


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)

Факультет химии и высоких технологий
Кафедра аналитической химии

Допустить к защите
Заведующий кафедрой
д-р хим. наук, проф.
 З. А. Темердашев

23 мая 2019 г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНОВОЙ
КИСЛОТЫ В РАСТВОРИМОМ КОФЕ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО
ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Работу выполнила  А.С. Степаненко

Направление подготовки 27.03.01 Стандартизация и метрология

Направленность (профиль) Стандартизация и сертификация

Научный руководитель
проф., д-р хим. наук, проф.  Т.Г. Цюпко

Нормоконтролер,
канд. хим. наук, доц.  О. Б. Воронова

Краснодар
2019

Содержание

Введение.....	4
1 Аналитический обзор.....	6
1.1 Химический состав зеленого кофе.....	6
1.2.1 Полифенольные соединения.....	7
1.2.2 Пуриновые алкалоиды.....	8
1.2.3 Никотиновая кислота – компонент пищевых продуктов.....	9
1.2.4 Тригонеллин – предшественник никотиновой кислоты.....	11
1.2.5 Другие компоненты кофе.....	11
1.2 Производство кофе растворимого и изменение его состава.....	12
1.2.1 Выбор вида сырья для производства кофе.....	13
1.2.2 Обжаривание зерен.....	14
1.2.3 Измельчение.....	15
1.2.4 Экстракция.....	16
1.3 Методы определения никотиновой кислоты в кофе.....	16
1.3.1 Хроматографические методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах.....	18
1.3.2 Электрофоретические методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах.....	20
1.3.3 Варианты концентрирования, применяемые в капиллярном электрофорезе.....	22
2 Экспериментальная часть.....	26
2.1 Исходные реактивы, материалы и используемая аппаратура.....	26
2.2 Приготовление растворов.....	27
2.2.1 Приготовление раствора гидроксида натрия с молярной концентрацией $c(\text{NaOH}) = 1,0$ моль/дм ³	27
2.2.2 Приготовление раствора гидроксида натрия с молярной концентрацией $c(\text{NaOH}) = 0,1$ моль/дм ³	28

2.2.3 Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты с концентрацией 500 мг/дм ³	28
2.2.4 Приготовление градуировочных растворов	28
2.2.5 Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты с концентрацией 10 мг/дм ³	28
2.2.6 Приготовление раствора борной кислоты с молярной концентрацией 0,2 моль/дм ³	29
2.2.7 Приготовление боратного буферного раствора	29
2.2.8 Приготовление основного раствора кофе	29
2.2.9 Приготовление раствора кофе для определения никотиновой кислоты	30
2.2.10 Алгоритм оценки показателя правильности методики анализа	30
2.2.11 Алгоритм оценки показателя внутрилабораторной прицезионности методики анализа	30
2.2.12 Алгоритм оценки показателя правильности методики анализа	31
2.3 Проведение анализа методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с применением стэкинга с большим объемом пробы и переключением полярности	32
2.3.1 Методика определения никотиновой кислоты методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с применением стэкинга ..	32
2.3.2 Расчет фактора эффективности концентрирования (SEF)	34
3 Результаты и обсуждения	35
Заключение	43
Список используемых источников	45
Приложение А Данные для расчета показателей качества методики анализа	53
Приложение В Отчет о патентно-информационных исследованиях	57

ВВЕДЕНИЕ

Растворимый кофе – высушенный экстракт натурального жареного кофе. Он является широко употребляемым напитком благодаря быстрому приготовлению, полезным свойствам и обладает приятным, но менее выраженным, чем у свежесжаренных зерен кофе, вкусом и ароматом, повышенным тонизирующим действием [1].

Для гарантии безопасности употребления физико-химические показатели растворимого кофе должны соответствовать регламентированным нормам ГОСТ Р 32776 – 2014 [2]: содержание влаги, кофеина, золы, металлических примесей, определение содержания глюкозы, способность растворения кофе в горячей и холодной воде.

Изменение индивидуального состава растворимого кофе от различных технологических факторов изучен недостаточно, в то время, как составу зеленого и жареного кофе уделяется большое внимание.

Качество растворимого кофе зависит не только от сохранившихся в готовом продукте водорастворимых соединений, но и образовавшихся в процессе производства растворимого кофе компонентов [3]. К сожалению, нередко на рынке оказывается фальсификационная продукция кофе, поэтому очень важно выявить вещества-маркеры растворимого кофе, содержание которых может изменяться в зависимости от состава сырья и которые определяют качество кофе [3, 4].

Кофе как продукт растительного происхождения содержит целый ряд витаминов, но особое место занимает никотиновая кислота. Этот микрокомпонент относят к классу витаминов, а его содержание в кофе обуславливает пищевую ценность продукта [3, 5]. Никотиновая кислота (НК) образуется в процессе обжаривания зерен из тригонеллина [6] и благодаря своей термической стабильности сохраняется в растворимом кофе. Исходя из этого, никотиновую кислоту можно рассматривать как потенциальный

показатель качества растворимого кофе, характеризующий технологические особенности его производства.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского госуниверситета, уникальный идентификатор RFMEFI59317X0008.

1 Аналитический обзор

Для производства жареного и растворимого кофе в Россию поступает большое количество сырья из разных стран. Около 60 % поступающего сырья приходится на растворимый кофе. Для привлечения потребителей с каждым годом совершенствуются технологии и рецептуры изготовления кофе. В состав кофейных зерен входит большое количество органических веществ. Все эти вещества исследуются различными научными лабораториями. Целью этих лабораторий является изучение химического состава зерен кофе, изменение веществ, входящих в этот продукт, а также поиск методов и технологий, которые будут обеспечивать повышение качества кофейного напитка. В связи с этим актуальным является изучение химического состава кофейных зерен, рассмотрение возможных трансформаций, происходящих с соединениями в процессе производства растворимого кофе, а также изучение методов определения компонентов наиболее важных для оценки качества растворимого кофе [3]. Все эти вопросы сложны, и в ряде случаев еще ждут своего решения.

1.1 Химический состав зеленого кофе

Химический состав зеленого, жареного, молотого и растворимого кофе образует около 2000 компонентов [7], но особое внимание уделяют водорастворимым экстрактивным веществам, так как именно они определяют состав кофе [8]. Примерно 21-30 % содержится в различных видах и сортах сырого кофе. Около 21 % содержится в высших сортах кофе вида Арабика, а во-вторых, сорта вида Робуста содержание количества экстрактивных веществ составляет 26-28 %. В зависимости от погодных условий и способов первичной переработки зерен в некоторых видах кофе содержание экстрактивных веществ выходит за эти пределы [8]. В состав экстрактивных веществ сырого кофе входят алкалоиды, белки, углеводы,

жиры, полифенольные соединения, моно- и дисахара, липиды, органические кислоты, эфирные масла, аминокислоты, минеральные элементы и некоторые другие вещества, содержащиеся в небольшом количестве [8].

Также в зеленых зернах кофе содержатся витамины: тиамин (B_1), рибофлавин (B_2), пантотеновая кислота (B_2), фолиевая кислота (B_9), аскорбиновая кислота (C), никотиновая кислота (PP), пиридоксин (B_6), витамин B_{12} (цианкобаламин) и токоферол (E) и др. [3, 8].

1.2.1 Полифенольные соединения

Как продукт растительного происхождения кофе имеет в своем составе полифенольные соединения. Они являются метаболитами растений и вовлекаются в защиту при агрессии патогенных микроорганизмов или от ультрафиолетового излучения.

Полифенолами кофе являются флавоноиды (к примеру, катехины) и фенольные кислоты [9]. В зеленых зернах кофе полифенольные соединения присутствуют в основном в виде семейства хлорогеновых кислот (ХГК). Эти кислоты включают различные группы соединений, образованных путем этерификации одной молекулы хинной кислоты с молекулами (одной, двумя или тремя) конкретного изомера транс – гидроксикоричной кислоты. Также семейство ХГК может быть разделено на следующие группы:

- моноэфиры хинной кислоты (кофеоилхинная, кумароилхинная, ферулоилхинная кислоты);
- диэфиры, три- и тетраэфиры кофейной кислоты (цикориевая или дикофеоилхинная кислота);
- смешанные эфиры различных оксикоричных кислот [10].

Из 45 различных кислот сложных эфиров в зеленых кофейных зернах в значительном количестве содержатся лишь некоторые группы соединений [3, 11, 12]:

- кофеилхинные кислоты, если $R=OH$ (около 81 % от общего содержания ХГК);
- ферулоилхинные кислоты, если $R=OCH_3$ (около 10 %),
- дикофеилхинные кислоты (около 8 %);
- *n*-кумароилхинные кислоты, если $R=H$.

В зеленых бобах кофе содержание ХГК может варьироваться в зависимости от степени созревания, сорта и генетики [12]. Важным фактором в установлении уровня содержаний является выбранная методика определения ХГК, так как по окончании проведения анализа могут быть выявлены расхождения между результатами, которые были получены с помощью хроматографических методов [13-18] и менее сложных методов [19]. По литературным данным содержание ХГК в зеленых кофейных зернах по отношению к сухому веществу находится в пределах от 4 до 8,4 % для кофе вида Арабика и от 7 до 14,4 % для кофе вида Робуста.

Наиболее значимым соединением из всего семейства ХГК в кофейных зернах является 5-кофеилхинная кислота (5-КХК), которую чаще всего и называют собственно хлорогеновой кислотой. Содержание 5-КХК составляет около 74 % по отношению ко всем изомерам кофеилхинной кислоты [20].

1.2.2 Пуриновые алкалоиды

Пуриновые алкалоиды в природе представлены метильными производными ксантина (рисунок 1).

Метилксантины в природе представлены такими веществами как кофеин, теofilлин и теобромин. Самым распространенным алкалоидом является кофеин, его содержание в зеленых зернах кофе варьируется от 9 до 14 грамм в одном килограмме зеленых зерен кофе, содержание теобромина и теofilлина насчитывается в сотни раз меньше, чем кофеина [21].



Рисунок 1 – Метилксантины

Для кофе вида Робуста характерна метилмочевая кислота – метиллиберин. Все эти вещества получают синтетически. Известно, что метилксантины стимулируют центральную нервную систему (особенно кофеин), стимулируют работу сердца, почек, активизируют физическую и психологическую активность человека, именно поэтому содержание этих веществ необходимо нормировать не только в лекарственных препаратах, но и в пищевых продуктах [3, 22].

1.2.3 Никотиновая кислота – компонент пищевых продуктов

Незаменимыми микрокомпонентами для человека являются витамины. Они важны для нормальной работы организма и поддержания здоровья. Попадая в организм, они начинают участвовать в жизненно важных процессах функционирования организма. Никотиновая кислота (ниацин, витамин РР, 3-пиридинкарбоновая кислота, рисунок 2) способен стимулировать кровообращение и мозговую деятельность, а также принимать участие в обмене аминокислот, белков, углеводов и жиров [3]. Данная кислота является производным пиридина [23]. Основными формами ниацина являются никотиновая кислота и ее амид – никотинамид (НА) [24].

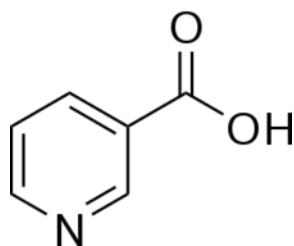


Рисунок 2 – Структурная формула никотиновой кислоты

По данным литературных источников [23, 24-27] НК содержится в продуктах животного и растительного происхождения: картофель, морковь, томаты, фрукты, злаки, орехи, семена подсолнечника, фасоль и др [3]. Но в свободном виде никотиновая кислота в этих продуктах содержится в малых количествах. Также было выявлено, 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 [3]. Причем никотиновая кислота и никотинамид в животном и растительном сырье находятся в основном в форме никотинамидаденин нуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФ) [28].

В некоторых исследованиях в образцах зеленого кофе НК найдена в малых количествах [3, 29-32], а в других данное соединение не было обнаружено [3, 29, 30]. Однако в статье [33] Perrone D. и другие проводили определение никотиновой кислоты, и было выявлено, что НК содержится во всех проанализированных образцах жареного кофе и ее содержание не зависит от видовых особенностей зерна [3, 33], но сильно варьируется по цвету образца [33]. В темных образцах кофе содержание никотиновой кислоты примерно в 3 раза больше, чем в светлых, также максимальное количество НК было выявлено в образцах растворимого кофе [34].

1.2.4 Тригонеллин – предшественник никотиновой кислоты

Изменения физико-химических свойств кофе происходит при обжаривании, когда кофейное зерно начинает приобретать темный цвет. Из литературы известно, что предшественником никотиновой кислоты в кофе является термически нестабильный тригонеллин (рисунок 3) [3, 35]. Исследованы зависимости содержаний никотиновой кислоты и тригонеллина в зернах от времени и температуры их обжаривания [3, 31, 35, 36]. С увеличением значений этих параметров уменьшается содержание тригонеллина в образцах, и возрастает концентрация никотиновой кислоты [3]. Так, изменение тригонеллина достигает 95 % при обжаривании зеленых зерен вида Арабика, 85% – вида Робуста, а содержание никотиновой кислоты в данных образцах возрастает в 5,7 и 6,5 раз, соответственно [36]. Авторы данной работы определили условия обжаривания зерен, при которых есть возможность формирования максимального количества никотиновой кислоты в продукте [37].

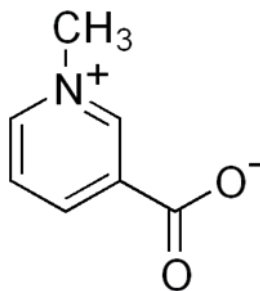


Рисунок 3 – Структурная формула тригонеллина

1.2.5 Другие компоненты кофе

Главным углеводом в зеленом кофе является сахароза, ее концентрация в среднем составляет 6-9% в сортах кофе вида Арабика и 3-7% вида Робуста. Помимо сахарозы в кофейных зернах есть и другие углеводы: глюкоза,

фруктоза, арабиноза и другие. Аминокислоты как составляющие структуры белков имеют определенное соотношение для других видов кофе.

В сырых кофейных зернах были найдены лимонная, яблочная, малеиновая, уксусная, щавелевая, фумаровая, янтарная и другие кислоты. Известно, что различные ботанические виды и сорта кофе отличаются кислотным составом (2,4-4,0 градуса Тернера). При хранении сырого кофе от 3-5 лет в нормальных условиях кислотность незначительно возрастает [8].

1.2 Производство кофе растворимого и изменение его состава

Самым часто употребляемым напитком в мире является кофе. Несмотря на тенденцию активного развития рынка натурального молотого жареного кофе в России, потребление растворимого кофе не уменьшается, поскольку простота и мгновенное приготовление такого напитка является преимуществом для многих потребителей [38]. Остается открытым вопрос о качестве производства растворимого кофе. Существует мнение, что растворимый кофе является менее качественным напитком, поскольку его производство приводит к опустошению вкуса и аромата, потери биологически активных компонентов во время дополнительных процессов: экстракции и сушки. В реальности эта потеря неизбежна, однако конкурентоспособный производитель растворимого кофе должен стремиться к максимальному сохранению полезных компонентов, вкусовых и ароматных свойств исходного жареного молотого кофе [3].

Производство растворимого кофе состоит из нескольких основных этапов (рисунок 4) [3].



Рисунок 4 – Основные этапы производства растворимого кофе

1.2.1 Выбор вида сырья для производства кофе

Выбор сырья – основополагающая стадия, так как от вида зеленых кофейных зерен зависит содержание биологически активных веществ [4]. Для производства растворимого кофе используют зеленый кофе видов Робуста и Арабика или их смесь [3].

Зеленый кофе вида Робуста по ряду исследований [26, 39, 40] содержит большее количество биологически активных соединений, таких как хлорогеновые и гидроксикоричные кислоты, кофеин, тригонеллин [3]. Большое количество этого вида кофе в смеси придает грубый и резкий вкус.

Напиток из смеси кофейных зерен вида Арабика придают напитку нежный вкус с тонким ароматом кофе. Несмотря на свою первоначальную несостоятельность в отношении биоактивных веществ, в кофейном напитке

из зерен Арабики наблюдается большее содержание хлорогеновых кислот, тригонеллина, чем в Робусте.

1.2.2 Обжаривание зерен

Для создания особого вкуса кофейного напитка подбираются оптимальный режим обжаривания зерен для создания характерного аромата и вкуса растворимого кофе. Кофейные зерна обрабатывают горячим воздухом в специальных обжарочных барабанах.

Растворимый кофе производят из кофейных зерен светлообжаренных, среднеобжаренных, темнообжаренных, высшей степени обжаривания, а также из их смеси. В процессе производства на стадии обжаривания контролируют уровень рН, потерю массы и экстрактивность.

Качественные показатели кофейной продукции являются результатом биохимических, физических и коллоидно-химических изменений во время термической обработки сырых зерен [41].

В процессе обжаривания кофейных зерен происходит их потемнение, эти изменения связаны с физико-химическими свойствами кофе. Все изменения в составе продукта при термическом воздействии на него начинаются с изменения состояния и формы связи воды во внутриклеточном пространстве, а также с отрыва молекул воды от твердого тела [8]. Вода активизирует все биохимические и физико-химические процессы, протекающие при обжаривании зерен кофе. Изменяющийся цвет и потеря массы, вследствие удаления влаги, характеризуют степень обжаривания, т.е. время и температуру обжаривания кофейных зерен [41, 42].

Процесс обжаривания сырых зерен кофе осуществляют при температуре 160-220 °С в течение 14-60 минут, включая стадию предварительной подсушки, до получения легко разламывающихся зерен коричневого цвета с выраженным кофейным ароматом [3, 8].

Авторами статьи [41] была выявлена оптимальная область обжаривания для получения высокоэкстрактивного полуфабриката, которая выражалась интервалом температур 200-220 °С и временем обжарки 13-16 минут, при этом учитывали величину рН и экстрактивность кофе. Вначале при обжаривании кофе величина рН снижается, достигая минимума 5-5,1 через 13 минут при 210-215 °С, затем несколько возрастает [41]. Максимум кислотности – 7,5 – достигается при температуре обжарки 210-215 °С на 13 минуте. Дальнейшее обжаривание при более высокой температуре (230-240 °С) способствует снижению кислотности [41]. В начале обжарки зеленых зерен кофе наблюдаются колебания кислотности, которые связаны с разложением органических кислот, а на последующих стадиях обжарки с образованием из сахарозы, моносахаров и полисахаридов летучих и нелетучих кислот [41].

Значительным изменениям подвергается тригонеллин, который разрушается с образованием никотиновой кислоты и ряда продуктов, участвующих в образовании аромата жареного кофе [8]. Casal S. и другие авторы статьи [36] наблюдали во время обжаривания зерен уменьшения содержания тригонеллина на 94,5 % для кофе вида Арабика и на 84,7 % для кофе вида Робуста. При этом содержание никотиновой кислоты в этих образцах увеличивалось в 5,6 и 6,5 раз соответственно [3]. Эти изменения наблюдались и при испытании модельных систем.

1.2.3 Измельчение

Процесс измельчения (грануляции) является важной частью производства растворимого кофе. Один и тот же вид кофе при разной степени измельчения кофейного зерна содержит разное количество экстрактивных водорастворимых веществ [8]. При грануляции кофе необходимо добиться, чтобы количество частиц размером более 1,5 мм

составляло большую часть всей массы частиц, а размером 0,5-0,6 мм [8] составляло около 3%.

1.2.4 Экстракция

Цель экстракции – максимально качественно и количественно извлечь полезные соединения кофе. При экстракции необходимо использовать воду, очищенную от солей магния и кальция. После вода подается в автоматический регулятор при давлении равном 1,5 МПа. Процесс экстракции ведут горячей водой, постепенно увеличивая ее температуру от 75 до 180 °С. Горячую воду пропускают через колонну с истощенным кофе и выводят через колонну со свежей порцией кофе. При этом содержание экстрактивных веществ в выходящем из колонны экстракте будет варьироваться от 20-26 % в зависимости от термической обработки и видов сырья.

Многие химические соединения, обнаруженные в обжаренном кофе, обладают различной скоростью экстракции. Хорошая растворимость в горячей воде и термическая стабильность никотиновой кислоты в растворах способствуют ее сохранению в процессе производственной экстракции молотых жареных зерен и накоплению в эквивалентном количестве в растворимом кофе [3].

Таким образом, важные изменения состава кофе происходит в процессе обжаривания зеленых зерен кофе, а экстракция создает состав характерный для растворимого кофе.

1.3 Методы определения никотиновой кислоты в кофе

Основными методами для определения никотиновой кислоты в кофе являются микробиологические, спектрофотометрические и хроматографические методы (таблица 1) [3].

Таблица 1 – Основные методы определения никотиновой кислоты в кофе

Объект анализа	Метод	Содержание, мкг/г продукта	Источник
Зеленый кофе	спектрофотометрический	16 - 44	32
	микробиологический	6 - 17	37, 43
	ВЭЖХ	25 - 28	30
Жареный кофе	спектрофотометрический	95 - 263	32
	микробиологический	27 - 327	6, 34, 37, 44
	ВЭЖХ	46 - 304	30, 31, 33, 42
Растворимый кофе	микробиологический	93 - 623	37
	ВЭЖХ	342 - 363	33
		< 100	34
		406 - 438	45
		233 - 531	46
		1014	43

Микробиологический метод успешно применен для определения ниацина в образцах зеленого и жареного молотого кофе разных видов и сортов [3, 37, 47]. Долгое время для определения витаминов группы В во всех пищевых продуктах применяли микробиологический метод микроорганизмом *L. plantarum* (8014), который являлся официальным на международном уровне (АОАС 944.13). Однако, несмотря на высокую чувствительность данного метода, все большее количество недостатков выявлялось при его применении [48]. К основным минусам относят длительность выполнения анализа и недостаточную воспроизводимость [49].

Спектрофотометрический метод по сравнению с микробиологическим является менее чувствительным, а также трудоемким и вредным для здоровья и не позволяет разделить никотиновую кислоту и никотинамид [49], [5]. Более того, производные пиридина образуют с реагентом окрашенные соединения, мешающие определению никотиновой кислоты, что требует предварительного выделения аналита из матрицы [6], [49]. Этот метод чаще применяют для определения общего содержания витамина РР в

хлебобулочных изделиях [50], а также продуктах переработки плодов и овощей [51].

1.3.1 Хроматографические методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах

Особое внимание при определении никотиновой кислоты уделяется пробоподготовке, так как этот компонент может находиться в разных формах. Цель – высвобождение ниацина для последующего определения хроматографическими методами.

Ниацин обладает относительной стабильностью, поэтому для подготовки проб мясной, молочной, рыбной продукции, а также различных видов орехов, круп, овощей и фруктов возможно проведение гидролиза [3, 25, 26, 28, 52, 53]. В статьях [25, 26, 28] было выявлено, что кислотный и ферментативный гидролиз способствуют высвобождению биологически активных форм витамина, в то время как щелочной [3] применяют для сбора информации об общем содержании ниацина в продукте. Чтобы освободить экстракт кофе от гидрофобных компонентов пробы возможно применение сорбентов с привитыми октадецильными группами C18, последующее концентрирование НК в пробе осуществляют на катион-обменной колонке [26, 53].

Li, H.X. и другие авторы статьи [27] проводили извлечение никотиновой кислоты из черной фасоли путем выдерживания пробы в водно-метанольном растворе в течение 24 часов [3].

При изучении научных статей, посвященных анализу различных видов кофе, было выявлено, что подготовка образцов чаще всего не предполагает проведение гидролиза компонентов пробы. Обычно экстракцию никотиновой кислоты проводят горячей водой [31, 33, 36, 44]. Возможна очистка экстракта кофе раствором ацетата свинца для осаждения основных фенольных компонентов пробы [3, 33].

Авторы статьи [31] для определения никотиновой кислоты 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°C, затем фильтровали и очищали экстракт на картридже RP18 SPE [3, 31].

Для определения никотиновой кислоты в кофе [3] хроматографическими способами широко применяют метод ВЭЖХ с УФ- [3] и/или масс-спектрометрическим детектированием [5, 30, 31, 33, 34, 45, 55] (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристики метода ВЭЖХ для определения никотиновой кислоты в кофе

Объект анализа	Пробоподготовка	Метод и его характеристика	Предел обнаружения, мг/л	Источник
Зеленый, жареный, растворимый кофе	Экстракция горячей водой, очистка экстракта основным ацетатом свинца, мембранная фильтрация [3]	ВЭЖХ-УФ-МС, колонка: Spherisorb S5 ODS2 Microbore; градиентное элюирование; элюент: 0,3 % р-р HCOOH, MeOH; скорость потока 2 мл/мин	0,0185-0,0617	33
Зеленый, жареный кофе	Экстракция горячей водой, фильтрация через бумажный фильтр	ВЭЖХ-УФ, колонка: Spherisorb ODS ₂ ; градиентное элюирование, элюент: 0,01 фосфатный буфер (pH 4,0), MeOH, скорость потока 1 мл/мин	0,10	30
Зеленый, жареный, растворимый кофе	Микроволновая экстракция, фильтрация	ВЭЖХ-УФ, колонки: PAK C18 и Bondapak NH ₂ ; изократическое элюирование, элюент - 0,02M H ₃ PO ₃ , - MeOH	0,02	45

Как видно из таблицы 2, определение никотиновой кислоты хроматографическими методами позволяет определить низкие пределы

обнаружения (1,8 нг/мл), но для данных методов требуются токсичные органические растворители, например, метанол [30, 31, 33, 44].

1.3.2 Электрофоретические методы определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах

Существуют различные методики для определения никотиновой кислоты в различных пищевых продуктах [25-28, 55], (некоторые из них представлены в таблице 3) методами капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) или мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии (МЭКХ).

Таблица 3 – Основные характеристики электрофоретических методов, применяемых для определения НК в различных продуктах

Вариант метода КЭ	Объект анализа	Напряжение, кВ	Буфер	Детектирование	Источник
КЗЭ	Семена подсолнечника, злаки, орехи, дрожжи	20	15% CH ₃ CN и 85% 0,02 М NaH ₂ PO ₄ , 0,02 М Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0	УФ, 254 нм	25
	Мясо, рыба, фрукты, овощи	25	7.5% CH ₃ CN, 92.5% 0.02 М, Na ₂ HPO ₄ , 0.02 М KH ₂ PO ₄ , pH 7.0	УФ, 254 нм	26
	Черная фасоль	20	0,02 М Na ₂ B ₄ O ₇ , 20% CH ₃ CN	УФ, 254 нм	27
МЭКХ	Бобы и чечевица	30	20% изопропанол и 80% 0,015 М ДДСН, 0,02 М Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 9,2	УФ, 254 нм	53

В своей работе Ward, С.М. и другие [55] проводили определение никотиновой кислоты в дрожжевых спредах с помощью капиллярного электрофореза. Освобождение ниацина проводили с помощью автоклавной пробоподготовки в водном растворе гидроксида кальция, после этого

полученный экстракт проводили через фильтр C18 Sep-Pak. Полученные данные по содержанию никотиновой кислоты с помощью капиллярного электрофореза (1,26 мг/г) были сопоставимы с результатами калориметрического метода АОАС (1,29 мг/г).

Определение ниацина в пищевых продуктах электрофоретическими методами проводят в немодифицированном кварцевом капилляре, ввод пробы осуществляется на анодном конце. В работах [25, 26, 34] для создания условия ионизации кислоты и миграции ее анионов к зоне детектирования вводят нейтральные или щелочные электролиты. Детектирование никотиновой кислоты происходит с помощью диодно-матричного детектора в УФ-области при длине волны 254 нм.

Электрофоретические методы анализа имеют ряд преимуществ по сравнению с хроматографическими методами – быстрота выполнения анализа, простота аппаратного оформления, отсутствие токсичных органических растворителей (например, метанол [30, 31, 33]).

Однако при изучении литературы не было найдено работ, посвященных определению никотиновой кислоты в кофе электрофоретическими методами. Определение микрокомпонентов, к которым относится и никотиновая кислота, не является частой практикой в виду низкой концентрационной чувствительности метода (нижний предел обнаружения около 0,7 мкг/мл [27]) по сравнению ВЭЖХ (нижний предел определения 0,05 мкг/мл [33]). Для повышения чувствительности метода капиллярного электрофореза (КЭ) возможно проведение различных вариантов онлайн концентрирования пробы в капилляре. Наиболее распространенным вариантом электрофоретического внутрикапиллярного концентрирования является стэкинг.

1.3.3 Варианты концентрирования, применяемые в капиллярном электрофорезе

В литературе описаны различные процедуры on-line концентрирования аналитов в капилляре, имеющие определенные требования, как к анализируемой пробе, так и к процедуре анализа (рисунок 5).

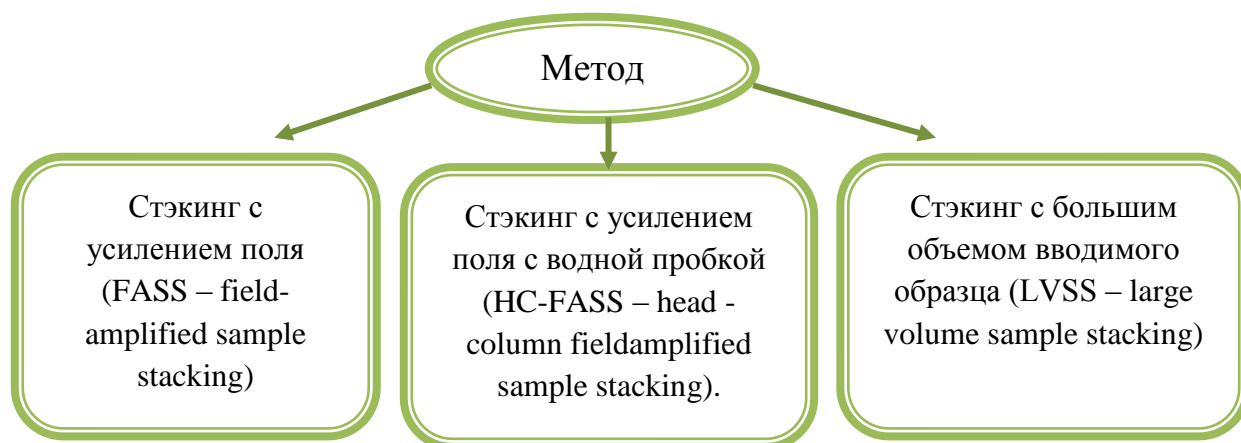


Рисунок 5 – Основные виды стэкинга, применяемые для концентрирования пробы в капиллярном электрофорезе

Стэкинг с усилением поля (FASS – field-amplified sample stacking) [61] – метод, основанный на различиях электропроводности матрицы образца и рабочего буфера. Этот метод широко используется в КЗЭ при определении низких концентраций аналитов (таблица 4).

Пробу гидродинамически вводят в кварцевый капилляр из раствора с меньшей электропроводностью, чем электропроводность буферного электролита. Ионы образца в растворе с более низкой проводимостью имеют большую электрофоретическую подвижность, чем в рабочем буфере [61]. Обязательное условия стэкинга с усилением поля заключается в следующем: ионная сила раствора образца должна быть значительно ниже, чем рабочего электролита [61]. С применением стэкинга с усилением поля достигается не менее, чем 10-кратное концентрирование пробы [56, 61].

Таблица 4 – Применение стэкинга с усилением поля в методе КЭ

Аналит	Объект анализа	Предел обнаружения, нг/мл	Источник
Никотин и его производные	Моча	0,55	57
Ионы Se (IV), Se (V)	Речная вода	0,057-0,071	58
Фенольные экотоксиканты	Питьевая вода	10	59
Лекарственные препараты (опиоиды)	Сыворотка крови	0,1	60

Одним из часто употребляемых методов on-line концентрирования аналитов является электростэкинг. Этот метод используют в процессе электрокинетического ввода пробы и называется стэкингом с усилением поля при вводе пробы. Большой объем пробы, растворенной в низкопроводящей матрице, электрокинетически вводят в кварцевый капилляр [56, 61]. Скорость электроосмотического потока (ЭОП) должна быть намного меньше электрофоретической скорости аналитов [61]. С использованием электростэкинга можно эффективно сконцентрировать только катионные или анионные аналиты, и при этом в большей степени - ионы с более высокой электрофоретической подвижностью [56, 61] (таблица 5).

Таблица 5 – Применение электростэкинга в методе КЭ

Аналит	Объект анализа	Предел обнаружения, нг/мл	Источник
Нуклеотиды	Биологические жидкости	0,04-0,07	60
Неорганические анионы	Почва, остатки от взрыва	310-640	62
Стероиды	Биологические жидкости	1-10	63

При анализе кислот в условиях, когда направления определяемых анионов и электроосмотического потока противоположны, возможно,

применение стэкинга с большим объемом образца (LVSS – large volume sample stacking) [61] и переключением полярности.

Вначале, гидродинамически вводится большой объем разбавленного образца, имеющего низкую проводимость. Далее на короткое время на входной конец капилляра подается отрицательное напряжение, и возникающий электроосмотический поток транспортирует все частицы пробы обратно в начало капилляра к катоду. При этом положительно заряженные и нейтральные частицы последовательно удаляются из системы. Анионы мигрируют с большей скоростью, чем скорость ЭОП в направлении анода и концентрируются в конце зоны пробы на границы с рабочим буфером. Концентрирование анионов в конце этой зоны обусловлено резким снижением их скорости миграции за счет высокой электропроводимости рабочего буфера. Завершение процедуры стэкинга происходит, когда матрица пробы почти полностью удалена, а анионы сконцентрированы в узкие зоны. В этот момент полярность меняют на положительную. Возникающий при этом электроосмотический поток транспортирует сконцентрированные анионы к катоду в сторону детектора. Анализ протекает в режиме зонного электрофореза [56, 61].

Метод капиллярного зонного электрофореза с применением процедуры LVSS используется для определения остаточных лекарственных препаратов, полифенолов в экстрактах растений, ионов ртути, гербициды и др. [56] (таблица 6).

Согласно данным, приведенным в таблицах 6-8, применяемые процедуры on-line концентрирования позволяют снизить предел обнаружения определяемых аналитов пробы

Таблица 6 – Применение стэкинга с большим объемом образца в методе КЭ

Аналит	Метод	Предел обнаружения, мкг/мл	Источник
Полифенольные соединения	Лечебные растения	0,009-0,016	64
Биогенные амины (белки)	Биологические жидкости	0,004-0,005	65
Пестициды	Сок, питьевая вода	0,003-0,004	66

Таким образом, анализ изученной литературы подтвердил актуальность темы и позволит сформулировать цель и задачи исследования.

Целью исследования является разработка методики определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом пробы и переключением полярности.

Задачи исследования:

Оценка возможности применения стэкинга с большим объемом пробы и переключением полярности для концентрирования никотиновой кислоты в капилляре в процессе анализа.

Выбор условий электрофоретического разделения никотиновой кислоты с компонентами пробы: фоновый электролит и значения условий проведения стэкинга.

Оценка показателей качества методики анализа.

Апробация разработанной методики на образцах растворимого кофе.

2 Экспериментальная часть

2.1 Исходные реактивы, материалы и используемая аппаратура

Для выполнения экспериментальных исследований использовались следующие средства измерений, устройства, реактивы, материалы:

- кварцевый немодифицированный капилляр с эффективной длиной 56 см (общая длина 64.5 см) и внутренним диаметром 50 мкм (Agilent Technologies, США);
- центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия);
- электроплитка бытовая «Искорка», Вятка;
- весы лабораторные ВЛР-200 2 класса точности, ТУ 25-06-1131-75;
- иономер «Эксперт – 001»;
- стеклянный электрод для измерения pH;
- магнитная мешалка (Lekі, 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);
- центрифуга MiniSpinEppendorf (Германия);
- пробирки одноразовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³, по ТУ 25–11–1592–81;
- 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 и 1.5 мл пропиленовые и стеклянные (Agilent, США) с полиуретановыми крышками для электрофоретического анализа;
- вода бидистиллированная, ГОСТ 6709–72;
- вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, х.ч. по ГОСТ 4172-76;
- натрий фосфорнокислый однозамещенный 2- водный, х.ч. по ГОСТ 245-76;
- борная кислота ($\geq 99,8 \%$)
- никотиновая кислота ($\geq 98 \%$, Sigma-Aldrich), имп.;
- натрия гидроксид по ГОСТ 4328-77 (х.ч.)
- образцы натурального растворимого кофе разных коммерческих наименований.

2.2 Приготовление растворов

2.2.1 Приготовление раствора гидроксида натрия с молярной концентрацией $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ моль/дм}^3$

Навеску гидроксида натрия массой 4,00 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см^3 с $50\text{-}60 \text{ см}^3$ бидистиллированной воды и объем в колбе доводят бидистиллированной водой до метки. Раствор перемешивают и хранят в емкости из полиэтилена с плотно закрывающейся крышкой [3, 67].

2.2.2 Приготовление раствора гидроксида натрия с молярной концентрацией $c(\text{NaOH}) = 0,1$ моль/дм³

10 см³ раствора гидроксида натрия, приготовленного по 2.2.1, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят объем в колбе до метки бидистиллированной водой и тщательно перемешивают [3, 67].

2.2.3 Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты с концентрацией 500 мг/дм³

На аналитических весах взвешивают 0,0500 г никотиновой кислоты с погрешностью 0,0002 г, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют и доводят объем до метки бидистиллированной водой [3, 67].

2.2.4 Приготовление боратного буферного раствора

Для приготовления боратного буферного раствора отобрать пипеткой 17 см³ раствора борной кислоты в мерный пластмассовый стаканчик, добавить примерно 18-20 см³ воды и довести рН до значения 9,0 путем добавления раствора натрия гидроксида 1 моль/дм³, затем отфильтровать полученный раствор через фильтр в колбу на 50 см³ и довести объем до метки бидистиллированной водой. Раствор хранят в емкости из полиэтилена с плотно завинчивающейся крышкой.

2.2.5 Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты с концентрацией 10 мг/дм³

0,5 см³ раствора никотиновой кислоты массовой концентрации 0,5 г/дм³ помещают в мерную колбу вместимостью 25 см³, доводят объем в колбе до метки бидистиллированной водой и тщательно перемешивают [3, 67].

2.2.6 Приготовление раствора борной кислоты с молярной концентрацией 0,2 моль/дм³

Навеску борной кислоты массой 1,2366 г растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ в 50-60 см³ бидистиллированной воды, доводят объем раствора в колбе до метки бидистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят в емкости из полиэтилена с плотно закрывающейся крышкой [3, 67].

2.2.7 Приготовление градуировочных растворов

В 6 мерных колб вместимостью 10 см³ примерно вносят 2–5 см³ бидистиллированной воды и с помощью мерной пипетки в каждую колбу последовательно вносят 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 см³ стандартного раствора никотиновой кислоты (2.2.5), объем доводят до метки бидистиллированной водой и растворы тщательно перемешивают. Содержание никотиновой кислоты в приготовленных растворах равно соответственно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мг/дм³ [3, 67].

2.2.8 Приготовление основного раствора кофе

Навеску аналитической пробы растворимого кофе массой 0,5 г поместить в мерную колбу вместимостью 100 см³, прилить приблизительно 30–40 см³ кипящей бидистиллированной воды и тщательно перемешать. Полученный раствор охладить до 18–20 °С под струей холодной воды. Довести объем бидистиллированной водой до метки [67].

2.2.9 Приготовление раствора кофе для определения никотиновой кислоты

Для приготовления раствора растворимого кофе содержанием 0,4 г в 1 литре необходимо из раствора основного кофе пипеткой отобрать 0,8 см³, перенести в колбу вместимостью 10 см³ и довести раствор бидистиллированной водой до метки.

2.2.10 Алгоритм оценки показателя правильности методики анализа

Оценку показателя правильности проводили на образце растворимого кофе «Индийский» производства «Москофе продукт» с концентрацией раствора растворимого кофе 0,4 г в 1 л.

Для этого готовили 8 навесок по п. 2.2.9, из которых были получены 8 рабочих проб (L).

Каждую пробу анализировали дважды и рассчитывали по каждой электрофореграмме содержание никотиновой кислоты (НК) (формула 1).

Таким образом, для каждой навески получены значения X_1 и X_2 (мкг/г) в условиях повторяемости.

Вся серия измерений L получена также в условиях повторяемости (в течение 1 суток, на одном оборудовании, один оператор, одни и те же реактивы).

2.2.11 Алгоритм оценки показателя внутрилабораторной прицезионности методики анализа

Оценку показателя внутрилабораторной прицезионности проводили на образце растворимого кофе «Индийский» производства «Москофе продукт» с концентрацией раствора растворимого кофе 0,4 г в 1 л.

Для оценки показателя внутрилабораторной прецизионности были выполнены следующие действия:

1. Готовили 2 навески по п. 2.2.9, из которых были получены 2 пробы (N).

2. Каждую пробу анализировали дважды и рассчитывали по каждой электрофореграмме содержание никотиновой кислоты (НК), (формула 1).

3. Таким образом, для 1-ой навески получены значения $X_{1,1}$ и $X_{1,2}$ (мкг/г), для 2-ой – $X_{2,1}$ и $X_{2,2}$ в условиях повторяемости (то есть две навески анализировали в один день, одним оператором и т.д.).

Аналогичным образом (пункт 1-3) повторяли эксперимент в разные дни, сменяя оператора, реактивы.

2.2.12 Алгоритм оценки показателя правильности методики анализа

Оценка показателя правильности методики выполняется с помощью применения метода добавок.

Для этого использовали образцы оценивания – кофе растворимый порошкообразный «Индийский» производства «Москофе продукт» и этот же образец кофе с введенной добавкой стандартного вещества никотиновой кислоты ($C_d = 500$ мкг/г). Использовали стандартное вещество никотиновой кислоты (≥ 98 %, Sigma-Aldrich).

Оценка показателя правильности состояла из следующих действий:

1. Готовили 2 навески по п. 2.2.9, из которых были получены 2 пробы (N). Отбирали часть каждой пробы и вводили в нее добавку НК. Получали две пробы без добавки и соответственно две пробы с добавкой.

2. Каждую пробу анализировали дважды и рассчитывали по каждой электрофореграмме содержание никотиновой кислоты (формула 1).

3. Таким образом, для 1-ой навески получены значения $C_{1,1}$ и $C_{1,2}$ (без добавки) и $C'_{1,1}$ и $C'_{1,2}$ (с добавкой), для 2-ой – $C_{2,1}$ и $C_{2,2}$ (без добавки) и для $C'_{2,1}$ и $C'_{2,2}$, (с добавкой) в условиях повторяемости.

Аналогичным образом (пункт 1-3) повторяли эксперимент в разные дни, сменяя оператора, реактивы.

Таким образом, получено по L=11 серий измерений и для проб без добавок и для проб с добавками. Каждая серия состоит из N=2 независимых определений в условиях повторяемости, каждое определение включает в себя анализ пробы в двух повторностях n=2 (две электрофореграммы).

2.3 Проведение анализа методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с применением стэкинга с большим объемом пробы и переключением полярности

2.3.1 Методика определения никотиновой кислоты методом капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) с применением стэкинга

Систему капиллярного электрофореза включают и выдерживают не менее 30 минут перед началом выполнения анализа [3, 67].

Электрофоретическое разделение компонентов проводят с помощью системы капиллярного электрофореза «Agilent^{3D} CE G1600A» с диодно-матричным УФ–детектором, немодифицированный кварцевый капилляр с эффективной длиной 56 см (общая длина 64,5 см) и внутренним диаметром 50 мкм, прозрачный в УФ–области спектра.

Оптимальные условия работы представлены в таблице 7.

Никотиновую кислоту детектируют при длине волны 254 нм, температура анализа 25° С, напряжение в системе +30 кВ.

Градуировочные растворы, приготовленные по п. 2.2.5, фильтруют через фильтры, затем в количестве 0,8 см³ помещают в тefлоновые пробирки Эппендорф, центрифугируют 3 мин со скоростью вращения 7000 об/мин., переносят в виалы и анализируют. Для образца растворимого кофе готовят три пробы, каждую из которых анализируют не менее трех раз. За результат анализа принимают среднее значение трех параллельных определений.

Таблица 7 – Условия определения никотиновой кислоты в растворе растворимого кофе методом КЗЭ-стэкинг

Кондиционирование		Параметры ввода пробы		Параметры обращения полярности	
Кондиционирование	Промывка	Давление ввода, мбар	Время ввода, с	Напряжение обращения, кВ	Время обращения, мин
- 2 минуты раствором NaOH 0,1 моль/дм ³ (п. 2.2.2), - 2 минуты раствором рабочего буфера	2 минуты бидистиллированной водой	50	500	-10	4,5

При помощи системы обработки хроматографических данных Chemstation получают электрофореграммы для заданных концентраций и строят график зависимости площади пика от концентрации вещества.

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 [3, 67].

Массовую концентрацию никотиновой кислоты в растворимом кофе, в мкг/г пробы, рассчитывают по формуле [3, 67]:

$$X_{\text{НК}} = \frac{C_{\text{НК}} \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot m}, \quad (1)$$

где $C_{\text{НК}}$ – содержание никотиновой кислоты, найденное по градуировочному графику или уравнению регрессии, мг/дм³;

V_1 – объем колбы, равный 100 см³;

V_2 – аликвота раствора кофе, взятая для разбавления, равная 0,8 см³;

V_3 – объем колбы для разбавления раствора кофе, равный 10 см^3 ;

m – масса навески пробы, равная $0,5 \text{ г}$.

2.3.2 Расчет фактора эффективности концентрирования (SEF)

Для расчета фактора эффективности используют данные полученные методом КЗЭ и КЗЭ-стэкинг раствора растворимого кофе, учитывают также коэффициент разбавления. Расчет проводят по формуле:

$$SEF = \frac{S_{\text{стэкинг}}}{S} \cdot k_{\text{разбавл}} , \quad (2)$$

где $S_{\text{стэкинг}}$ – площадь пика, полученная при КЗЭ-стэкинг, $\text{mAU} \cdot \text{s}$;

S – площадь пика, полученная при КЗЭ, $\text{mAU} \cdot \text{s}$;

$k_{\text{разбавл}}$ – коэффициент разбавления

3 Результаты и обсуждения

* Консультантом при выполнении исследования является канд. хим. наук Тищенко Е.А.

Изучение состава пищевого продукта может быть важным не только для оценки его пищевой ценности, но и для контроля технологического процесса производства продукта. Среди компонентов кофе никотиновая кислота занимает особое место. С одной стороны, этот микрокомпонент относят к классу витаминов (витамин РР), а с другой никотиновая кислота образуется в процессе обжаривания зерен из тригонеллина и благодаря своей термической стабильности сохраняется в растворимом кофе. Важно отметить, что в продуктах растительного происхождения никотиновая кислота содержится в связанной с полисахаридами и пептидами форме. Однако в растворимом кофе этот витамин находится преимущественно в свободной форме. Исходя из этого, никотиновую кислоту можно рассматривать как потенциальный показатель качества растворимого кофе, характеризующий технологические особенности его производства.

Для определения НК в кофе используют микробиологические [37, 38], спектрофотометрические [49] и хроматографические методы [16, 30, 31, 33, 44-46]. Последний метод наряду с двумя первыми является наиболее эффективным и в последние годы широко используется в различных модификациях.

Определение НК в пищевых продуктах проводят также электрофоретическими методами. Однако в изученной нами литературе не было обнаружено соответствующих методик, применяемых для кофе. Вероятно, это связано с низкой концентрационной чувствительностью метода капиллярного электрофореза (нижний предел обнаружения около 0,7 мкг/мл [27]) по сравнению с ВЭЖХ (нижний предел определения 0,05 мкг/мл [33]). Для повышения чувствительности метода капиллярного

электрофореза (КЭ) применяется процедура on-line концентрирования пробы в капилляре, называемая стэкингом (large volume sample stacking, LVSS) [56].

Целью данной работы является разработка методики определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом пробы и переключением полярности.

Для реализации данной цели поставлены следующие задачи:

1) Оценка возможности применения стэкинга с большим объемом пробы и переключением полярности для концентрирования никотиновой кислоты в капилляре в процессе анализа;

2) Выбор условий электрофоретического разделения никотиновой кислоты с компонентами пробы: фоновый электролит и значения условий проведения стэкинга;

3) Оценка показателей качества методики анализа;

4) Апробация разработанной методики на образцах растворимого кофе.

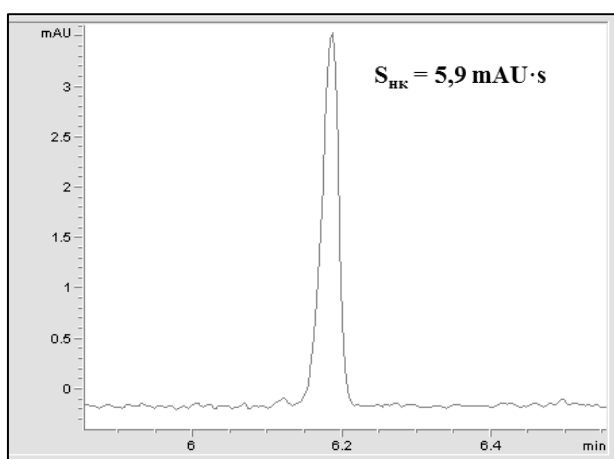
В литературе описаны различные процедуры on-line концентрирования аналитов в капилляре, имеющие определенные требования, как к анализируемой пробе, так и к процедуре анализа. При анализе кислот в условиях, когда направления определяемых анионов и электроосмотического потока противоположны, возможно, применение стэкинга с большим объемом образца и переключением полярности.

1) Вначале, гидродинамически вводится большой объем разбавленного образца, имеющего низкую проводимость.

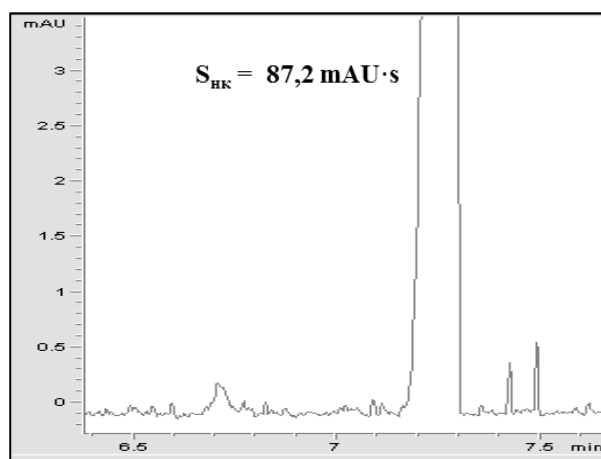
2) Далее на короткое время на входной конец капилляра подается отрицательное напряжение, и возникающий электроосмотический поток транспортирует все частицы пробы обратно в начало капилляра к катоду. В этот момент происходит концентрирование аналитов, в том числе и никотиновой кислоты, обусловленное различием электропроводимости пробы и электролита.

3) Завершение процедуры стэкинга происходит, когда матрица пробы почти полностью удалена, а анионы сконцентрированы в узкие зоны. В этот момент полярность меняют на положительную. Возникающий при этом электроосмотический поток транспортирует сконцентрированные анионы к катоду в сторону детектора и их разделение протекает в режиме зонного электрофореза.

Сравнение электрофореграмм, полученных в режиме КЗЭ и КЗЭ со стэкингом для модельного раствора НК и раствора растворимого кофе, показывает необходимость проведения процедуры концентрирования. Сравнения представлены на рисунках 6 и 7.

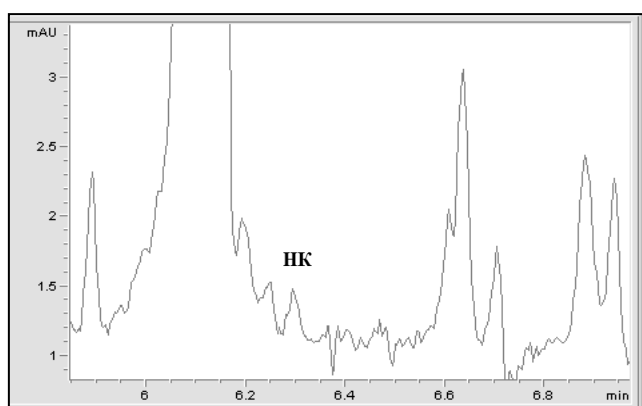


а)

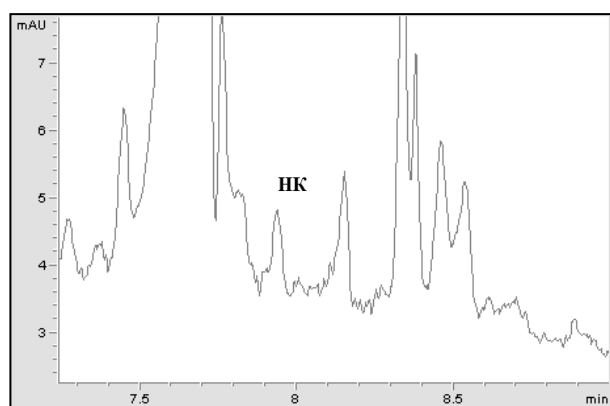


б)

Рисунок 6 – Электрофореграммы раствора никотиновой кислоты с концентрацией 20 мг/дм^3 , полученные методом: а) КЗЭ, б) КЗЭ-стэкинг



а)



б)

Рисунок 7 – Электрофореграммы раствора растворимого кофе: а) 6 г в 1 л (метод КЗЭ), б) 1,2 г в 1 л (метод КЗЭ-стэкинг)

Оптимизацию условий определения никотиновой кислоты методом КЗЭ с применением стэкинга начинали с выбора буфера. Кислоты в методе КЗЭ, как правило, определяют в форме анионов. Принимая во внимание, что константа устойчивости НК составляет 4,86, в качестве буферов могут использоваться системы с рН больше семи. Предварительный анализ электрофореграмм показал, что разрешающая способность выше, а время анализа в 1,5 раза меньше в боратном буфере по сравнению с фосфатным [3]. (рисунок 8).

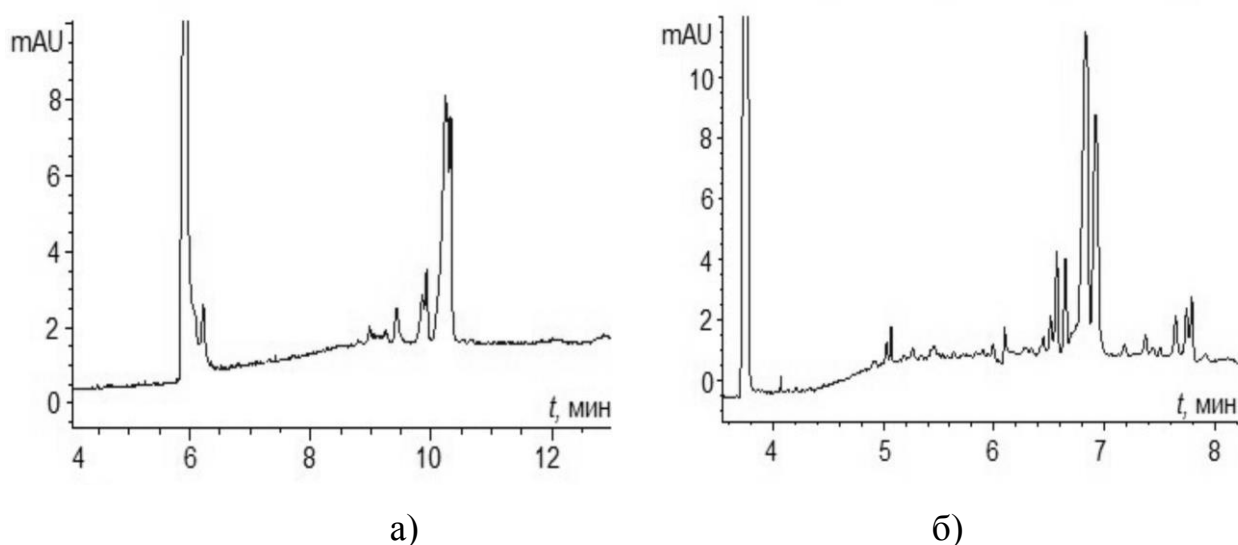


Рисунок 8 – Электрофореграммы раствора растворимого кофе 6 г в 1 л, полученные методом КЗЭ: а) фосфатный буфер рН 7,0, 40 мМ, и б) боратный буфер рН 9,2, 40 мМ

Для получения условий, обеспечивающих наилучшее разрешение пика НК и компонентами матрицы в режиме зонного электрофореза, варьировали величину рН боратного буфера в пределах от 8,0 до 9,5, а также его концентрацию от 10 до 70 мМ. Это позволило выделить ряд буферных систем, в которых обнаруживается сигнал никотиновой кислоты. Далее эти буферы были опробированы в режиме зонного электрофореза с использованием стэкинга.

Рассматривая изменение параметра разрешения от концентрации буферного раствора при разных рН установлено, что удовлетворительное разрешение достигается в системе с рН 9,0 при концентрации 70 мМ (рисунок 9). Дальнейшее увеличение концентрации не целесообразно, так как наблюдается увеличение шума на электрофореграмме.

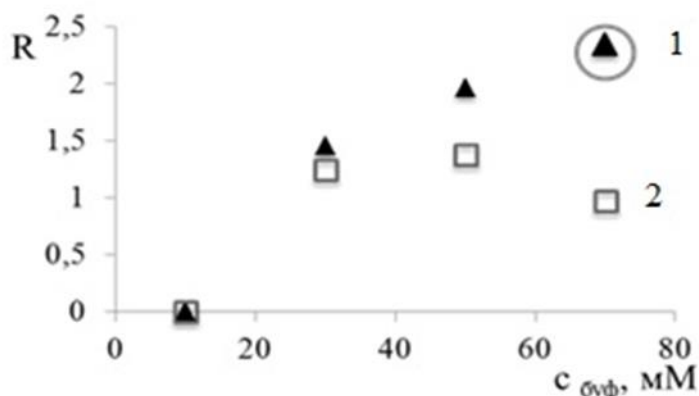


Рисунок 9 – Зависимость разрешения пика никотиновой кислоты от концентрации буфера при рН 9.0 (1) и 9.5 (2)

Увеличение напряжения до +30 кВ практически не влияет на разрешение и площадь пика НК, но значительно сокращает время ее миграции. Это стало решающим фактором при выборе оптимального значения напряжения +30 кВ [3].

Следующий этап исследования заключался в выборе оптимальных значений параметров стэкинга. Рассмотрены параметры ввода пробы и параметры обращения полярности, рассчитывается фактор эффективности концентрирования (SEF) аналита.

При выборе времени обращения полярности рассматривали изменение тока в системе при фиксированных параметрах напряжения обращения, давления, времени ввода пробы и определяли зону, где соблюдается условие стэкинга. В зоне соблюдения стэкинга площадь пика никотиновой кислоты практически не изменяется. За зоной стэкинга наблюдается либо неудовлетворительное разрешение пиков (при уменьшении времени

обращения), либо удаление кислоты из капилляра (при увеличении времени) (рисунок 10).

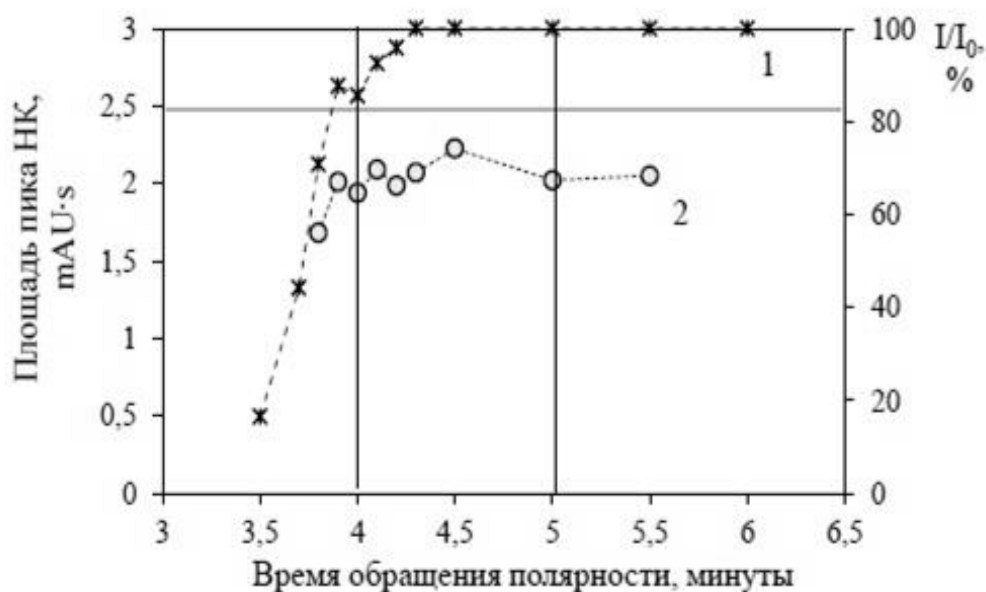


Рисунок 10 – Зависимости отношения величин I к I_0 (1) и площади пика НК (2) от времени обращения полярности (проба: 0.3 г на 100 мл воды, $t_{\text{ввод}}=500$ с, $U_{\text{обр}} = -10$ кВ, $U = +30$ кВ, $\lambda=254$ нм)

Аналогичные исследования были проведены при напряжении обращения -5 и -15 кВ и выбраны оптимальные диапазоны времени обращения. При работе в зоне стэкинга, время обращения при напряжении -5 кВ значительно возрастает при незначительном увеличении площади пика НК. Увеличение напряжения свыше -10 кВ не целесообразно ввиду уменьшения сигнала.

В рассмотренных условиях определения НК варьировали время ввода пробы от 400 до 600 с. При оптимизации учитывали не только величину площади пика, но и общее время анализа (таблица 8).

Таким образом, проведенный эксперимент позволил выбрать оптимальные условия концентрирования никотиновой кислоты и ее электрофоретического определения в растворимом кофе.

Таблица 8 – 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	1,7	1,4

В выбранных оптимальных условиях было получено линейное изменение АС никотиновой кислоты от ее концентрации в модельном растворе в диапазоне концентраций 0,1 – 1,0 мкг/мл (рисунок 11).

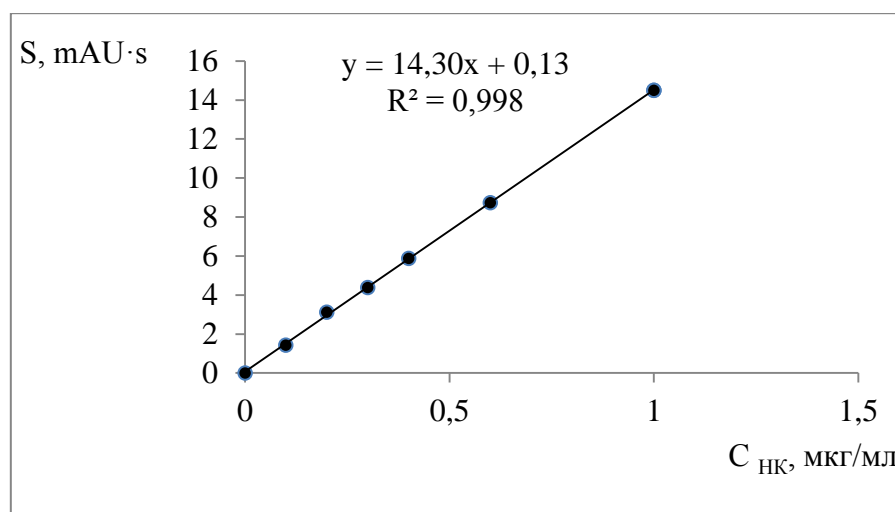


Рисунок 11 – Зависимость площади пика никотиновой кислоты от ее концентрации в модельном растворе

Оценку показателей качества методики определения никотиновой кислоты в растворимом кофе методом капиллярного электрофореза с применением стэкинга проводили согласно РМГ 61-2010 [3, 68]. Диапазон измерений массовой концентрации никотиновой кислоты составляет от 250 до 2500 мкг/г [3, 67].

Оценка показателей повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности проводили на образце растворимого кофе «Индийский» производства «Москофе продукт», содержание раствора растворимого кофе

0,4 г в 1 л. Правильности методики оценивали с применением метода добавок.

Полученные метрологические характеристики методики представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Метрологические характеристики методики определения НК в растворимом кофе, P = 0,95, n = 2

Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r, \%$	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), $\sigma_{R_L}, \%$	Показатель правильности (относительное среднеквадратическое отклонение правильности), $\sigma_c, \%$	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности P=0,95, n = 2), $\pm\delta, \%$
4	7	3	14

Точность разработанной методики не превышает 14 %

Разработанная методика апробирована на различных образцах растворимого кофе (рисунок 11) [4]. Установлено, что содержание никотиновой кислоты в испытуемых образцах варьируется в диапазоне 250-750 мкг/г, что согласуется с литературными данными (таблица 12).

Отмечено, что в образце «Fresco Arabica Solo» с маркировкой «темная обжарка» (таблица 10) содержание никотиновой кислоты примерно в 1,5 раза больше по сравнению с другими образцами [3]. Это может быть обусловлено образованием НК на высокотемпературных этапах производства растворимого кофе.

Таблица 10 – Содержание НК в образцах растворимого кофе

№ п/п	Образец	Содержание, мкг/г
1	Московская кофейня на паяхъ. Арабика	250 ± 35
2	Москофе продукт. Индийский	407 ± 57
3	Якобс Монарх	413 ± 58
4	Чибо Голд Селекшн	415 ± 58
5	Жардин Кения Килиманджаро	570 ± 80
6	Чибо Эксклюзив	432 ± 61
7	Черная карта Голд	509 ± 71
8	Жардин Колумбия Меделлин	513 ± 72
9	Жокей Триумф	550 ± 77
10	Москофе продукт. Московский	560 ± 78
11	Максвелл Хаус	570 ± 80
12	Migel Classic. Гранулированный	570 ± 80
13	Fresco Arabica Solo	750 ± 105

Таблица 12 – Концентрационный диапазон определения НК в растворимом кофе

Метод	Содержание, мкг/г	Источник
КЗЭ (капиллярный зонный электрофорез)	200-2500	[53]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1 Анализ литературных и экспериментальных данных показал, что при электрофоретическом определении никотиновой кислоты необходимо применение процедуры стэкинга для концентрирования аналита в капилляре перед его определением.

2 Выбраны оптимальные условия разделения никотиновой кислоты и компонентов матрицы: электролит – боратный буферный раствор с концентрацией 70 мМ и рН 9,0; напряжение в системе +30 кВ.

3 Установлены оптимальные условия концентрирования: время ввода 500 с при давлении 50 мбар, время обращения полярности – 4,5 минут, напряжение обращения -10 кВ.

4 Разработана «Методика определения массовой концентрации никотиновой кислоты в пробах растворимого кофе методом капиллярного зонного электрофореза с применением стэкинга с большим объемом вводимого образца» (МУ 08-47/411). Получены следующие метрологические характеристики: $\sigma_r = 4 \%$, $\sigma_{RЛ} = 7 \%$, $\sigma_c = 3\%$, $\pm \delta = 14 \%$.

5 Проведена апробация разработанной методики определения никотиновой кислоты в тринадцати образцах растворимого кофе методом КЗЭ-стэкинг. Содержание никотиновой кислоты в испытуемых образцах варьируется в диапазоне 250-750 мкг/г и согласуется с литературными данными.

6 Результаты проведенной работы опубликованы в V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (г. Краснодар, 2018 г.) [69].

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Васильев, Н.А. Качество растворимого кофе на потребительском рынке / Н.А. Васильев, Н.А. Батурина // Орловский государственный университет экономики и торговли. – 2016. – № 3. – С. 268–270.
- 2 ГОСТ 32776 – 2014. Кофе растворимый. Общие технические условия. – Введ. 2016 – 01 – 01. – М.: Стандартинформ, 2014. – С. 17.
- 3 Тищенко, Е.А. Оценка качества растворимого кофе по суммарным показателям и содержанию индивидуальных компонентов: диссертация на соискание уч. ст. канд. хим. наук.– Краснодар, 2018. – 162 с.
- 4 Тищенко, Е.А. Оценка качества растворимого кофе по суммарным показателям и содержанию индивидуальных компонентов: автореферат диссертации на соискание уч. ст. канд. хим. наук. – Краснодар, 2018. – 23 с.
- 5 Coffee: Physiology Edited by R.J. Clarke, R. Macrae. Elsevier applied science publishers LTD. 1998. p. 389.
- 6 Barton-Wright, E.C. The microbiological assay of nicotinic acid in cereals and other products / E.C. Barton-Wright // Biochem. J. – 1944. – V. 38. – P. 314.
- 7 Yashin, A. Chromatographic methods for coffee analysis: a review / A. Yashin [et al.] // Journal of Food Research. – 2017. – Vol. 6, №. 4. – С. 60–82.
- 8 Блинникова, О.М. Товароведение и экспертиза вкусовых товаров: Учеб. пособие / О. М. Блинникова. – Мичуринск: Издательство МичГАУ, 2007. – 234 с.
- 9 Wang, Y. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress / Y. Wang, C.T. Ho // J. Agric. FoodChem.–2009. –Vol.57. – P. 8109 – 8114.
- 10 Левицкий, А. П. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология / А.П. Левицкий [и др.] // Микробиология и биотехнология. – 2010. – №2. – С. 6–20.

- 11 Stalmach, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee / A. Stalmach [et al.] // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2006. – Vol.18. – №.1. – P. 253–262.
- 12 Farah, A. Phenolic compounds in coffee / A. Farah, C. M. Donangelo // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2006. – Vol.18. – №.1. – P. 12–25.
- 13 Vignoli, J.A. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material / J.A. Vignoli [et al.] // *Food Chemistry.* – 2011. – Vol.124. – P.863–868.
- 14 Moreira, D.P. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages/ D.P. Moreira [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53. – №5. – P.1399–1402.
- 15 Stalmach, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee / A. Stalmach [et al.] // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2006. – Vol.18. – №.1. – P. 253–262.
- 16 Bravo, J. Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds / J. Bravo [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* –2012. –Vol. 60. – P.12565–12573
- 17 Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews/ C. Delgado-Andrade, F.J. Morales // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol.53. –№ 5. – P. 1403–1407.
- 18 Castillo, M.D. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews/ Castillo M.D. [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – Vol. 50. – P. 3698–3703.
- 19 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.
- 20 Monteiro, M. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans / M. Monteiro [et al.] // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137. – № 10. – P. 2196–2201.

- 21 Татарченко, И. И. Химия субтропических и пищевкусковых продуктов: учебное пособие для студ. высш. учеб. Заведений / И.И. Татарченко [и др.]. – М: Издательский центр «Академия», 2003. – 256 с.
- 22 Андреева, Е. Ю. Метилксантины: свойства и определение в различных объектах / Е.Ю. Андреева [и др.] // Успехи химии. –2012. – Т. 81. – №5. – С. 397–414
- 23 Олейникова, И.Ю. Никотиновая кислота как объект фармацевтической химии / И.Ю. Олейникова, А.С. Шинкаренко // Молодой учёный. – 2017. – № 26. – С. 62–64.
- 24 Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия: учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 416 с.
- 25 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. – V. 60. – № 4, P. 667–674.
- 26 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. – V. 65. P. 263–270.
- 27 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. – V. 6(5). – P. 1327–1330.
- 28 Trenerry, V.C. The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages / V.C. Trenerry // Electrophoresis. – 2001. – V. 22. P. 1468–1478.
- 29 Coffee: Physiology / ed by R.J. Clarke, R. Macrae. – London: Elsevier applied science, publishers LTD. 1998. p. 389.
- 30 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.

31 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.

32 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.

33 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.

34 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.

35 Teply, L. J. Studies on the nicotinic acid content of coffee / L. J. Teply, W. A. Krehl, C.A. Elvehjem // *Arch. Biochem* – 1945. – V. 6. – P. 139

36 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. – V. 68. – P. 481–485.

37 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. BioI. Chem.* – 1985. – V. 49. – № 12. P. 3467–3471.

38 Наумова, В. В. Информационная фальсификация кофе / В. В. Наумова // *БМИК: Тез.докл.* – 2012. – Т.2. – №2. – С. 125

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

- 40 Farah, A. Coffee Constituents / A. Farah // Coffee: Emerging health effects and disease prevention. –2012. – Vol. 2. – P. 22-58.
- 41 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.
- 42 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. – V. 8. – № 9. P. 223–2242
- 43 Bressani, R. Niacin content of coffee in central America / R. Bressani, D.A. Navarrete // Journal of Food Science. – 1959. – Vol. 24. – P. 344–351.
- 44 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.
- 45 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.
- 46 Rodrigues, N.P. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn / N.P. Rodrigues, N. Bragagnolo // Journal of Food Composition and Analysis. – 2013. – Vol. 32. – P.105–115.
- 47 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.
- 48 Blake, C.J. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review / C.J. Blake // Anal Bioanal Chem. – 2007. – V. 389. P. 63–76.

49 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. – V. 65. – P. 129–133.

50 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.

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

52 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. – V. 16. – P. 93–106.

53 Diaz-Pollan, C. Niacin determination in legumes by capillary electrophoresis (CE). Comparison with high performance liquid chromatography (HPLC) / C. Diaz-Pollan, C. Vidal-Valverde // *J. High Resol. Chromatogr.* – 1998. – V. 21. – P. 81–86.

54 Caprioli, G. Quantification of caffeine, trigonelline and nicotinic acid in espresso coffee: the influence of espresso machines and coffee cultivars / G. Caprioli [et al.] // *Int J Food Sci Nutr.* – 2014. – V. 65. – № 4. – P. 465–469.

55 Ward, C.M. The application of capillary electrophoresis to the determination of total niacin in concentrated yeast spreads / C.M. Ward [et al.] // *Food Chemistry*. – 1997. – V. 58. – № 3, P. 185–192.

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

57 Baidoo, E.E.K. Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry / E. E.K. Baidoo [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – V. 796. – P. 303.

58 Duan, J. Nanometer-sized alumina packed microcolumn solid-phase extraction combined with field-amplified sample stacking-capillary electrophoresis for the speciation analysis of inorganic selenium in environmental water samples / J. Duan, B. Hu, M. He // *J. Electrophoresis*. – 2012. – V. 33. – P. 1–8.

59 Rodríguez, I. Combination of solid-phase extraction procedures with gas chromatographic hyphenated techniques for chlorophenol determination in drinking water / I. Rodríguez, R. Cela // *J. Chromatogr. A*. – 1997. – V. 778. – P. 279.

60 Zhang, C.X. Head-Column Field-Amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis. 2. Optimization with a Preinjection Plug and Application to Micellar Electrokinetic Chromatography / C.X. Zhang, W.Thormann // *J. Anal.Chem.* – 1998. – V. 70. – P. 540.

61 Потолицына В.Г. Расширение аналитических возможностей капиллярного электрофореза и капиллярной электрохроматографии для определения микроконцентраций белков в биологических жидкостях: диссертация на соискание уч. ст. канд. хим. наук. Санкт-Петербург, 2014. – 156 с.

62 Sarazin, C. Application of a new capillary electrophoretic method for the determination of carbohydrates in forensic, pharmaceutical, and beverage samples / C. Sarazin [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2010. – V. 1217. – P. 202–206.

63 Fang, H. Pressure-assisted field-amplified sample injection with reverse migrating micelles for analyzing trace steroids in MEKC / H. Hang [et al.] // *J. Electrophoresis*. – 2007. – V. 28. – P. 3697.

64 Lee, I.S.L. Extraction and on-line concentration of flavonoids in *Brassica oleracea* by capillary electrophoresis using large volume sample stacking / I.S.I. Lee, M.C. Boyce, M.C. Breadmore // *J. Food Chem.* – 2012. – V. 133. – P. 205–211.

65 Kawai, T. Toward 10,000-fold sensitivity improvement of oligosaccharides in capillary electrophoresis using large-volume sample stacking

with an electroosmotic flow pump combined with field-amplified sample injection / T. Kawai [et al.] // J. Anal.Chem.– 2010. – V. 82. – P. 6504

66 Hernandez-Borges, J. Combining solid-phase microextraction and on-line preconcentration-capillary electrophoresis for sensitive analysis of pesticides in foods / J. Hernandez-Borges [et al.] // J. Electrophoresis. – 2005. – V. 26. – P. 980.

67 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.

68 РМГ 61 – 2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа.– Введ. 2012 – 09 – 01. – М.: Стандартиформ, 2012. – С. 57.

69 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Данные для расчета показателей качества методики анализа

Таблица А.1 – Данные для оценки показателя повторяемости («Москофе продукт. Индийский»)

Серии измерений L	Результаты единичного анализа, полученные в условиях повторяемости, мкг/г	
	X ₁	X ₂
1	394	416
2	406	389
3	408	379
4	401	427
5	415	416
6	401	384
7	379	391
8	401	400

Таблица А.2 – Данные для расчета показателя повторяемости («Москофе продукт. Индийский»)

Среднее арифметическое значение (X)	Дисперсия (S _i ²)	Максимальное значение дисперсии (S ² _{max})	Критерий Кохрена G _{расч}	G _{табл} (v=1, f=8)	СКО повторяемости S _r , мкг/г)	Предел повторяемости (r, мкг/г)
405	248.10	424.27	0.310	0.680	13.1	36
398	146.80					
393	424.27					
414	330.31					
416	1.47					
392	146.80					
385	71.93					
401	0.21					

Таблица А.3 – Значения показателя повторяемости

Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) – σ_r , %	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами параллельных определений) при $P=0,95$, $n=2$ – r , %
4	9,1

Таблица А.4 – Данные для оценки показателя внутрилабораторной прецизионности («Москофе продукт. Индийский»)

Номер рабочей пробы W (L)	Условия внутрилабораторной прецизионности			Результаты анализа рабочей пробы, полученной в условия повторяемости N					
				1 заварка		2 заварка		Среднее арифметическое (по заваркам)	
	Оператор	Дата анализа	Реактивы	X	X	X	X	X ₁	X ₂
				1,1	1,2	2,1	2,2		
1	1	10.10.2018	буф. р-р от 10.10	404	428	396	401	416	398
2	1	11.10.2018		401	382	413	403	392	408
3	1	12.10.2018		425	392	416	437	409	427
4	2	17.10.2018	буф. р-р от 18.10	387	396	380	389	392	385
5	2	18.10.2018		336	350	394	392	343	393
6	2	19.10.2018		368	394	350	334	381	342
7	2	20.10.2018		442	415	389	365	428	377
8	2	23.10.2018	буф. р-р от 23.10	413	403	413	420	408	416
9	2	24.10.2018	буф. р-р от 24.10	399	413	350	362	406	356
10	2	25.10.2018	буф. р-р от 25.10	374	399	372	415	386	393
11	2	26.10.2018		380	379	336	374	380	355

Таблица А.5 – Значения внутрилабораторной прецизионности

Показатель внутрилабораторной прецизионности – σ_{R_b} , %	Предел внутрилабораторной прецизионности $P=0,95$, $n=2$ R_b , %
7	15,9

Таблица А.7 – Данные для оценки показателя правильности методом добавок («Москофе продукт. Индийский»)

Номер результата анализа L	Результаты анализа рабочей пробы без добавки, полученной в условия повторяемости N, мкг/г						Результат анализа пробы без добавки $C_{п}$, мкг/г	Результаты анализа рабочей пробы с добавкой, полученной в условия повторяемости N, мкг/г						Результат анализа пробы с добавкой с $C_{п+д}$, мкг/г
	1 заварка		2 заварка		Среднее арифметическо е			1 заварка		2 заварка		Среднее арифметическо е		
	$C_{1,1}$	$C_{1,2}$	$C_{2,1}$	$C_{2,2}$	C_1	C_2		$C'_{1,1}$	$C'_{1,2}$	$C'_{2,1}$	$C'_{2,2}$	C'_1	C'_2	
1	404	428	396	401	416	398	407	882	860	843	833	871	838	855
2	401	382	413	403	392	408	400	822	829	848	860	826	854	840
3	425	392	416	437	409	427	418	906	858	858	891	882	875	879
4	387	396	380	389	392	385	388	900	745	841	864	822	852	837
5	336	350	394	392	343	393	368	877	898	912	939	888	925	906
6	368	394	350	334	381	342	362	826	852	843	783	839	813	826
7	442	415	389	365	428	377	403	876	860	855	821	868	838	853
8	413	403	413	420	408	416	412	966	951	932	982	959	957	958
9	399	413	350	362	406	356	381	843	874	838	821	858	829	844
10	374	399	372	415	386	393	390	920	901	867	889	911	878	894
11	380	379	336	374	380	355	367	867	872	798	872	870	835	852

Таблица А.8 – Данные для оценки показателя правильности методом добавок («Москофе продукт. Индийский»)

Значение экспериментально найденной величины добавки $C_{д, \text{экспер}}$, МКГ/Г	$C_{п}$ (средн), МКГ/Г	$C_{п+д}$ (средн), МКГ/Г	$C_{д, \text{экспер}}$ (средн), МКГ/Г	$(C_{п} - C_{п+д})^2$, МКГ/Г	S_1	$(C_{п+д} - C_{п+д})^2$, МКГ/Г	S_2	θ	$\Delta_{\text{доб}}$	$\frac{S_1^2/L + S_2^2/L + \Delta_{\text{доб}}^2}{3}$	t-критерий	t (f=11, p=0,95)
447	390	868	477	2.9E+02	19.27	1.7E+02	39	-22.8	0.2	171	1.74	2.23
440				8.5E+01		7.6E+02						
461				7.4E+02		1.2E+02						
449				5.5E+00		9.1E+02						
538				5.0E+02		1.5E+03						
464				8.3E+02		1.7E+03						
450				1.5E+02		2.2E+02						
546				4.7E+02		8.1E+03						
463				9.3E+01		5.7E+02						
505				3.9E-01		7.2E+02						
485				5.4E+02		2.3E+02						
значение смещения незначимо												