

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

**Е.А. Тищенко\*, Т.Г. Цюпко, О.Б. Воронова**

*Кубанский государственный университет,  
Российская Федерация, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149*

\*Адрес для переписки: Тищенко Екатерина Александровна, e-mail: [ekaterina-pydyk@mail.ru](mailto:ekaterina-pydyk@mail.ru)

Поступила в редакцию 8 апреля 2019 г., после доработки – 10 мая 2019 г.

Никотиновая кислота (витамин РР) – является биологически активным микрокомпонентом растворимого кофе, образующимся из тригонеллина в процессе обжаривания кофейных зерен. В работе обсуждены известные методы определения никотиновой кислоты в кофе, их преимущества и недостатки. Исследования посвящены разработке новой методики определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением процедуры on-line концентрирования аналита – стэкинга с большим объемом образца и обращением полярности (CZE-LVSS). В качестве фонового электролита использован боратный буферный раствор (рН 9.0, концентрация 70 мМ). Разделение компонентов растворимого кофе проведено при наложении напряжения +30 кВ на входной конец немодифицированного кварцевого капилляра (64.5 (56) см × 50 мкм). Параметры стэкинга: время ввода пробы 500 с (при 50 мбар), напряжение обращения полярности -10 кВ, время обращения полярности 4.5 минуты. В этих условиях фактор эффективности концентрирования никотиновой кислоты, рассчитанный по результатам анализа растворимого кофе, составляет 70. Разработанная методика прошла метрологическую аттестацию (№ 08-47/411.01.00143-2013.2018 от 25.09.2018 г.) и позволяет проводить определение никотиновой кислоты в растворимом кофе в диапазоне 250-2500 мкг/г с относительной погрешностью (±δ) 14 %. Содержание никотиновой кислоты в различных образцах растворимого кофе, полученное методом CZE-LVSS, варьируется от 250 до 750 мкг/г.

**Ключевые слова:** капиллярный зонный электрофорез, on-line концентрирование, стэкинг с большим объемом образца (LVSS), никотиновая кислота, кофе.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 2, pp. 208-215

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.008

## Nicotinic acid determination in instant coffee by capillary zone electrophoresis using large volume sample stacking

**E.A. Tishchenko\*, T.G. Tsiupko, O.B. Voronova**

*Kuban State University, Stavropolskaia ul., 149, Krasnodar, 350040, Russian Federation*

\*Corresponding author: Ekaterina A. Tishchenko, e-mail: [ekaterina-pydyk@mail.ru](mailto:ekaterina-pydyk@mail.ru)

Submitted 08 April 2019, received in revised form 10 May 2019

Nicotinic acid (vitamin РР) - is a biologically active micro component of the instant coffee. It is formed from the trigonelline during the roasting process of coffee beans. The methods of nicotinic acid determination in coffee, their advantages and disadvantages are discussed in this article. Current studies are devoted to the development of a new method for the nicotinic acid determination in soluble coffee by capillary zone electrophoresis using on-line analyte concentration / stacking with a large sample volume and polarity inversion (CZE-LVSS). The separation of the instant coffee components was carried out in the borate buffer (70 mM, pH 9.0) with the voltage of +30 kV to the capillary inlet (64.5 (56) cm × 50 μm). Stacking parameters: sample injection time 500s (at 50 mbar), stacking voltage -10 kV, stacking time 4.5 minutes. In these conditions the stacking efficiency factor of nicotinic acid calculated for instant coffee is 70. The developed method has passed the metrological certification and allows determining the nicotinic acid contents in instant coffee in

the range from 250 to 2500 µg/g with the relative error (accuracy) of 14%. The nicotinic acid content in the instant coffee samples was obtained by CZE-LVSS method and varied in the range from 250 to 750 µg/g.

**Keywords:** capillary zone electrophoresis, on-line concentration, large volume sample stacking (LVSS), nicotinic acid, coffee

## ВВЕДЕНИЕ

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 меланоидинов и ароматических соединений. Наряду с этим в готовом продукте, растворимом кофе, сохраняются многие биологически активные компоненты зеленых зерен, например: хлорогеновые кислоты и кофеин, обуславливающие пищевую ценность напитка [1, 2]. Кроме того, в процессе термической обработки сырья возможно образование витаминов. Так, тригонеллин, в отличие от кофеина, обладающего термической устойчивостью, практически полностью разрушается в процессе обжаривания кофе, образуя одну из форм витамина РР (ниацина) – никотиновую кислоту (НК). Это соединение способно стимулировать кровообращение, мозговую деятельность и принимать участие в обмене белков, жиров и углеводов, а его дефицит в организме человека может приводить к возникновению заболеваний кожи [3-5].

Известно, что НК в продуктах растительного происхождения, как правило, находится в связанной форме с полисахаридами, пептидами и гликопептидами [6]. Однако в растворимом кофе эта кислота содержится преимущественно в свободной форме и является одним из основных источников биодоступного витамина в продукте [7-9].

Для определения НК в образцах зеленого, жареного и растворимого кофе применяют различные методы (табл. 1). Микробиологический метод долгое время являлся наиболее распространенным методом определения ниацина в различных пищевых продуктах, в том числе и в кофе [10-13]. Наряду с главным преимуществом данного метода – высокой чувствительностью (нижний предел определения 5 мкг/л [12]), он имеет ряд недостатков: длительность выполнения анализа и неудовлетворительная воспроизводимость результатов [14]. Известна также спектрофотометрическая методика определения НК в образцах зеленого и жареного кофе, основанная на реакции ее взаимодействия с цианоген бромидом в присутствии *l*-аминоацетофенона с образованием соединения желтого цвета [15]. 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 [9, 16].

В последние годы для определения биологически активных веществ в сложных органических матрицах широкое развитие получили такие методы разделения, как жидкостная хроматография и капиллярный электрофорез (КЭ). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) возможно определение НК на уровне 50 мкг/л [7, 17] одновременно с другими компонентами кофе: кофеином, тригонеллином, сахарозой [17-21]. Известно также большое количество электрофоретических методик определения НК в продуктах растительного происхождения: орехах,

**Таблица 1**

Определение никотиновой кислоты в кофе различными методами

**Table 1**

Nicotinic acid determination in coffee using different methods

Объект анализа	Метод	Содержание, мкг/г	Источник
Зеленый кофе	спектрофотометрический	16 - 44	15
	микробиологический	6 - 17	10, 11
	хроматографический	не обнаружено	7, 17, 21
		7	8
		25 - 28	18
Жареный кофе	спектрофотометрический	95 - 263	15
	микробиологический	27 - 327	10-13
	хроматографический	46 - 304	7, 8, 18, 19, 21
		487 - 1338*	20
Растворимый кофе	микробиологический	93 - 623	11
	хроматографический	342 - 363	7
		< 100	17
		406 - 438*	20
		1014	21

Примечание: \* – мкг на г сухого экстракта кофе (µg per g dry coffee extract).

арахисовом масле, семенах подсолнечника [22], бобах, чечевице [23], черной фасоли [24], фруктах и овощах [25]. Однако в изученной нами литературе не было найдено соответствующих методик, применяемых для кофе. Вероятно, это связано как с малым содержанием НК в этом продукте, так и недостаточной чувствительностью наиболее часто используемого в методе КЭ спектрофотометрического детектирования [26].

Для повышения чувствительности определения аналитов в сотни и даже более раз в КЭ применяют различные варианты *on-line* концентрирования: стэкинг, изотахофоретический стэкинг, динамический pH-скачок и свипинг [26]. В основе каждого из них лежит определенный механизм, обусловленный различием свойств фонового электролита и раствора пробы. Так, стэкинг реализуется созданием в капилляре зон разной электропроводности: низкой – разбавленная проба и высокой – электролит, на границе между которыми концентрируются аналиты [26]. Применение данного приема в методе мицеллярной электрокинетической хроматографии с введением дополнительных зон, создающих градиент электропроводности, при определении фенольных кислот в образцах порошкообразного кофе позволило снизить предел детектирования в среднем до 4 мкг/л [27]. Проведение LVSS (large volume sample stacking) – стэкинга с большим объемом образца при электрофоретическом определении аналитов, содержащихся в малых количествах в пищевых продуктах [28, 29], косметических средствах [30] и биологических объектах [31], позволяет достичь высоких значений факторов концентрирования и низких пределов детектирования.

Целью нашей работы являлась разработка методики определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного

электрофореза с применением стэкинга с большим объемом образца (CZE-LVSS).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Исследования проводили с использованием следующих реактивов (Sigma-Aldrich): никотиновая кислота ( $\geq 98\%$ ), борная кислота ( $\geq 99.8\%$ ), натрий фосфорнокислый однозамещенный 1-водный ( $\geq 99\%$ ), натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный ( $\geq 99.8\%$ ) и гидроксид натрия ( $\geq 99.8\%$ ).

Объектами исследования являлись образцы порошкообразного, гранулированного и сублимированного растворимого кофе разных коммерческих наименований.

Приготовление растворов стандартных веществ, образцов кофе и рабочего электролита. Рабочие растворы никотиновой кислоты готовили растворением ее точной навески в бидистиллированной воде с последующим разбавлением до необходимой концентрации. Пробы растворимого кофе для анализа методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) готовили растворением в горячей воде (70-90 мл) навески продукта, массой 0.50 г, затем раствор охлаждали и доводили объем до 100 мл водой. Для анализа методом CZE-LVSS полученный раствор разбавляли в 8-50 раз. Серию боратных буферных растворов с концентрациями 10-70 мМ, применяемых в качестве фонового электролита, готовили разбавлением бидистиллированной водой водного раствора борной кислоты (200 мМ) до необходимой концентрации с добавлением гидроксида натрия (1 М) до соответствующего значения pH. Все растворы перед вводом в капилляр фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и центрифугировали в течение 3 мин (7000 об/мин).

Таблица 2

Основные условия определения никотиновой кислоты методом капиллярного зонного электрофореза

Table 2

Main conditions of nicotinic acid determination by capillary zone electrophoresis

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

Примечания: 1 – значение параметра для водного раствора растворимого кофе (The parameter value for an aqueous solution of instant coffee); 2 – значение параметра для водного раствора никотиновой кислоты (The parameter value for an aqueous solution of nicotinic acid).

**Оборудование.** Для электрофоретических исследований использовали систему капиллярного электрофореза Agilent<sup>3D</sup> CE G1600A («Agilent Technologies», США) с диодно-матричным детектированием. Разделение проводили в немодифицированном кварцевом капилляре с эффективной длиной 56 см (общая длина 64.5 см) и внутренним диаметром 50 мкм. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Chemstation. Для центрифугирования образцов использовали центрифугу MiniSpin, Eppendorf (Германия).

Условия электрофоретического определения никотиновой кислоты. Перед началом работы капилляр последовательно промывали по 10 минут водой, 1 М NaOH и водой. Для разделения компонентов пробы в качестве электролита использовали боратный буферный раствор с pH 9.0 и концентрацией 70 мМ. Анализ модельных растворов НК и проб растворимого кофе проводили методами КЗЭ и CZE-LVSS, руководствуясь параметрами, представленными в табл. 2. Аналитическим сигналом (АС) служила площадь пика (mAU·s) на электрофореграмме. Идентификацию аналита проводили путем введения добавки стандартного вещества в пробу образца. Содержание НК в образцах растворимого кофе определяли методом градуировочного графика, линейного в диапазоне концентраций 0.1-1.0 мкг/мл.

Для количественной оценки степени концентрирования аналита использовали фактор эффективности концентрирования  $SEF$  [26], который рассчитывали как отношение площади пика НК, полученной при стэкинге с большим объемом образца (CZE-LVSS), к площади пика, полученной при введении пробы в течение 6 секунд (КЗЭ), умноженное на коэффициент разбавления пробы ( $K_{разб} = 12.5$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Оптимизация условий метода CZE-LVSS.** Проведение стэкинга с большим объемом образца в капиллярном зонном электрофорезе возможно в условиях, когда направления движения аналита и электроосмотического потока (ЭОП) противоположны. Исходя из этого, для определения никотиновой кислоты (НК) в растворимом кофе методом КЗЭ выбран режим положительной полярности, при котором электрод на входном конце капилляра выступает в роли анода, а в качестве электролита применены буферные растворы с pH > 7, создающие условия для ионизации кислоты и возникновению направленного к катоду ЭОП, транспортирующего аналит к детектору.

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

– выбор условий, обеспечивающих удовлетворительное разрешение пика НК и матричными пиками, как методом КЗЭ, так и CZE-LVSS (тип электролита, его концентрация  $C_{буф}$  и pH, напряжение  $U$  в системе);

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

На первом этапе (КЗЭ без стадии концентрирования) апробированы различные электролиты: фосфатный (pH 7.0) и боратный (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 в качестве электролита для дальнейших исследований.

При варьировании концентрации раствора боратного буфера (10-70 мМ) и величины его pH (8.0-9.5) выделен ряд буферных систем, 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.

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 pH 9.0 (рис. 1). Дальнейшее увеличение концентрации электролита нецелесообразно, т.к. наблюдается увеличение шума базовой линии.

Установлено, что увеличение напряжения 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. Это послужило решающим фактором при выборе оптимального значения напряжения +30 кВ.

На втором этапе при оптимизации условий *on-line* концентрирования НК изучено влияние времени ввода

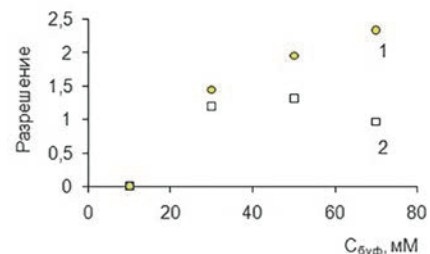


Рис. 1. Зависимости разрешения пиков НК и компонентов пробы от концентрации буферного раствора при pH 9.0 (1) и 9.5 (2).

Fig. 1. Dependences of resolutions between peaks of nicotinic acid and the sample components from the buffer concentration at pH 9.0 (1) and 9.5 (2).



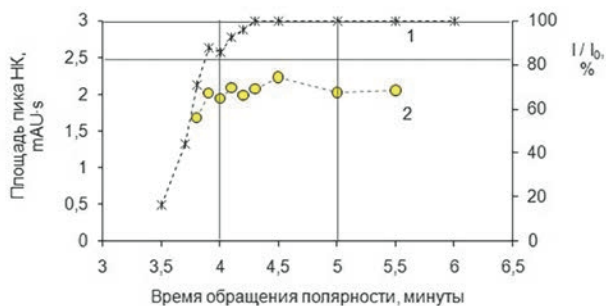


Рис. 2. Зависимости отношения величин  $I$  к  $I_0$  (1) и площади пика НК (2) от времени обращения полярности (проба: 0.03 г на 100 мл воды,  $t_{\text{ввод}} = 500$  с,  $U_{\text{обр}} = -10$  кВ,  $U = +30$  кВ,  $\lambda = 254$  нм).

Fig. 2. Dependences of values ratios  $I$  to  $I_0$  (1) and NA peak area (2) from the stacking time (sample: 0.03 g of coffee in 100 ml of water,  $t_{\text{inj}} = 500$  s,  $U_{\text{stack}} = -10$  kV,  $U = +30$  kV,  $\lambda = 254$  nm).

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 в системе ( $I$ ). Окончание процессов удаления матрицы и концентрирования аналита контролируется достижением значения  $I/I_0$  величины 85-99 % (где  $I_0$  – значение силы тока в капилляре, полностью заполненном фоновым электролитом). Для фиксированных параметров  $t_{\text{ввод}}$

**Таблица 3**

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

**Table 3**

Influence of sample injection time and stacking voltage on NA peak area values

Напряжение обращения, кВ	Площадь пика НК при времени ввода пробы ( $t_{\text{ввод}}$ , 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	1.6

= 500 с и  $U_{\text{обр}} = -10$  кВ эти условия достигаются при времени обращения 4.0-5.0 минут (рис. 2). 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 (табл. 3), 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.

Электрофореграммы растворов растворимого кофе, полученные методом КЗЭ и CZE-LVSS, представлены на рис. 3. 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.

Определение НК в образцах растворимого кофе методом **CZE-LVSS**. Для получения метрологических характеристик методики определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом CZE-LVSS проведены эксперименты по оценке показателей повторяемости, прецизионности, правильности и точности разработанной методики анализа, организованные согласно рекомендациям [32]. Описанная методика прошла метрологическую аттестацию (метрологические характеристики представлены в табл. 4) [33] и позволяет проводить определение НК в диапазоне 250-2500 мкг/г.

Разработанная методика определения НК в растворимом кофе методом CZE-LVSS апробирована

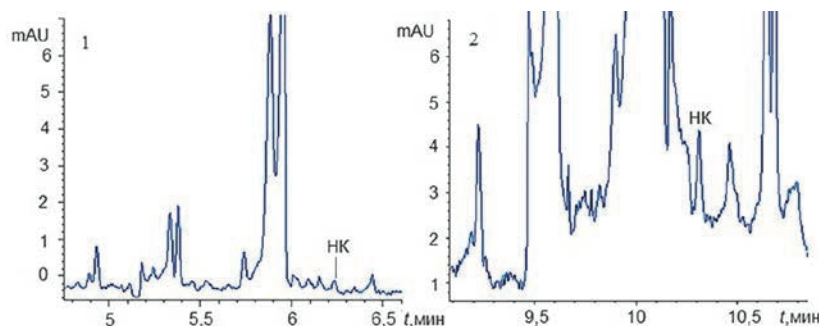


Рис. 3. Электрофореграммы растворов растворимого кофе «Индийский» производства «Москофе продукт» 0.5 г (1) и 0.04 г (2) в 100 мл воды, полученные методами КЗЭ (1) и CZE-LVSS (2) согласно условиям, описанным в табл. 2.

Fig. 3. Electropherograms of “Indian” instant coffee solutions produced by “Moscoffe Product”: 0.5 g (1) and 0.04 g (2) of coffee in 100 ml of water obtained by the methods CZE (1) and CZE-LVSS (2) according to the conditions described in Table 2.

Таблица 4

Метрологические характеристики разработанной методики

Table 4

Metrological characteristics of the developed method

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

Таблица 5

Результаты определения НК в образцах растворимого кофе

Table 5

NA determination results in the instant coffee samples

Образец	Содержание, мкг/г
Московская кофейня на паяхъ. Арабика	250 ± 40
Москофе продукт. Индийский	410 ± 60
Якобс Монарх	410 ± 60
Чибо Эксклюзив	430 ± 60
Черная карта Голд	510 ± 70
Жардин Колумбия Меделлин	510 ± 70
Жокей Триумф	550 ± 80
Жардин Кения Килиманджаро	560 ± 80
Максвелл Хаус	570 ± 80
Migel Classic. Гранулированный	570 ± 80
Fresco Arabica Solo	750 ± 110

на различных образцах сублимированного, гранулированного и порошкообразного растворимого кофе.

Установлено (табл. 5), что содержание НК в исследуемых образцах растворимого кофе варьируется в диапазоне 250-750 мкг/г, что согласуется с литературными данными [7, 20]. 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом КЗЭ с применением стэкинга с большим объемом образца и обращением полярности в диапазоне концентраций 0.1-1.0 мкг/мл аналита. Оптимизированы условия разделения НК с компонентами матрицы, а также параметры *on-line* концентрирования аналита в капилляре. Фактор эффективности концентрирования,

рассчитанный для образца растворимого кофе, составил 70.

Разработанная методика прошла метрологическую аттестацию. В пределах диапазона определения 250-2500 мкг/г погрешность методики не превышает 14 %. Методика апробирована на образцах растворимого кофе, содержание никотиновой кислоты в них составляет в среднем 500 мкг/г, что соответствует уровню ее содержания, полученных в других работах.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось при финансовой поддержке РФФИ (грант №17-03-01254) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского госуниверситета, уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by RFBR (grant 17-03-01254) with the use of the scientific equipment of the «Environmental Analysis Center» Center of Collective Use of the Kuban State University, unique identifier RFMEFI59317X0008.

## ЛИТЕРАТУРА

1. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature / N. Tajik [et al.] // Eur J Nutr. 2017. V. 56. P. 2215-2244.
2. Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review / G. Grosso [et al.] // Annual Review of Nutrition. 2017. V. 37. P. 131-156.
3. Norris F. W. Nicotinic acid in the materials and process of brewing // Journal of the Institute of Brewing. 1945. V. 51. P. 177-184.
4. Олейникова И.Ю., Шинкаренко А.С. Никотиновая кислота как объект фармацевтической химии // Молодой ученый. 2017. № 26. С. 62-64.
5. Coffee: biochemistry and potential impact on health / I. A. Ludwig [et al.] // Food Funct. 2014. V. 5. P. 1695-1717.
6. Trenerry V.C. Review. The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages // Electrophoresis. 2001. V. 22. P. 1468-1478.

7. Perrone D., Donangelo C.M., Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography – mass spectrometry // *Food Chemistry*. 2008. V. 110. P. 1030-1035.
8. 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.] // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 11114-11121.
9. Macrae R. Nutritional factors // *Coffee: Physiology*: edited by R.J. Clarke, R. Macrae. London, Elsevier applied science. 1988. V. 3. P. 126-139.
10. Bressani R., Navarrete D. A. Niacin content of coffee in Central America // *Journal of Food Science*. 1959. V. 24, № 4. P. 334-351.
11. Taguchi H., Sakaguchi M., Shimabayashi Y. Trigonelline content in coffee beans and the thermal conversion of trigonelline into nicotinic acid during the roasting of coffee beans // *Agric. Biol. Chem.* 1985. V. 49, № 12. P. 3467-3471.
12. Barton-Wright E.C. The microbiological assay of nicotinic acid in cereals and other products // *Biochem. J.* 1944. V. 38, № 4. P. 314.
13. Teply L. J., Krehl W. A., Elvehjem C. A. Studies on the nicotinic acid content of coffee // *Arch. Biochem.* 1945. № 6. P. 139.
14. Blake C.J. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review // *Anal Bioanal Chem.* 2007. V. 389. P. 63-76.
15. Hughes E.B., Smith R.F. The nicotinic acid content of coffee // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1946. V. 65, № 10. P. 284-286.
16. Lahely S., Bergaentzle M., Hasselmann C. Fluorimetric determination of niacin in foods by high performance liquid chromatography with post-column derivatization // *Food Chemistry*. 1999. V. 65, № 1. P. 129-133.
17. 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. V. 95, № 4. P. 1138-1141.
18. Casal S., Oliveira M.B., Ferreira M. A. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 1998. V. 21, № 20. P. 3187-3195.
19. Parham H., Zargar B., Khoshnam F. Ultrasonic-assisted solid-phase extraction pre-concentration and determination of nicotinamide and nicotinic acid by high-performance liquid chromatography using anthracite // *Food Analytical Methods*. 2015. V. 8, № 9. P. 2235-2242.
20. Rodrigues N.P., Bragagnolo N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013. V. 32, № 2. P. 105-115.
21. Validated HPLC-Diode array detector method for simultaneous evaluation of six quality markers in coffee / A. Gant [et al.] // *J AOAC Int.* 2015. V. 98, № 1. P. 98-102.
22. Ward C.M., Trenerry V.C. The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography // *Food Chemistry*. 1997. V. 60, № 4. P. 667-674.
23. Diaz-Pollan C., Vidal-Valverde C. Niacin determination in legumes by capillary electrophoresis (CE). Comparison with high performance liquid chromatography (HPLC) // *J. High Resol. Chromatogr.* 1998. V. 21, № 2. P. 81-86.
24. Determination of vitamin C and nicotinic acid content in black bean by capillary zone electrophoresis / H-X. Liu [et al.] // *J. Chem. Pharm. Res.* 2014. V. 6, № 5. P. 1327-1330.
25. Windahl K.L., Trenerry V. C., Ward C.M. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction // *Food Chemistry*. 1998. V. 65, № 2. P. 263–270.
26. Бессонова Е.А., Карцова Л.А. Методы on-line концентрирования в капиллярном электрофорезе // *Проблемы аналитической химии. Капиллярный электрофорез*: под ред. Л.А. Карцовой. М.: Наука. 2014. Т. 18. С. 76-125.
27. 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. V. 1212, № 1-2. P. 137-144.
28. Lee I.S.L., Boyce M.C., Breadmore M.C. Extraction and on-line concentration of flavonoids in Brassica oleracea by capillary electrophoresis using large volume sample stacking // *Food Chemistry*. 2012. V. 133, № 1. P. 205-211.
29. Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking / H.-Y. Huang [et al.] // *Journal of Chromatography A*. 2003. V. 995. P. 29-36.
30. Comparative study for the analysis of parabens by micellar electrokinetic capillary chromatography with and without large-volume sample stacking technique / S. He [et al.] // *Talanta*. 2006. V. 69. P. 166–171.
31. On-line концентрирование белков в условиях капиллярной электрохроматографии с использованием PLOT-колонок на основе сверхразветвленных полимеров / Е.А. Бессонова [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014. Т. 14. № 2. С. 275-285.
32. РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М., 2013. 58 с.
33. 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. № 08-47/411.01.00143-2013.2018 от 25.09.2018 г. Краснодар. 2018. 23 с.

## REFERENCES

1. Tajik N., Tajik M., Mack I., Enck P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur J Nutr*, 2017, vol. 56, pp. 2215-2244. doi: 10.1007/s00394-017-1379-1.
2. Grosso G., Godos J., Galvano F., Giovannucci E. L. Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. *Annual Review of Nutrition*, 2017, vol. 37, pp. 131-156. doi: 10.1146/annurev-nutr-071816-064941.
3. Norris F. W. Nicotinic acid in the materials and process of brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 1945, vol. 51, pp. 177-184.
4. Oleinikova I. Iu., Shinkarenko A.S. [Nicotinic acid as an object of pharmaceutical chemistry]. *Molodoi Uchenyi [Young Scientist]*, 2017, no. 26, pp. 62-64 (in Russian).
5. Ludwig I. A., Clifford M. N., Lean M. E. J., Ashiharad H., Crozier A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct*, 2014, vol. 5, pp. 1695-1717. doi: 10.1039/c4fo00042k.
6. Trenerry V.C. Review. The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages. *Electrophoresis*, 2001, vol. 22, pp. 1468-1478. doi: 10.1002/1522-2683 (200105).
7. Perrone D., Donangelo C.M., Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food*



- Chemistry*, 2008, vol. 110. pp. 1030-1035. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.012.
8. Lang R., Yagar E.F., Eggers R., Hofmann T. Quantitative investigation of trigonelline, nicotinic acid, and nicotinamide in foods, urine, and plasma by means of LC-MS/MS and stable isotope dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56. pp. 11114-11121. doi:10.1021/jf802838s.
  9. Macrae R. *Nutritional factors // Coffee: Physiology*: edited by R.J. Clarke, R. Macrae. London, Elsevier applied science, 1988, vol. 3, pp. 126-139.
  10. Bressani R., Navarrete D. A. Niacin content of coffee in central America. *Journal of Food Science*, 1959, vol. 24, no. 4, pp. 334-351. doi:10.1111/j.1365-2621.1959.tb17282.x.
  11. Taguchi H., Sakaguchi M., Shimabayashi Y. Trigonelline content in coffee beans and the thermal conversion of trigonelline into nicotinic acid during the roasting of coffee beans. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, vol. 49, no. 12, pp. 3467-3471. doi: 10.1080/00021369.1985.10867295.
  12. Barton-Wright E.C. The microbiological assay of nicotinic acid in cereals and other products. *Biochem. J.*, 1944, vol. 38, no. 4, pp. 314.
  13. Teply L. J., Krehl W. A., Elvehjem C. A. Studies on the nicotinic acid content of coffee. *Arch. Biochem.*, 1945, no. 6, pp. 139.
  14. Blake C.J. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem.*, 2007. vol. 389, pp. 63-76. doi: 10.1007/s00216-007-1309-9.
  15. Hughes E.B., Smith R.F. The nicotinic acid content of coffee. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1946, vol. 65, no. 10, pp. 284-286. doi: doi.org/10.1002/jctb.5000651002.
  16. Lahely S., Bergaentzle M., Hasselmann C. Fluorimetric determination of niacin in foods by high performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chemistry*, 1999, vol. 65, no. 1, pp. 129-133. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00182-4.
  17. Liu H., Shao J., Li Q., Li Y., Yan H. M., He L. Determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in Yunnan Arabica Coffee by microwave-assisted extraction and HPLC with two columns in Series. *Journal of AOAC International*, 2012, vol. 95, no. 4, pp. 1138-1141. doi: 10.5740/jaoacint.11-275.
  18. Casal S., Oliveira M.B., Ferreira M. A. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 1998, vol. 21, no. 20, pp. 3187-3195. doi: 10.1080/10826079808001267.
  19. Parham H., Zargar B., Khoshnam F. Ultrasonic-assisted solid-phase extraction pre-concentration and determination of nicotinamide and nicotinic acid by high-performance liquid chromatography using anthracite. *Food Analytical Methods*, 2015, vol. 8, no. 9, pp. 2235-2242. doi: 10.1007/s12161-015-0095-9.
  20. Rodrigues N.P., Bragagnolo N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, vol. 32, no. 2, pp.105-115. doi: 10.1016/j.jfca.2013.09.002.
  21. Gant A., Leyva V.E., Gonzalez A.E., Maruenda H. Validated HPLC-Diode array detector method for simultaneous evaluation of six quality markers in coffee. *JAOAC Int.*, 2015, vol. 98, no.1, pp. 98-102. doi: 10.5740/jaoacint.14-113.
  22. Ward C.M., Trenerry V.C. The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 1997, vol. 60, no. 4, pp. 667-674. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00022-8.
  23. Diaz-Pollan C., Vidal-Valverde C. Niacin determination in legumes by capillary electrophoresis (CE). Comparison with high performance liquid chromatography (HPLC). *J. High Resol. Chromatogr.*, 1998, vol. 21, no. 2, pp. 81-86. doi: 10.1002/(SICI)1521-4168(19980201).
  24. Liu H-X., Xu Y., Li H., Yan Y-M, Ye K-Q., Wang L-T., Cao H. Determination of vitamin C and nicotinic acid content in black bean by capillary zone electrophoresis. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2014, vol. 6, № 5. pp. 1327-1330.
  25. Windahl K.L., Trenerry V. C., Ward C.M. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction. *Food Chemistry*, 1998, vol. 65, no. 2, pp. 263-270. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00225-8.
  26. Bessonova E.A., Kartsova L.A. [Methods of on-line concentration in capillary electrophoresis] // *Problemy analiticheskoi khimii. Kapilliarnyi elektroforez* [Problems of analytical chemistry. Capillary electrophoresis]: edited by L.A. Kartsova. Moscow, Science. 2014, vol. 18, pp. 76-125.
  27. Zhu J., Qi S., Li J., Chen X. Low-temperature bath/high-conductivity zone/stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of phenolic acids in coffee drink. *Journal of Chromatography A*, 2013, vol. 1212, no. 1-2, pp.137-144.
  28. Lee I.S.L., Boyce M. C., Breadmore M.C. Extraction and on-line concentration of flavonoids in Brassica oleracea by capillary electrophoresis using large volume sample stacking. *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, no. 1, pp. 205-211. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.006.
  29. Huang H.-Y., Chiu C.-W., Sue S.-L., Cheng C.-F. Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 995, pp. 29-36. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00530-2.
  30. He S., Zhao Y., Zhu Z., Liu H., Li M., Shao Y., Zhuang Q. Comparative study for the analysis of parabens by micellar electrokinetic capillary chromatography with and without large-volume sample stacking technique. *Talanta*, 2006, vol. 69, pp. 166-171. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.018.
  31. Bessonova E. A., Koroleva V. U., Kartsova L. A., Potolitsyna V. E. On-line preconcentration of proteins in capillary electrochromatography using PLOT-columns based on hyperbranched polymers. *Sorption and chromatographic processes [Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy]*, 2014, T. 14, № 2, C. 275-285. (in Russian).
  32. RMG 61-2010 Gosudarstvennaia sistema obespecheniia edinstva izmerenii. Pokazateli tochnosti, pravil'nosti, pretsizionnosti metodik kolichestvennogo khimicheskogo analiza. *Metody otsenki [State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness, precision of quantitative chemical analysis method. Evaluation methods]*. Moscow, Standartinform Publ., 2013. 58 p. (in Russian).
  33. Metodicheskie ukazaniia 08-47/411 [Methodical instruction 08-47/411] Metodika (metod) izmerenii massovoi kontsentratsii nikotinovoi kisloty v probakh rastvorimogo kofe metodom kapilliarnogo zonnogo elektroforeza s primeneniem stekinga s bol'shim ob'emom obraztsa [Method for measuring the mass concentration of nicotinic acid in instant coffee samples by capillary zone electrophoresis using with a large volume sample stacking]. № 08-47/411.01.00143-2013.2018, 25.09.18 r. Krasnodar. 2018. 23 p. (in Russian).