – 20с.

53. Ludwig, I. A. Coffee: biochemistry and potential impact on health / I.A. Ludwig [et al.] // *Food and Function*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1695–1717.

54. Grosso, G. Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review / G. Grosso [et al.] // *Annual Review of Nutrition*. – 2017. – Vol. 37. – P. 131–156.

55. Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists/ ed by H. A. Lepper. – 1945. – 6th ed. – Vol. 18.14. – p. 217.

56. Ishler, N.H. Rapid Spectrophotometric Determination of Caffeine / N.H. Ishler, T.P. Finucane, E. Borker // *Analytical Chemistry*. – 1948. – Vol. 20, № 12. – P. 1162–1166.

57. Salinas-Vargas, M.E. On-line solid–phase extraction using a C18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green

and roasted coffee beans / M.E. Salinas-Vargas, M.P. Canizares-Macias // *Food Chemistry*. – 2014. – Vol. 147. – P. 182–188.

58. Russo, M. Use of an online extraction technique coupled to liquid chromatography for determination of caffeine in coffee, tea, and cocoa [Электронный ресурс] / M. Russo [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2018. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1247-5> (дата обращения 23.08.2018).

59. Gopinandhan, T. N. A comparative study on caffeine estimation in coffee samples by different methods / T. N. Gopinandhan [et al.] // *International journal of current research in chemistry and pharmaceutical sciences*. – 2014. – Vol. 1, № 8. – P. 4–8.

60. Bouhsain, Z. Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in coffee / Z. Bouhsain [et al.] // *Vibrational Spectroscopy*. – 1999. – Vol. 21. – P. 143–150.

61. Amare, M. Polymer modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee / *Talanta*. – 2012. – Vol. 93. – P. 122–128.

62. Amare, M. Electrochemical determination of caffeine content in ethiopian coffee samples using lignin modified glassy carbon electrode [Электронный ресурс] / M. Amare, S. Aklog // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2017. – Vol. 2017. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1155/2017/3979068> (дата обращения 23.08.2018).

63. do Lago, C.L. Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and separation by CZE / C.L. do Lago, T. Nogueira // *Electrophoresis*. – 2007. – Vol. 28. – P. 3570–3574.

64. Li, M. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets / M. Li [et al.] // *Journal of Separation Science*. – 2009. – Vol. 32. – P. 267 – 274.

65. Maeso, N. Capillary electrophoresis for caffeine and pyroglutamate determination in coffees. Study of the in vivo effect on learning and locomotor

activity in mice / N. Maeso [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2006. – Vol. 4. – P. 1095–1100.

66. Fujioka, K. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees / K. Fujioka, T. Shibamoto // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 106. – P. 217–221.

67. Santos, J.R. Development of a chromatographic low pressure flow injection system: Application to the analysis of methylxanthines in coffee / J.R. Santos, A.O.S.S. Rangel // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 715. – P. 57–63.

68. Moreira, D.P. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages / D.P. Moreira [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53, №5. – P. 1399–1402.

69. Ferreira, B.L. Exploring the Versatility of an Atomic Absorption Spectrometer: Application to Direct Molecular Determination of Caffeine and Propranolol / B.L. Ferreira, L. Vital, E.S. Vital // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2016. – Vol. 27, № 4. – P. 794–798.

70. Rejane, M. Fully-automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of caffeine in coffee beverages / M. Rejane [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 212. – P. 759–767.

71. Sereshti, H. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages / H. Sereshti, S. Samadi // *Food Chemistry*. – 2014. – V. 158. – P. 8–13.

72. Arai, K. Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee samples by HPLC using an acidic mobile phase containing octanesulfonate / K. Arai [et al.] // *Analytical Sciences*. – 2015. – Vol. 31. – P. 831–835.

73. Jeon, J.S. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions / J.S. Jeon [et al.] // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2017. – Vol. 1064. – P. 115–123.



74. Хасанов, В.В. Новый способ определения кофеина / В.В. Хасанов [и др.] // Журнал прикладной химии. – 2005. – Т. 78, №3. – С. 1451–1454.
75. Ramalakshmi, K. Antioxidant potential of low-grade coffee beans / K. Ramalakshmi, I.R. Kubra, L.G.M. Rao // Food Research International. – 2008. – Vol. 41. – P. 96–103.
76. ГОСТ Р 51182-98 Кофепродукты. Методика выполнения измерений массовой доли кофеина. – Введ. 1998 – 07 – 01 – М.: ИПК Издательство стандартов, 2001 – 8 с.
77. ГОСТ ISO 4052-2013 Кофе. Определение содержания кофеина. Контрольный метод. – Введ. 2015 – 07– 01 – М.: Стандартиформ, 2015 – 14 с.
78. Пат. 2404428 Российская Федерация; МПК G01N33/02. Способ определения кофеина в чае и кофе / Турусова Е.В., Додин Е.И., Насакин О.Е., Лукин П.М.; заявитель и патентообладатели ФГОУ ВПО Чувашский гос. ун-т им. И. Н. Ульянова. – № 2009116079/10; заявл. 27.04.2009; опубл. 20.11.2010. – 8 с.
79. Znao, Y. Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis / Znao Y., Lunte C.E. // Journal of Chromatography B. – 1977. – Vol. 688. – P. 265–274.
80. Shrivastava, K. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry / Shrivastava K., Wu H.F. // Journal of Chromatography A. – 2007. – Vol. 1170, № 1-2. – P. 9–14.
81. Bispo, N.S. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography / Bispo N.S. [et al.] // Journal of Chromatographic Science. – 2002. – Vol. 40. – P. 45–48.
82. Воронцова, О.С. Сравнительный анализ методов определения кофеина в кофе, растворимых кофейных и энергетических напитках / О.С. Воронцова // Здоровье и окружающая среда. – 2015. – Т. 2, № 25. – С. 193–196.

83. Caprioli, G. Quantification of caffeine, trigonelline and nicotinic acid in espresso coffee: the influence of espresso machines and coffee cultivars / G. Caprioli [et al.] // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 2014. – Vol. 65, № 4. – P. 465–469.
84. Manach, C. Polyphenols: food sources and bioavailability/ C. Manach [et al.] // *The American journal of clinical nutrition*. – 2004. – Vol. – 79, № 5. – P. 727–747.
85. Hoelzl, C. Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules / C. Hoelzl [et al.] // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2010. – Vol. 54. – P. 1722–1733.
86. Moores, R.G. Determination of chlorogenic acid in coffee / R.G. Moores, D.L. McDermott, T.R. Wood // *Analytical Chemistry*. – 1948. – Vol. 20, № 7. – P. 620–624.
87. Deshpande, S. N. Effects of roasting temperatures and gamma irradiation on the content of chlorogenic acid, caffeic acid and soluble carbohydrates of coffee / S. N. Deshpande, A. A. Aguilar // *International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. – 1975. – Vol. 26. – P. 656-661.
88. Belay, A. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy / A. Belay, A.V. Gholap // *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. – 2009. – Vol. 3, № 11. – P. 234–240.
89. de Carvalho, M.L. Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper (II) complex / M.L. de Carvalho [et al.] // *Talanta*. – 2008. – Vol. 77. – P. 394–399.
90. Santos, W.J.R. Novel electrochemical sensor for the selective recognition of chlorogenic acid / W.J.R. Santos [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. –2011. – Vol. 695, № 1-2. – P. 44–50.
91. Moccelini, S. K. Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid / S. K. Moccelini, A. Spinelli, I. C. Vieira // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2008. – Vol. 43. – P. 381–387.

92. Fernandes, S. C. Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase / S.C. Fernandes [et al.] // *Talanta*. – 2009. – Vol. 79, № 2. – P. 222–228.

93. Araujo, T. A. Influence of the surfactant bromide of cetyltrimethyl ammonium in the determination of chlorogenic acid in instant coffee and mate tea samples / T.A. Araujo [et al.] // *Colloids and Surfaces B*. – 2009. – Vol. 73, № 2 – P. 408–414.

94. Wei, F. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy / F. Wie [et al.] // *Magnetic Resonance Chemistry* – 2010. – Vol. 48. – P. 857–865.

95. Zhu, J. Low-temperature bath/high-conductivity zone/stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of phenolic acids in coffee drink / J. Zhu [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2013. – Vol. 1212. – P.137–144.

96. Risso, E.M. Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography / E.M. Risso [et al.] // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 105. – P. 1578–1582.

97. Craig, A.P. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts / A.P. Craig [et al.] // *Talanta*. – 2016. – Vol. 154. – P. 481–485.

98. Zanin, R. C. Good cup quality roasted coffees show wide variation in chlorogenic acids content / R. C. Zanin phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography / E.M. Risso [et al.] // *LWT - Food Science and Technology*. – 2016. – Vol. 74. – P. 480–483.

99. Maria, C. A. B. De Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography / C. A. B. De Maria, L. C. Trugo, R. F. A. Moreira // *Food Chemistry*. – 1995. – Vol. 52. – P. 447–449.

100. Clifford, M.N. Chlorogenic acids – their complex nature and routine determination in coffee beans / M.N. Clifford // *Food Chemistry*. – 1979. – Vol. 4, № 1. – P. 63–71.

101. Liang, N. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities / N. Liang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 213. – P. 251–259.

102. Marcia, N. Chlorogenic acid isomers, caffeine and trigonellin contents in Brazilian instant coffee / N. Marcia, L.C. Trugo // *Food Science and Technology*. – 2003. – Vol. 23, № 2. – P. 296–299.

103. Belguidoum, K. HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market / K. Belguidoum [et al.] // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. – 2014. – Vol. 45, №4. – P. 1314–1320.

104. Monteiro, M.C. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops / M.C. Monteiro, A. Farah // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 134. – P. 611–614.

105. Farah, A. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees / A. Farah [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 2. – P. 374–381.

106. O’Driscoll, D.J. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry / D.J. O’Driscoll [et al.] // *Methods X*. – 2014. – Vol. 1. – P. 264–268.

107. Тищенко, Е.А. Идентификация и хроматографическое определение биоактивных компонентов в образцах растворимого кофе / Е.А. Тищенко [и др.] // *Аналитика и контроль*. – 2017. – Т. 21, № 3. – С. 251-261.

108. Corso, M.P. Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids / M. P. Corso, J. A. Vignoli, M. de T. Benassi // *Food Science and Technology*. – 2016. – Vol. 53, № 3. – P. 1380–1388.

109. Rostagno, M.A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column / M.A. Rostagno [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 685. – P. 204–211.

110. Gomez-Ruiz, J.A. Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation / J.A. Gomez-Ruiz, J.M. Ames, D. S. Leake // *European Food Research and Technology*. – 2008. – Vol. 227. – P. 1017–1024.

111. Gant, A. Validated HPLC-Diode array detector method for simultaneous evaluation of six quality markers in coffee / A. Gant [et al.] // *Journal of AOAC International*. – 2015. – Vol. 98, № 1. – P. 98-102.

112. Farah, A. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee / A. Farah [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53. – P. 1505–1513.

113. Cammerer, B. Antioxidant activity of coffee brews / B. Cammerer, L.W. Kroh // *European Food Research and Technology*. – 2006. – Vol. 223. – P. 469–474.

114. Wang, H.-Y. Review. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity / H.-Y. Wang, H. Qian, W.-R. Yao // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 128 – P. 573–584.

115. Cammerer, B. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins / B. Cammerer, L.W. Kroh // *Food Chemistry*. – 1995. – Vol. 53. – P. 55-59.

116. Charurin, P. Antioxidant activity of coffee model systems / P. Charurin, J.M. Ames, M. D. del Castillo // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50, № 13. – P. 3751–3756.

117. Bravo, J. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee / J. Bravo [et al.] // *Food Research International*. – 2013. – Vol. 50. – P. 610–616.

118. Rodrigues, N.P. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MS<sup>n</sup> / N.P. Rodrigues, N. Bragagnolo // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2013. – Vol. 32. – P. 105–115.

119. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия: учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 416 с.

120. Олейникова, И.Ю. Никотиновая кислота как объект фармацевтической химии / И.Ю. Олейникова, А.С. Шинкаренко // Молодой ученый. – 2017. – № 26. – С. 62–64.

121. Norris, F. W. Nicotinic acid in the materials and process of brewing / F.W. Norris // Journal of the Institute of Brewing. – 1945. – Vol. 51. – P. 177–184.

122. Ward, C.M. The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography / C.M. Ward, V.C. Trenerry // Food Chemistry. – 1997. – Vol. 60, № 4. – P. 667–674.

123. Windahl, K.L. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction / K.L. Windahl, V. C. Trenerry, C.M. Ward // Food Chemistry. – 1998. – Vol. 65. – P. 263–270.

124. Liu, H.X. Determination of vitamin C and nicotinic acid content in black bean by capillary zone electrophoresis / H.X. Liu [et al.] // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2014. – Vol. 6, № 5. – P. 1327–1330.

125. Trenerry, V.C. The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages / V.C. Trenerry // Electrophoresis. – 2001. – Vol. 22. – P. 1468–1478.

126. Casal, S. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee / S. Casal, M.B. Oliveira, M. A. Ferreira // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. – 1998. – Vol. 21, № 20. – P. 3187–3195.

127. Lang, R. Quantitative investigation of trigonelline, nicotinic acid, and nicotinamide in foods, urine, and plasma by means of LC-MS/MS and stable isotope dilution analysis / R. Lang [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56. – P. 11114–11121.

128. Hughes, E.B. The nicotinic acid content of coffee / E. B. Hughes, R.F. Smith // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 1946. – Vol. 65. – P. 284–286.

129. Perrone, D. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry / D. Perrone, C.M. Donangelo, A. Farah // *Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 110. – P. 1030–1035.

130. Liu, H. Determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in Yunnan Arabica Coffee by microwave-assisted extraction and HPLC with two columns in Series / H. Liu [et al.] // *Journal of AOAC International*. – 2012. – Vol. 95, № 4. – P. 1138–1141.

131. Taguchi, H. Trigonelline content in coffee beans and the thermal conversion of trigonelline into nicotinic acid during the roasting of coffee beans / H. Taguchi, M. Sakaguchi, Y. Shimabayashi // *Agric. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 49, № 12. – P. 3467–3471.

132. Parham, H. Ultrasonic-assisted solid-phase extraction pre-concentration and determination of nicotinamide and nicotinic acid by high-performance liquid chromatography using anthracite / H. Parham, B. Zargar, F. Khoshnam // *Food Analytical Methods*. – 2015. – Vol. 8, № 9. – P. 2235–2242.

133. Zeijlemaker, F.G.J. The metabolism of nicotinic acid in the green pea and its connection with trigonelline / F.G.J. Zeijlemaker // *Acta Botanica Neerlandica*. – 1953. – Vol. 2, № 2. – P. 123–143.

134. Snell, E. C. A microbiological method for the determination of nicotinic acid / E.C. Snell, L. D. Wright // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1941. – Vol. 6. – P. 139.

135. AOAC 944.13, 5.2.04 Niacin and niacinamide in vitamin preparations // *Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed.*, AOAC International. – Gaithersburg, Md.

136. Bressani, R. Niacin content of coffee in central America / R. Bressani, D.A. Navarrete // *Journal of Food Science*. – 1959. – Vol. 24. – P. 344–351.

137. Blake, C.J. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review / C.J. Blake // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 389. – P. 63–76.

138. Lahely, S. Fluorimetric determination of niacin in foods by high performance liquid chromatography with post-column derivatization / S. Lahely, M. Bergaentzle, C. Hasselmann // *Food Chemistry*. – 1999. – Vol. 65. – P. 129–133.

139. ГОСТ 29140-91 Мука, хлеб и хлебобулочные изделия пшеничные витаминизированные. Метод определения витамина РР (никотиновой кислоты). – Введ. 1991 – 11 – 29 – М.: Стандартинформ, 2007 – 6 с.

140. ГОСТ Р 50479-93 Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения содержания витамина РР. – Введ. 1994 – 01 – 01 – М.: Стандартинформ, 2010 – 8 с.

141. Ward, C.M. The application of capillary electrophoresis to the determination of total niacin in concentrated yeast spreads / C.M. Ward, V.C. Trenerry, I. Pant // *Food Chemistry*. – 1997. – Vol. 58, № 3. – P. 185–192.

142. Juraja, S.M. Asia Pacific food analysis network (APFAN) training exercise: the determination of niacin in cereals by alkaline extraction and high performance liquid chromatography / S. M. Juraja [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2003. – Vol. 16. – P. 93–106.

143. Diaz-Pollan, C. Niacin determination in legumes by capillary electrophoresis (CE). Comparison with high performance liquid chromatography (HPLC) / C. Diaz-Pollan, C. Vidal-Valverde // *Journal of High Resolution Chromatography*. – 1998. – Vol. 21. – P. 81–86.

144. Casal, S. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content / S. Casal [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – Vol. 48, № 8. – P. 3420–3424.

145. Barton-Wright, E.C. The microbiological assay of nicotinic acid in cereals and other products / E.C. Barton-Wright // *Biochemical Journal*. – 1944. – Vol. 38. – P. 314.

146. Teply, L. J. Studies on the nicotinic acid content of coffee / L.J. Teply, W. A. Krehl, C.A. Elvehjem // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1945. – Vol. 6. – P. 139.



147. Тищенко, Е.А. Электрофоретическое определение соединений фенольной природы в растворимом кофе / Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, О.Б. Воронова // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22, № 2. – С. 197–205.
148. Цюпко, Т.Г. Спектрофотометрическая оценка железовосстанавливающей способности растворимого кофе / Т.Г. Цюпко, Е.А. Тищенко, О.Б. Воронова // Аналитика и контроль. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 320–329.
149. Balasundram, N. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses / N. Balasundram [et al.] // Food Chemistry. – 2006. – Vol. 99. – P. 19–203.
150. Schrader, K. Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee / K. Schrader [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1996. – Vol. 71. – P. 392–398.
151. Clifford, M.N. The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans / M.N. Clifford, S. Knight // Food Chemistry. – 2004. – Vol. 87. – P. 457–463.
152. ГОСТ 32776-2014 Кофе растворимый. Общие технические условия. – Введ. 2016 – 01– 01 – М.: Стандартинформ, 2014 – 16 с.
153. Тищенко, Е.А. Создание визуального профиля растворимого кофе по данным ВЭЖХ-анализа / Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, Б.А. Ачмиз, К.С. Гуцаева, В.В. Милевская // Третий съезд аналитиков России: тез. докладов. – Москва, 2017. – С. 114.
154. John, P. Polyol complexes and tructure of the benzenboronate ion / P. John [et al.] // Structure of benzenboronate ion. – 1959. – Vol. 24. – P. 769–774.
155. Vaheer, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis / M. Vaheer, M. Koel // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 990. – P. 225–230.
156. Сычев, К. Анализ полифенольных соединений кофе и чая в условиях гидрофильного режима ВЭЖХ / К. Сычев, И. Стыскин // Аналитика. – 2015. – Т. 4, № 5. – С. 56–61.

157. Shan, Y. Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors / Y. Shan [et al.] // International Journal of Food Properties. – 2017. – Vol. 20. – P. 2028-2030.

158. Тищенко, Е.А. Применение капиллярного зонного электрофореза для определения некоторых фенольных компонентов растворимого кофе / Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, Е.С. Рябчун, О.Б. Воронова // «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез»: материалы III всер. конф. с междунар. участием. – Краснодар, 2017. – С. 48.

159. Тищенко, Е.А. Определение хлорогеновой кислоты в растворимом кофе электрофоретическим и спектрофотометрическим методами / Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, Е.С. Рябчун, О.Б. Воронова // «Аналитика РБ-2017»: сборник тез. докладов Пятой республ. конф по аналитической химии с междунар. участием. – Минск, 2017. – С. 179.

160. Проблемы аналитической химии. Капиллярный электрофорез / под ред. Л. А. Карцовой. – М.: Академия, 2014. – Т. 18. – 356 с.

161. МУ 08-47/411 Методика (метод) измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца. Свидетельство об аттестации методики измерений 8-47/411.01.00143-2013.2018 от 25.09.2018 г.– Краснодар, 2018. –23 с.

162. Тищенко, Е.А. *On-line* концентрирование и электрофоретическое определение никотиновой кислоты в растворимом кофе / Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, А.С. Степаненко, О.Б. Воронова // «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии»: материалы V всер. симп. с междунар. участием. – Краснодар, 2018. – С. 262.

163. Темердашев, З.А. Определение антиоксидантной активности пищевых продуктов с использованием индикаторной системы Fe (III) / Fe (II) – органический реагент/ З.А. Темердашев [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2006. – Т. 72, № 11. – С. 15–19.

164. Gomez-Ruiz, J.A. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites / J.A. Gomez-Ruiz [et al.] // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 55, №17. – P. 6962–6969.

165. Jovanovic, S.V. One-electron redox potentials of purines and pyrimidines / S.V. Jovanovic, M. G. Simic // J. Phys. Chem. – 1986. – Vol. 90. – P. 974–978.

166. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP / Т.Г. Цюпко [и др.] // Аналитика и контроль. – 2011. – Т. 15, № 3. – С. 287–298.

167. Николаев, И.В. Изучение механизмов антиоксидантного действия пептидов и их композиции: автореф. дис. ...канд. хим. наук: 28.02.12. М., 2012. – 21 с.

168. Тищенко, Е.А. Определение суммарного содержания биоактивных компонентов в растворимом кофе / Тищенко Е.А., Цюпко Т.Г., Николаева Н.А. // «Аналитика РБ-2015»: сборник Четвертой респ. конф. по аналитической химии с междунар. участием. – 2015, Минск – С. 53.

169. МУ 08-47/275 Спектрофотометрический метод измерений антиоксидантной активности пищевых продуктов. ФР 1.31.2011.09197. – Краснодар, 2010. – 14 с.

170. Тищенко, Е.А. Спектрофотометрическая оценка качества растворимого кофе / Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко // Материалы II всер. конф. по аналитической спектроскопии с междунар. участием. – Краснодар, 2015. – С. 219.

171. Тищенко, Е.А. Оценка взаимосвязи между некоторыми компонентами растворимого кофе / Тищенко Е.А., Цюпко Т.Г., Воронова О.Б. // «Аналитика РБ-2018»: сборник статей Шестой респ. конф. по аналитической химии с междунар. участием. – 2018, Минск – С. 15.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

МУ 08-47/411 Методика (метод) измерений массовой концентрации  
никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе методом капиллярного  
зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«Кубанский государственный университет»**  
Учебно-научный производственный коллектив «Аналит»

«УТВЕРЖДАЮ»  
Ректор ФГБОУ ВО «КубГУ»  
М.В. Дегтярев  
«\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.



«УТВЕРЖДАЮ»  
Руководитель УНИК «Аналит»  
З.А. Темрдашев  
«\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.



МУ 08-47/411

**Методика (метод) измерений**  
**МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В**  
**ПРОБАХ РАСТВОРИМОГО КОФЕ**  
**МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА**  
**С ПРИМЕНЕНИЕМ СТЭКИНГА С БОЛЬШИМ ОБЪЕМОМ ОБРАЗЦА**

Краснодар

2018

## СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ

РАЗРАБОТАНА: Кубанский государственный университет. Учебно-научный производственный коллектив «Аналит».

Адрес: 350040, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149

Телефон: 7 861 219-95-01

Факс: 8(861)219-95-17

E-mail: [analyt@chem.kubsu.ru](mailto:analyt@chem.kubsu.ru)

Сайт: [kubsu.ru](http://kubsu.ru)

РУКОВОДИТЕЛЬ: Руководитель УНПК «Аналит» З.А.Темердашев

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

АТТЕСТОВАНА: Федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»)

Номер и дата выдачи аттестата аккредитации юридического лица, аттестовавшего методику (метод) измерений: аттестат аккредитации в области обеспечения единства измерений № 01.00143-2013 от 11.12.2013 г.

---

Свидетельство об аттестации методики измерений

08-47/411.01.00143-2013.2018 от 25.09.2018 г.

634050, РФ, г. Томск, пр. Ленина, 30, тел./факс (3822) 60-62-68

Руководитель юридического лица, аттестовавшего методику (метод) измерений:

Проректора по научной работе и инновациям ФГАОУ ВО НИ ТПУ

Степанов И.Б.

## СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ

Регистрационный код методики (метода) измерений по Федеральному реестру

---

Полное или частичное тиражирование, копирование и размещение в Интернете и на любых других носителях информации данных материалов без письменного разрешения разработчика **преследуется по ст. 146 Уголовного Кодекса Российской Федерации**

## **1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца.

Диапазон измерений массовой концентрации никотиновой кислоты составляет от 250 до 2500 мкг/г.

## **2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

В настоящем документе использованы ссылки на следующие документы по стандартизации:

ГОСТ 12.0.004-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования (с Изменением N 1)

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (с Изменением N 1)

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2)

ГОСТ Р 12.1.019-2009 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание (с Изменением N 1)

ГОСТ 12.4.021-75 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Системы вентиляционные. Общие требования (с Изменением N 1)

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия.

ГОСТ 9656-75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 14919-83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 15113.0-77 Концентраты пищевые. Правила приемки, отбор и подготовка проб (с Изменениями N 1, 2)

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 52501-2005 Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ Р 53228-2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

ТУ 9464-015-29508133-2014 Пробирки для микропроб однократного применения (типа Эппендорфа). Технические условия.

Примечание - При использовании настоящего документа целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории Российской Федерации по соответствующему указателю стандартов, составленному на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменён (изменён), то при пользовании настоящим документом следует руководствоваться заменяющим (изменённым) стандартом. Если ссылочный стандарт отменён без

замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 ПРИПИСАННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Приписанные характеристики показателей точности результатов измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе соответствуют характеристикам, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 – Диапазон измерений, относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и точности, при доверительной вероятности  $P=0,95$

Диапазон измерений, (массовая концентрация), мкг/г	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r, \%$	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), $\sigma_{Rл}, \%$	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$ ), $\pm\delta, \%$
От 250 до 2500 включ.	4	7	14

Значения показателей точности методики используют при:

- оценке деятельности лабораторий на качество проведения испытаний;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики выполнения измерений в конкретной лаборатории.

### 4 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Метод капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца для отрицательно заряженных веществ, основан на:



– гидродинамическом введение в кварцевый капилляр (вплоть до зоны детектирования) пробы с меньшей электропроводностью, чем у рабочего буферного раствора;

– миграции отрицательно заряженных компонентов по направлению к концу зоны пробы под действием приложенного на входной конец капилляра отрицательного напряжения и их концентрировании в узкие зоны (стэкинге) на границе с рабочим буфером при одновременном перемещении за пробой по мере ее удаления из входного конца капилляра возникающим электроосмотическим потоком;

– миграции компонентов пробы под действием приложенного на входной конец капилляра положительного напряжения, их разделение вследствие различной электрофоретической подвижности веществ и детектировании в потоке жидкости.

## **5 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ**

При выполнении измерений используют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

### **5.1 Средства измерений**

-система капиллярного электрофореза с возможностью обращения полярности в процессе проведения измерений (например, типа G1600A по технической документации фирмы «Agilent Technologies» (США)), зарегистрирована в Государственном реестре средств измерений под номером 15720-96;

- весы лабораторные электронные Adventurer, мод. AR2140 с наибольшим пределом взвешивания 210 г, 2-го класса точности, зарегистрированы в Государственном реестре средств измерений под номером 18785-00;

- анализатор жидкости Эксперт-001, предел абсолютной погрешности при измерении рН,  $\pm 0,05$  ед.рН, зарегистрирован в Государственном реестре средств измерений под номером 21068-01;

- колбы мерные 2-10-2; 2-25-2; 2-50-2; 2-100-2 по ГОСТ 1770;

- цилиндры мерные 2-100-2 по ГОСТ 1770;

- пипетки 2-2-2-1; 2-2-2-10 по ГОСТ 29227

## 5.2 Вспомогательные устройства

- центрифуга лабораторная по [1];

- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919;

- мешалка магнитная по [2];

- стаканы химические стеклянные В-1-100 ТС по ГОСТ 25336;

- стаканы химические полипропиленовые Н-1-50 по [3];

- пробирки для микропроб однократного применения (типа Эппендорфа) вместимостью не менее  $1,5 \text{ см}^3$  по ТУ 9464-015-29508133;

- виалы пропиленовые вместимостью  $1,5 \text{ см}^3$ ;

- виалы стеклянные вместимостью  $1,5 \text{ см}^3$ ;

- крышки для виал полипропиленовые

## 5.3 Реактивы и материалы

- натрия гидроокись по ГОСТ 4328;

- кислота борная по ГОСТ 9656;

- никотиновая кислота ( $\geq 98 \%$ , Sigma-Aldrich), имп.;

- вода для лабораторного анализа 1-ой степени чистоты по ГОСТ Р 52501.

- мембранные фильтры с размерами пор  $0,22 \text{ мкм}$ .

Все реактивы, используемые для анализа, должны быть квалификации ч.д.а или х.ч.

### Примечания

1 Допускается использование других средств измерений, обеспечивающих измерения с установленной точностью.

2 Средства измерений должны быть поверены в установленные сроки.

3 Допускается использование оборудования, материалов и реактивов с аналогичными или лучшими метрологическими и техническими характеристиками.

## **6 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

6.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

6.2 При работе с оборудованием необходимо соблюдать правила электробезопасности по ГОСТ Р 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на используемый прибор.

6.3 Организация обучения работающих безопасности труда должна проводиться по ГОСТ 12.0.004.

6.4 Помещение должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

6.5 Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021.

6.6 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

6.7 Утилизацию используемых растворов после выполнения измерений проводят в соответствии с «Инструкцией по утилизации растворов», разработанной в организации.

## **7 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ**

7.1 К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, имеющие среднее или высшее образование химического профиля, опыт работы в химической лаборатории, изучившие правила по эксплуатации используемого

оборудования, настоящую методику и владеющие методом капиллярного электрофореза.

7.2 Специалист должен пройти соответствующий инструктаж, а также получить удовлетворительные результаты при проведении контрольных измерений.

## **8 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ**

При выполнении измерений должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 18 до 25 °С;
- атмосферное давление от 630 до 800 мм рт. ст.;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при 25 °С;
- напряжение в сети от 210 до 230 В.

## **9 ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ**

Отбор и хранение проб кофе проводят в соответствии с ГОСТ 15113.0.

## **10 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ**

### **10.1 Приготовление растворов**

10.1.1. Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации  $c(\text{NaOH})=1,0$  моль/дм<sup>3</sup>

Навеску гидроокиси натрия массой 4,00 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> с 50-60 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды и объем в колбе доводят бидистиллированной водой до метки. Раствор перемешивают и хранят в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой. Срок хранения – 2 месяца.

10.1.2. Приготовление раствора гидроокиси натрия молярной концентрации  $c(\text{NaOH})=0,1$  моль/дм<sup>3</sup>

10 см<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия, приготовленного по 10.1.1. помещают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят объем в колбе до метки бидистиллированной водой и тщательно перемешивают.

10.1.3. Приготовление раствора борной кислоты молярной концентрации  $(1/3 \text{ H}_3\text{BO}_3)=0,2$  моль/дм<sup>3</sup>

Навеску борной кислоты массой 1,2360 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см<sup>3</sup> в 50-60 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, доводят объем раствора в колбе до метки бидистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой. Срок хранения - 2 месяца.

10.1.4. Приготовление боратного буферного раствора

17,5 см<sup>3</sup> раствора борной кислоты, приготовленного по 10.1.3, помещают в химический полипропиленовый стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup>, добавляют 25 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, раствор гидроокиси натрия с концентрацией  $(\text{NaOH})=1,0$  моль/дм<sup>3</sup> до pH 9,0. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>, доводят объем раствора в колбе до метки бидистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой. Срок хранения – 2 месяца.

10.1.5. Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты (НК) концентрации 0,5 г/дм<sup>3</sup>

На аналитических весах взвешивают 0,0500 г никотиновой кислоты с погрешностью 0,0002 г, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, растворяют и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

10.1.6. Приготовление рабочего раствора никотиновой кислоты концентрации 10 мг/дм<sup>3</sup>

0,5 см<sup>3</sup> раствора никотиновой кислоты массовой концентрации 0,5 г/дм<sup>3</sup> помещают в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup>, доводят объем в колбе до метки бидистиллированной водой и тщательно перемешивают.

### 10.1.7. Приготовление градуировочных растворов

В каждую из 6 мерных колб вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают примерно по 2-5 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды, добавляют с помощью мерной пипетки отдельно в каждую колбу соответственно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 см<sup>3</sup> рабочего раствора никотиновой кислоты (10.1.6), доводят объем в каждой колбе до метки бидистиллированной водой. Растворы в каждой колбе перемешивают. Содержание никотиновой кислоты в приготовленных растворах равно соответственно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мг/дм<sup>3</sup>.

10.1.8. Приготовление контрольного раствора никотиновой кислоты концентрации 0,25 мг/дм<sup>3</sup>

0,25 см<sup>3</sup> раствора никотиновой кислоты массовой концентрации 10 мг/дм<sup>3</sup> помещают в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят объем в колбе до метки бидистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Примечание – Все растворы перед введением в капилляр необходимо:

– профильтровать через фильтр с размерами пор 0,22 мкм, отбросив первые порции фильтрата (1-1,5 см<sup>3</sup>);

– дегазировать центрифугированием в течение 3 мин при скорости вращения 7000 об/мин.

## 10.2 Подготовка проб кофе

Навеску растворимого кофе массой 0,500 г, взвешенную с точностью до 0,001 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и с помощью цилиндра приливают примерно 70-80 см<sup>3</sup> горячей (около 90°C) бидистиллированной воды, тщательно перемешивают вращательными движениями до полного растворения кофе, затем охлаждают до комнатной температуры и доводят объем до метки бидистиллированной водой. 0,8 см<sup>3</sup> полученного раствора кофе переносят в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

Примечание – Все растворы перед введением в капилляр необходимо:

- профильтровать через фильтр с размерами пор 0,22 мкм, отбросив первые порции фильтрата (1-1,5 см<sup>3</sup>);
- дегазировать центрифугированием в течение 3 мин при скорости вращения 7000 об/мин.

### **10.3 Подготовка системы капиллярного электрофореза к работе**

Систему капиллярного электрофореза включают и выдерживают не менее 30 мин перед началом выполнения измерений.

#### **10.3.1 Подготовка капилляра к работе**

##### 10.3.1.1. Подготовка нового капилляра к работе

Подготовку нового капилляра к работе проводят в соответствии с руководством по эксплуатации системы капиллярного электрофореза.

##### 10.3.1.2. Ежедневная подготовка капилляра к работе

Перед работой капилляр необходимо последовательно промыть раствором гидроокиси натрия с  $c(\text{NaOH})=1.0$  моль/дм<sup>3</sup>, бидистиллированной водой и боратным буферным раствором по 10 мин без напряжения.

Между анализами капилляр промывают бидистиллированной водой, раствором гидроокиси натрия с  $c(\text{NaOH})=0.1$  моль/дм<sup>3</sup> и боратным буферным раствором по 3 мин.

После работы с испытуемыми образцами в конце рабочего дня необходимо проводить последовательную промывку капилляра бидистиллированной водой, раствором гидроокиси натрия с  $c(\text{NaOH})=1.0$  моль/дм<sup>3</sup>, бидистиллированной водой по 5 мин.

Примечание – При работе с испытуемыми пробами на электрофореграмме может наблюдаться дрейф базовой линии, появление ступеней и смещение времени выхода компонентов, что связано с возможным мешающим влиянием матричных компонентов или примесей. В этом случае рекомендуется:

- во время проведения анализов увеличить время промывки капилляра между анализами;
- проводить промывку в течение 3 мин под напряжением;
- при появлении ступеней заменить свежими порциями ведущий электролит в пробирках.

### **10.3.2 Хранение капилляра**

Порядок хранения капилляра при перерывах в работе зависит от интенсивности использования прибора.

При перерывах в работе на 2-3 суток (до недели) капилляр следует промыть дистиллированной водой и оставить заполненным дистиллированной водой.

При перерывах на срок более недели капилляр необходимо после тщательной промывки дистиллированной водой высушить и оставить в сухом состоянии. В этом случае для восстановления работоспособности капилляра его нужно подготовить к работе, как новый капилляр.

### **10.3.3 Градуировка системы методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца**

Рекомендуемые рабочие параметры и условия анализа градуировочных растворов представлены в таблице 2. Содержимое одной пробирки с рабочим буферным раствором можно использовать для выполнения не более пяти измерений.

Для проведения градуировки системы последовательно, не менее трех раз, анализируют градуировочные растворы (10.1.7.). На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков, при необходимости, корректируют разметку, удаляют лишние пики и далее обрабатывают электрофореграммы согласно процедуре градуировки, описанной в руководстве пользователя применяемого программного обеспечения.



Таблица 2 – Параметры системы и условия анализа градуировочных растворов

Ввод градуировочного раствора (пробы)	50 мбар, 500 с
Напряжение обращения $U_{обр}$ , кВ	-10
Время обращения полярности $t_{обр}$ для градуировочного образца (пробы), минуты	4.5(3.0)
Напряжение $U$ , кВ	+30
Температура, °С	+25
Длина волны, нм	254
Время миграции, мин	9,5-11

Строят график зависимости величины площади пика никотиновой кислоты от ее содержания в анализируемом растворе. Данный график можно перевести в уравнение прямой. Уравнение регрессии получают, обрабатывая полученные данные методом наименьших квадратов.

#### 10.3.4 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят вначале рабочего дня перед измерениями анализируемых проб. Не допускается использовать для контроля стабильности градуировочной характеристики растворы, применявшиеся при построении градуировочных зависимостей.

Для проверки работоспособности системы и контроля стабильности градуировочной характеристики используют свежеприготовленный рабочий контрольный раствор (10.1.8.), который анализируют в условиях, соответствующих анализу градуировочных растворов (таблица 2).

Градуировочную характеристику признают стабильной при выполнении следующего условия:

$$| X_i - C | \leq G_{абс.}, \quad (1)$$

$$G_{\text{абс.}} = 0,01 \cdot C \cdot G_{\text{отн.}},$$

где  $G$  – норматив контроля стабильности градуировочной характеристики,  $G_{\text{отн}} = 10\%$ ;

$C$  – рассчитанное значение массовой концентрации НК в контрольном растворе, мг/дм<sup>3</sup>;

$X$  – результат контрольного измерения массовой концентрации НК в контрольном растворе.

При невыполнении данного условия процедуру контроля стабильности повторяют. При повторном невыполнении условия выясняют и устраняют причины, приводящие к нарушению стабильности градуировочной характеристики.

Также необходимо обращать внимание на время выхода пиков компонентов, отклонения которых не должны превышать 5% от среднего значения.

## 11 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

Пробу, приготовленную по п. 10.2, переносят при необходимости в специальную виалу согласно требованиям, прописанным в руководстве по эксплуатации системы капиллярного электрофореза. В прибор устанавливают виалу с пробой, с раствором гидроксида натрия  $c(\text{NaOH}) = 0.1$  моль/дм<sup>3</sup>, по две виалы с буферным раствором и бидистиллированной водой, одну – для слива. Проводят анализ согласно параметрам и условиям, представленным в таблице 2. Содержимое одной пробирки с рабочим буферным раствором можно использовать для выполнения не более пяти измерений.

Для каждой пробы кофе регистрируют не менее двух электрофореграмм в тех же условиях анализа, при которых была проведена градуировка (таблица 2). На полученных электрофореграммах необходимо проверить правильность автоматической разметки пика.

## 12 ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Массовую концентрацию никотиновой кислоты в растворимом кофе, в мкг/г пробы, рассчитывают по формуле:

$$X_{НК} = \frac{C_{НК} \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot m}, \quad (2)$$

где  $C_{НК}$  – содержание никотиновой кислоты, найденное по градуировочному графику или уравнению регрессии, мг/дм<sup>3</sup>;

$V_1$  – объем колбы, равный 100 см<sup>3</sup>;

$V_2$  – аликвота раствора кофе, взятая для разбавления, равная 0,8 см<sup>3</sup>;

$V_3$  – объем колбы для разбавления раствора кофе, равный 10 см<sup>3</sup>;

$m$  – масса навески пробы, равная 0,5 г.

## 13 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

13.1 Результаты измерений в протоколах анализов представляют в виде:

$$(X_{ср} \pm \Delta), \text{ мкг/г, } P=0,95$$

где  $X_{ср}$  – среднеарифметическое значение двух определений массовой концентрации никотиновой кислоты в пробе, признанных приемлемыми, мкг/г;

$\Delta$  – абсолютная погрешность измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в мкг/г, вычисляемая по формуле:

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot X_{ср}. \quad (3)$$

где  $\delta$  – относительная погрешность измерений массовой концентрации никотиновой кислоты, значения  $\delta$  приведены в таблице 1, %.

13.2 Допустимо результат измерений представлять в виде:

$$(X_{ср} \pm \Delta_L), \text{ мкг/г, } P=0,95,$$

при условии, что  $\Delta_L < \Delta$ ,

где  $\Delta_L$  – значение показателя точности измерений (доверительные границы абсолютной погрешности измерений), установленное при реализации настоящей методики в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов.

## **14 ПРОЦЕДУРЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ**

Обеспечение достоверности измерений организуют и проводят путем проведения проверки приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, оперативного контроля процедуры измерений и контроля стабильности результатов измерений в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6 и РМГ 76.

### **14.1 Проверка приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях повторяемости**

14.1.1 Проверку приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях повторяемости, проводят по результатам измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в рабочих пробах.

14.1.2. Результаты измерений признают приемлемыми при выполнении условия:

$$|X_1 - X_2| \leq 0,01r \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (4)$$

где  $X_1$  и  $X_2$  – результаты измерений массовой концентрации никотиновой кислоты, полученные в условиях повторяемости, мкг/мг.

$r$  – предел повторяемости, %.

Относительное значение предела повторяемости приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Диапазон измерений, относительное значение предела повторяемости при доверительной вероятности  $P=0,95$

Диапазон измерений, (массовая концентрация), мкг/г	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости), $r$ , %
От 250 до 2500 включ.	11

14.1.3 Если условие (4) не выполнено, эксперимент повторяют. При повторном невыполнении условия (4) необходимо выяснить и исключить причины появления неприемлемых результатов измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в условиях повторяемости.

#### 14.2 Проверка приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях внутрилабораторной прецизионности

14.2.1. Проверку приемлемости результатов измерений, получаемых в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, проводят по результатам измерений массовой концентрации никотиновой кислоты в рабочих пробах.

14.2.2. Расхождение между двумя средними арифметическими результатами измерений, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности, не должно превышать предела внутрилабораторной прецизионности:

$$|X_1 - X_2| \leq 0,01R_L \frac{X_1 + X_2}{2} \quad (5)$$

где  $X_1$  и  $X_2$  – результаты измерений массовой концентрации никотиновой кислоты, полученные в условиях внутрилабораторной прецизионности, для которых выполняется условие (4), мкг/мг;

Рл – предел внутрилабораторной прецизионности, %. Относительное значение предела внутрилабораторной прецизионности приведено в таблице 4.

Таблица 4 – Диапазон измерений, относительное значение предела внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности Р=0,95

Диапазон измерений, (массовая концентрация), мкг/г	Предел внутрилабораторной прецизионности (относительное значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), Рл, %
От 250 до 2500 включ.	19

### 14.3 Оперативный контроль процедуры выполнения измерений с использованием метода добавок

14.3.1. Оперативный контроль процедуры измерений проводят путем сравнения результата отдельно взятой процедуры  $K_k$  с нормативом контроля точности  $K$ .

14.3.2. Результат контрольной процедуры рассчитывают по формуле:

$$|K_k| = |\bar{X}' - \bar{X} - C_d|, \quad (6)$$

где  $\bar{X}'$  – результат контрольного измерения массовой концентрации никотиновой кислоты в пробе с добавкой – среднее арифметическое двух результатов параллельных определений, для которых выполняется условие (4), мкг/г;<sup>3</sup>

$\bar{X}$  – результат контрольного измерения массовой концентрации никотиновой кислоты в рабочей пробе – среднее арифметическое двух

результатов параллельных определений, для которых выполняется условие (4), мкг/мг;

Сд – величина добавки никотиновой кислоты, мкг/г.

14.3.3. Норматив контроля К рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{(\Delta_{Л, \bar{X}'})^2 + (\Delta_{Л, \bar{X}})^2}, \quad (7)$$

где  $\Delta_{Л, \bar{X}'}$  ( $\Delta_{Л, \bar{X}}$ ) – значение характеристики погрешности результатов измерений, установленное в лаборатории при реализации методики, соответствующее массовой концентрации компонента в пробе с добавкой (рабочей пробе), мкг/г.

Значение характеристики погрешности рассчитывают по формуле:

$$\Delta_{Л, \bar{X}'} (\Delta_{Л, \bar{X}}) = 0,01 \delta_{Л} \bar{X}' (\bar{X}), \quad (8)$$

где  $\delta_{Л}$  – относительное значение характеристики погрешности результатов измерений, установленное в лаборатории при реализации методики, %.

14.3.4. Реализация решающего правила контроля:

$$|K_k| \leq K. \quad (9)$$

При невыполнении условия (9) эксперимент повторяют. При повторном невыполнении условия (9) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

**ПРИЛОЖЕНИЕ А***(Справочное)*

Электрофореграммы стандартного раствора никотиновой кислоты и образца растворимого кофе

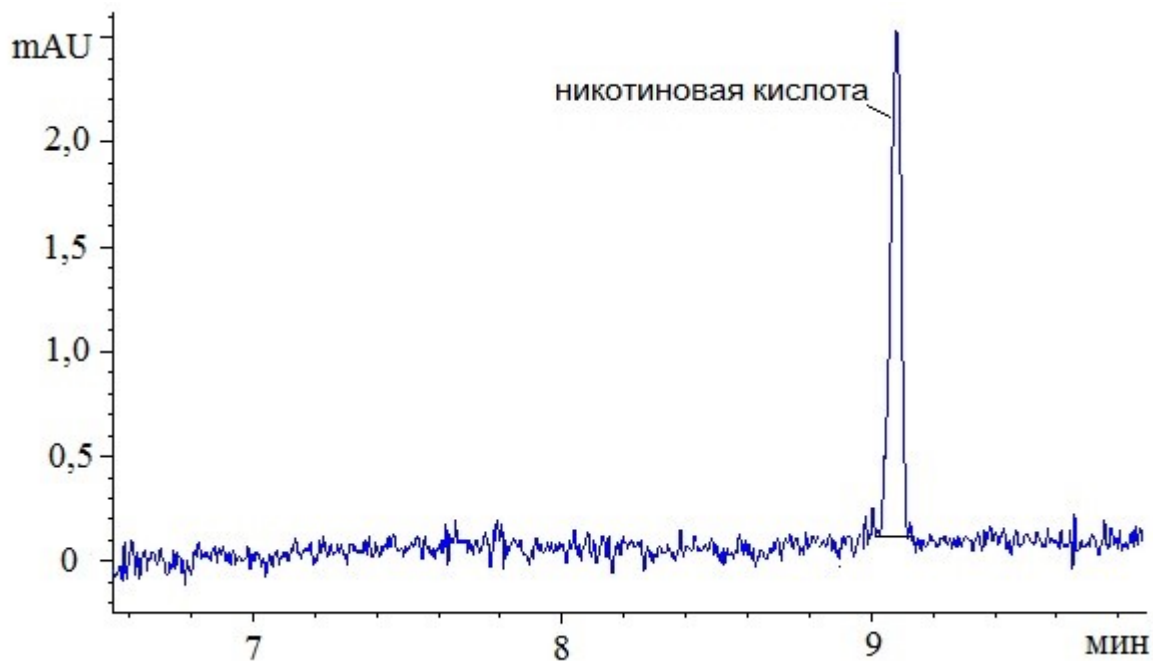


Рисунок А.1 – Электрофореграмма стандартного раствора никотиновой кислоты с концентрацией 0,5 мг/дм<sup>3</sup>

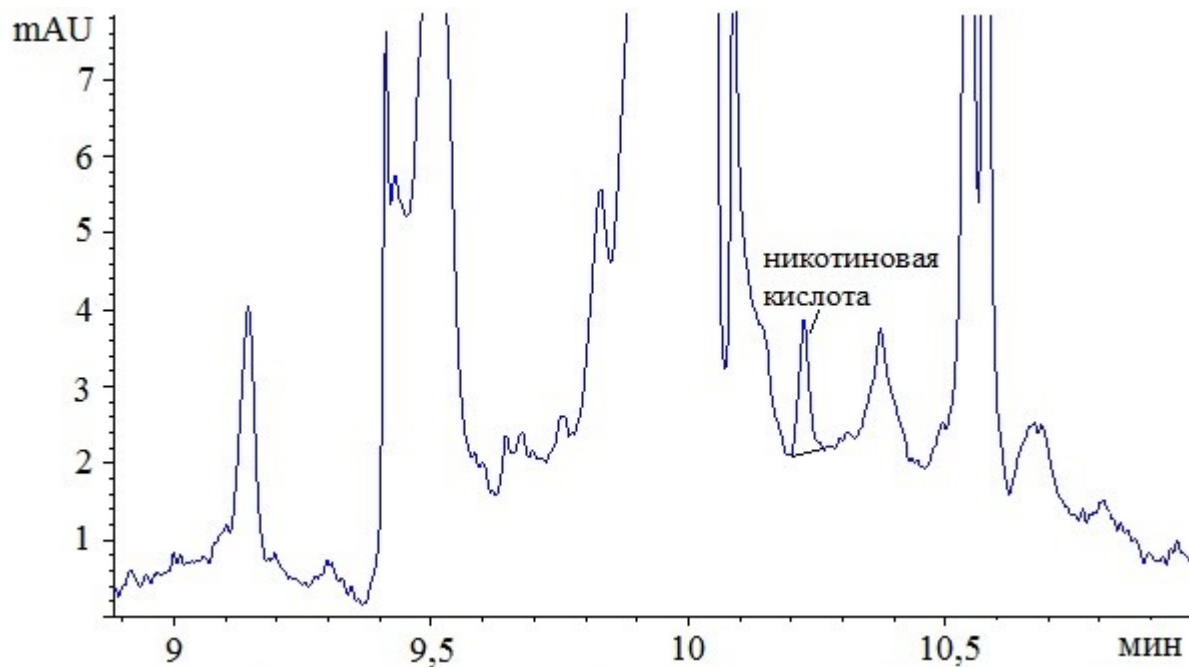


Рисунок А.2 – Электрофореграмма образца растворимого кофе



**Библиография**

- [1] ШХ. 2.779.040 ПС Центрифуга лабораторная. Технические условия.
- [2] ТУ 3615-009-23050963-98 Магнитная мешалка. Технические условия.
- [3] ТУ 229-018-23050963-99                   Стаканы           химические полипропиленовые. Технические условия.

**РАЗРАБОТЧИКИ:**

Д-р хим. наук, профессор

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,

УНПК «Аналит»



Темердашев З.А.

Аспирант, ст. преподаватель кафедры

аналитической химии

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,

УНПК «Аналит»



Тищенко Е.А.

д-р хим. наук., профессор кафедры

аналитической химии

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,

УНПК «Аналит»



Цюшко Т.Г.

канд. хим. наук, доцент кафедры

аналитической химии

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,

УНПК «Аналит»



Воронова О.Б.