

На правах рукописи



Николаева Алёна Андреевна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИНИНА И ИНДИГОКАРМИНА В ПРОДУКЦИИ
ПИЩЕВОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
МЕТОДОМ ФЛУОРИМЕТРИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель: д.х.н., профессор Короткова Елена Ивановна

Официальные оппоненты:

Лосев Владимир Николаевич, д.х.н., профессор, ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», профессор кафедры композиционных материалов и физико-химии металлургических процессов (г. Красноярск).

Бакибаев Абдигали Абдиманович, д.х.н., профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», ведущий научный сотрудник лаборатории органического синтеза, профессор кафедры органической химии (г. Томск).

Защита состоится 24 марта 2020 года в 14:30

на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина 43 а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: dis.tpu.ru

Автореферат разослан 28 января 2020 года

Ученый секретарь диссертационного совета



Е. В. Дорожко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

В настоящее время пищевые добавки, как вещества, придающие определенные специфические свойства продукции, широко используют в пищевой и фармацевтической промышленности.

В связи с токсичностью пищевых добавок, в последние годы контроль их применения в пищевой и фармацевтической промышленности усиливается. Использование известных методов определения пищевых добавок зачастую осложнено ограниченностью области применения, а также некоторыми метрологическими показателями. Согласно распоряжению Правительства РФ № 1364-р от 29.06.2016 г. требуется совершенствование существующей системы методов контроля пищевых добавок в пищевой промышленности.

Для исследований в данной работе выбраны две пищевые добавки – это вкусоароматическая добавка хинин и синтетический пищевой краситель индигокармин (E132), которые чаще всего встречаются в производстве продуктов питания и лекарственных препаратов.

Флуориметрические методы привлекательны за счет распространенности применения в современных испытательных лабораториях и центрах, поэтому исследования в области качественного и количественного определения пищевых добавок этими методами актуальны.

Использование флуориметрической методики при определении пищевых добавок перспективно ввиду имеющихся возможностей метода, таких как высокая чувствительность, широкий диапазон определяемых концентраций, экспрессность, простота и невысокая стоимость аппаратного оформления.

Цель работы

Исследовать люминесцентные свойства хинина и индигокармина с целью разработки методик их количественного определения в продукции пищевой и фармацевтической промышленности.

Для достижения данной цели в работе поставлено несколько **задач**:

1. Исследовать люминесцентные свойства анализируемых пищевых добавок хинина и индигокармина в модельных средах, рассчитать квантовый выход их люминесценции и установить природу сигнала.

2. Исследовать мешающее влияние сопутствующих компонентов матрицы пищевых и фармацевтических объектов на аналитический сигнал определяемых пищевых добавок. Выбрать условия пробоподготовки исследуемых объектов.

3. Разработать флуориметрические методики определения пищевой вкусоароматической добавки хинина и синтетического пищевого красителя индигокармина в продукции пищевой (напитки и конфеты) и фармацевтической (таблетки и витамины) промышленности. Определить метрологические характеристики методик.

4. Провести сличительные испытания хинина и индигокармина в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах с использованием независимых методов – спектрофотометрии (напитки) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (конфеты, таблетки и витамины).

Научная новизна

1. Изучена природа сигнала люминесценции хинина. По типу возбужденного электронного состояния установлен фосфоресцентный тип люминесценции.

2. Проведена оценка квантового выхода люминесценции хинина в различных концентрациях серной кислоты. Установлено, что максимальный квантовый выход наблюдается в присутствии 0,01 М серной кислоты.

3. Впервые исследованы люминесцентные свойства лейкосоединения индигокармина в щелочи. Показано, что сигнал его люминесценции имеет флуоресцентную природу. Определен квантовый выход лейкосоединения индигокармина в щелочи.

4. Разработан новый подход к определению синтетического пищевого красителя индигокармина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах,

который заключается в применении щелочи при получении аналитического сигнала люминесценции индигокармина.

Практическая значимость

1. Экспериментально установлен алгоритм экспрессной пробоподготовки, исключая сорбцию и десорбцию определяемых пищевых добавок хинина и индигокармина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах методом флуориметрии.

2. На основании выбранных условий пробоподготовки разработаны флуориметрические методики определения хинина и индигокармина в продукции пищевой и фармацевтической промышленности с улучшенными метрологическими характеристиками. Подтверждена правильность результатов флуориметрического определения хинина и индигокармина в напитках, лекарствах и витаминах с результатами независимых методик спектрофотометрии и хроматографии.

3. Предложенные методики могут быть использованы для контроля качества и безопасности продуктов питания и фармацевтических препаратов.

Личный вклад автора

Анализ и систематизация литературных данных по методам определения пищевых добавок, проведение экспериментальных исследований, обработка и представление результатов, публикация полученных результатов в виде статей и тезисов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования люминесцентных свойств хинина: подбор концентрации серной кислоты, расчет квантового выхода хинина в различных концентрациях серной кислоты, подбор параметров строга, установление природы сигнала.

2. Результаты исследования люминесцентных свойств лейкосоединения индигокармина в щелочи: подбор необходимой концентрации щелочи для образования лейкосоединения, расчет квантового выхода лейкосоединения в

различных концентрациях щелочи, подбор параметров строга, установление природы сигнала.

3. Результаты исследований по оценке мешающего влияния сопутствующих компонентов пищевой и фармацевтической матрицы, а также мешающее влияние синтетических и натуральных пищевых красителей на флуориметрическое определение хинина и индигокармина.

4. Флуориметрические методики определения хинина и индигокармина в газированных напитках и лекарственных препаратах. Результаты сравнительных испытаний с использованием независимых методов (спектрофотометрия и хроматография) определения хинина и индигокармина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах для оценки правильности разрабатываемых флуориметрических методик.

Апробация результатов работы

Основные результаты исследовательской работы доложены на XXII Всероссийской конференции молодых ученых-химиков с международным участием (г. Нижний Новгород, 2019); XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых (г. Томск, 2016 – 2019 гг.); 15th International Students Conference ‘Modern Analytical Chemistry’ (Prague, 2019); IV Всероссийской конференции «Химия и химическая технология: достижения и перспективы» (г. Кемерово, 2018); 24-ой всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых (г. Томск, 2018 г.); IX научной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы» (г. Москва, 2018 г.); XXVIII Российской молодежной научной конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.А. Кузнецова «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (г. Екатеринбург, 2018 г.); IV Всероссийской конференции «Химия и химическая технология: достижения и перспективы» (г. Кемерово, 2018 г.); VIth International scientific conference “Theoretical and Experimental chemistry” (г. Караганда, 2017 г.); VIII Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы. Взгляд в будущее» (г.

Геленджик, 2017 г.); VI всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды» (г. Чебоксары, 2016 г.); X Всероссийской научной конференции молодых ученых «Наука. Технологии. Инновации» (г. Новосибирск, 2016 г.).

Публикации:

Результаты проведенных исследований отражены в 18 печатных работах, из них 2 статьи, индексируемые базами Web of Science и Scopus, 1 статья в рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК.

Структура и объем работы:

Диссертационная работа выполнена на 125 страницах машинописного текста, включает 30 рисунков, 20 таблиц, список литературы из 110 наименований.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Государственного задания РФ "Наука" № 4.5752.2017. Исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования "Физико-химические методы анализа" Томского политехнического университета.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, обозначена цель работы, сформулированы задачи исследования, отражена научная и практическая значимость исследований.

В первой главе проведен анализ литературных данных по известным методам пробоподготовки продукции пищевой и фармацевтической промышленности и методам определения синтетических пищевых красителей, включая отдельные работы по определению красителя индигокармина и вкусоароматической добавки хинина. Из обзора литературных данных установлены проблемы определения исследуемых пищевых добавок, которые в дальнейшем решены в работе. Дано описание флуориметрическому методу

анализа. Дополнительно дана классификация известных пищевых добавок и их назначение.

Вторая глава посвящена характеристике объектов исследования пищевых добавок хинина и индигокармина. Описано основное оборудование и методика проведения экспериментальных измерений. Исследования проводились на анализаторе жидкости «Флюорат-02-Панорама» (производитель ООО «Люмэкс-маркетинг», г. Санкт-Петербург).

Третья глава посвящена исследованию люминесцентных свойств пищевой вкусоароматической добавки хинина с целью разработки флуориметрической методики его определения.

Поиск рабочих условий определения хинина в модельных средах методом флуориметрии

Хинин (6'-methoxycinchonan-9-ol) – основной алкалоид коры хинного дерева, который известен, как самый эффективный противомаларийный препарат. Структурная формула хинина приведена на рисунке 1.

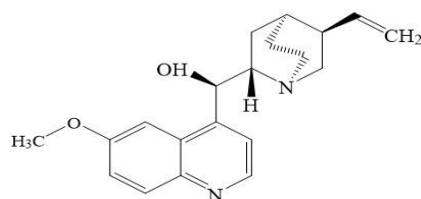


Рисунок 1 - Структурная формула хинина

Хинин имеет сильный горький вкус, что и явилось причиной использования его в качестве вкусоароматической добавки в различные напитки-тоники.

Найдены рабочие условия регистрации сигнала люминесценции хинина: длина волны возбуждения 353 нм, длина волны люминесценции 452 нм. На рисунке 2 представлен спектр возбуждения и спектр люминесценции хинина в серной кислоте.

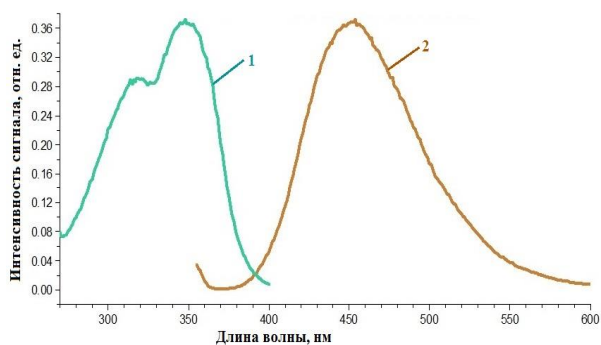


Рисунок 2 - Спектры возбуждения (1) и люминесценции (2) хинина в серной кислоте

Для увеличения чувствительности аналитического сигнала хинина исследовали квантовый выход люминесценции хинина в различных концентрациях серной кислоты от 0,005 до 1,000 М.

В результате исследований, для количественного определения содержания хинина в анализируемых фармацевтических и пищевых продуктах определили максимальное значение квантового выхода люминесценции хинина при концентрации серной кислоты, равной 0,01 М.

Для увеличения чувствительности определения хинина в исследуемых объектах подбирали параметры строба – время задержки (зависимость интенсивности сигнала от времени) и длительности сигнала (время регистрации на одной длине волны).

При изучении зависимости интенсивности люминесценции от задержки сигнала в диапазоне от 0,05 до 8,00 мкс установлено оптимальное значение задержки сигнала для хинина – 0,85 мкс. Из диапазона длительности сигнала от 1,00 до 25,00 мкс установлена длительность – 21,25 мкс. При этих параметрах строба наблюдается наибольшая интенсивность люминесценции хинина.

В зависимости от природы возбужденного электронного состояния люминесценция делится на два типа – флуоресценцию и фосфоресценцию. На практике процессы флуоресценции и фосфоресценции различаются временными характеристиками.

Для установления вида процесса люминесценции хинина строили зависимость интенсивности сигнала люминесценции от времени сигнала (Рис.3).

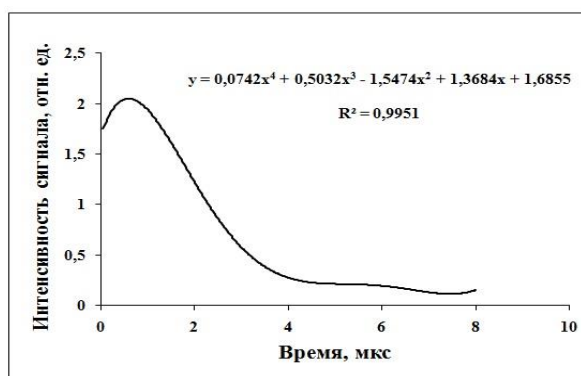


Рисунок 3 - Кривая кинетики затухания хирина в 0,01 М Н₂SO₄

С помощью полученной кривой затухания хирина высчитывали среднее время жизни люминесценции через площадь под кривой затухания (определенный интеграл от 0 до 8 мкс для функции на рис. 3).

Для хирина время жизни люминесценции составило $7,94 \cdot 10^{-4}$ с. Из расчетов можно сделать вывод, что для хирина в 0,01М Н₂SO₄ характерен процесс фосфоресценции.

Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы пищевых продуктов и фармацевтических препаратов на сигнал люминесценции хирина

Исследовали сигнал люминесценции хирина в 0,01 М растворе серной кислоты в присутствии сахара, лимонной кислоты, а также двукратное и трехкратное превышение заявленного содержания для более широкой и точной оценки мешающего влияния данных компонентов на люминесцентный сигнал хирина. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов пищевой матрицы на флуориметрическое определение хирина (n = 5, p = 0,95)

Введено хирина, мг/дм ³	Сопутствующий пищевой компонент	Содержание сопутствующего компонента на 100 мл, г	Найдено хирина, мг/дм ³
50,0	сахар	9	48,5 ± 1,6
		18	49,4 ± 2,0
		27	48,9 ± 1,6
	Лимонная кислота	5	48,3 ± 2,0
		10	47,3 ± 2,8
		15	48,2 ± 2,7
	сахар + лимонная кислота	9 и 5	51,4 ± 2,1
		18 и 10	50,8 ± 1,1
		27 и 15	49,8 ± 0,5

Как видно из таблицы 1 трехкратное превышение максимального содержания сахара и лимонной кислоты как отдельно, так и при совместном присутствии, в напитках не оказывает существенного влияния на люминесценцию хинина, что позволяет определять пищевую добавку флуориметрическим методом без предварительного его выделения из пищевой матрицы.

Количественное содержание исследуемых сопутствующих компонентов определяли исходя из их содержания в анализируемых лекарственных препаратах и витаминах. Также исследовали сигнал люминесценции хинина при превышении содержания сопутствующих компонентов в два и три раза больше, чем указано на упаковке фармацевтического препарата. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы фармацевтических препаратов на флуориметрическое определение хинина (n = 5, p = 0,95)

Введено хинина, мг	Сопутствующий фармацевтический компонент	Содержание сопутствующего компонента, мг	Найдено хинина, мг
51,00	анальгин	200	52,8 ± 1,6
		400	51,4 ± 0,6
		600	52,3 ± 1,8
	рибофлавин (витамин В ₂)	30	53,0 ± 2,2
		60	52,0 ± 1,3
		90	51,7 ± 1,4
	аскорбиновая кислота	10	51,2 ± 0,6
		20	51,9 ± 1,3
		30	52,9 ± 2,2

Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что присутствие анальгина, рибофлавина и аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах не оказывает значительного мешающего влияния на сигнал люминесценции хинина. Двукратное и трехкратное превышение нормы исследуемых сопутствующих компонентов сказывается на аналитическом сигнале в пределах лабораторного смещения.

Исследование мешающего влияния пищевых красителей на сигнал люминесценции хинина

Проведены количественные исследования мешающего влияния пищевых красителей на люминесценцию хинина, таких как патентованный синий E131 и

блестящий синий E133, индигокармина E132, хинолиновый желтый E104, понсо 4R, азорубин E122 и натуральный пищевой краситель красный свекольный E162.

Как видно из рисунка 4А, присутствие красителя индигокармина снижает интенсивность люминесценции хинина, что доказывает, что все красители однозначно в той или иной мере гасят люминесценцию хинина. При интенсивном окрашивании исследуемого раствора, часть энергии возбуждения тратится на поглощение цветным раствором, то есть происходит перепоглощение энергии возбуждения и люминесценции хинина.

Для того, чтобы избавиться от мешающего влияния красителей при флуориметрическом определении хинина, необходимо разбавить исследуемый раствор до достижения им практически бесцветного оттенка (рис. 4Б).

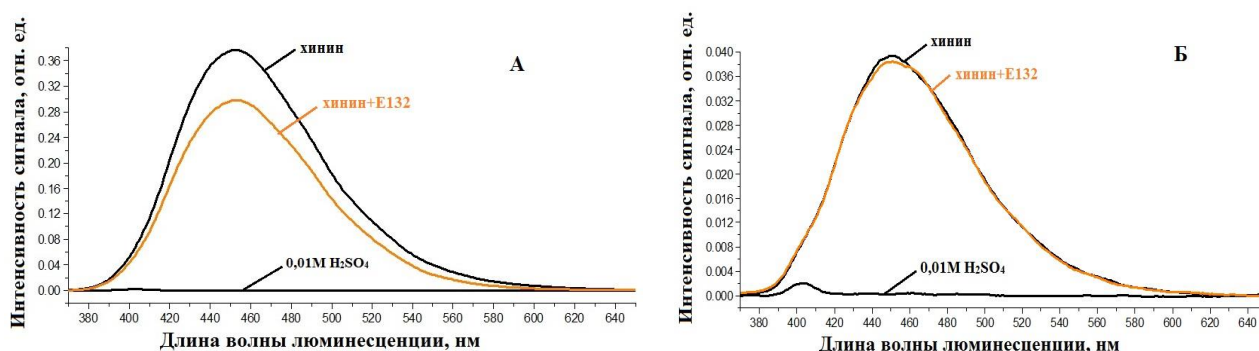


Рисунок 4 – Спектр люминесценции хинина ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в присутствии синтетического пищевого красителя индигокармина ($C=10 \text{ мг/дм}^3$): А – исходный раствор, Б – исходный раствор, разбавленный в 10 раз

Разработка методики количественного определения хинина в исследуемых объектах

Для количественного определения хинина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах строили градуировочную зависимость интенсивности люминесцентного сигнала от концентрации хинина в 0,01M H₂SO₄ в диапазоне концентраций от 0,10 до 1,00 мг/дм³ (Рис. 5А). Для оценки правильности результатов разрабатываемой флуориметрической методики использовали спектрофотометрический метод анализа на длине волны поглощения 331 нм. Для метода сравнения строили градуировочную зависимость

оптической плотности раствора от концентрации хинина в серной кислоте в диапазоне концентраций от 1,00 до 10,00 мг/дм³ (Рис. 5Б).

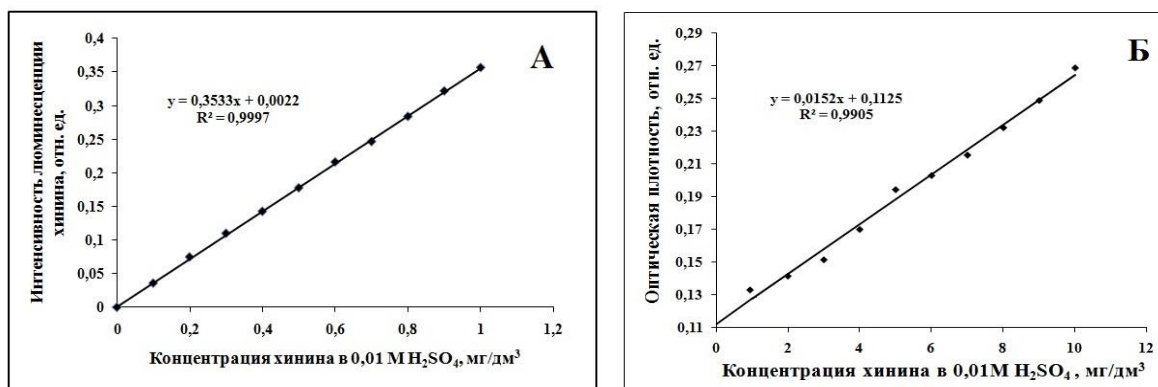


Рисунок 5 - Градуировочная зависимость интенсивности сигнала люминесценции (А) и поглощения (Б) от концентрации хинина в 0,01 М серной кислоте

Результаты количественного определения хинина в исследуемых фармацевтических и пищевых объектах двумя методами анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты определения хинина в таблетках и безалкогольных напитках флуориметрическим и спектрофотометрическим методами анализа, (n=5, p=0,95, $t_{\text{табл}}=2,78$)

Объект исследования	Флуориметрическая методика, мг/дм ³	Sr	Спектрофотометрическая методика, мг/дм ³	Sr	$t_{\text{табл}}$
Напиток «Schweppes Indian tonic»	72,6 ± 0,9	0,37	74,1 ± 1,2	0,49	1,73
Напиток «Schweppes Bitter lemon»	53,7 ± 1,9	0,75	54,4 ± 5,3	2,11	1,69
Напиток «Evervess»	42,4 ± 0,8	0,34	44,4 ± 4,9	1,98	2,61
Таблетка «анальгин-хинин»	51,4 ± 0,4	0,17	52,3 ± 2,7	1,11	2,15

Как видно из таблицы 3 наблюдается хорошая сходимость результатов разрабатываемой флуориметрической методики с результатами известной спектрофотометрической методики. В напитке содержание хинина не превышает максимальное допустимое значение 85 мг/дм³.

Дополнительно рассчитали предел обнаружения хинина в 0,01 М серной кислоте. При найденных условиях определения хинина в лекарствах и напитках предел обнаружения составил 0,0012 мг/дм³. Получен

низкий предел обнаружения хинина по сравнению с большинством известных работ.

Оценка метрологических характеристик методики определения хинина в исследуемых объектах

Таблица 4 - Диапазон измерений метрологических характеристик флуориметрической методики определения хинина (P=0,95, n=2, L=10)

Диапазон измерений, мг/дм ³	Показатели прецизионности		Показатель точности ±Δ, %
	Показатель повторяемости σ _г , %	Показатель воспроизводимости σ _{Рл} , %	
0,1 ÷ 0,4	3	7	23
0,4 ÷ 1,0	1	4	15

Полученные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов, полученных при соблюдении требований методики флуориметрического определения хинина при ее реализации в отдельной лаборатории.

В четвертой главе описано исследование люминесцентных свойств определения синтетического пищевого красителя индигокармина (ИК, E132) в щелочи для разработки флуориметрической методики его определения.

Индигокармин относится к классу индигоидных красителей, основным свойством которых является способность восстановления до водорастворимого бесцветного лейкосоединения (ЛС) (Рис. 6) в щелочной среде. Сам краситель E132 в водном растворе не люминесцирует, но обнаружена люминесценция лейкосоединения индигокармина в щелочи, что и явилось идеей определения синтетического красителя индигокармина в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах методом флуориметрии.

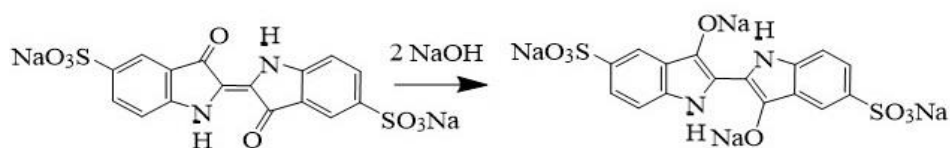


Рисунок 6 - Схема образования лейкосоединения индигокармина в щелочной среде

Подбор рабочих условий определения индигокармина в модельных средах методом флуориметрии

Найдены рабочие условия регистрации сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина: длина волны возбуждения 270 нм, длина волны люминесценции 410 нм

Из синхронного режима сканирования установили оптимальную длину волны возбуждения 270 нм, при которой наблюдали наиболее интенсивную люминесценцию лейкосоединения индигокармина на длине волны 410 нм (Рис. 7).

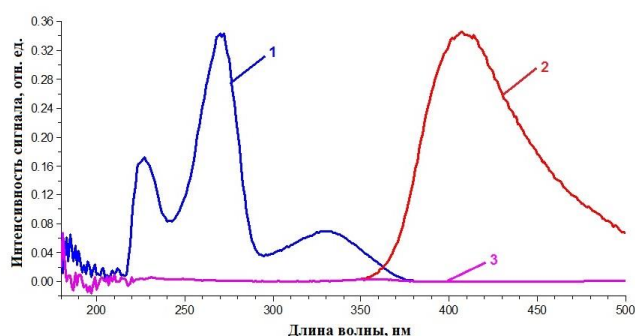


Рисунок 7 - Спектры возбуждения (1) и люминесценции (2) лейкосоединения синтетического пищевого красителя индигокармина (E132), 3 – NaOH

Для увеличения чувствительности аналитического сигнала лейкосоединения индигокармина при найденной длине волны возбуждения 270 нм исследовали величину интенсивности сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина от концентрации щелочи в растворе. Из исследований выявлено, что при концентрации щелочи NaOH – 1,00 М наблюдается наибольшая интенсивность сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина на длине волны 410 нм.

Для увеличения чувствительности и точности определения красителя индигокармина в исследуемых объектах подбирали параметры строба – время задержки и длительности сигнала.

При изучении зависимости интенсивности люминесценции от задержки сигнала в диапазоне от 0,05 до 8,00 мкс установлено оптимальное значение задержки сигнала для индигокармина в 1,00 М NaOH – 0,75 мкс. Из диапазона длительности сигнала от 1,00 до 18,00 мкс установлена длительность – 17,35 мкс.

При этих параметрах строба наблюдается наибольшая интенсивность люминесценции индигокармина в 1,00 М растворе NaOH.

Для установления вида процесса люминесценции индигокармина в 1М NaOH строили зависимость интенсивности сигнала люминесценции от времени сигнала (Рис.8).

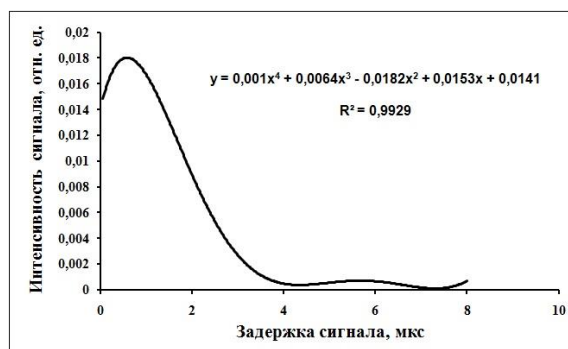


Рисунок 8 – Кривая кинетики затухания лейкосоединения индигокармина в 1М NaOH

Для индигокармина (E132) в 1,00 М растворе NaOH время жизни составило $10,0 \cdot 10^{-7}$ с. Из расчетов можно сделать вывод о том, что для лейкосоединения синтетического пищевого красителя индигокармина в 1,00 М NaOH характерен процесс флуоресценции.

Необходимо отметить, что образование лейкосоединения индигокармина в щелочной среде происходит не сразу, на это требуется длительное время, это продемонстрировано на рисунке 9А.

Для аналитической методики время анализа является важным фактором и длительная химическая реакция зачастую недопустима. Поэтому были проведены исследования по сокращению времени образования лейкосоединения индигокармина в щелочной среде с помощью нагревания раствора (рис.9Б).

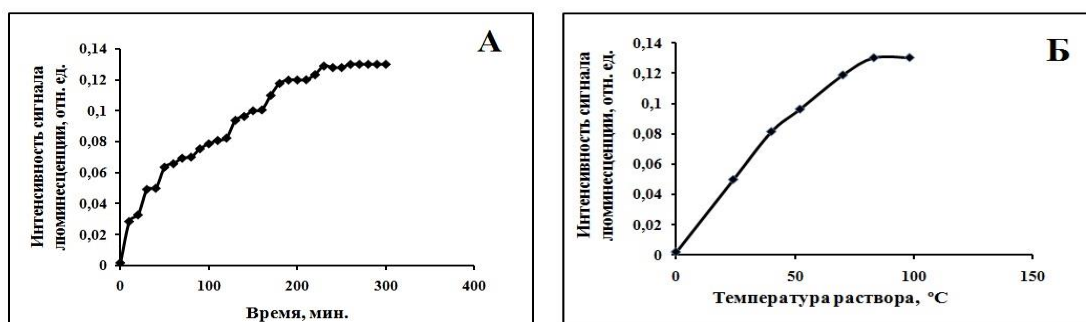


Рисунок 9 - Исследование времени реакции образования лейкосоединения индигокармина ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в щелочной среде: А – при комнатной температуре, Б – при нагревании раствора до 98°C (измерение люминесценции после охлаждения до 24°C)

Из проделанных исследований можно сделать вывод, что для сокращения времени разрабатываемой флуориметрической методики, необходимо нагревать раствор индигокармина в 1 М NaOH в течение 15 минут (зависит от мощности нагревательного прибора) до закипания раствора с последующим охлаждением перед измерением сигнала.

Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы объектов пищевой и фармацевтической промышленности на сигнал люминесценции индигокармина

Было проанализировано влияние на сигнал люминесценции лейкосоединения индигокармина максимального заявленного на упаковке продукта производителем количества сахара и лимонной кислоты, а также двукратное, трехкратное превышение заявленного содержания и совместное влияние данных компонентов в смеси. Результаты анализа мешающего влияния сахара и лимонной кислоты представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов пищевой матрицы на флуориметрическое определение индигокармина (ИК) (n = 5, p = 0,95)

Введено ИК (E132), мг/дм ³	Сопутствующий пищевой компонент	Содержание сопутствующего компонента на 100 мл, г	Найдено ИК (E132), мг/дм ³
0,50	сахар	5	0,46 ± 0,11
		10	0,46 ± 0,04
		15	0,44 ± 0,08
	Лимонная кислота	5	0,53 ± 0,06
		10	0,56 ± 0,05
		15	0,57 ± 0,08
	сахар + лимонная кислота	5 и 5	0,47 ± 0,06
		10 и 10	0,46 ± 0,12
		15 и 15	0,42 ± 0,08

Как видно из таблицы 5 максимальное содержание сахара и лимонной кислоты, а также их двукратное и трехкратное превышение не оказывает значительного мешающего влияния на аналитический сигнал.

При исследовании мешающего влияния фармацевтической матрицы на люминесценцию лейкосоединения индигокармина установлено, что рибофлавин не оказывает мешающего влияния. А левомецетин и аскорбиновая кислота в

больших количествах оказывают мешающее влияние на люминесценцию лейкосоединения индигокармина в пределах погрешности анализа (Табл. 6).

Таблица 6 - Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы фармацевтических препаратов на флуориметрическое определение индигокармина (E132) (n = 5, p = 0,95)

Введено E132, мг/дм ³	Сопутствующий фармацевтический компонент	Содержание сопутствующего компонента, мг	Найдено E132, мг/дм ³
0,60	левомицетин	50	0,56 ± 0,07
		100	0,48 ± 0,13
		200	0,33 ± 0,14
	рибофлавин (витамин B ₂)	30	0,75 ± 0,16
		60	0,71 ± 0,12
		90	0,73 ± 0,18
	аскорбиновая кислота	10	0,56 ± 0,04
		20	0,51 ± 0,08
		30	0,51 ± 0,06

Исследование мешающего влияния пищевых красителей на сигнал люминесценции индигокармина

Индигокармин используют в пищевой и фармацевтической промышленности не только как самостоятельный краситель синего цвета, но и зачастую в смеси с другими красителями для получения новых оттенков. Так, например, часто E132 смешивают с желтыми красителями для получения зеленого цвета.

Для оценки селективности методики исследовали люминесценцию индигокармина в присутствии других синих красителей – патентованный синий E131 и бриллиантовый голубой E133. На рисунке 10А представлены спектры люминесценции лейкосоединения индигокармина в присутствии различных концентраций других синих красителей. В отличие от индигокармина, другие красители такие, как E131 и E133 в растворе щелочи не образуют лейкосоединение и не обесцвечиваются.

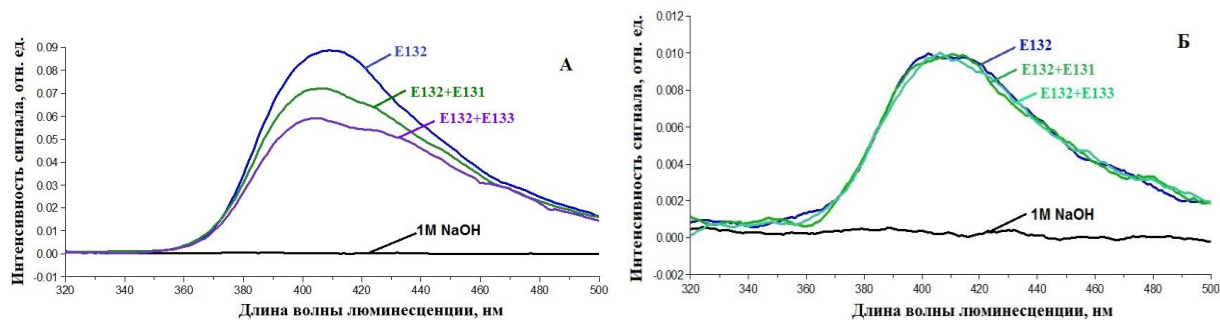


Рисунок 10 – Спектры люминесценции синтетического пищевого красителя E132 ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в присутствии других красителей E132 и E133 синего цвета ($C=10 \text{ мг/дм}^3$) А – исходный раствор, Б – исходный раствор, разбавленный в 10 раз

Как видно из рисунка 10Б наличие синих красителей в растворе тушит люминесценцию лейкосоединения индигокармина, что оказывает мешающее влияние на его флуориметрическое определение. Как и в случае с хинином, данная проблема решена с помощью разбавления исходного раствора до обесцвечивания.

Разработка методики количественного определения индигокармина в исследуемых объектах

Для количественного определения синтетического пищевого красителя E132 строили градуировочный график зависимости интенсивности люминесцентного сигнала от концентрации лейкосоединения индигокармина в 1,00 М NaOH в диапазоне концентраций от 0,10 до 1,00 мг/дм^3 (Рис. 11А).

Для оценки правильности результатов разрабатываемой флуориметрической методики использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на 610 нм. Среднее время удерживания составило 5,101 мин. Для метода сравнения строили градуировочную зависимость площади пика от концентрации водного раствора красителя индигокармина в диапазоне концентраций от 0,10 до 1,00 мг/дм^3 (Рис. 11Б).

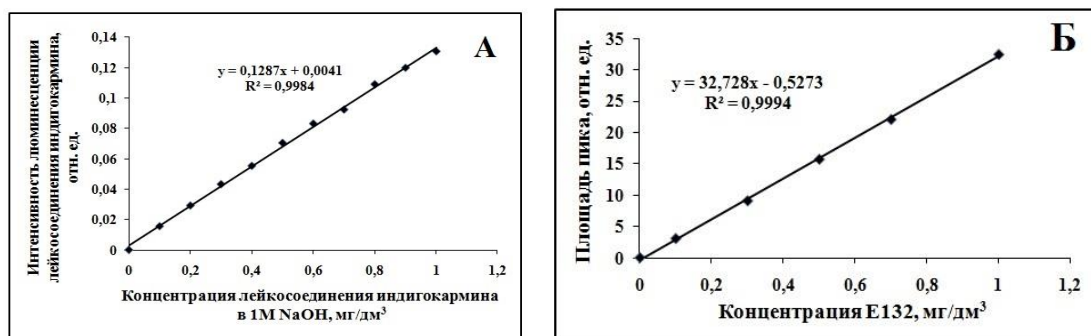


Рисунок 11 - Градуировочная зависимость: А – интенсивности сигнала люминесценции от концентрации лейкосоединения индигокармина в 1,00 М NaOH; Б – площади пика от концентрации водного раствора красителя индигокармина

Результаты определения синтетического пищевого красителя индигокармина (E132) в исследуемых пищевых продуктах и фармацевтических препаратах двумя методами анализа представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты определения содержания синтетического красителя индигокармина (E132) в продуктах питания и фармацевтических препаратах методом флуориметрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (n=3, p=0,95, t_{табл}=2,78)

Объект исследования	Флуориметрическая методика, мг	Sr	Хроматографическая методика, мг	Sr	t _{эксп}
Таблетки «Левомецетин»	0,0156 ± 0,0031	0,080	0,0168 ± 0,0023	0,054	1,69
Витамины «Пиковит»	0,0036 ± 0,0013	0,139	0,0048 ± 0,0007	0,056	1,48
Конфеты «Скиттлс»	0,0658 ± 0,0057	0,035	0,0592 ± 0,0028	0,019	1,92

Как видно из таблицы 7 наблюдается хорошая сходимость результатов разрабатываемого флуориметрического метода определения индигокармина по сигналу люминесценции его лейкосоединения в щелочи и арбитражного хроматографического метода определения индигокармина в воде в пищевых и фармацевтических объектах. Предел обнаружения индигокармина флуориметрическим методом составил 0,0033 мг/дм³.

Оценка метрологических характеристик методики определения индигокармина в исследуемых объектах

Обобщенные результаты полученных метрологических характеристик разрабатываемой флуориметрической методики определения индигокармина в модельных растворах, в присутствии компонентов матрицы исследуемых объектов, представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Диапазон измерений метрологических характеристик флуориметрической методики определения индигокармина (P=0,95, n=2, L=10)

Диапазон измерений, мг/дм ³	Показатели прецизионности		Показатель точности ±Δ, %
	Показатель повторяемости σ _г , %	Показатель воспроизводимости σ _{Рл} , %	
0,1 ÷ 0,6	1	11	32
0,6 ÷ 1,0	2	5	15

Полученные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов, полученных при соблюдении требований методики флуориметрического определения индигокармина при ее реализации в отдельной лаборатории.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы основные характеристики и люминесцентные свойства пищевых добавок хинина (вкусоароматическая добавка) и индигокармина (синтетический пищевой краситель) в модельных средах. Установлена природа сигнала люминесценции исследуемых веществ. Показано, что для хинина в 0,01 М серной кислоте характерен процесс фосфоресценции. Для индигокармина в 1,0 М гидроксиде натрия характерен процесс флуоресценции.

2. Проведена оценка квантового выхода люминесценции хинина в различных концентрациях серной кислоты и лейкосоединения индигокармина в щелочи.

3. Оценено мешающее влияние сопутствующих компонентов пищевой и фармацевтической матрицы, а также мешающее влияние синтетических и натуральных пищевых красителей на аналитический сигнал определяемых пищевых добавок хинина и индигокармина.

4. Разработаны флуориметрические методики определения пищевой вкусоароматической добавки хинина и синтетического пищевого красителя индигокармина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах

5. Проведены сличительные испытания хинина и индигокармина в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах с использованием

независимых методов: спектрофотометрической для хинина и высокоэффективной жидкостной хроматографии для индигокармина.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. **Nikolaeva, A.A.** Determination of quinine in drugs and beverages by fluorimetric method / Nikolaeva A.A. Korotkova E.I., Lipskikh O.I. // Bulletin of the Karaganda University. Chemistry series. – 2019. – № 2. – p. 56-61. DOI: 10.31489/2019Ch2/56-61.

2. **Nikolaeva A.A.** Determination of quinine in soft drinks using the fluorometry method / A.A. Nikolaeva, A.A. Ivanov, E.I. Korotkova // Analytics and Control. - 2019. - V. 22. – № 3. – p. 334-342. DOI: 10.15826/analitika.2019.23.3.007

3. **Николаева А.А.** Определение синтетического пищевого красителя индигокармина в фармацевтических препаратах методом флуориметрии / Николаева А.А. , Иванов А.А., Короткова Е.И. // Аналитика. – 2019. – Т.9, №5. – С. 403-408

4. **Николаева А.А.** Флуориметрический способ определения пищевой вкусоароматической добавки хинина в напитках-тониках // Материалы XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых, 20 – 23 мая 2019 г. Томск – С. 261–262.

5. **Николаева А.А.** Разработка флуориметрического метода анализа смесей натуральных и синтетических пищевых красителей одного оттенка // XXII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием), г. Нижний Новгород, 23–25 апреля 2019 г., ННГУ им. Н.И. Лобачевского, С. 21.

6. **Nikolaeva A.** Determination of food additives quinine and indigo carmine in pharmaceutical drugs by the fluorimetry / A. Nikolaeva, E. Korotkova // Proceedings of the 15th ISC Modern Analytical Chemistry. – Prague, 2019.- p. 125-130

7. **Николаева А.А.** Исследование люминесцентных свойств азокрасителей // Двадцать четвертая всероссийская научная конференция

студентов-физиков и молодых ученых: материалы, Томск, 31 Марта-7 Апреля 2018. - Екатеринбург: АСФ России, 2018 - С. 300.

8. **Николаева А.А.** Разработка флуориметрической методики выявления фальсификата продуктов питания // Инновации в химии: достижения и перспективы - 2018: материалы IX научной конференции молодых ученых, Москва, 9 Апреля-13 Мая 2018. - М.: Перо, 2018 - С. 70.

9. **Николаева А.А.** Флуориметрический способ определения пищевых красителей одинакового оттенка в смеси // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых, Томск, 21-24 Мая 2018. - Томск: ТПУ, 2018 - С. 287.

10. **Николаева А. А.** Флуориметрическое определение натуральных и синтетических пищевых красителей // Байкальская школа-конференция по химии (БШКХ–2018): сборник научных трудов II Всероссийской школы-конференции, посвященной 100-летию Иркутского государственного университета и 85-летию химического факультета ИГУ, Иркутск, 24-28 Сентября 2018. - Иркутск: Отгиск, 2018 - С. 146-148.

11. Булычева Е. В., **Николаева А.А.** Разработка методики выявления фальсификата пищевых продуктов // Проблемы теоретической и экспериментальной химии: Тезисы докладов XXVIII Российской молодежной научной конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.А. Кузнецова, Екатеринбург, 25-27 Апреля 2018. - Екатеринбург: УрФУ, 2018 - С. 129.

12. **Николаева А.А.** Разработка флуориметрической методики разделения и анализа смесей синтетических пищевых красителей одного цвета // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием, г. Краснодар, 07-13 октября 2018.

13. **Николаева А.А.** Разработка флуориметрической методики выявления фальсификата продуктов питания // Химия и химическая технология: достижения

и перспективы: материалы IV Всероссийской конференции, г. Кемерово, 27-28 ноября 2018.

14. **Nikolaeva A.A.** Simultaneous determination of natural and synthetic food dyes by fluorimetric method// Abstracts of the VIth International scientific conference “Theoretical and Experimental chemistry”, June 15-17, 2017, Karaganda, P. 123.

15. **Николаева А.А.** Флуориметрическое определение азокрасителей в продуктах питания // Экологические проблемы. Взгляд в будущее: сборник трудов VIII Международной научно-практической конференции. Геленджик, 8-11 сентября 2017. – Ростов-на-Дону: ЮФУ, 2017 – С. 331-333.

16. **Николаева А.А.**, Булычева Е.В., Флуориметрическое определение ряда пищевых красителей // Материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва, посвященной 120-летию Томского политехнического университета, 17 – 20 мая 2016 г. Томск – С. 243.

17. **Николаева А.А.** Определение синтетических пищевых красителей в напитках флуориметрическим методом анализа // VI всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы химической технологии и защиты окружающей среды» // Чебоксары, 24-25 ноября, 2016 г. С. – 154-155.

18. **Николаева А.А.**, Булычева Е.В. Определение ряда пищевых красителей методом флуориметрии // материалы X Всероссийской научной конференции молодых ученых «Наука. Технологии. Инновации», Новосибирск, 05 – 09 декабря, 2016 г.