

Идентификация и хроматографическое определение биоактивных компонентов в образцах растворимого кофе

**Е.А. Тищенко, Т.Г. Цюпко, В.В. Милевская, А.З. Темердашев*

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

*Адрес для переписки: *Тищенко Екатерина Александровна, E-mail: ekaterina-pydyk@mail.ru*

Поступила в редакцию 25 июня 2017 г., после доработки – 17 августа 2017 г.

Работа посвящена идентификации хлорогеновых кислот и их лактонов, а также определению основных изомеров этих кислот и кофеина в растворимом кофе методом ВЭЖХ-УФ-МС. Обсуждены особенности ВЭЖХ определения биоактивных компонентов (алкалоидов и фенольных соединений) в кофе. Выбраны условия хроматографического разделения основных фенольных соединений – изомеров хлорогеновых кислот (**ХГК**) и их производных, а также кофеина в растворимом кофе. В результате проведенных исследований идентифицированы мажорные компоненты, соответствующие основным изомерам кофеилхинных кислот (**КХК**) – 5-*O*-кофеилхинной (5-*O*-КХК), 3-*O*-кофеилхинной (3-*O*-КХК) и кофеину. С использованием литературных данных и результатов ВЭЖХ-УФ-МС анализа в испытуемых образцах растворимого кофе идентифицированы изомеры кофеилхинных, ферулоилхинных (**ФХК**) и дикофеилхинных (**диКХК**) кислот, а также некоторые их лактоны. Обнаружены компоненты со значениями *m/z* их депротонированных ионов, которые соответствуют кумароилхинной, ферулоил-кофеилхинным кислотам и некоторым конъюгатам производных коричной кислоты и триптофана. Определено содержание 5-*O*-КХК, 3-*O*-КХК и кофеина в тринадцати проанализированных образцах растворимого кофе, которое варьируется в диапазонах 3.4-11.6, 5.3-23.0 и 23.5-42.4 мг/г соответственно. Показано, что содержание ХГК в растворимом кофе может являться эффективным показателем качества данного продукта.

Ключевые слова: ВЭЖХ-УФ-МС, изомеры хлорогеновых кислот, лактоны хлорогеновых кислот, кофеин, растворимый кофе.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2017, vol. 21, no. 3, pp. 251-261

DOI: 10.15826/analitika.2017.21.3.008

Identification and chromatographic determination of bioactive components in the instant coffee samples

**E.A. Tishchenko, T.G. Tsiupko, V.V. Milevskaia, A.Z. Temerdashev*

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

*Corresponding author: *Ekaterina A. Tishchenko, E-mail: ekaterina-pydyk@mail.ru*

Submitted 25 June 2017, received in revised form 17 August 2017

This work is devoted to the identification of chlorogenic acids and their lactones as well as to the determination of the main isomers of these acids and caffeine in the instant coffee samples by HPLC-UV-MS. The features of HPLC determination of bioactive components (alkaloids and phenolic compounds) in coffee are discussed. The conditions for chromatographic separation of the main phenolic compounds - isomers of chlorogenic acids (CGA) and their derivatives, as well as for the caffeine in instant coffee, are selected. As a result of these studies the major components corresponding to the main isomers of caffeoylquinic acids (CQA) - 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), 3-caffeoylquinic acid (3-CQA) and caffeine were identified. Using the literature data and the results of HPLC-UV-MS analysis the isomers of caffeoylquinic acids, feruloylquinic acids (FQA) and dicaffeoylquinic acids (diCQA) and some of their lactones were identified in the test samples of instant coffee. The components with *m/z* values of their deprotonated ions, which correspond to the

coumaroylquinic, caffeoylferuloylquinic acids (CFQA) and some conjugates of cinnamic acid and tryptophan derivatives, were found. The content of 5-CQA, 3-CQA and caffeine in thirteen analyzed samples of instant coffee was determined and varied in the ranges of 3.4-11.6, 5.3-23.0 and 23.5-42.4 mg/g respectively. It was shown that the content of CGA in instant coffee can be an effective indicator of the quality of the product.

Keywords: HPLC-UV-MS, isomers of chlorogenic acids, lactones of chlorogenic acids, caffeine, instant coffee.

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к определению алкалоидов [1-4] и фенольных соединений [5-7] – биоактивных компонентов кофе обусловлен их способностью проявлять физиологическую активность в организме человека [8]. Не менее важным является участие этих соединений в формировании органолептических свойств напитка [9].

Одним из биоактивных соединений кофе является кофеин. Этот алкалоид достаточно термостабилен и практически не разрушается в процессе обжаривания зерен [10], поэтому его содержание в растворимом кофе будет зависеть от соответствующего содержания в зеленых зернах. К основным полифенольным соединениям, содержащимся в кофе, относят хлорогеновые кислоты. Это семейство сложных эфиров, образованных в результате реакции этерификации между хинной кислотой и одним или несколькими изомерами *транс*-коричной (кофейной, феруловой, *п*-кумаровой) кислоты. Из всего многообразия этих эфиров преобладающими в кофе являются кофеилхинные кислоты, в меньших количествах содержатся ферулоилхинные, дикофеилхинные и кумароилхинные кислоты [11]. Известно, что хлорогеновые кислоты (ХГК) проявляют антиоксидантные, фармакологические и антимуtagenные свойства [12, 13]. Их суммарное содержание в экстрактах зеленых зерен достигает до 50 % мас. [14] и значительно варьируется в зависимости от места произрастания кофейного дерева, климатических условий и сортовых особенностей [15]. В процессе производства растворимого кофе количество термически нестабильных ХГК сокращается за счет их частичной деградации [16,17], изомеризации [18, 19] и лактонизации [20, 21]. Часть кислот участвует в образовании меланоидинов, обуславливающих коричневый цвет напитка [22]. Продукты деградации ХГК – летучие фенольные компоненты формируют неповторимый кофейный аромат [23]. Содержатся в кофе также и свободные фенольные кислоты, но в незначительном количестве [6, 24], что связано с их способностью к полимеризации и окислению [20].

Определение кофеина и суммарного содержания ХГК в кофе проводят спектрофотометрически [25-27] и электрофоретически [22, 28, 29]. Индивидуальные кофеилхинные кислоты в этом продукте определяют методом мицеллярной электрокинетической хроматографии [24], а разделение практически всех известных изомеров ХГК достигается методом ВЭЖХ (табл. 1). На основе этого метода также разработаны различные методики определе-

ния кофеина в кофе [7, 32, 33]. Возможно и одновременное определение ХГК и кофеина в данном продукте хроматографическими методами [15, 34].

Детектирование аналитов после их хроматографического разделения осуществляют спектрофотометрически [7, 15, 18] или масс-спектрометрически [31]. В качестве неподвижных фаз в методе обращено-фазовой ВЭЖХ используют сорбенты с привитыми октадецильными (С18) [31, 15, 35], реже октильными (С8) [6] группами. Градиентное элюирование фенольных соединений проводят в водно-ацетонитрильной, чаще в водно-метанольной смеси с добавлением лимонной [15, 7, 36, 19], фосфорной [6, 35] и уксусной [20] кислот. Однако при масс-спектрометрическом детектировании предпочтительно использование муравьиной кислоты [31, 37], обеспечивающей необходимое значение рН и, в тоже время, достаточно нейтральной по отношению к ионной оптике и другим узлам хроматографа и масс-спектрометра.

В некоторых работах [6, 30], посвященных анализу кофе, исследуемыми компонентами являются различные биоактивные соединения, в том числе и основной изомер ХГХ; в других проводится разделение и определение всех изомеров ХГК в продукте [15, 18]. Ряд работ посвящен идентификации и одновременному определению не только изомеров хлорогеновых кислот, но и их лактонов в зеленом и жареном кофе [11, 19, 21, 38]. Актуальным является одновременное определение основных мажорных и минорных компонентов растворимого кофе.

Целью настоящей работы является масс-спектрометрическая идентификация хлорогеновых кислот и их лактонов, а также определение основных изомеров этих кислот и кофеина в образцах растворимого кофе методом ВЭЖХ-УФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагенты и растворители. Объектами исследования являлись образцы растворимого кофе разных производителей и наименований, приобретенные в розничной сети. Для проведения исследований использовали реактивы: хлорогеновая кислота – 3-*О*-КХК (≥ 95 %, Sigma-Aldrich, рис. 1, а), неохлорогеновая кислота – 5-*О*-КХК (≥98 %, Sigma-Aldrich, рис. 1, б), *транс*-феруловая кислота (≥ 96 % Sigma-Aldrich); 3,4-дигидроксibenзойная кислота (≥ 96 %, Merck), ванилиновая кислота (≥ 97 %, Fluka), 3,4-дигидроксикоричная кислота и (≥ 99 %, Acros Organics) и галловая кислота (≥ 98, Acros Organics), катехол (≥ 99 %, Acros Organics), кофеин

Таблица 1

ВЭЖХ определение фенольных соединений и кофеина в растворимом кофе

Table 1

HPLC determination of phenolic compounds and caffeine in the instant coffee

Аналит	Колонка	Элюент	Детектирование	Время анализа, мин	Источник
ХГК, ГК, КК, КрК, мКрК, ФК, КТХ, КФ	Nucleosil-100 C8 (125 мм×4.6 мм×5 мкм)	А: 1 % фосфорная к-та в воде; Б: 1 % фосфорная к-та в ацетонитриле	УФ-Вид	13	6
ХГК, КК, КФ	Kinetex C18, 2.6 мкм, 100 А°, 100 × 4.6 мм)	А: 1 % фосфорная к-та в воде; Б: 1 % фосфорная к-та в ацетонитриле	УФ	5	30
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 5-ФХК, 4-ФХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	C18 Nova Pak (250×4.6 мм×5 мкм)	А: 0.1 % соляная к-та в 5 % водном р-ре MeOH, Б: 0.1 % соляная к-та в 50 % водном р-ре MeOH	УФ-Вид	60	31
	Zorbax SB C18 (2,1×100 мм×1.8 мкм)	А: 0.1 % уксусная к-та в воде, Б: 0.1 % уксусная к-та в ацетонитриле	МС ³		
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 5-ФХК, 4-ФХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	Rexchrom ODS S5100	А: 10 мМ лимонная к-та, Б: MeOH	УФ-Вид	-	7
КФ		40 % MeOH в воде			
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 5-ФХК, 4-ФХК, 3-ФХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК	Spherisorb 5-ODS (250×5 мм)	А: 0.01 М цитрат натрия, Б: MeOH	УФ-Вид	45	18
5-КХК, 4-КХК, 3-КХК, 3,4-диКХК, 3,5-диКХК, 4,5-диКХК, КФ	Zorbax Eclipse XDB C18 (150×4.6 мм×5 мкм)	А: 10 мМ лимонная к-та, Б: MeOH	УФ-Вид	85	15
3-КХЛ, 4-КХЛ	C18 (ODS)-Hypersil (250×4.6 мм× 5 мкм)	А: 2 % уксусная к-та в воде, Б: MeOH (75:25)	УФ-МС	20	20

Сокращения: ГК – галловая кислота, КК – кофейная кислота, КрК – коричная кислота, ФК – феруловая кислота, м-КрК – метокси-коричная кислота, КТХ-катехин, КФ – кофеин, КХЛ – лактон кофеилхиновой кислоты.

Abbreviations: GA – gallic acid, CA – caffeic acid, TsA – cinnamic acid, FA – ferulic acid, m-TsA – methoxy-cinnamic acid, KTH – catechin, CF – caffeine, CGL – lactone of caffeoylquinic acid.

(х.ч., Лабтех), метанол («х.ч.», Вектон), муравьиная ки.слота (85%, Вектон). В работе использовали бидистиллированную воду.

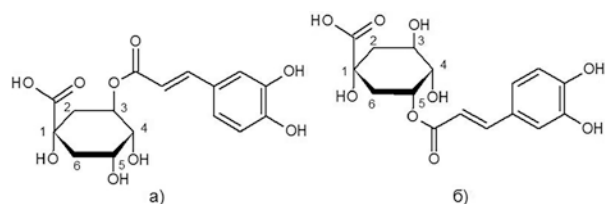


Рис. 1. Структурные формулы хлорогеновых кислот: а) 3-О-КХК, б) 5-О-КХК В дальнейшем по тексту статьи приводятся названия соединений в соответствии с коммерческими названиями использованных реактивов

Fig. 1. Structural formulas of chlorogenic acids: а) 3-О-СQA, б) 5-О-СQA. Subsequently, the title of the compounds is given in accordance with the commercial names of the reagents used

Оборудование. Анализ проводили с использованием ВЭЖХ-системы Shimadzu LC-20 Promipеse, оснащенной автосамплером (SIL-20A), градиентным насосом, обеспечивающим смешивание на стороне низкого давления (LC-20AD), дегазатором (DGU-20A₅), термостатом колонок (СТО-20АС) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Система соединена с моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором Shimadzu LCMS-2010EV. Генерацию основного и вспомогательного газа (азота) осуществляли с помощью генератора азота Dominic Hunter. Сбор и обработку данных проводили с использованием программного обеспечения LCMS Solution (Shimadzu).

Условия хроматографического разделения. Хроматографирование осуществляли в обращено-фазовом режиме на аналитической колонке Agilent Zorbax SB-C18 (150 × 2.1 мм, 5 мкм) с предохранительной колонкой Zorbax SB-C18 (20 × 2 мм,

5 мкм) со скоростью потока подвижной фазы 0.35 мл/мин и при температуре термостата колонок, равной 40 °С. В качестве подвижной фазы использовали 0.1 % водный раствор муравьиной кислоты (А) и метанол (Б). Разделение проводили в режиме градиентного элюирования: 0-2 минуты 0-2 % Б; 2-20 минут 2-20 % Б; 20-27 минут 20-40 % Б; 27-34 минуты 40-90 % Б; 34-36 минут 90 % Б; 36-40 минут 0 % Б. Объем вводимой пробы составлял 5 мкл, продолжительность анализа – 40 минут.

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

Приготовление растворов стандартных веществ и растворимого кофе. Приготовление основных растворов стандартных веществ осуществляли путем растворения их точной навески в метаноле. Для дальнейшего разбавления этих растворов использовали бидистиллированную воду. Образец растворимого кофе готовили растворением навески (0.25 г) продукта в горячей бидистиллированной воде (50 мл) с последующим охлаждением и фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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

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

На втором этапе проводили разделение и идентификацию компонентов растворимого кофе в выбранных условиях (рис. 2). Анализ полученной хроматограммы совместно со спектрами разделенных компонентов показал, что при 325 нм детектируется большое количество компонентов, максимумы поглощения которых характерны для гидроксикоричных кислот и их производных. На ос-

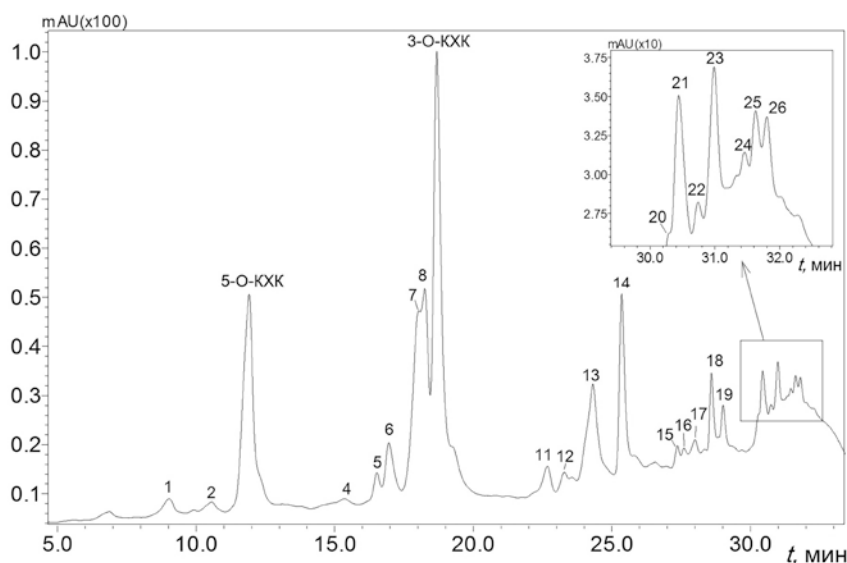


Рис. 2. Хроматограмма раствора растворимого кофе «Grand Classic» (325 нм)

Fig. 2. Chromatogram of the “Grand Classic” instant coffee solution (325 nm)

новании соответствия спектральных характеристик, времен удерживания аналитов и стандартных веществ были идентифицированы мажорные компоненты – основные изомеры кофеинных кислот (КХК): 5-О-КХК, 3-О-КХК. Детектирование разделенных компонентов кофе при 270 нм позволило одновременно получить аналитический сигнал, соответствующий кофеину ($\lambda_{\max} = 272$ нм).

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

Третий этап исследования заключался в МС-идентификации компонентов растворимого кофе, для которых не было стандартных веществ. По результатам ВЭЖХ-МС анализа в образцах растворимого кофе были найдены следующие основные группы изомеров ХГК: кофеилхинные, ферулоилхинные, дикофеилхинные кислоты и их лактоны, а также некоторые другие хлорогеновые кислоты и их производные.

Изомеры кофеилхинных кислот и их лактоны. Помимо двух мажорных кофеилхинных кислот, идентифицированных как 3-О-КХК и 5-О-КХК, в растворимом кофе найдено еще четыре хроматографических пика (1, 5, 6, 8), масс-спектры кото-

рых содержат интенсивный ион с $m/z = 353$, что указывает на наличие других изомеров КХК в составе кофе. Наибольший из вышеперечисленных пик 8 (время удерживания $t_{уд} = 18.2$ мин) может относиться к 4-О-КХК. Согласно литературным данным [13] этот компонент является третьим, наиболее распространенным изомером кофеилхинной кислоты. Это связано с тем, что именно в C_5 , C_3 и C_4 положениях циклогексанового кольца хинной кислоты расположены легко этерифицируемые кофейной кислотой гидроксильные группы. Пики 1, 5 и 6 могут относиться к продуктам цис-изомеризации или рацемизации хинной кислоты [11].

Производство растворимого кофе сопровождается термической обработкой зеленых зерен. В процессе их обжаривания около 10 % всех ХГК трансформируются в соответствующие лактоны (хинидины) путем отщепления от них молекулы воды с образованием внутримолекулярной эфирной связи между 1 и 5 углеродом в циклогексановом кольце хинной кислоты [20, 21]. Найдено, что 3- и 4-кофеил-1,5-хинидины содержатся в жареном кофе [20, 21, 38]. Нами идентифицированы два подобных компонента, содержащих на масс-спектре основной ион, величина m/z которого равна 335, что на восемнадцать единиц меньше соответствующей характеристики, полученной для КХК. Таким образом, пики 11 и 12 были отнесены к лактонам кофеилхинных кислот.

Изомеры ферулоилхинных кислот и их лактоны. Масс-спектры компонентов 7, 13 и 14 имеют интенсивный ион с $m/z = 367$, что соответствует депротонированному иону ферулоилхинных кислот (ФХК) ($M_r = 368$ г/моль). Компонент 7 плохо разделен с КХК на ВЭЖХ-УФ-хроматограмме (рис. 2) и потому его идентификация была бы затруднительна без МС-анализа (рис. 3).

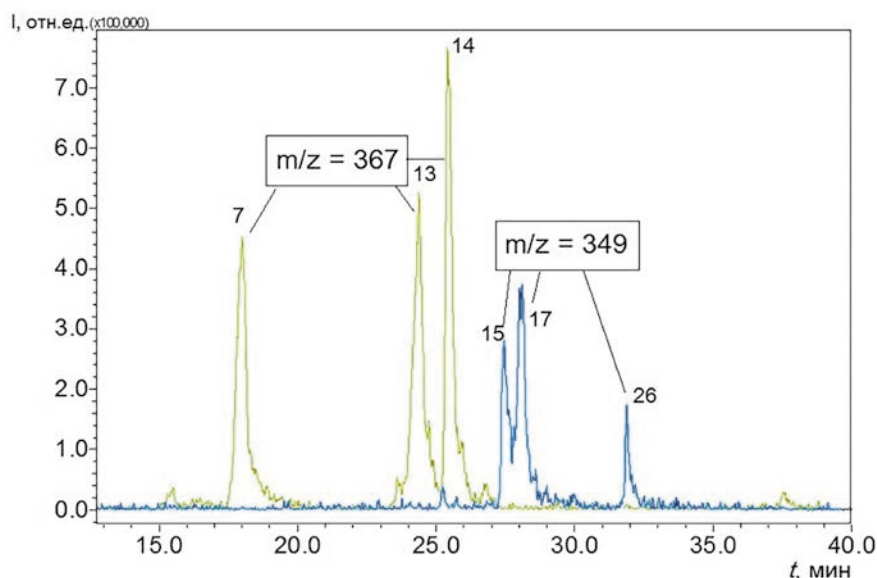


Рис. 3. Хроматограммы раствора растворимого кофе в режиме сканирования по выделенным ионам $m/z = 367$ и $m/z = 349$

Fig. 3. Chromatograms of the instant coffee solution with the scanning mode for $m/z = 367$ and $m/z = 349$ ions respectively

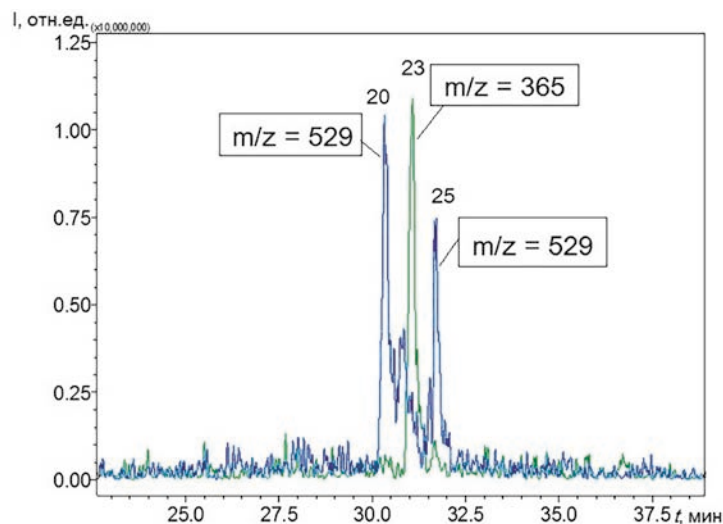


Рис. 4. Хроматограммы раствора растворимого кофе в режиме сканирования по выделенным ионам $m/z = 365$ и $m/z = 529$

Fig. 4. Chromatograms of the instant coffee solution with the scanning mode for $m/z = 365$ and $m/z = 529$ ions respectively

В наших исследованиях найдены три компонента (пики 15, 17 и 26), элюируемые после ферурилхинных кислот и имеющие на МС-спектре сигнал, соответствующий одинаковой величине m/z , равной 349 (рис. 3). В некоторых работах в кофе были идентифицированы компоненты с соответствующей относительной молекулярной массой. К ним относились как лактоны 3-ФХК и 4-ФХК [19, 34, 39], так и конъюгаты кумаровой кислоты и триптофана [34, 40]. В наших исследованиях два компонента (пики 15 и 17), имеющих весьма схожие хроматографические ($t_{15} = 27.4$ мин, $t_{17} = 28.0$ мин) и спектральные ($\lambda_{1,15} = 251$ нм и $\lambda_{2,15} = 326$ нм; $\lambda_{1,17} = 252$ нм и $\lambda_{2,17} = 327$ нм) характеристики, последние из которых согласуются с литературными данными [34], были отнесены к лактонам ФХК. Сильно удерживаемый компонент (пик 26) может являться кумарил-триптофаном [40]. Однако однозначное отнесение рассматриваемых пиков к этим соединениям возможно с проведением их МСⁿ-фрагментации.

Изомеры дикофеилхинных кислот и их лактоны. В процессе депротонирования компонентов растворимого кофе, последовательно элюируемых в виде трех пиков 18, 19 и 21, на полученном масс-спектре наблюдается интенсивный ион с $m/z = 515$. В работе [31] компоненты с соответствующими массами были идентифицированы в растворимом кофе как 3,4-, 3,5- и 4,5- диКХК.

Образование внутримолекулярной эфирной связи в молекуле хинной кислоты, что характерно для лактонов, не затруднено даже в случае, если ее C_3 и C_4 положения уже этерифицированы двумя молекулами кофейной кислоты. Дикофеилхинные лактоны являются неотъемлемой частью компонентного состава жареного кофе [19], некоторые из них сохраняются в процессе производства растворимого кофе. Пик 24 ($m/z = 497$) на представлен-

ной хроматограмме (рис. 2) может соответствовать одному из лактонов диКХК.

Другие хлорогеновые кислоты и их производные. Разнообразие ХГК в кофе весьма велико. Помимо выше идентифицированных представителей этой группы описано наличие нескольких десятков минорных кислот, общее содержание которых в кофе не превышает 1 % [11, 13, 41].

В результате ВЭЖХ-МС анализа некоторых образцов растворимого кофе, например, образца с наименованием «Арабика», изготовленного ЗАО «Московская кофейня на паяхъ», найден компонент с относительной молекулярной массой, равной 338 г/моль ($t_{уд} = 15.0$ мин), который может являться кумарилхинной кислотой [34]. Опираясь на литературные данные, можно сделать предположение, что компонент, соответствующий пику 23 и имеющий на масс-спектре ион с $m/z = 365$ (рис. 4), относится к кофеил-триптофану [11].

Известно, что при производстве растворимого кофе к основному сырью возможно добавление зерен кофе вида Робуста для увеличения степени экстрактивности [34, 42]. Характерной особенностью этого вида кофе является содержание в нем ферулоил-кофеилхинных кислот [43]. В наших образцах найдены компоненты (пики 20 и 25, $m/z = 529$), которые могут соответствовать изомерам таких смешанных ХГК (рис. 4).

Таким образом, проведена идентификация разделенных методом ВЭЖХ компонентов растворимого кофе и обобщенные идентификационные параметры для основных компонентов представлены в табл. 2.

Определение кофеина, 5- и 3-О-кофеилхинных кислот в различных коммерческих образцах растворимого кофе. Анализ литературных данных показал, что содержание ХГК в растворимом кофе зависит не только от исходного сырья,

Таблица 2

Результаты идентификации некоторых компонентов растворимого кофе

Table 2

Identification results of some instant coffee components

№ пика	Соединение	Идентификационные параметры		
		$t_{уд}$, мин	λ_{max} , нм	m/z
1	изомер КХК	9.1	327	353
3	5-О-КХК	11.9	234, 298, 325	353
5	изомер КХК	16.5	246, 269, 327	353
6	изомер КХК	16.9	244, 298, 326	353
7	изомер ФХК	18.0	243, 293, 326	367
8	изомер КХК	18.2	243, 297, 326	353
9	3-О-КХК	18.7	242, 297, 326	353
10	кофеин	21.2	272	195
11	лактон изомера КХК	22.7	275, 327	335
12	лактон изомера КХК	23.2	277, 327	335
13	изомер ФХК	24.3	246, 294, 327	367
14	изомер ФХК	25.3	245, 293, 326	367
15	лактон изомера ФХК	27.4	251, 283, 326	349
17	лактон изомера ФХК	28.0	252, 283, 327	349
18	диКХК	28.6	247, 292, 326	515
19	диКХК	29.0	249, 291, 327	515
21	диКХК	30.4	248, 291, 327	515
24	лактон изомера диКХК	31.4	249, 283, 325	497

но и технологии производства, а также соблюдения технологического режима [10, 13, 31]. Принимая во внимание, что ХГК, как и кофеин, являются широко известными биологически активными веществами, содержание этих кислот в продукте может быть перспективным для оценки качества растворимого кофе.

Для определения содержаний 3-О-КХК, 5-О-КХК и кофеина в образцах растворимого кофе для соответствующих веществ получены градуировочные зависимости, коэффициенты корреляции которых имели значения не ниже 0.99. Определение

этих компонентов проводили в диапазоне от 1 до 50 мг/г. Погрешность определения аналитов в модельных растворах, рассчитанная на основе данных, полученных методом «введено-найдено», не превышала 5 %.

Проведен анализ образцов растворимого кофе различных коммерческих наименований, результаты представлены в табл. 3.

Содержание кофеина в испытуемых образцах (1-13) варьируется в диапазоне от 23.5 до 42.4 мг/г. В среднем его массовая доля составляет 3.0 %, что согласуется с литературными данными [2, 3, 7]. Наи-

Таблица 3

Результаты ВЭЖХ-УФ-определения содержаний изомеров кофеилхиновых кислот и кофеина в растворимом кофе

Table 3

HPLC-UV determination results of the caffeoylquinic acid isomers and caffeine content in the instant coffee

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

меньшее значение этого показателя – 2.4 % получено для образца 1, однако оно не выходит за границы установленной нормы для растворимого кофе (не менее 2.3 %) [44]. Содержание 3-О-КХК в образцах в 1.5-2 раза выше, чем содержание 5-О-КХК. Значения этих компонентов варьируются в диапазонах 5.3-23.0 и 3.4-11.6 мг/г соответственно.

В растворе образца гранулированного кофе наименования «Красная цена. Classic» отмечено наличие нерастворимых в воде частиц. Массовая доля кофеина в этом образце составила величину 1.5 %, что в 1.5 раза ниже установленной ГОСТ 32776-2014 нормы для этого продукта [44]. Поэтому данный образец был отнесен нами к продукту ненадлежащего качества. Необходимо отметить, что содержание 5-О-КХК и 3-О-КХК в образце гранулированного кофе наименования «Красная цена. Classic» минимально по сравнению с другими образцами.

Стоит отметить, что в образце «Nescafe Classic CREMA» сумма содержаний 5-О-КХК и 3-О-КХК (24.0 мг/г) примерно в два раза меньше аналогичной величины для образца «Nescafe Classic» (13.2 мг/г). Существенное различие в значениях содержаний КХК наблюдаются для образцов растворимого кофе, произведенных одной компанией, но с применением зерен разного географического происхождения. Так, например, образцы сублимированного кофе «Жардин Гватемала» и «Жардин Колумбия» в среднем содержат 7.0 и 10.0 мг/г 5-О-КХК и 3-О-КХК соответственно. В то время как для образца «Жардин Килиманджаро» эти значения составляют 3.8 мг/г для 5-О-КХК и 6.0 мг/г для 3-О-КХК.

Таким образом, содержание ХГК в растворимом кофе может служить показателем качества этого продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Благодарности

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

Acknowledgements

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Евлашенко И.В., Аскалепова О.И., Алешина И.Г. Определение содержания кофеина в чае и кофе классическими аналитическими методами // Известия вузов пищевая технология. 2000. № 2-3. С. 88-90.
2. A comparative study on caffeine estimation in coffee samples by different methods / T.N. Gopinandhan [et al.] // Int. J. Curr. Res. Chem. Pharma. Sci. 2014. V. 1, № 8. P. 4-8.
3. Santos J.R., Rangel A.O.S.S. Development of a chromatographic low pressure flow injection system: Application to the analysis of methylxanthines in coffee // Analytica Chimica Acta. 2012. V. 715. P. 57-63.
4. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares / L. López-Martínez [et al.] // Analytica Chimica Acta. 2003. V. 493. P. 83-94.
5. Яшин А.Я. ВЭЖХ фенольных кислот – антиоксидантов с амперометрическим детектированием // Сорбционные и хроматографические процессы. 2014. Т.14, № 3. С. 419-427.
6. HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market / K. Belguidoum [et al.] // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2014. V. 45, № 4. P. 1314-1320.
7. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages / D.P. Moreira [et al.] // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53, № 5. P. 1399-1402.
8. Cano-Marquina A., Tarín J.J., Cano A. The impact of coffee on health // Maturitas. 2013. V. 75. P. 7-21.
9. Esquivel P., Jiménez V.M. Functional properties of coffee and coffee by-products // Food Research International. 2012. V. 46. P. 488-495.
10. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees / J.A. Vignoli [et al.] // Food Research International. 2014. V. 61. P. 279-285.
11. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars / D. Perrone [et al.] // Food Chem. 2008. V. 106. P. 859-867.
12. Farah A., Donangelo C. M. Phenolic compounds in coffee // Braz. J. Plant Physiol. 2006. V. 18, № 1. P. 12-25.
13. Farah A. Coffee Constituents // Coffee: emerging health effects and disease prevention, edited by Yi-Fang Chu. Wiley-Blackwell. 2012. Ch.2. P. 21-58.

14. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts / A.P. Craig [et al.] // *Talanta*. 2016. V. 154. P. 481-485.
15. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities / N. Liang [et al.] // *Food Chem.* 2016. V. 213. P. 251-259.
16. Trugo L.C., Macrae R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC // *Food Chem.* 1984. V. 15. P. 219-227.
17. Moon J.K., Yoo H.S., Shibamoto T. Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57, № 12. P. 5365-5369.
18. Trugo L.C., Macrae R. Chlorogenic acid composition of instant coffees // *Analyst*. 1984. V. 109. P. 263-266.
19. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees / A. Farah [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54, № 2. P. 374-381.
20. HPLC analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee / C. Bennat [et al.] // *Z. Lebensm Unters Forsch.* 1994. V. 199. P. 17-21.
21. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee / A. Farah [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 1505-1513.
22. Delgado-Andrade C., Rufian-Henares J.A., Morales F.J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods // *Agric. Food Chem.* 2005. V. 53, № 20. P. 7832-7836.
23. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective / W.B. Sunarharum [et al.] // *Food Research International*. 2014. V. 62. P. 315-325.
24. 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. P.137-144.
25. Moores R.G., McDermott D.L., Wood T.R. Determination of chlorogenic acid in coffee // *Analytical Chemistry*. 1948. V. 20, № 7. P. 620-624.
26. Belay A., Gholap A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy // *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 2009. V. 3, № 11. P. 234-240.
27. ГОСТ ISO 4052–2013. Кофе. Определение содержания кофеина. Контрольный метод. М., 2015. 16 с.
28. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee / A.D. Meinhardt [et al.] // *Food Chem.* 2010. V. 120. P. 1155-1161.
29. Nogueira T., do Lago C. L. Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and separation by CZE // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. P. 3570-3574.
30. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column / M.A. Rostagno [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. 2011. V. 685. P. 204-211.
31. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee / C.E. Mills [et al.] // *Food Chem.* 2013. V. 141, № 15. P. 3335-3340.
32. 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 Chem.* 2008. V. 110. P. 1030-1035.
33. ГОСТ ISO 20481 Кофе и кофейные продукты. Определение содержания кофеина с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Стандартный метод. М., 2014. 17 с.
34. Rodrigues N.P., Bragagnolo N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSⁿ // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2013. V. 32. P. 105-115.
35. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry / H. Morishita [et al.] // *Journal of Chromatography*. 1984. V. 315. P. 253-260.
36. Monteiro M.C., Farah A. Chlorogenic acids in Brazilian Coffea arabica cultivars from various consecutive crops // *Food Chem.* 2012. V.134. P. 611-614.
37. O'Driscoll D.J. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *MethodsX*. 2014. V. 1. P. 264-268.
38. Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee / K. Schrader [et al.] // *J Sci Food Agric*. 1996. V. 71. P. 392-398.
39. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids / M.N. Clifford [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 2900-2911.
40. Clifford M.N., Knight S. The cinnamoyl–amino acid conjugates of green robusta coffee beans // *Food Chem.* 2004. V. 87. P. 457-463.
41. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids / M.N. Clifford [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54, № 6. P. 1957-1969.
42. Блиникова О.М. Товароведение и экспертиза вкусовых товаров: учеб. пособие // Мичуринск.: МичГАУ, 2007. 234 с.
43. Clifford M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000. V. 80. P. 1033-1043.
44. ГОСТ 32776–2014 Кофе растворимый. Общие технические условия. М., 2014. 16 с.

REFERENCES

1. Evlashenkova I.V., Askalepova O.I., Aleshina I.G. [Determination of caffeine content in tea and coffee by classical analytical methods]. *Izvestiia vuzov. Pishchevaia tekhnologiya* [Proceedings of Higher Education. Food technology], 2000, no. 2-3, pp 88-90 (in Russian).
2. Gopinandhan T.N., Banakar M., Ashwini M.S. Basavaraj K. A comparative study on caffeine estimation in coffee samples by different methods. *Int. J.Curr. Res. Chem. Pharma. Sci.*, 2014, vol. 1, no. 8. pp. 4-8.
3. Santos J.R., Rangel A.O.S.S. Development of a chromatographic low pressure flow injection system: Application to the analysis of methylxanthines in coffee. *Analytica Chimica Acta*, 2012, no. 715, pp. 57- 63. doi: 10.1016/j.aca.2011.12.002.
4. López-Martinez L., López-de-Alba P.L., Garcia-Campos R., De León-Rodríguez L.M. Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 493, pp. 83-94. doi: 10.1016/S0003-2670(03)00862-6.
5. Yashin A. Ya. [HPLC of phenolic acids - antioxidants with amperometric detection]. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssesy* [Sorptions and Chromatographic Processes], 2014, vol. 14, no. 3, pp. 419-427 (in Russian).

6. Belguidoum K., Amira-Guebailia H., Boulmouk Y., Houache O. HPLC coupled to UV–vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2014, vol. 45, no. 4, pp. 1314–1320. doi: 10.1016/j.jtice.2014.03.014.
7. Moreira D.P., Monteiro M.C., Ribeiro-Alves M., Donangelo C.M., Trugo L.C. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. *J. Agric. Food Chem*, 2005, vol. 53, no. 5, pp. 1399–1402. doi: 10.1021/jf0485436.
8. Cano-Marquina A., Tarín J.J., Cano A. The impact of coffee on health. *Maturitas*, 2013, vol. 75, pp. 7–21. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.02.002.
9. Esquivel P., Jiménez V.M. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 2012, vol. 46, pp. 488–495. doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028.
10. Vignoli J.A., Viegas M.C., Bassoli D.G., Benassi M.T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*, 2014, vol. 61, pp. 279–285. doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.006.
11. Perrone D., Farah A., Donangelo C.M., de Paulis T., Martin P.R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chemistry*, 2008, vol. 106, pp. 859–867. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.06.053.
12. Farah A., Donangelo C. M. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol*, 2006, vol. 18, no 1, pp. 12–25. doi: 10.1590/S1677-04202006000100003.
13. Farah A. Coffee Constituent. *Coffee: emerging health effects and disease prevention*, edited by Yi-Fang Chu. Wiley-Blackwell, 2012, ch.2, pp. 21–58. doi: 10.1002/9781119949893.ch2.
14. Craig A.P., Fields C., Liang N., Kitts D., Erickson A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. *Talanta*, 2016, vol. 154, pp. 481–485. doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.101.
15. Liang N., Liang W., Kennepohl P., Kitts D.D. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry*, 2016, vol. 213, pp. 251–259. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.041.
16. Trugo L.C., Macrae R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem*, 1984, vol. 15, pp. 219–227. doi: 10.1016/0308-8146(84)90006-2.
17. Moon J.K., Yoo H.S., Shibamoto T. Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity. *J. Agric. Food Chem*, 2009, vol. 57, no. 12, pp. 5365–5369. doi: 10.1021/jf900012b.
18. Trugo L.C., Macrae R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. *Analyst*, 1984, vol. 109, pp.263–266. doi: 10.1039 / AN9840900263.
19. Farah A., De Paulis T., Daniel P. Moreira D.P., Trugo L.C., Martin P.R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J. Agric. Food Chem*, 2006, vol. 54, no. 2, pp. 374–381. doi: 10.1021/jf0518305.
20. Bennat C., Engelhardt U.H., Kiehne A., Wirries F.-M., Maier H.G. HPLC analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 1994, vol. 199, pp. 17–21. doi: 10.1007/BF01192945.
21. Farah A., De Paulis T., Trugo L.C., Martin P.R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J. Agric. Food Chem*, 2005, vol. 53, pp. 1505–1513. doi: 10.1021/jf048701t.
22. Delgado-Andrade C., Rufian-Henares J.A., Morales F.J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *Agric. Food Chem*, 2005, vol. 53, no. 20, pp. 7832–7836. doi: 10.1021/jf048500p.
23. Sunarharum W.B., Williams D.J., Heather E. Smyth H.E. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Research International*, 2014, vol. 62, pp. 315–325. doi: 10.1016/j.foodres.2014.02.030.
24. 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, pp.137–144. doi: 10.1016/j.chroma.2008.10.027.
25. Moores R.G., McDermott D.L., Wood T.R. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Analytical Chemistry*, 1948, vol. 20, no. 7, pp. 620–624. doi: 10.1021 / ac60019a007.
26. Belay A., Gholap A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 2009, vol. 3, no. 11, pp. 234–240. doi: 10.5897 / AJPAC.
27. GOST ISO 4052–2013. *Kofe. Opređenje soderžaniia kofeina. Kontrol'nyi metod* [Interstate Standart 4052–2013. Coffee. Determination of caffeine content. Control method]. Moscow, Standartinform Publ., 2015. 16 p. (in Russian).
28. Meinhart A. D., Bizzotto C. S., Ballus C. A., Prado M.A., Bruns R. E., Filho J.T., Godoy H.T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. *Food Chem*, 2010, vol. 120, pp. 1155–1161. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.048.
29. Nogueira T., do Lago C. L. Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and separation by CZE. *Electrophoresis*, 2007, vol. 28, pp. 3570–3574. doi: 10.1002/elps.200700039.
30. Rostagno M.A., Manchón N., D'Arrigo M., Guillamón E., Villares A., García-Lafuente A., Ramos A., Martínez J.A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*, 2011, vol. 685, pp. 204–211. doi: 10.1016/j.foodqual.2004.04.014.
31. Mills C.E., Oruna-Concha M.J., Mottram D.S., Gibson G.R., Spencer J.P.E. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chem*, 2013, vol. 141, no. 15, pp. 3335–3340. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.014.
32. Perrone D., Donangelo C.M., Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry/ D. Perrone. *Food Chem*, 2008, v. 110, pp. 1030–1035. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.012.
- 33 GOST ISO 2048. *Kofe i kofeinye produkty. Opređenje soderžaniia kofeina s ispol'zovaniem vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii (HPLC). Standartnyi metod* [Coffee and coffee products. Determination of caffeine content using high performance liquid chromatography (HPLC). Standard method]. Moscow, Standartinform Publ., 2014. 17 p. (in Russian).
34. Rodrigues N.P., Bragagnolo N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSⁿ. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, vol. 32, pp. 105–115. doi: 10.1016/j.jfca.2013.09.002.
35. Morishita H., Iwahashi H., Osaka N., Kido R. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1984, vol. 315, pp. 253–260. doi: 10.1016 / S0021-9673 (01) 90742-3.
36. Monteiro M.C., Farah A. Chlorogenic acids in Brazilian Coffea arabica cultivars from various consecutive crops. *Food Chem*, 2012, vol.134, pp. 611–614. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.118.

37. O'Driscoll D.J. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *MethodsX*, 2014, vol. 1, pp. 264-268. doi: 10.1016/j.mex.2014.10.006.
38. Schrader K., Kiehne A., Engelhardt U.H., Maier H.G. Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee. *J Sci Food Agric*, 1996, vol. 71, pp. 392-398. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199607)71:3<392::AID-SF392>2.0.CO;2-O.
39. Clifford M.N., Johnston K.L., Knight S., Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem*, 2003, vol. 51, pp. 2900-2911. doi: 10.1021/jf026187q.
40. Clifford M.N., Knight S. The cinnamoyl–amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Food Chem*, 2004, vol. 87, pp. 457-463. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.
41. Clifford M.N., Knight S., Surucu B., Kuhnert N. Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *J. Agric. Food Chem*, 2006, vol. 54, no. 6, pp. 1957-1969. doi: 10.1021/jf0601665.
42. Blinnikova O.M. *Tovarovedenie i ekspertiza vkusovykh tovarov: uchebnoe posobie* [Commodity and examination of goods flavor: training manual]. Michurinsk, MichGAU Publ., 2007. 234 p. (in Russian).
43. Clifford M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, pp. 1033-1043. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:73.0.CO;2-T.
44. GOST 32776-2014. *Kofe rastvorimyi. Obshchie tekhnicheskie usloviia* [Instant coffee. General specifications]. Moscow, Standartinform Publ., 2014. 16 p. (in Russian).