

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Николаева Алёна Андреевна

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

02.00.02 – Аналитическая химия
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук,
профессор
Короткова Елена Ивановна

Томск – 2020

Содержание

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР..... | 9 |
| 1.1. Пищевые добавки. Классификация и номенклатура..... | 9 |
| 1.1.1. Вкусоароматические пищевые добавки | 13 |
| 1.1.2. Синтетические пищевые красители | 15 |
| 1.2. Методы пробоподготовки продукции пищевой и фармацевтической промышленности для определения пищевых добавок..... | 18 |
| 1.2.1. Твердофазная экстракция..... | 19 |
| 1.2.2. Экстракция органическими растворителями | 24 |
| 1.2.3. Гомогенная экстракция | 26 |
| 1.3. Методы определения хинина и индигокармина | 28 |
| 1.3.1. Спектрофотометрические методы | 28 |
| 1.3.2. Электрохимические методы | 30 |
| 1.3.3. Капиллярный электрофорез..... | 31 |
| 1.3.4. Хроматографические методы | 32 |
| 1.3.5. Флуориметрические методы..... | 33 |
| ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА..... | 37 |
| 2.1. Оборудование | 37 |
| 2.2. Объекты исследования и реактивы | 39 |
| 2.3. Методика эксперимента | 40 |
| ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ХИНИНА..... | 42 |
| 3.1. Поиск рабочих условий определения хинина в модельных средах методом флуориметрии | 42 |
| 3.2. Расчет квантового выхода люминесценции хинина | 45 |
| 3.3. Исследование природы сигнала люминесценции хинина..... | 49 |
| 3.4. Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы пищевых продуктов и фармацевтических препаратов на сигнал люминесценции хинина..... | 51 |
| 3.5. Исследование мешающего влияния пищевых красителей на сигнал люминесценции хинина..... | 54 |
| 3.6. Разработка методики количественного определения хинина в исследуемых объектах | 57 |
| 3.7. Оценка метрологических характеристик методики определения хинина в исследуемых объектах..... | 60 |

| | |
|--|-----|
| ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ИНДИГОКАРМИНА (E132) | 65 |
| 4.1. Поиск рабочих условий определения индигокармина в модельных средах методом флуориметрии..... | 65 |
| 4.2. Расчет квантового выхода люминесценции индигокармина | 71 |
| 4.3. Исследование природы сигнала люминесценции индигокармина.... | 74 |
| 4.4. Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы объектов пищевой и фармацевтической промышленности на сигнал люминесценции индигокармина | 75 |
| 4.5. Исследование мешающего влияния пищевых красителей на сигнал люминесценции индигокармина..... | 78 |
| 4.6. Разработка методики количественного определения индигокармина в исследуемых объектах | 82 |
| 4.7. Оценка метрологических характеристик методики определения индигокармина в исследуемых объектах..... | 84 |
| ВЫВОДЫ | 88 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 89 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 90 |
| Приложение 1 | 103 |
| Приложение 2 | 117 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Пищевыми добавками называют вещества, которые добавляют в продукты питания в процессе их производства, упаковки, транспортировки и хранения для придания им определенных желаемых свойств [1]. Например, необходимого аромата (ароматизаторы), определенного цвета (красители), длительного срока хранения (консерванты), вкуса, нужной консистенции и так далее. В настоящее время пищевые добавки используют не только в пищевой промышленности, но и в фармацевтической. Наибольшую популярность в фармацевтической промышленности получили красители, их используют для окрашивания капсул и таблеток в различные цвета.

Самыми распространенными и многочисленными классами пищевых добавок являются красители и ароматизаторы. Поэтому для исследований выбраны две пищевые добавки из этих классов – это вкусоароматическая добавка хинин и синтетический пищевой краситель индигокармин (E132).

В связи с токсичностью пищевых добавок, в последние годы контроль их применения в пищевой и фармацевтической промышленности усиливается. Анализ литературных данных показал, что на сегодняшний день для определения пищевых добавок самыми распространенными являются хроматографические методы определения, также используются спектрофотометрические, электрохимические методы анализа и капиллярный электрофорез. Использование известных методов определения пищевых добавок зачастую осложнено ограниченностью области применения, а также некоторыми метрологическими показателями. Согласно распоряжению Правительства РФ № 1364-р от 29.06.2016г. требуется совершенствование существующей системы методов контроля пищевых добавок в пищевой промышленности.

Флуориметрические методы привлекательны за счет распространенности применения в современных испытательных лабораториях и центрах, поэтому

исследования в области качественного и количественного определения пищевых добавок методом флуориметрии 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 пищевой и фармацевтической матрицы объектов на люминесценцию 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 люминесценции лейкосоединения 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 по сигналу люминесценции его лейкосоединения в щелочи методом флуориметрии.

Практическая значимость

1. Установлен экспрессный алгоритм пробоподготовки, исключающий сорбцию и десорбцию определяемых пищевых добавок хинина и индигокармина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах методом флуориметрии.

2. Впервые разработана методика определения хинина в лекарственных препаратах методом флуориметрии.

3. На основании выбранных условий пробоподготовки разработаны флуориметрические методики определения хинина и индигокармина в продукции пищевой и фармацевтической промышленности.

4. Подтверждена правильность результатов флуориметрического определения хинина и индигокармина в напитках, лекарствах и витаминах с результатами независимых методик спектрофотометрии и хроматографии.

5. 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. Флуориметрическая методика определения пищевой вкусоароматической добавки хинина в газированных напитках и лекарственных препаратах.

3. Результаты исследования люминесцентных свойств лейко соединения индигокармина в щелочи: подбор необходимой концентрации щелочи для образования лейко соединения, расчет квантового выхода лейко соединения в различных концентрациях щелочи, подбор параметров строга, установление природы сигнала.

4. Флуориметрическая методика определения пищевого синтетического красителя индигокармина в продукции пищевой и фармацевтической промышленности.

5. 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.

6. Результаты сличительных 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, 2019), 15th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry' (Prague, 2019), IV Всероссийской конференции «Химия и химическая технология: достижения и перспективы» (г. Кемерово, 2018).

Публикации:

Результаты проведенных исследований отражены в 18 печатных работах, в том числе в 15 тезисах докладов на всероссийских и международных конференциях, в 3 статьях научных журналов, из них 2 статьи, индексируемые базами Web of Science и Scopus, 1 статья в рецензируемом научном издании, рекомендованными 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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Пищевые добавки. Классификация и номенклатура

Пищевые добавки – природные, полусинтетические, синтетические вещества или продукты биотехнологии, которые добавляют в пищевые продукты в количествах, обычно варьирующихся от нескольких мг/кг до 1% масс [2]. Основной целью применения пищевых добавок является сохранение привлекательности, продление срока годности, усиление вкуса, сохранение или восстановление цвета и стабилизация консистенции продуктов питания. Использование пищевых добавок регламентируется Международными стандартами – Международным комитетом экспертов Международной сельскохозяйственной организации (JECFA) и Кодекса Алиментариус (Codex Alimentarius), принятый Международной комиссией ФАО/ВОЗ.

С 1953 года действует специальная система нумерации пищевых добавок, которая постоянно дорабатывается Кодексом Алиментариуса для международной классификации. Все пищевые добавки зашифрованы под уникальным номером, который начинается с буквы «Е». Первая цифра буквенного кода носит информацию о назначении пищевой добавки:

- 1 – красители;
- 2 – консерванты;
- 3 – антиоксиданты;
- 4 – стабилизаторы и эмульгаторы;
- 5 – вещества против комкования и слёживаемости;
- 6 – усилители вкуса, запаха и аромата;
- 7 – антибиотики;
- 8 – запасные номера;
- 9 – улучшатели выпечки (глазирователи и размягчители).

Существует широкий класс веществ, не имеющих буквенного кода, например крахмал, ванилин и исследуемый нами хинин. Краткая классификация всех пищевых добавок, известных и применяющихся на сегодняшний день, представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Международная классификация пищевых добавок

| Группа индексов | Наименование | Технологические функции |
|------------------------|--|---|
| E100 – E199 | красители | Окрашивание готовой продукции в различные цвета |
| E200 – E299 | консерванты | Увеличение длительности хранения продукции |
| E300 – E399 | антиокислители | Останавливают процесс окисления органических соединений |
| E400 – E499 | стабилизаторы, загустители, эмульгаторы | Придание продуктам желаемой формы и текстуры, сохранение нужной консистенции |
| E500 – E599 | регуляторы рН и вещества против слеживания | Поддерживание определенного уровня рН в продукте, препятствуют образованию комьев в сыпучих продуктах |
| E600 – E699 | усилители вкуса и аромата | Усиление, восстановление и стабилизация вкуса и аромата продукта |
| E700 – E799 | антибиотики | Подавление роста микроорганизмов |
| E800 – E899 | резерв | |
| E900 – E999 | прочие | Вещества, улучшающие мучные изделия. Газы для упаковки, подсластители, пенообразователи. |
| E1000 – E1999 | Пищевые добавки. Дополнительные вещества. | Вещества, совмещающие в себе несколько функций пищевых добавок. Антифламинги. |

Благодаря постоянным исследованиям токсичности пищевых добавок, часть из них выводится из применения в промышленности. Поэтому на сегодняшний

день пищевые добавки можно разделить на три класса по возможности применения: разрешенные, запрещенные и неразрешенные [3].

Запрещенные пищевые добавки:

- E121 – краситель Цитрусовый красный;
- E123 – краситель Красный амарант;
- E128 – краситель Красный 2G;
- E216 – консервант группы парабенатов: Пара-гидроксибензойной кислоты пропиловый эфир;
- E217 – консервант: натриевая соль Пара-гидроксибензойной кислоты пропилового эфира;
- E240 – консервант Формальдегид.

Неразрешенные пищевые добавки (добавки проходят различные испытания, но нет окончательного результата для полного запрета):

- E127 – Эритрозин;
- E142 – Зеленый S;
- E154 – Коричневый FK;
- E173 – Алюминий
- E180 – Рубиновый литол BK;
- E388 – Тиопропионовая кислота;
- E389 – Дилаурилтиодипропионат;
- E424 – Курдлан;
- E425 – Конняку, Камедь;
- E512 – Хлорид олова;
- E537 – Гексацианоманганат железа;
- E557 – Силикат цинка;
- E912 – Эфиры монтаниновой кислоты;
- E914 – Окисленный полиэтиленовый воск;
- E916 – Кальция йодат;
- E917 – Кальция йодат, йодноватокислый калий;

- E918 – Оксиды азота;
- E919 – Нитрозил хлорид;
- E922 – Персульфат калия;
- E923 – Персульфат аммония;
- E924b – Бромат кальция;
- E925 – Хлор;
- E926 – Диоксид хлора;
- E929 – Пероксид ацетона.

С 1978 года применение пищевых добавок в России контролируется национальными органами Роспотребнадзора, а также нормативными актами и санитарными правилами Минздрава России [4-7].

Необходимо отметить, что существует разница между странами в разрешении применения тех или иных пищевых добавок. Ряд пищевых добавок, разрешенных в России, запрещен к применению в других странах и наоборот. Это связано с отсутствием единой этики использования пищевых добавок в мире, а также постоянными новыми исследованиями токсичности пищевых добавок. Отсюда возникают проблемы импорта и экспорта продуктов, которые могут содержать пищевые добавки, разрешенные в одной стране, но незаконные в другой.

Кроме пищевой промышленности, пищевые добавки активно используются и в фармацевтической индустрии. Часть пищевых добавок, разрешенных для применения в продуктах питания, запрещена к применению в лекарственных препаратах, но также существуют различия между государствами в подобных использованиях пищевых добавок. В связи с вышесказанным, разработка новых методов определения пищевых добавок является актуальной задачей для решения проблем контроля качества и безопасности продуктов питания и лекарственных препаратов.

1.1.1. Вкусоароматические пищевые добавки

Одним из популярных классов пищевых добавок являются усилители вкуса и аромата (Е600 – Е699). Данный класс добавок нашел широкое применение при производстве фаст-фуда, продуктов из мяса, колбасных изделий, супов и десертов. Вкусоароматические добавки применяют для возвращения вкусовых качеств продуктам, которые могли быть утеряны в процессе технологической обработки или хранения пищевых продуктов [8].

Кроме этого вкусоароматические добавки могут использоваться для маскировки вкуса и запаха испорченных или некачественных продуктов питания. На сегодняшний день множественные исследования показали, что благодаря содержанию нуклеотидов в большинстве вкусоароматических добавок, чрезмерное употребление продуктов, содержащих такие добавки, ведет к эффекту привыкания и влечения [9]. Кроме этого чрезмерное усиление вкуса и аромата пищевых продуктов приводит к повышению аппетита и вызывает последствия лишнего веса и болезней желудочно-кишечного тракта [10].

Помимо пищевой промышленности усилители вкуса и аромата в настоящее время используются в электронных сигаретах, где также остро встает вопрос о вредности влияния этих добавок на организм человека, в данном случае на легкие [10-11].

Как ранее уже было сказано, ряд пищевых добавок не имеет буквенного кода. Одними из самых известных представителей являются ароматизатор ванилин и вкусовая (вкусоароматическая) добавка хинин.

Хинин

С 1633 года хинин начали использовать в качестве противомаларийного препарата. Существует множество историй о том, как европейцы узнали о целебных противомаларийных свойствах коры хинного дерева. По одной версии, испанский солдат страдал сильнейшей малярийной лихорадкой. Но, после того как он попил воды из озера, рядом с которым росли хинные деревья, солдат

чудесным образом исцелился от этого недуга. По другой версии, от малярии измельченной корой хинного дерева излечили графиню Чинчон – жену вице-короля Перу. После чего кора хинного дерева была переправлена в Рим, где ею было вылечено множество солдат. Хинин употребляли в качестве настойки с очень горьким вкусом. В 1870 году компания «Швепс» выпустила первый газированный напиток-тоник, который носил название «содовая». В наши дни хинина в тониках находится значительно меньше, так как он уже применяется для вкусовых характеристик, а не для лечебных целей [13].

Хинин обладает жаропонижающими и обезболивающими свойствами [14]. Также хинин применяют в акушерской практике [15] для усиления родовой деятельности, но при передозировке может наступить аборт [16]. Недавние исследования на крысах показали, что хинин полностью блокирует овуляцию и вызывает окислительный стресс в яичнике крыс [17].

Хинин применяется и в косметической промышленности. Он входит в состав шампуней и бальзамов против выпадения волос. Также хинин присутствует в различных БАДах, применяемых для профилактики заболеваний суставов и кожи. В сочетании с анальгином хинин применяется против головных болей.

Кроме того, этот алкалоид имеет сильный горький вкус, что и явилось причиной использования хинина в качестве вкусоароматической добавки в различные напитки-тоники. Тем не менее, хинин является опасным веществом. В зависимости от принятой дозы хинин может угнетать нервную систему, вызывать головную боль и нарушение зрения. Передозировка хинина может привести к летальному исходу (смертельная доза – около 10 г).

По этим причинам, в настоящее время, применение хинина, как пищевой добавки, ограничено 83 мг/дм³ Управлением по контролю над продуктами и лекарствами (FDA) в США [18]; верхний предел содержания хинина в пищевых продуктах 85 мг/дм³ СанПин в России; в соответствии с законодательством Греции верхний предел содержания хинина в безалкогольных напитках не должен

превышать 100 мг/дм³ [19]; в Китае по закону не разрешается добавлять хинин в напитки [18-19].

1.1.2. Синтетические пищевые красители

Одним из самых многочисленных классов пищевых добавок является класс синтетических пищевых красителей. Синтетические пищевые красители (СК) представляют собой водорастворимые органические соединения, которые не встречаются в природе и применяются для придания более привлекательного внешнего вида продуктам питания, а также улучшения их органолептических свойств.

Пищевыми красителями называют природные или искусственные (синтетические) вещества, предназначенные для придания, усиления или восстановления окраски пищевых продуктов [20-21].

В соответствии с ГОСТ Р 52481 – 2005 «Красители пищевые. Термины и определения» пищевые красители классифицируются на три группы: натуральные, синтетические и неорганические.

Натуральный пищевой краситель – пищевой краситель, полученный из сырья растительного или животного происхождения [21].

Натуральные пищевые красители включают:

- Смеси красящих и сопутствующих веществ, полученные из пищевых продуктов и других источников сырья растительного или животного происхождения путем экстракции, приводящей к селективному выделению красящих веществ относительно питательных, ароматических и прочих компонентов;
- Карамельный колер – продукт термической карамелизации углеводов, в том числе с применением химических реагентов;
- Медные комплексы хлорофилла и хлорофиллина.

Синтетический пищевой краситель – пищевой краситель, полученный методами химического синтеза [21].

Синтетические пищевые красители – это смеси органических красящих веществ и сопутствующих продуктов, полученные химическим путем. Синтетические красители, не имеющие природных аналогов, называют также искусственными.

Неорганический пищевой краситель – пищевой краситель, полученный из минерального сырья природного или химического происхождения [21].

Неорганические пищевые красители – это некоторые мелкодисперсные металлы и оксиды (гидроксиды) металлов, аморфный углерод, углекислый кальций, а также синий пигмент ультрамарин.

В России классификация пищевых красителей по происхождению приведена в СанПиН 2.3.2.1293 – 03. Следует отметить, что ни в странах ЕС, ни в США подразделения пищевых красителей по происхождению в нормативных документах не принято.

На сегодняшний день в пищевой промышленности синтетические красители практически вытеснили натуральные благодаря значительным технологическим преимуществам: дают яркие и легко воспроизводимые цвета, более устойчивы к различным видам технологических обработок.

Многие годы считалось, что использование синтетических красителей в пищевых продуктах полностью безопасно. Однако современные исследования доказывают, что пищевые красители являются потенциально опасными для человека ввиду возможности распада в организме на токсичные амины [23]. Большинство синтетических пищевых красителей вызывают аллергические реакции, являются потенциальными канцерогенами, а также являются причиной гиперактивности и снижения концентрации внимания у детей [24].

Кроме того существуют проблемы отсутствия единой нормативной системы использования красителей, что приводит к возможной фальсификации продуктов питания.

Индигокармин

Индигокармин – E132 (Indigo carmine, Indigotine, Food Blue 1, Acid Blue 74, Indigo Blue, Pigment Blue 66, Vat Blue 1) относится к классу индигоидных красителей, имеющих в составе гетероциклическую (индигоидную) группировку с сопряженными двойными связями в сочетании с бензольными кольцами. Структурная формула красителя индигокармина представлена на рисунке 1. Среди всего класса индигоидных красителей индигокармин является единственным представителем пищевых красителей [25].

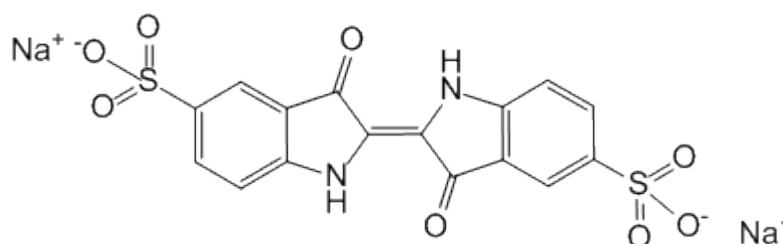


Рисунок 1 – Структурная формула индигокармина (E132)

Индигокармин выпускается в форме порошка натриевой соли, который хорошо растворим в воде с образованием раствора синего цвета. В промышленности краситель выпускается в виде порошка или гранулята с содержанием основного красящего вещества не менее 85 %, а также в форме алюминиевого лака с содержанием основного красящего вещества 10 – 40 % [26].

В РФ индигокармин разрешен к применению в пищевой промышленности, как краситель в безалкогольных напитках, кондитерских и мучных изделиях, десертах и супах в количестве до 50 мг/кг; в алкогольных напитках, плодовых винах до 200 мг/кг; в соусах, приправах, декоративных покрытиях и фарше до 500 мг/кг [7]. Приемлемое суточное потребление 0 – 5 мг на кг массы тела [23].

Кроме продуктов питания индигокармин часто применяется при окрашивании лекарственных препаратов в виде таблеток в голубые и синие цвета. Также индигокармин используется в медицине в диагностических целях почек и мочеточников. Как и все синтетические красители, E132 является вредным для

организма человека, вызывает аллергические реакции, приступы удушья у людей, страдающих астмой, и проблемы с сердцем [27].

1.2. Методы пробоподготовки продукции пищевой и фармацевтической промышленности для определения пищевых добавок

Одним из важнейших моментов получения правильных результатов анализа является пробоподготовка исходных объектов исследования, то есть извлечение анализируемых пищевых добавок из сложной матрицы продуктов питания и фармацевтических препаратов. От стадии пробоподготовки зависит правильность дальнейших результатов и стоимость анализа в целом.

Важной стадией в анализе пищевых добавок является их извлечение из продуктов, содержащих большое количество белков и углеводов – кисломолочная и мясная продукция, конфеты, жевательная резинка, мармелад и мороженое. Содержащиеся дополнительные компоненты в таких пищевых продуктах могут оказать значительное мешающее влияние на результаты анализа. Матрица лекарственных препаратов наравне с пищевыми продуктами имеет сложный состав, поэтому извлечение анализируемых компонентов из фармацевтической матрицы исследуемого объекта также является важнейшей стадией разработки методики.

Обзор библиографических источников показал, что для извлечения пищевых добавок из продуктов питания и лекарственных препаратов применяются разнообразные методы, но можно выделить 3 основных способа извлечения [27-28]:

- Твердофазная экстракция;
- Экстракция органическими растворителями;
- Гомогенная экстракция.

Так же следует отметить возможность сочетания нескольких способов извлечения пищевых добавок из продуктов питания и лекарственных препаратов.

1.2.1. Твердофазная экстракция

Данный метод является одним из самых распространенных методов извлечения красителей из пищевых продуктов. Все твердофазные сорбенты в настоящее время используются в первую очередь для сорбции красителей, для экстракции хинина из всех известных твердофазных сорбентов применяют только ионообменные смолы. На сегодняшний день методу твердофазной экстракции красителей посвящено значительное количество работ, а также основные нормативные документы.

Твердофазная экстракция основана на сорбции анализируемых красителей из матрицы продуктов на твердых сорбентах с последующей стадией десорбции (вымыванием красителей различными растворителями). Предварительно исследуемые образцы измельчают и растворяют в воде или других органических растворителях. Рассмотрим основные виды сорбентов, применяемые для анализа в настоящее время.

Оксид алюминия. Данный вид сорбента нашел широкое применение в органическом анализе. Он представляет собой недорогой, доступный и механически прочный сорбент.

Кислотность среды является основным фактором, влияющим на сорбцию на поверхности оксида алюминия органических веществ. Сорбцию пищевых анионных сульфазокрасителей, как правило, проводят из слабокислых растворов [30]. Имеется работа по сорбции красителей на оксид алюминия из смеси метанола с ацетонитрилом [31]. К сожалению, авторы работ не приводят данных о степени извлечения красителей при таком способе пробоподготовки.

В отличие от других работ, авторы [30] установили, что некоторые красители на кислотном оксиде алюминия имеют очень низкую степень извлечения (тартразин, понсо 4R), а некоторые совсем не сорбируются (эритрозин).

В России на сегодняшний день разработано 4 нормативных документа с использованием в качестве сорбента оксида алюминия:

- ГОСТ Р52470-2005. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в алкогольной продукции;
- ГОСТ Р52671-2006. Продукты пищевые. Методы идентификации и массовой доли синтетических красителей в карамели;
- ГОСТ Р52825-2007. Продукты пищевые. Метод определения наличия синтетических красителей в пряностях;
- ГОСТ Р54491-2011 Консервы фруктовые. Метод определения наличия хинолиновых, триарилметановых и азокрасителей.

Десорбцию синтетических красителей проводят, в основном, раствором аммиака. Промывают патроны с оксидом алюминия до и после сорбции ледяной уксусной кислотой.

Таким образом, не смотря на хорошие эксплуатационные свойства оксида алюминия, пробоподготовка на данном виде сорбента занимает значительное время. Это связано с многостадийностью, трудоемкостью и использованием токсичных растворителей в таких методиках анализа. Кроме того для обеспечения полноты извлечения красителей в большинстве случаев используется несколько патронов с оксидом алюминия.

Полиамидный сорбент. В последнее время для извлечения синтетических красителей из пищевых продуктов все шире используются полиамидные порошки [30, 32]. Это группа различных гетероцепных полимеров, содержащих амидную группу – CO–NH–, способную образовывать водородные связи. Данный процесс сорбции включает следующие стадии: измельчение и растворение твердых образцов в горячей воде, предварительное дегазирование при нагревании, подкисление растворами соляной или лимонной кислот, добавление полиамидного порошка, тщательное перемешивание до обесцвечивания раствора. После фильтрования адсорбент промывают горячей дистиллированной водой или пропанолом. Для десорбции применяют 5% раствор гидроксида натрия, раствор аммиака [28], смесь этанол: аммиак (90:10) [32] до полного удаления красителя с сорбента. Полученный раствор либо нейтрализуют добавлением соляной кислоты,

либо нагревают на водяной бане для удаления аммиака и спирта. Затем доводят до pH 4 20 % - ным раствором лимонной кислоты.

В работе [30] отмечено, что использование полиамидного сорбента позволяет избавиться от мешающего воздействия матричных компонентов продукта при анализе красителей в рыбьей икре. Но восстановление красителей зависит в некоторой степени от партий полиамидных сорбентов.

К недостаткам данного вида сорбента можно также отнести длительную и трудоемкую пробоподготовку, а также низкие прочностные характеристики полиамидных сорбентов.

Ионообменные смолы. Ионообменные смолы представляют собой нерастворимые полимеры, способные к ионному обмену твердой матрицы (ионита) с ионами раствора. В зависимости от знака заряда обменивающихся ионов различают смолы: катионообменные, анионообменные и амфотерные ионообменные, содержащие одновременно кислотные и основные группы. Существуют специфические группы ионообменных смол – селективные, содержащие комплексообразующие группы, и окислительно-восстановительные, способные к изменению зарядов ионов.

Основное назначение ионообменных смол – очистка, умягчение и обессоливание вод, а также разделение различных химических веществ. Единичные работы посвящены извлечению синтетических красителей из пищевых продуктов с помощью ионообменных смол. В работе [33] использованы ионообменные гели Sephadex DEAE A-25 для извлечения и одновременного определения трех красителей в продуктах питания (тартразин, понсо 4R и желтый солнечный закат).

Экстракция хинина ионообменными смолами встречается редко. Авторы работы [34] экстрагируют алкалоиды, в том числе и хинин, картриджами со смолой GP (дивинилбензольный полимер). Но было показано, что данный тип смол не пригоден для улавливания фенольных алкалоидов.

Новой литературы по данной теме не встречается. Работы, посвященные извлечению пищевых красителей ионообменными смолами, проводились до

2000х годов. Современные авторы не проявляют интерес к данным видам сорбента, возможно ввиду наличия множества других более известных.

Углеродные сорбенты. Одним из новейших сорбентов, так называемая инновационная технология, являются многослойные углеродные нанотрубки. Этот вид сорбентов получают в лабораторных условиях из атомов углерода. Углеродные сорбенты имеют размер пор от одного до нескольких десятков нанометров, что позволяет сорбировать на их поверхности различные вещества, в том числе синтетические пищевые красители.

Углеродные нанотрубки нашли широкое применение в медицине. Как сорбенты в пищевой промышленности многослойные углеродные нанотрубки используются относительно недавно. Многослойные углеродные сорбенты обладают отличными механическими и физическими характеристиками.

В работе [35] определяли синтетических краситель тартразин в порошковых напитках путем добавления фосфатного буфера (рН 6,0) к пробе и пропускали через колонку, заполненную многослойными углеродными нанотрубками. Извлеченный краситель элюировали диметилсульфоксидом и количественно определяли спектрофотометрическим методом анализа. Но большинство работ [35-37] посвящено удалению красителей из водных сред путем адсорбции синтетических красителей на многослойных углеродных нанотрубках.

Пенополиуретаны. Пенополиуретаны – сорбенты с пористой мембранной структурой, полимерная матрица которых включает уретановые, амидные, сложноэфирные и мочевиновые группы. Это позволяет использовать данный вид сорбентов для сорбции полярных и неполярных молекул. Благодаря наличию системы ячеек-пор обеспечивается доступ сорбируемого вещества внутрь сорбента. Извлечение соединений происходит как за счет адсорбции, так и в результате абсорбции [29].

В работе [39] извлечение синтетических красителей из фруктовых и желатиновых порошков проводили на основе сложных эфиров с использованием полиуретанов. Аналогично извлекают из продуктов питания красители в работах [40, 41], но в качестве растворителя используют диметилформиад.

В качестве достоинств пенополиуретана в роли сорбента для извлечения красителей можно отметить удобство в использовании, легкость отделения от раствора, доступность и низкую стоимость. Тем не менее, невысокие значения степеней извлечения красителей на пенополиуретановых сорбентах и сложность десорбции обуславливают ограниченное применение этого сорбента в анализе.

Шерсть. Одним из первых сорбентов для выделения красящих веществ из различных продуктов являлась белая обезжиренная шерсть [42]. Возможность ее использования в качестве сорбента обусловлена наличием в структуре шерсти amino- и карбоксильных групп, работающих как активные анионообменные центры.

На сегодняшний день шерсть по-прежнему используют в качестве сорбента для анионных и нейтральных красителей [43, 44]. Подкисленные, в основном уксусной кислотой, растворы сорбируют, далее десорбируют раствором аммиака.

Шерсть является очень дешевым и доступным сорбентом. Но многие авторы указанных работ отмечают длительность и сложность процессов сорбции и десорбции на данном виде сорбента. Так же, по мнению авторов, использование шерсти как сорбента не гарантирует количественного извлечения красителей. В связи с этим количество современных работ, посвященных извлечению синтетических красителей на шерсти, невелико.

Кремнеземные сорбенты. Кремнезем – оксид кремния в кристаллической, аморфной или гидратированной формах. Широкое применение для извлечения синтетических красителей получил химически модифицированный кремнезем, на поверхности которого присоединены октадецильные группы. Основные марки такого сорбента используются для извлечения красителей из разнообразных продуктов питания (напитки, кондитерские продукты, мороженое и лекарства).

Авторы работы [45] твердофазную экстракцию красителей производили на картриджах C18 SPE из мясных продуктов. Красители элюировали смесь метанол – уксусная кислота. В работе [46] использовали картридж Sep – Pack C18 для извлечения синтетических красителей из безалкогольных напитков. Десорбцию красителей производили изопропиловым спиртом.

Из представленной литературы можно сделать вывод, что исследования сорбции красителей на кремнеземных сорбентах практически не систематизированы. Одни авторы считают, что гидрофильные красители не сорбируются на кремнеземе, другие напротив, используют данный сорбент для извлечения анионных красителей. Поэтому вопрос использования кремнеземных сорбентов для извлечения синтетических пищевых красителей остается открытым.

Новые композиционные материалы. Развитие нанотехнологий привело к появлению новых видов сорбентов на основе наночастиц. Такие сорбенты применяются преимущественно для извлечения анионных красителей и разрабатываются на основе наночастиц металлов.

Сорбция красителей производится из водных растворов образцов пищевых продуктов на магнитных наночастицах оксида железа [47] или оксида кремния [48]. В качестве десорбента используется метанол. Авторы [49] отмечают возможность повторного использования сорбентов на основе наночастиц. Хотя авторы и отмечают экономичность времени анализа при использовании таких сорбентов, в общей сложности процедура извлечения красителей на наноманитных сорбентах остается дорогостоящей.

1.2.2. Экстракция органическими растворителями

Экстракция органическими растворителями основана на процессе разделения смеси жидких веществ с помощью селективных растворителей (экстрагентов). Процесс экстракции включает смешение исходной смеси веществ с экстрагентом, механическое расслаивание образующихся фаз и удаление экстрагента из обеих фаз.

Пищевые красители – гидрофобные соединения, поэтому они эффективно экстрагируются полярными органическими растворителями. Одним из основных условий проведения экстракции органическими растворителями является

введение в пробу нейтральных солей – высаливателей. Высаливатель способствует наиболее полному переходу экстрагируемого вещества из водной фазы в органическую. Наиболее распространенным и эффективным высаливателем является сульфат аммония.

Работ, посвященных извлечению красителей органическими растворителями, не много. Данным способом извлекают не более 15 красителей и в основном из модельных растворов и некоторых пищевых продуктов.

В качестве экстрагентов чаще всего используют ацетон и его смеси с различными спиртами с применением сульфата аммония в качестве высаливателя.

При анализе спектрофотометрическим методом в качестве экстрагентов используют толуол и н-бутанол при определении красителей в желатиновых десертах и безалкогольных напитках, ацетонитрил [24] для определения красителей в порошках напитков и желе. В тонкослойной хроматографии применяют в качестве экстрагентов хлороформ [25] при определении пищевых красителей в напитках и карамели; ацетон, изопропанол и 1,4-диоксан в модельных растворах [26]. Смесь ацетон-диацетоновый спирт используют в качестве экстрагента в бумажной хроматографии при определении красителей в молочных продуктах и леденцовых конфетах.

Авторы [12] отмечают, что экстракция пищевых красителей кетонами более эффективна, чем спиртами. Это связано с ослаблением водородных связей между молекулами спирта в системе спирт-вода. При применении в качестве экстрагентов смесей спиртов возможно достижение более высоких коэффициентов распределения.

Экстракция пищевых добавок органическими растворителями мало разработана и применима не часто, так как подразумевает работу с токсичными веществами.

На сегодняшний день ионные жидкости являются кандидатами на замену летучих опасных органических растворителей, так как являются более безопасными и экологичными экстрагентами.

1.2.3. Гомогенная экстракция

В настоящее время для экстракции различных веществ в качестве экстрагентов становятся популярными ПАВ (поверхностно-активные вещества) [27,49-50], водорастворимые полимеры [52], ионные жидкости [53]. Однако для определения красителей описанные экстрагенты практически не применяются.

Напротив, для экстракции хинина наиболее привлекательными являются ионные жидкости [54]. Ионные жидкости представляют собой расплавы органических солей, обладающих высокой сольватацией, а также химической и термической стабильностью [54-55]. В настоящее время сообщается об экстракции алкалоидов ионными жидкостями из водных растворов [57]. Также применяют ионные жидкости в основе ультразвуковой экстракции (IUAE) [58]. Работа [59] посвящена экстракции хинина из плазмы крови после употребления напитков-тонигов и последующему спектрофотометрическому и флуориметрическому его определению.

Следует отметить активно развивающуюся в последнее время мицеллярную экстракцию или так называемую «экстракцию в точке помутнения», в качестве экстрагентов в которой используются поверхностно-активные вещества (ПАВ). Мицеллярная экстракция проводится следующим образом: в анализируемый раствор вводят высаливатель, затем добавляют ПАВ, смесь перемешивают, термостатируют и отделяют фазы. Далее определение пищевых красителей проводят спектрофотометрическим [49-52] или хроматографическим [60] методами анализа.

На сегодняшний день только для небольшого числа разрешенных синтетических пищевых красителей найдены оптимальные условия экстракции «в точке помутнения». В качестве экстрагентов использовали неионные ПАВ – Тритон X114 [50] и Тритон X100 [51, 61]. Из чего можно сделать вывод, что на данном этапе работы, посвященные извлечению синтетических красителей с помощью гомогенной экстракции, применимы лишь для узкого круга пищевых продуктов.

Таким образом, можно заключить, что в настоящее время применяются различные способы извлечения пищевых добавок из продуктов питания и лекарственных препаратов. Все они имеют свои достоинства и недостатки. Твердофазная экстракция отличается разнообразием твердых сорбентов, имеющих хорошие прочностные характеристики и недорогую стоимость. Применяется твердофазная экстракция для множества образцов пищевых продуктов. Но, хоть и является самым распространенным методом выделения красителей из продуктов питания, имеет достаточно сложный процесс пробоподготовки. Также во многих работах авторы не упоминают об оценке полноты извлечения красителя из сорбента.

Экстракционные методы извлечения пищевых добавок различными растворителями в отличие от твердофазной экстракции занимают меньше времени на этапе пробоподготовки. Но большинство экстрагентов являются очень токсичными, а также затруднен подбор фаз и оптимальных условий экстракции. Применяются гомогенная экстракция и экстракция органическими растворителями на сегодняшний день только для пищевых продуктов, имеющих не сложную матрицу (например, газированные напитки).

По нашему мнению сложно выделить преимущества тех или иных способов извлечения пищевых добавок из матриц продуктов пищевой и фармацевтической промышленности. Все они очень разнообразны и выбор метода выделения пищевых добавок, прежде всего, от сложности образцов исследуемых объектов. Но, тем не менее, поиск оптимального, селективного, дешевого и универсального способа извлечения пищевых добавок из продуктов питания и лекарственных препаратов является актуальной задачей для решения проблем качества и безопасности пищевых продуктов и фармацевтических препаратов, а также представляется перспективным исследованием для ученых.

1.3. Методы определения хинина и индигокармина

Основной стадией в любой аналитической процедуре является определение искомым веществ в исследуемых образцах. На сегодняшний день среди методов определения пищевых добавок (хинина и индигокармина) в продуктах питания и фармацевтических препаратах можно выделить основные: хроматографические, спектрофотометрические, электрохимические, флуориметрические методы анализа и капиллярный электрофорез.

1.3.1. Спектрофотометрические методы

Спектрофотометрический метод определения основан на измерении спектров поглощения растворов в ультрафиолетовой (200 – 400 нм), видимой (400 – 760 нм) и инфракрасной (более 760 нм) спектральных областях. Концентрация пищевых добавок в спектрофотометрическом анализе определяется путем измерения оптической плотности на определенном участке спектра в анализируемом растворе.

Спектрофотометрические методы анализа являются достаточно простыми в исполнении. Также в видимой области поглощения синтетических красителей и хинина большинство веществ, находящихся в растворе исследуемых пищевых продуктов (в основном углеводы) не оказывают мешающего воздействия при проведении анализа.

Но в спектрофотометрии существует проблема определения нескольких красителей, находящихся в одном образце одновременно, в виду наложения спектров поглощения красителей в смеси. Множество работ посвящено именно определению нескольких пищевых красителей при совместном присутствии. В основном, для решения таких задач применяют производную спектрофотометрию.

Некоторые спектрофотометрические методы анализа пищевых красителей представлены в работе [62].

При определении двух красителей в пищевых продуктах применяют первые производные спектров [62-63] при их совместном определении применяют производные второго порядка [65]. При наличии в образце трех красителей помимо первой производной и первой производной отношения спектров, применяют вторые производные спектров и производные двойного отношения спектров [66].

В случае, когда спектры первой и второй производных смесей перекрываются и уже невозможно применить для анализа красителей вышеописанные методы, тогда используют хемометрические алгоритмы [32].

Имеются работы по фотоколориметрическому определению красителя индигокармина E132 в напитках [67]. Индигокармин поглощает УФ свет в области 610 нм [68]. Спектрофотометрическое определение индигокармина в основном производится в продуктах питания [69]. Работы по спектрофотометрическому определению индигокармина в лекарственных препаратах практически не встречаются.

Не смотря на то, что спектрофотометрические методы являются самыми простыми для определения красителей, для определения вкусоароматической добавки хинина данные методы применяются реже.

Спектрофотометрические методы имеют недостаточную точность и узкий диапазон определяемых концентраций, возможно, это связано с тем, что хинин имеет три спектра поглощения. Поэтому спектрофотометрические методы для определения хинина в основном используются в качестве детекторов [70].

Спектрофотометрические методы широко применяются для анализа, как индивидуальных красителей, так и их смесей. Для анализа хинина эти методы применяются реже. Интервал концентрации красителей в пищевых продуктах от 0,01 до 60 мг/дм³. Погрешность измерений составляет 5 – 9 %.

Но спектрофотометрические методы, в основном, применяются для анализа достаточно простых веществ, не требующих сложной пробоподготовки, для анализа лекарственных препаратов данные методы не подходят.

1.3.2. Электрохимические методы

Синтетические пищевые красители содержат электроактивные группы, которые могут быть окислены или восстановлены. Каждый краситель имеет индивидуальный потенциал окисления или восстановления, также их можно определить в смесях. Для определения синтетических пищевых красителей описаны следующие электрохимические методы анализа: дифференциально-импульсная полярография, адсорбционная вольтамперометрия и потенциометрия.

Дифференциально-импульсная полярография описана в работах [70-71] для определения красителей E102, E110, E122, E124 и E129. Диапазон определяемых концентраций составляет 5 – 200 мкг/дм³. Метод применяется для определения красителей в безалкогольных напитках, сиропах и конфетах.

Метод адсорбционной вольтамперометрии применен для определения красителей E102, E104, E110, E120, E122, E123, E124, E127, E129 и E133 в различных пищевых продуктах [73]. Диапазон определяемых концентраций красителей варьируется в интервале 5,0 – 272,4 мкг/дм³.

Методом потенциометрии определяют красители E102, E110 и E104 в напитках и желе, но данному методу посвящено достаточно малое количество работ [74].

Для определения пищевой добавки хинина электрохимические методы анализа применяются чаще, чем спектрофотометрические, но хинин данными методами определяют только в напитках [74-75].

В электрохимических методах анализа используют различные электроды: ртутные, стеклоуглеродные, модифицированные (полиамингидрохлоридом, многослойными углеродными нанотрубками, висмутом, ацетиленовой сажей,

графеном, полимером с молекулярными отпечатками красителя E110 и фосфорновольфрамовой кислотой) [77].

Электрохимические методы анализа пищевых добавок на сегодняшний день мало разработаны и мало испытаны на реальных объектах. Описанными методами определяют лишь до четырех красителей в смеси. Из СК синего цвета определяют лишь E133 (синий блестящий), E132 (индигокармин) в работах по электрохимическому определению красителей не встречается. В основном определение красителей электрохимическими методами проводится в напитках и конфетах.

1.3.3. Капиллярный электрофорез

В основном капиллярный электрофорез применяется для разделения смесей синтетических пищевых красителей и проводится двумя вариантами: капиллярный зонный электрофорез [35] и мицеллярная электрокинетическая хроматография [78].

Метод основан на разделении компонентов в кварцевом капилляре под действием электрического поля. Смеси двигаются по капилляру с различной скоростью, зависящей от величины ионного радиуса, и в разное время достигают зоны детектирования. Также с помощью данного метода определяют подсластители и консерванты.

Метод капиллярного электрофореза применяют для определения красителей в напитках (алкогольных, безалкогольных и молочных), в мороженом и кондитерских изделиях. Пределы обнаружения варьируются для капиллярного зонного электрофореза 0,21 – 2,42 мг/мл и для мицеллярной электрокинетической хроматографии 0,27 – 1,80 мг/дм³. Индигокармин также определяют капиллярным электрофорезом [78-79].

Также с помощью данного метода определяют подсластители и консерванты. Множество работ посвящено определению хинина электрофорезом [80-82].

Метод капиллярного электрофореза отличается длительностью и тщательностью пробоподготовки и самого анализа, а также самой низкой чувствительностью по сравнению с известными методами определения пищевых добавок.

1.3.4. Хроматографические методы

Хроматографические методы анализа основаны на многократной сорбции и десорбции веществ в момент их перемещения в потоке жидкой фазы вдоль неподвижного сорбента. Разделение таких многокомпонентных систем основано на разной способности к сорбции компонентов в смеси. Основные хроматографические методы определения красителей представлены в работе [83].

Хроматографические методы анализа пищевых красителей наиболее распространены. Данным методом определяют наибольшее количество синтетических пищевых красителей, до 40 красителей, включая индигокармин [84]. В качестве неподвижной фазы используют неполярные сорбенты ХМК-С18 и ХМК-С8. В качестве подвижной фазы используют смеси этанола, ацетата аммония, ацетонитрила.

Бумажная хроматография. Данный метод является простым и доступным, не требует дорогостоящего оборудования. Основное достоинство бумажной хроматографии – разделение малых количеств веществ. Недостаток – неоднородность бумаги, вследствие чего происходит размывание хроматографических зон, что приводит к длительности анализа и большому расходу растворителя. В связи с этим бумажной хроматографии посвящены единичные работы [85].

Тонкослойная хроматография. Метод тонкослойной хроматографии позволяет определить от 4 до 13 синтетических пищевых красителей [28]. Существует несколько вариантов тонкослойной хроматографии: в большинстве случаев используется обращено-фазовая [86], меньшее количество работ посвящено ион-парной [87].

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Самое многочисленное количество работ посвящено именно этому хроматографическому методу анализа синтетических пищевых красителей. Данный метод позволяет не только разделить смесь, но и качественно и количественно определить содержание пищевых красителей в пробе.

В большинстве случаев при определении красителей данным методом используют обращено-фазовый вариант [29,83-84].

Хинин и его производные, в основном, определяют высокоэффективной жидкостной хроматографией в лекарственных препаратах [19, 80, 88], ликерах [89] и продуктах питания [19, 89, 90, 92].

В отличие от спектрофотометрических методов анализа хроматографические имеют более сложную и длительную пробоподготовку. Для твердых образцов производится растворение, гомогенизация, центрифугирование, сорбция и десорбция с сорбента, а также экстракция, фильтрация, упаривание и растворение в соответствующем растворителе.

1.3.5. Флуориметрические методы

Флуориметрией (флуоресцентный анализ) называется фотометрический метод определения концентрации вещества, основанный на измерении интенсивности света, возникающий при облучении вещества ультрафиолетовыми лучами. Физический эффект флуоресценции заключается в поглощении веществом кванта света возбуждения и переходе в новое энергетически богатое

состояние. Некоторый промежуток времени вещество излучает избыточную энергию в виде кванта света флуоресценции.

Флуориметрия – высокочувствительный фармакопейный метод, который применяется для качественного и количественного анализа. Количественный флуоресцентный анализ основан на зависимости между интенсивностью люминесценции и концентрацией исследуемого вещества.

Наличие в молекуле вещества сопряженных связей, карбоксильной, карбонильной, амидо-, нитрозо-, нитрогрупп и некоторых других указывает на возможность проявления его люминесцентных свойств.

Флуориметрический метод применяется в контроле качества фолиевой кислоты, риванола, хинина гидрохлорида, хлортетрациклина гидрохлорида, резерпина, тиамин гидрохлорида и гидробромида, рибофлавина, многих металлов (например, катиона магния в биологической жидкости) и др.

Флуориметрию используют при количественном определении очень малых количеств вещества в анализируемом растворе. Предел обнаружения 0,0001 – 100 мг/дм³. Погрешность определения 2-5%. Это позволяет определять в продуктах питания ничтожные количества вредных для здоровья, а часто и запрещенных к использованию, синтетических пищевых добавок.

На сегодняшний день методом флуориметрии определяют натуральные пищевые красители, такие как рибофлавин (витамин В2) в биологически активных добавках, путем титрования связывающим рибофлавин апобелком [23]. Также существуют не многочисленные работы [92-93] по определению синтетических пищевых красителей в продуктах питания методом флуориметрии, но все они носят перспективный характер, результаты имеют хорошую точность и воспроизводимость. Это связано с множеством достоинств метода флуориметрии по сравнению с остальными методами анализа. Кроме высокой чувствительности, широкого диапазона определяемых концентраций и экспрессности метод флуориметрии имеет дополнительные преимущества, не характерные для множества других методов анализа – это возможность анализа сложных смесей, исключительно низкий предел обнаружения, простота применения и небольшая

стоимость аппаратуры. Что касается анализа кондитерских изделий, здесь метод флуоресценции тоже имеет преимущество, так как при данном методе возможен анализ мутных растворов, что недопустимо в спектрофотометрии.

Так как синтетические пищевые красители не имеют жесткой структуры молекул, большинство из них, включая индигокармин, не способны к люминесценции.

Известно, что в кислой среде хинин имеет интенсивную голубую флуоресценцию. Несмотря на это, имеются немногочисленные работы по определению хинина в напитках методом флуориметрии [94-95]. Так как флуориметрия является самым чувствительным методом анализа [96], также используются флуориметрические детекторы в хроматографии. Но прямое флуориметрическое определение хинина в продуктах питания и фармацевтических препаратах носит перспективный характер.

Анализ литературных данных показал, что для определения СК индигокармина и вкусоароматической добавки хинина в продуктах питания и фармацевтических препаратах на сегодняшний день используется множество аналитических методов. Наибольшее количество пищевых добавок определяют хроматографическими методами, но, к сожалению, данные методы являются достаточно дорогостоящими. Также количество пищевых добавок определяют спектрофотометрическими методами и капиллярным электрофорезом. Появляются новые электрохимические методы анализа красителей.

Тем не менее, все описанные методы имеют свои достоинства и недостатки, что свидетельствует об актуальности не только усовершенствования уже имеющихся методов анализа, но и разработки совершенно новых.

Индигокармин является одним из малоизученных синтетических красителей на сегодняшний день, несмотря на его широкое использование в продуктах питания и лекарственных препаратах. Несмотря на известные люминесцентные свойства хинина, методом флуориметрии его определяют

только в напитках, во всех остальных продуктах питания и лекарственных препаратах хинин в основном определяют высокоэффективной жидкостной хроматографией. В связи с этим, разработка новых методик количественного определения хинина и индигокармина в продуктах питания и лекарственных препаратах с минимальной пробоподготовкой является актуальной задачей аналитической химии.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРА И МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1. Оборудование

Спектрофлуориметр «Флюорат-02-Панорама» – прибор для регистрации спектров пропускания растворов в УФ– и видимой области, а также для регистрации спектров люминесценции. Внешний вид прибора показан на рис. 2. Спереди расположены кнопки управления прибором, сверху – кюветное отделение, вмещающее стандартные кюветы с длиной оптического пути 1 см.

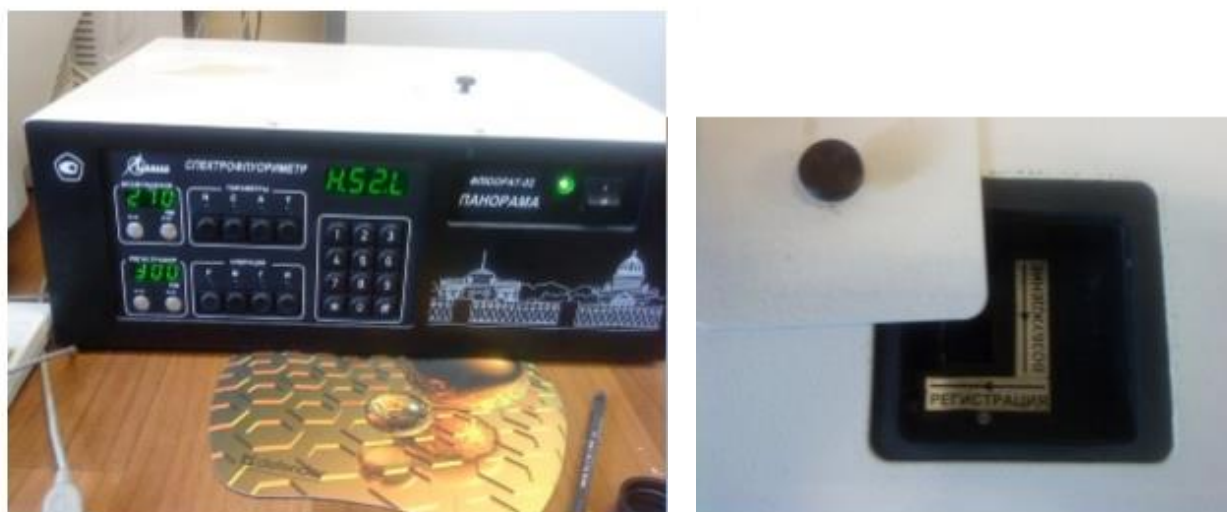


Рисунок 2 – Внешний вид прибора «Флюорат-02-Панорама» и вид кюветного отделения с крышкой

Прибор построен по однолучевой схеме. Оптическая схема прибора представлена на рис. 3.

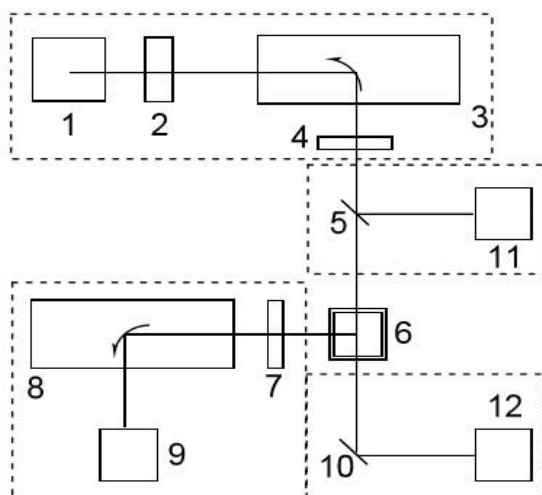


Рисунок 3 – Оптическая схема спектрофлуориметра «Флюорат-02-Панорама»

1 – Ксеноновая лампа; 2 – устройство отсечки второго порядка дифракции; 3 – монохроматор возбуждения; 4, 7 – светофильтры каналов возбуждения и регистрации люминесценции; 5, – светоделительная пластина; 6 – кювета с анализируемой пробой; 8 – монохроматор флуориметрического канала; 9 – фотоприёмник флуориметрического канала; 11 – фотоприёмник опорного канала; 12 – фотоприёмник канала пропускания (фотометрического).

Освещающий луч, источником которого является ксеноновая лампа (1), сначала проходит монохроматор канала возбуждения (3), который пропускает излучение лишь определённой длины волны. После монохроматора луч посредством светоделительной пластины (5) разделяется на два луча; только один из которых идет через образец (6). Оба луча попадают впоследствии на детекторы (11, 12), и степень погашения излучения раствором (пропускание, $I/I_0 = T, \%$) определяется сравнением интенсивностей этих лучей. Таким образом, оптическую плотность раствора D , являющуюся функцией пропускания, а также спектр (зависимость D от длины волны) по отношению к растворителю, можно получить, записав последовательно два спектра – раствора сравнения и испытуемого раствора. Для минимизации попадания в детектор возбуждающего излучения, под углом в 90° к освещающему лучу (если смотреть относительно кюветного отделения), расположен монохроматор канала испускания (флуориметрического канала) (8), который также из общего спектра (флуоресценции либо фосфоресценции) выделяет излучение с некоей длиной волны. После этого оно попадает в приемник (9), который регистрирует его интенсивность.

Источником излучения является импульсная ксеноновая лампа (1), которая позволяет генерировать короткие световые импульсы длительностью около 1 мкс с частотой повторения до 25 Гц. Это даёт возможность исследовать временные характеристики наведённого излучения – исследовать фосфоресценцию, которая длится некоторое время после прекращения освещения раствора. Можно также за непродолжительное время сделать несколько независимых измерений пропускания и люминесценции для множества (10, 25, 250) вспышек. Регистрация люминесценции производится фотоумножителем (9). Диапазон измерения спектров поглощения данного прибора – 180 ÷ 860 нм, спектров испускания – 180 ÷ 720 нм. Таким образом, в составе прибора есть два независимо работающих монохроматора (3, 8), каждый из которых можно либо установить на определённую длину волны, либо дать ему задание сканировать излучение по длинам волн, с записью определённого спектра. Управлять работой прибора можно с передней панели (рис. 3), где есть кнопки и цифровые индикаторы, достаточные для этой задачи. Кроме того, можно осуществлять и управление, и сбор данных с персонального компьютера, используя программу Panorama Pro, ярлык которой находится на рабочем столе компьютера.

В комплект входит кварцевая кювета для исследования флуоресценции 10×10×40 мм.

2.2. Объекты исследования и реактивы

Реактивы

В работе использованы следующие реактивы и стандартные вещества:

- Хинин, х.ч. (Реахим, Россия)
- Натрий гидроокись, х.ч. (лабтех, Россия)
- Лимонная кислота, ч.д.а. (Лаверна-лаб, Россия)
- Индигокармин (E132), ч.д.а. (Вектон, Россия)
- Синий патентованный (E131), ч.д.а. (Вектон, Россия)

- Бриллиантовый голубой (E133), ч.д.а. (Вектон, Россия)
- Хинолиновый желтый (E104), ч.д.а. (Вектон, Россия)
- Азорубин (кармуазин, E122), ч.д.а. (Вектон, Россия)
- Понсо 4R (E124), ч.д.а. (Вектон, Россия)
- Красный свекольный (E162), ч.д.а. (Китай)
- Флуоресцеин, ч.д.а. (Вектон, Россия)
- Кислота серная, х.ч. (ГОСТ 4204-77, Россия)

Объекты исследования

- Безалкогольный напиток «Schweppes Bitter Lemon» – изготовитель «The Coca-Cola Company», США
- Безалкогольный напиток «Schweppes Indian Tonic» – изготовитель «The Coca-Cola Company», США
- Безалкогольный напиток «Evervess» – изготовитель ООО «ПепсиКо Холдингс», США
- Таблетки «Анальги-хинин» – производитель Софарма, Болгария
- Таблетки (антибактериальное средство) «Левомецетин Актитаб»
- Витамины для детей «Пиковит» – производитель АО «КРКА», Словения
- Конфеты «Skittles» – производитель ООО «Марс», США.

2.3. Методика эксперимента

Спектрофотометрическая методика

Пробоподготовка исследуемых объектов при определении хинина заключалась в дегазации и разбавлении исходной пробы напитка в 10 раз в 0,01 М серной кислоте; растворении таблетки в 20 мл серной кислоты, фильтровании и разбавлении в 1000 раз. Снимали спектры поглощения стандарта и образцов веществ для определения максимума поглощения, который, в дальнейшем, использовали для измерения оптической плотности исследуемых растворов.

Хроматографическая методика

Пробоподготовка исследуемых объектов при определении содержания красителя ИК заключалась в растворении таблетки и конфеты в 10 мл дистиллированной воды с последующим центрифугированием, отбором пробы и снятии хроматограммы (качественный анализ) с последующим количественным анализом с применением спектрофотометрического детектора. В качестве неподвижной фазы использовали силикагель (С-18), в качестве подвижной – ацетонитрил.

Флуориметрическая методика

Пробоподготовка исследуемых объектов при определении содержания хинина заключалась в следующем. Таблетку предварительно растворяли в 20 мл 0,01 М серной кислоты. Полученный раствор разбавляли в 10 000 раз. Измеряли интенсивность разбавленного раствора, высчитывали концентрацию хинина в нем и пересчитывали на 20 мл исходного раствора. Исходную пробу напитка дегазировали и разбавляли в 100 раз дистиллированной водой.

Пробоподготовка исследуемых пищевых объектов при определении красителя ИК заключалась в растворении исходной пробы (оболочка таблетки и конфеты) в растворе щелочи (1,00 М NaOH) с последующим центрифугированием в течение 10 минут.

Исследование люминесцентных свойств заключалось в снятии синхронного спектра сканирования воды, серной кислоты и щелочи в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм при различных смещениях монохроматора от 20 до 120 нм. Аналогично в синхронном режиме снимали спектры анализируемых стандартов веществ хинина и индигокармина. Максимальный пик из синхронного режима сканирования соответствовал длине волны возбуждения, при которой в дальнейшем фиксировали длину волны люминесценции (регистрации сигнала). Полученный спектр в дальнейшем использовали для качественного и количественного анализа вещества в реальном объекте. Все операции проводили не менее трех раз.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ХИНИНА

Хинин (6'-methoxycinchonan-9-ol) – основной алкалоид коры хинного дерева, который известен, как самый эффективный противомаларийный препарат. Структурная формула хинина приведена на рисунке 4.

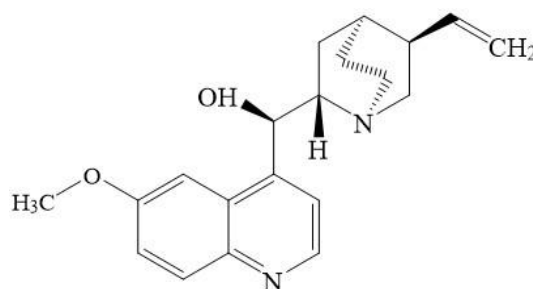


Рисунок 4 – Структурная формула хинина

Из литературы известно, что хинин обладает свойством люминесценции [95- 96, 99]. Однако, в ряде работ, встречаются разрозненные данные, как об оптимальных условиях его определения, так и о природе сигнала. В связи с этим в данной работе проведен поиск рабочих условий для количественного определения хинина, как в модельных средах, так и в пищевых продуктах.

3.1. Поиск рабочих условий определения хинина в модельных средах методом флуориметрии

Для поиска всех возможных длин волн возбуждения, при которых возможна люминесценция хинина в серной кислоте проводили сканирование раствора в синхронном режиме [97] при различных смещениях монохроматора от 20 до 100 нм.

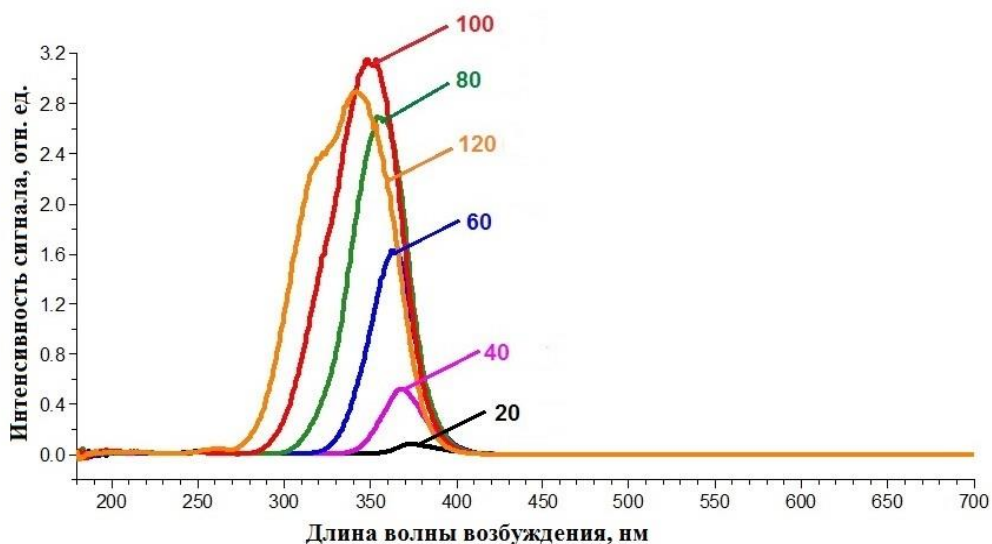


Рисунок 5 – Синхронный режим сканирования хинина при различных смещениях монохроматора ($C=10 \text{ мг/дм}^3$)

Как видно из рисунка 5 максимальное смещение монохроматора (разница между длиной волны возбуждения и люминесценции) достигает 100 нм, далее интенсивность сигнала падает.

Поэтому из синхронного режима сканирования установлена длина волны возбуждения 353 нм, при которой наблюдали максимальную люминесценцию хинина в серной кислоте 452 нм. На рисунке 6 представлен спектр возбуждения и спектр люминесценции хинина в серной кислоте. Все исследования проводили при низкой чувствительности прибора.

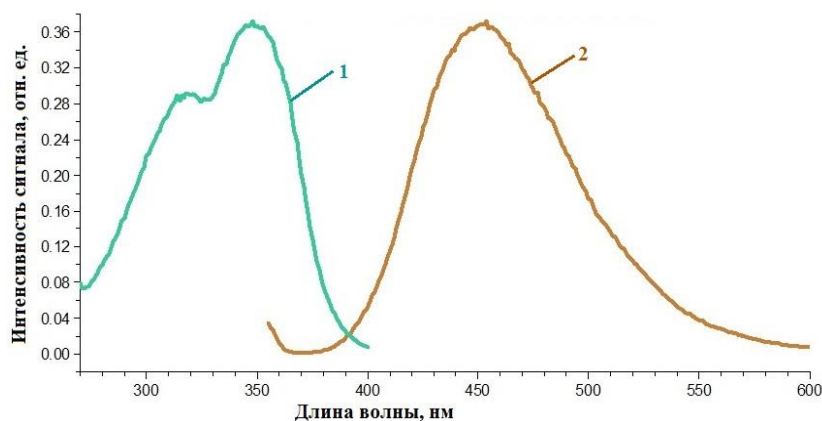


Рисунок 6 – Спектры возбуждения (1) и люминесценции (2) хинина в серной кислоте

В литературных источниках по флуориметрическому определению хинина в пищевых и фармацевтических объектах авторы используют различные концентрации серной кислоты. Например, при определении хинина капиллярным электрофорезом, авторы [70] применяют 0,0005 М серную кислоту. Для определения хинина в напитках-тониках авторы используют 0,05 М серную кислоту [94]. При определении хинина в безалкогольных напитках последовательным анализом впрыска (SIA) использовали 0,1 М H₂SO₄ [98].

К сожалению, авторы всех вышеупомянутых работ никак не обосновывают выбор той или иной конкретной концентрации серной кислоты.

В связи с вышеописанными фактами, для увеличения точности и чувствительности разрабатываемой методики исследовали несколько концентраций серной кислоты, а также интенсивность сигнала исследуемого вещества хинина разной концентрации в этих концентрациях серной кислоты и квантовый выход люминесценции хинина в исследуемых растворах кислот. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Исследование люминесцентных свойств хинина в растворах серной кислоты различных концентраций

| Концентрация H ₂ SO ₄ , М | Интенсивность сигнала люминесценции хинина (C = 0,1 мг/дм ³) в серной кислоте, отн.ед. | Интенсивность сигнала люминесценции хинина (C = 1 мг/дм ³) в серной кислоте, отн. ед. | Интенсивность сигнала люминесценции хинина (C = 10 мг/дм ³) в серной кислоте, отн. ед. | Квантовый выход хинина, отн. ед. |
|---|--|---|--|----------------------------------|
| 0,005 | 0,018 | 0,199 | 1,822 | 0,571 |
| 0,010 | 0,036 | 0,357 | 3,607 | 0,611 |
| 0,050 | 0,035 | 0,348 | 3,604 | 0,420 |
| 0,100 | 0,036 | 0,355 | 3,615 | 0,592 |
| 0,500 | 0,037 | 0,354 | 3,620 | 0,600 |
| 1,000 | 0,037 | 0,356 | 3,652 | 0,599 |

Как видно из таблицы, наибольший квантовый выход люминесценции хинина наблюдается в растворах серной кислоты с концентрациями 0,01 М и

0,500 М. При незначительном увеличении интенсивности сигнала люминесценции хинина с увеличением концентрации серной кислоты, всё-таки наиболее интенсивный сигнал люминесценции наблюдается в 0,01 М серной кислоте. Поэтому для количественного определения содержания хинина в исследуемых фармацевтических и пищевых продуктах выбрали концентрацию серной кислоты, равную 0,01 М. При данной концентрации кислоты наблюдали наименьшую интенсивность сигнала фона, что в дальнейшем поспособствовало уменьшению предела обнаружения.

3.2. Расчет квантового выхода люминесценции хинина

Квантовый выход – важная характеристика вещества, которая показывает эффективность преобразования возбуждающего света в свет люминесценции в исследуемом веществе [99]. В работе квантовый выход рассчитывали методом стандарта [100]. В качестве стандарта необходимо подбирать вещества, имеющие близкий максимум люминесценции, т.е., чтобы спектры люминесценции стандарта и исследуемого веществ пересекались (накладывались друг на друга). В работе стандартом выбрали раствор флуоресцеина ($C=10 \text{ мг/дм}^3$) в 0,1 М NaOH, квантовый выход которого хорошо известен и составляет 0,64 на длине волны испускания 520 нм [102,103]. Для правильности расчетов предварительно подбирали концентрации стандарта (флуоресцеин) и исследуемого (хинин) веществ так, чтобы их оптическая плотность была ниже 0,1. Данное требование необходимо для избегания поглощения части излучаемого света самим веществом, то есть концентрация растворов должна быть наиболее низкая.

Поэтому на первом этапе работы по определению квантового выхода рассчитывали оптические плотности исследуемого и стандартного растворов веществ. Для этого проводили сканирование растворов веществ и фоновых растворов в режиме регистрации сигнала от 363 до 650 нм. После сканирования растворов все данные переносили в программу Excel и средствами данной

программы усредняли значения измерений пропускания раствора при длине волны возбуждения (Таблица 3).

Таблица 3 – Расчет оптической плотности растворов стандарта и исследуемого веществ

| Длина волны | 0,1 М NaOH | | Флуоресцеин в 0,1М NaOH, С=10 мг/дм ³ | | 0,01 М H ₂ SO ₄ | | Хинин в 0,01 М H ₂ SO ₄ , С=8 мг/дм ³ | |
|-------------|------------|---------------------|--|---------------------|---------------------------------------|---------------------|--|---------------------|
| | T, % | T _{ср} , % | T, % | T _{ср} , % | T, % | T _{ср} , % | T, % | T _{ср} , % |
| 363 | 0,997159 | 0,99451 | 0,780212 | 0,778895 | 1,03791 | 1,033497 | 0,809819 | 0,809343 |
| 364 | 0,994234 | | 0,779828 | | 1,033221 | | 0,811125 | |
| 365 | 0,997276 | | 0,781116 | | 1,038341 | | 0,811185 | |
| 366 | 0,998300 | | 0,780826 | | 1,041152 | | 0,807741 | |
| 367 | 0,997989 | | 0,781823 | | 1,037712 | | 0,813117 | |
| 368 | 0,997436 | | 0,780891 | | 1,044041 | | 0,808865 | |
| 369 | 0,995806 | | 0,779901 | | 1,037071 | | 0,813826 | |
| 370 | 0,997433 | | 0,777295 | | 1,037639 | | 0,808837 | |
| | | | | | | | | |
| 649 | 0,996827 | | 0,779429 | | 1,039372 | | 0,815286 | |
| 650 | 0,994916 | | 0,778497 | | 1,032191 | | 0,807430 | |

Далее по полученным данным оптическую плотность на длине волны возбуждения вычисляли по формуле (1):

$$D = \lg (T_{\text{фон}} / T_{\text{исслед}}) \quad (1)$$

где D – оптическая плотность раствора;

T_{фон} – независимое измерение пропускания фонового раствора (0,1 М NaOH и 0,01 М H₂SO₄);

T_{исслед} – независимое измерение пропускания исследуемого раствора (флуоресцеин и хинин).

Концентрации исследуемых растворов хинина и флуоресцеина подбирали до тех пор, пока оптическая плотность не станет меньше 0,1:

для стандартного вещества (флуоресцеин): $D = \lg (0,99451/0,778895) = 0,010$

для исследуемого вещества (хинин): $D = \lg (1,033497/0,809343) = 0,010$

После подбора установлены следующие концентрации растворов исследуемого и стандартного веществ: хинин – 8 мг/дм³, флуоресцеин – 10 мг/дм³.

Из полученных расчетов можно сделать вывод о том, что подобранные концентрации стандартного и исследуемого веществ подходят для дальнейшего расчета квантового выхода.

Далее получали исправленные на фон спектры люминесценции исследуемого и стандартного веществ. Для этого для каждой длины волны вычитали интенсивность люминесценции фонового спектра из интенсивности люминесценции самого вещества (исследуемого и стандарта).

После получения исправленных на фон спектров люминесценции средствами Excel численным интегрированием методом трапеций рассчитывали площади под этими исправленными спектрами люминесценции. Для этого для каждого значения испускания рассчитывали значение площади элементарной трапеции под кривой испускания по формуле (2):

$$S_i = (I_i + I_{i+1}) \cdot \Delta\lambda / 2 \quad (2)$$

Где S_i – площадь элементарной трапеции под кривой испускания;

I_i – значение испускания раствора;

$\Delta\lambda$ – полуширина полосы поглощения (половина максимальной оптической плотности).

Сумма значений площадей элементарных трапеций будет равна площади под кривой исследуемого и стандартного веществ ($S_{\text{исслед}}$ и $S_{\text{ст}}$).

Исправленные на фон спектры люминесценции и площади элементарных трапеций представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Квантовый выход люминесценции хинина в 0,005 М H₂SO₄

| Длина волны | Флуоресцеин в 0,1 М NaOH, C=10 мг/дм ³ | | | | | Хинин в 0,01 М H ₂ SO ₄ , C=8 мг/дм ³ | | | | |
|-------------|--|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| | I _{фон} | I _{р-ра} | I _i | S _i | S _{ст} | I _{фон} | I _{р-ра} | I _i | S _i | S _{исслед} |
| 363 | 0,02753 | 0,04014 | 0,01262 | 0,01388 | 168,649 | 0,01232 | 0,01311 | 0,00079 | 0,00124 | 168,458 |
| 364 | 0,01689 | 0,02409 | 0,00721 | 0,00766 | | 0,00749 | 0,00918 | 0,00168 | 0,00194 | |
| 365 | 0,00947 | 0,01319 | 0,00373 | 0,00429 | | 0,00450 | 0,00669 | 0,00219 | 0,00252 | |
| 366 | 0,00479 | 0,00721 | 0,00241 | 0,00258 | | 0,00236 | 0,00522 | 0,00286 | 0,00286 | |
| 367 | 0,00221 | 0,00348 | 0,00127 | 0,00186 | | 0,00105 | 0,00391 | 0,00287 | 0,00317 | |
| 368 | 0,00094 | 0,00233 | 0,00139 | 0,00209 | | 0,00056 | 0,00403 | 0,00347 | 0,00346 | |
| 369 | 0,00034 | 0,00193 | 0,00159 | 0,00212 | | 0,00048 | 0,00393 | 0,00344 | 0,00349 | |
| 370 | 0,00033 | 0,00176 | 0,00143 | 0,00186 | | 0,00051 | 0,00405 | 0,00354 | 0,00389 | |
| | | | | | | | | | | |
| 649 | 0,00004 | 0,02427 | 0,02424 | 0,03308 | | 0,00031 | 0,00754 | 0,00723 | 0,00717 | |
| 650 | 0,00004 | 0,02305 | 0,02302 | | | 0,00042 | 0,00752 | 0,00711 | | |

Расчет квантового выхода проводили по формуле (3):

$$\varphi_{\text{исслед}} = \frac{(1-10^{-D_{\text{ст}}}) * S_{\text{исслед}} * n_{\text{исслед}}^2}{(1-10^{-D_{\text{исслед}}}) * S_{\text{ст}} * n_{\text{ст}}^2} * \varphi_{\text{ст}} \quad (3)$$

где $D_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартного раствора флуоресцеина на длине волны возбуждения 353 нм;

$D_{\text{исслед}}$ – оптическая плотность исследуемого раствора хинина на длине волны возбуждения 353 нм;

$S_{\text{ст}}$ – площадь под спектром испускания (люминесценции) стандартного раствора флуоресцеина;

$S_{\text{исслед}}$ – площадь под спектром испускания (люминесценции) исследуемого раствора хинина;

$n_{\text{ст}}$ – показатель преломления стандартного растворителя NaOH – 1,47;

$n_{\text{ст}}$ – показатель преломления исследуемого растворителя H₂SO₄ – 1,39;

$\varphi_{\text{ст}}$ – квантовый выход стандартного раствора флуоресцеина (0,64);

$\varphi_{\text{исслед}}$ – квантовый выход исследуемого раствора хинина.

По полученным данным квантовый выход хинина в 0,005 М H₂SO₄ составил:

$$\varphi_{исслед} = \frac{(1-10^{-0,10}) * 168,458 * 1,39^2}{(1-10^{-0,10}) * 168,649 * 1,47^2} * 0,64 = 0,571$$

Аналогично приведенному выше алгоритму рассчитаны квантовые выходы хинина в 0,01М, 0,05М, 0,1М, 0,5М и 1М растворах серной кислоты. Результаты представлены в таблице 2.

3.3. Исследование природы сигнала люминесценции хинина

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) (Рис. 7).

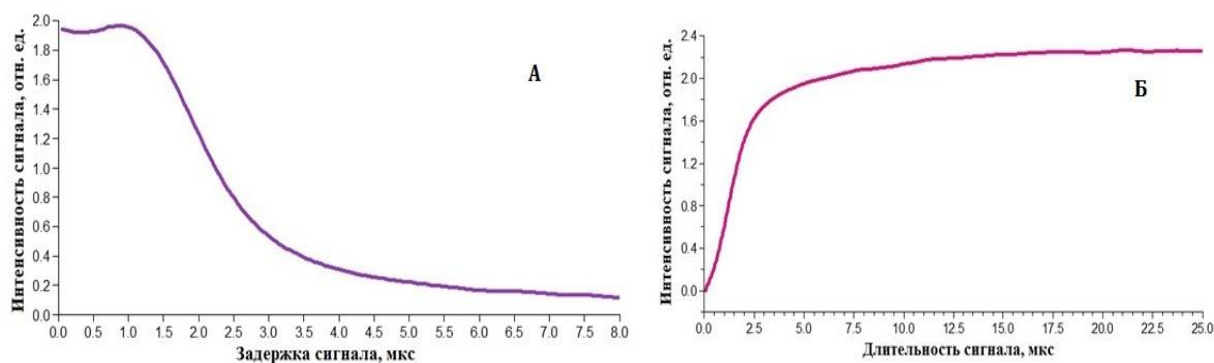


Рисунок 7 – Зависимость интенсивность люминесценции хинина от параметров строба: А – задержка сигнала, В - длительность сигнала

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. Мгновенное затухание свечения после прекращения возбуждения от 10^{-7} до 10^{-10} с характерно для флуоресценции, продолжение некоторое время свечения после прекращения возбуждения от 10^{-6} до 10^{-1} с для фосфоресценции [99].

Для установления вида процесса люминесценции хинина строили зависимость интенсивности сигнала люминесценции от времени сигнала (Рис.8).

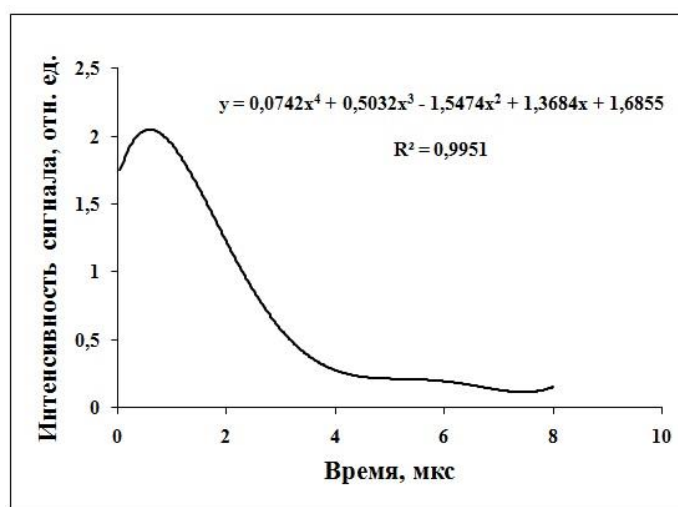


Рисунок 8 – Кривая кинетики затухания хинина в 0,01 М H_2SO_4

С помощью полученной кривой затухания хинина высчитывали среднее время жизни люминесценции через площадь под кривой затухания (определенный интеграл от 0 до 8 мкс для функции):

$$\int_0^8 (0,0742x^4 + 0,5032x^3 - 1,5474x^2 + 1,3684x + 1,6855) dx$$

Для хинина время жизни составило $7,94 \cdot 10^{-4}$ с. Из расчетов можно сделать вывод, что для хинина в 0,01М H_2SO_4 характерен процесс фосфоресценции.

3.4. Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы пищевых продуктов и фармацевтических препаратов на сигнал люминесценции хинина

В анализе пищевых добавок, при определении веществ в сложных объектах (пищевые продукты и фармацевтические препараты) одной из важных стадий является пробоподготовка, чтобы обеспечить высокую селективность и точность анализа. Этой проблеме посвящено множество работ и публикаций, что свидетельствует о важности и актуальности исследований в данной области [54-60]. Но не всегда удается полностью извлечь исследуемое вещество из пищевой или фармацевтической матрицы, а зачастую в этом и нет необходимости, если другие компоненты матрицы не мешают определению искомого вещества, что может также сократить время анализа и его себестоимость.

Поэтому дополнительным этапом данной работы явился анализ мешающего влияния компонентов матрицы пищевых продуктов и фармацевтических препаратов на сигнал люминесценции хинина.

Самыми распространенными компонентами пищевой матрицы продуктов являются сахар и лимонная кислота. Что касается сахара, данный компонент также очень часто встречается в лекарственных препаратах.

Исследовали сигнал люминесценции хинина в 0,01 М растворе серной кислоты при добавлении максимального количества сахара, заявленного производителем на этикетке напитков (9 г на 100 мл продукта), а также двукратное и трехкратное превышение заявленного содержания для более широкой и точной оценки мешающего влияния данного компонента (сахара) на люминесцентный сигнал хинина. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Количественное содержание лимонной кислоты в пищевых продуктах производителями на этикетке обычно не указывается. Максимально допустимое содержание лимонной кислоты [103] в напитках регламентируется как 5 г на 100 мл продукта. Исходя из этих данных, проведены исследования сигнала

люминесценции хинина в присутствии максимально разрешенного количества лимонной кислоты, а также его двукратного и трехкратного превышения. Результаты представлены в таблице 5.

Кроме этого проведена серия экспериментов по исследованию сигнала люминесценции хинина в присутствии обоих компонентов пищевой матрицы – сахара и лимонной кислоты. Также проведена серия экспериментов при двукратном и трехкратном превышении максимального содержания этих компонентов в смеси. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов пищевой матрицы на флуориметрическое определение хинина ($n = 5, p = 0,95$)

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

Как видно из таблицы 5 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 хинин флуориметрическим методом без предварительного выделения хинина из пищевой матрицы.

Кроме напитков, хинин также широко используется в лекарственных препаратах в качестве основного действующего вещества. В связи с этим было проанализировано мешающее влияние таких фармацевтических веществ как

анальгин, рибофлавин (витамин В₂) и аскорбиновая кислота. Количественное содержание исследуемых фармацевтических 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 6.

Таблица 6 – 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 | Лабораторное смещение, % |
|--------------------|--|--|--------------------|--------------------------|
| 51,00 | анальгин | 200 | 52,79 ± 1,64 | 2 |
| | | 400 | 51,43 ± 0,60 | |
| | | 600 | 52,33 ± 1,79 | |
| | рибофлавин (витамин В ₂) | 30 | 52,97 ± 1,15 | |
| | | 60 | 51,94 ± 0,29 | |
| | | 90 | 51,66 ± 0,31 | |
| | аскорбиновая кислота | 10 | 51,22 ± 0,57 | |
| | | 20 | 51,97 ± 1,28 | |
| | | 30 | 52,92 ± 1,24 | |

Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что присутствие анальгина, рибофлавина и аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах, а также их двукратное и трехкратное превышение нормы, не оказывает значительного мешающего влияния на сигнал люминесценции хинина.

3.5. Исследование мешающего влияния пищевых красителей на сигнал люминесценции хинина

Помимо различных компонентов пищевой и фармацевтической матрицы в продуктах питания и лекарственных препаратах практически всегда присутствуют пищевые красители. Для окрашивания пищевых продуктов и лекарственных препаратов используют как синтетические, так и натуральные пищевые красители. Кроме этого для достижения необходимого цвета зачастую используют смесь красителей. Поэтому в отдельный блок работы было выделено исследование мешающего влияния синтетических и натуральных пищевых красителей на сигнал люминесценции хинина.

Для более широкого обзора влияния пищевых красителей на люминесценцию хинина были выбраны следующие синтетические красители: синие – патентованный синий E131 и блестящий синий E133 (трифенилметановые красители), индигокармина E132 (индигоидный краситель); желтые – хинолиновый желтый E104 (хинофталоновые красители); оранжевые – понсо 4R (азокрасители); красные – азорубин E122 (азокрасители). Из натуральных пищевых красителей выбран краситель красный свекольный E162 розового оттенка.

Из полученных исследований можно сделать вывод о том, что все пищевые красители по-разному влияют на люминесценцию хинина. Одни красители, такие как патентованный синий E131 и хинолиновый желтый E104 смещают сигнал люминесценции хинина в батохромную область. Другие красители, такие как азокрасители понсо 4R E124 и азорубин E122, а также натуральный пищевой краситель красный свекольный E162 сдвигают спектр люминесценции хинина в гипсохромную область. Влияние пищевых красителей на люминесценцию хинина представлено на рисунке 9. Здесь показано влияние красителей при их концентрации в растворе 10 мг/дм^3 , то есть интенсивно окрашенные растворы.

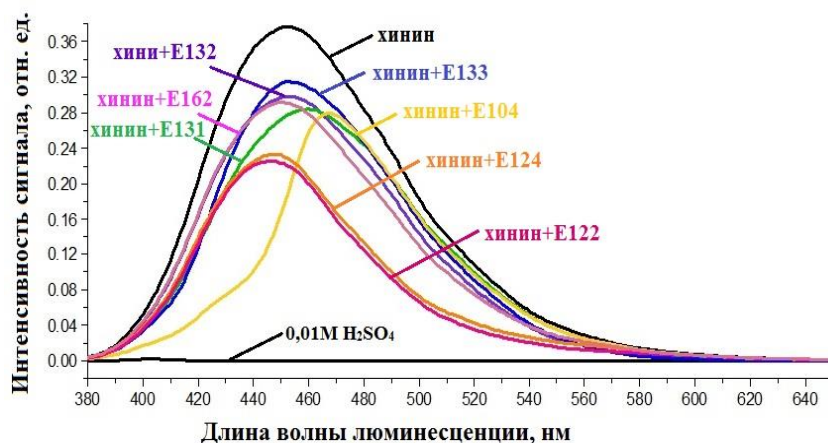


Рисунок 9 – Спектр люминесценции хинина ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) и спектр люминесценции хинина в присутствии различных пищевых красителей ($C_{\text{хинина}}=1 \text{ мг/дм}^3$, $C_{\text{красителей}}=10 \text{ мг/дм}^3$)

Установлено, что все красители однозначно в той или иной мере гасят люминесценцию хинина. Это связано с окраской раствора. При интенсивном окрашивании исследуемого раствора, часть энергии возбуждения тратиться на поглощение цветным раствором, то есть происходит перепоглощение энергии возбуждения и люминесценции хинина. Доказательство этому можно проследить на рисунках 10 и 11.

На рисунке 10 на примере красителя хинолинового желтого показана зависимость спектра люминесценции хинина в растворах, содержащих различную концентрацию этого красителя. То есть, чем менее интенсивно окрашен раствор, тем более интенсивнее проявляется сигнал люминесценции хинина.

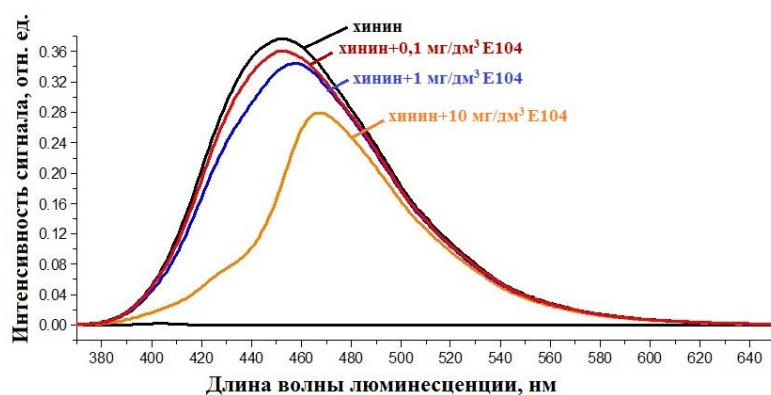


Рисунок 10 – Спектр люминесценции хинина ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в присутствии синтетического пищевого красителя хинолинового желтого E104 различной концентрации

Для того, чтобы избавиться от мешающего влияния красителей при флуориметрическом определении хинина, необходимо разбавить исследуемый раствор до достижения им практически бесцветного оттенка. Данный процесс продемонстрирован на рисунке 11.

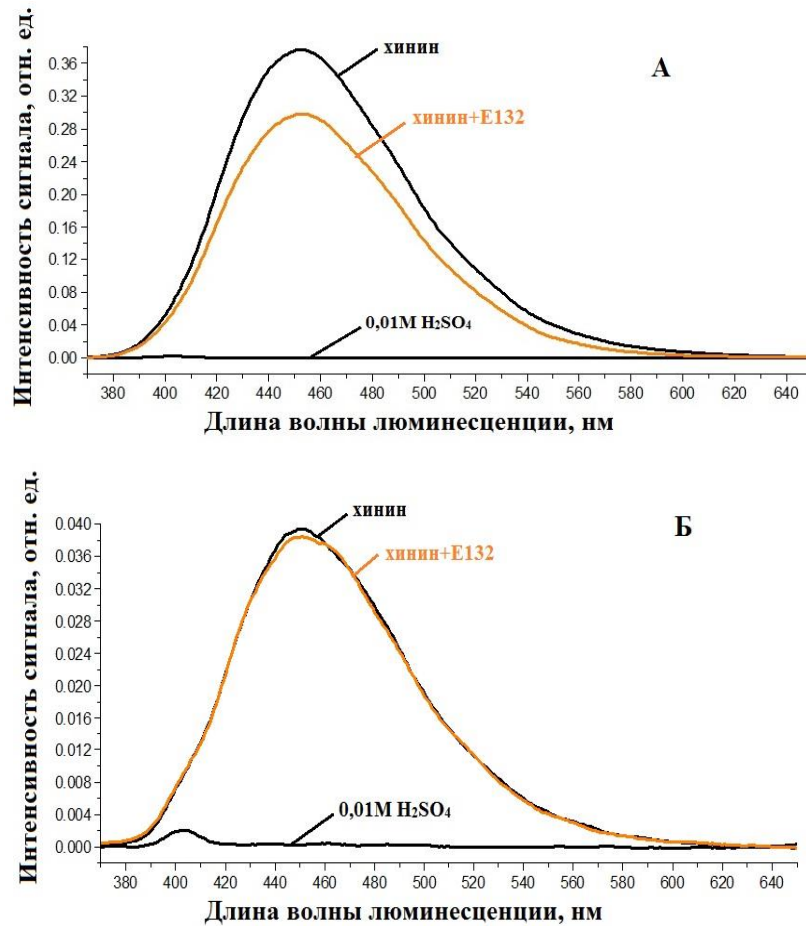


Рисунок 11 – Спектр люминесценции хинина ($C=1$ мг/дм³) в присутствии синтетического пищевого красителя индигокармина ($C=10$ мг/дм³): А – исходный раствор, Б – исходный раствор, разбавленный в 10 раз

Как видно из полученных исследований на рисунках 9 – 11, разбавление ярко окрашенных исследуемых объектов до практически бесцветных растворов необходимая часть пробоподготовки для разрабатываемой флуориметрической методики. Это необходимо для предотвращения процесса перепоглощения света в исследуемом растворе и для получения правильных результатов количественного определения содержания хинина в этих растворах. Результаты количественных исследований мешающего влияния пищевых красителей на люминесценцию

хинина, а также смещение длин волн люминесценции хинина (нм) представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Исследование мешающего влияния различных пищевых красителей на флуориметрическое определение хинина

| Введено хинина, мг/дм ³ | Пищевой краситель | Исходный раствор | | | Исходный раствор, разбавленный в 10 раз | |
|------------------------------------|-------------------|--|------------------------------------|--|---|--|
| | | Введено пищевого красителя, мг/дм ³ | Найдено хинина, мг/дм ³ | Длина волны люминесценции λ , нм | Найдено хинина, мг/дм ³ | Длина волны люминесценции λ , нм |
| 1 | E131 | 10 | 0,79 ± 0,01 | 460 | 1,06 ± 0,02 | 452 |
| | | 1 | 0,89 ± 0,01 | 454 | | |
| | | 0,1 | 0,99 ± 0,04 | 452 | | |
| 1 | E132 | 10 | 0,83 ± 0,03 | 455 | 1,04 ± 0,05 | 452 |
| | | 1 | 1,04 ± 0,05 | 452 | | |
| | | 0,1 | 1,08 ± 0,07 | 452 | | |
| 1 | E133 | 10 | 0,87 ± 0,03 | 455 | 0,96 ± 0,06 | 452 |
| | | 1 | 0,93 ± 0,07 | 452 | | |
| | | 0,1 | 0,95 ± 0,06 | 452 | | |
| 1 | E104 | 10 | 0,78 ± 0,02 | 469 | 1,03 ± 0,06 | 452 |
| | | 1 | 0,97 ± 0,03 | 458 | | |
| | | 0,1 | 1,02 ± 0,04 | 452 | | |
| 1 | E124 | 10 | 0,64 ± 0,06 | 448 | 1,04 ± 0,07 | 452 |
| | | 1 | 0,79 ± 0,03 | 450 | | |
| | | 0,1 | 1,01 ± 0,01 | 452 | | |
| 1 | E122 | 10 | 0,62 ± 0,01 | 447 | 0,94 ± 0,06 | 452 |
| | | 1 | 0,98 ± 0,01 | 451 | | |
| | | 0,1 | 1,08 ± 0,06 | 452 | | |
| 1 | E162 | 100 | 0,82 ± 0,06 | 452 | 1,04 ± 0,07 | 452 |
| | | 10 | 0,95 ± 0,05 | 452 | | |
| | | 1 | 0,99 ± 0,05 | 452 | | |

3.6. 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. 12).

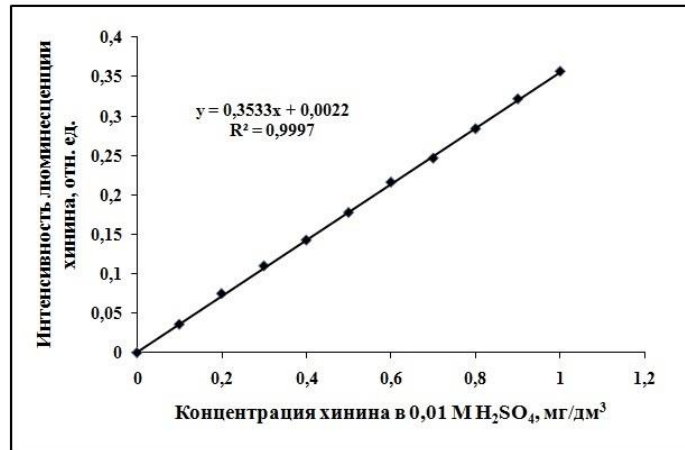


Рисунок 12 – Градуировочная зависимость интенсивности сигнала люминесценции от концентрации хинина в 0,01 М серной кислоте

Для оценки правильности результатов разрабатываемой флуориметрической методики использовали спектрофотометрический метод анализа на длине волны поглощения 331 нм (Рис. 13).

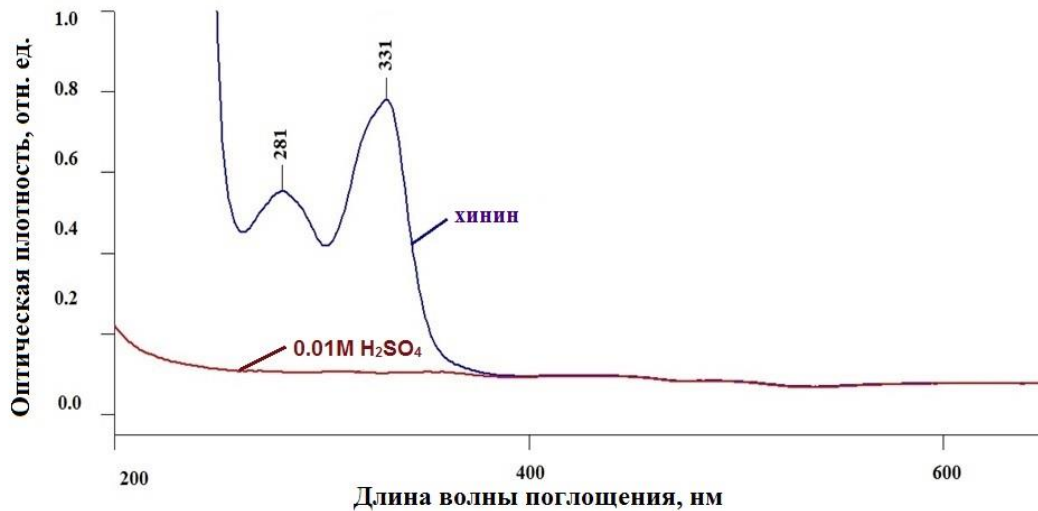


Рисунок 13 – Спектр поглощения хинина в 0,01 М серной кислоте

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. 14).

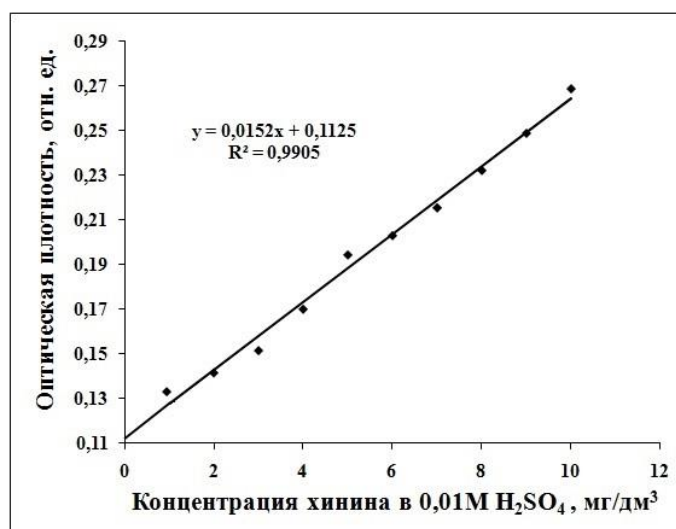


Рисунок 14 – Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации хинина в 0,01 М серной кислоте

Результаты количественного определения хинина в исследуемых фармацевтических и пищевых объектах двумя методами анализа представлены в таблице 8.

Таблица 8 – 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 8 наблюдается хорошая сходимость результатов разрабатываемой флуориметрической методики с результатами известной спектрофотометрической методики. В напитке содержание хинина не превышает

максимальное допустимое значение 85 мг/дм³. Но содержание хинина в таблетке немного превышает заявленное количество 51 мг на таблетку, что может повредить здоровью человека при постоянном употреблении данного лекарства.

Для установления минимальной определяемой концентрации хинина флуориметрическим методом рассчитывали предел обнаружения хинина в 0,01 М серной кислоте, который составил 0,0012 мг/дм³. Предел обнаружения был рассчитан как минимальный аналитический сигнал, значимо превышающий сигнал фона по формуле (4):

$$C_{\min} = 3S_0/S \quad , \quad (4),$$

где S_0 – стандартное отклонение для серии значений сигнала контрольного опыта (фоновый раствор 0,01 М H₂SO₄ ($n = 10$)), S – коэффициент чувствительности, который составил 0,3533. Получен низкий предел обнаружения хинина по сравнению с рядом известных работ.

3.7. Оценка метрологических характеристик методики определения хинина в исследуемых объектах

Одной из важнейших задач при разработке методики является получение точных, достоверных и воспроизводимых результатов.

Методика измерений – документированная совокупность операций, выполняющихся для получения результата измерений с установленными показателями точности.

Основными стандартами, на которые необходимо опираться при разработке любой методики, являются следующие:

ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

РМГ 61–2010 ГСИ Показатели точности, правильности, прецизионности методики количественного химического анализа. Методы оценки.

РМГ 76 – 2014 Государственная система обеспечения единства измерений.

В аналитической химии ошибки измерений делятся на систематические (правильность анализа), случайные (прецизионность или воспроизводимость) и грубые (отброс).

Основными метрологическими характеристиками разрабатываемой методики являются:

Правильность – качество результатов измерения, характеризующее малость (близость к нулю) систематической погрешности или степень близости среднего результата к принятому опорному.

Воспроизводимость (прецизионность) – качество результатов измерений, характеризующее малость случайной погрешности (стабильность результатов анализа) или степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях.

Точность – обобщающее понятие, характеризующее малость любой составляющей неопределенности, как систематической, так и случайной.

Правильность и воспроизводимость являются составляющими точности или так называемыми точностными характеристиками.

На результаты химического анализа могут влиять различные факторы, такие как оборудование, квалификация оператора, калибровка, интервал времени между анализами и факторы окружающей среды.

В зависимости от этих факторов прецизионность результатов анализа может включать:

- прецизионность анализа в условиях повторяемости – работа в максимально контролируемых условиях по одной методике в одной лаборатории, одним оператором на одном оборудовании;

- прецизионность анализа в условиях воспроизводимости – работа по одной методике, но выполняемая разными операторами в разное время и на разном оборудовании;

- внутрилабораторная прецизионность анализа – работа по одной методике на одном оборудовании, но разными людьми и в разное время.

Мерой оценки разрабатываемой методики принято считать среднеквадратичное отклонение (СКО):

σ_r – СКО повторяемости;

σ_R – СКО воспроизводимости;

$\sigma_{RЛ}$ – СКО внутрилабораторной прецизионности.

После проведения пробоподготовки, описанной в главе 2, проводили определение количества содержания хинина в исследуемых продуктах пищевой и фармацевтической промышленности по градуировочную графику $y=0,3533x+0,0022$ ($R^2=0,9997$). Для построения градуировочного графика готовили серию стандартов раствора хинина в 0,01М H_2SO_4 и регистрировали сигнал люминесценции хинина на 452 нм в одинаковых условиях. Строили график зависимости интенсивности люминесценции хинина в 0,01М H_2SO_4 на длине волны 452 нм от его концентрации в серной кислоте.

При определении концентрации хинина в исследуемых образцах, фиксировали интенсивность сигнала анализируемой пробы и находили его концентрацию по соответствующему значению градуировочного графика.

При разработке данной флуориметрической методики были определены следующие метрологические характеристики:

1. Показатель повторяемости (σ_r);
2. Показатель внутрилабораторной прецизионности ($\sigma_{RЛ}$);
3. Показатель правильности ($\pm\Delta_c$);
4. Показатель точности ($\pm\Delta$).

Подробный расчет перечисленных метрологических показателей представлен в Приложении 1.

Обобщенные результаты полученных метрологических характеристик разрабатываемой флуориметрической методики определения хинина в модельных растворах, в присутствии компонентов матрицы исследуемых объектов, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Метрологические характеристики флуориметрической методики определения хинина ($P=0,95$, $n=2$, $L=10$)

| Концентрация хинина, мг/дм ³ | Показатель повторяемости σ_r , % | Показатель внутрилабораторной прецизионности $\sigma_{Rл}$, % | Показатель правильности $\pm\Delta_c$, % | Показатель точности $\pm\Delta$, % |
|---|---|--|---|-------------------------------------|
| 0,1 | 3 | 7 | 6 | 23 |
| 0,2 | 1 | 4 | 4 | 19 |
| 0,4 | 1 | 4 | 4 | 15 |
| 0,6 | 1 | 3 | 3 | 13 |
| 0,8 | 1 | 3 | 4 | 11 |
| 1,0 | 1 | 3 | 4 | 7 |

Из полученных метрологических характеристик разрабатываемой флуориметрической методики определения хинина в присутствии сахара и лимонной кислоты (матрица исследуемых объектов), представленных в таблице 9, можно сделать вывод, что показатель точности не превышает 34%, а показатели повторяемости и воспроизводимости не превышают 3%.

Необходимо отметить, что при возрастании концентрации хинина происходит увеличение таких показателей, как точность, правильность и воспроизводимость (Рис. 15).

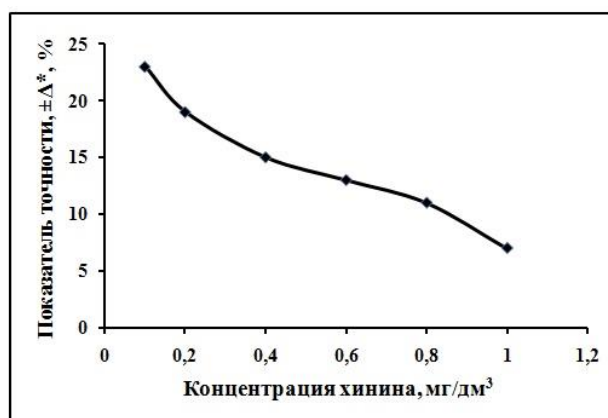


Рисунок 15 – Изменение показателя точности флуориметрической методики определения хинина от его концентрации в 0,01 М серной кислоте в модельных растворах

Как видно из рисунка 15, зависимость показателя точности от концентрации исследуемого вещества хинина не носит линейный характер, поэтому целесообразно разбить оценку показателя точности на несколько интервалов концентраций и каждому интервалу приписать соответствующие количественные характеристики (Таблица 10).

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

| Диапазон измерений, мг/дм ³ | Показатели прецизионности | | Показатель точности $\pm\Delta$, % |
|--|---|--|-------------------------------------|
| | Показатель повторяемости σ_r , % | Показатель воспроизводимости $\sigma_{Rл}$, % | |
| 0,1 ÷ 0,4 | 3 | 7 | 23 |
| 0,4 ÷ 1,0 | 1 | 4 | 15 |

Из таблицы 10 можно установить, что при определении хинина в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,4 мг/дм³ показатель точности не превышает 23 %. Данная систематическая погрешность в области малых концентраций обусловлена мешающим влиянием компонентов матрицы исследуемых объектов. С возрастанием концентрации анализируемого вещества хинина систематическая погрешность уменьшается, что можно наблюдать в диапазоне концентраций от 0,4 до 1,0 мг/дм³, где показатель точности не превышает 15 %.

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

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ ИНДИГОКАРМИНА (E132)

СПК синего цвета Индигокармин (E132) также известен как кислотно-основной индикатор, применяемый для анализа металлов в растворе [104]. Индигокармин относится к классу индигоидных красителей, основным свойством которых является способность восстановления до водорастворимого бесцветного лейкосоединения (Рис. 16) в щелочной среде [105].

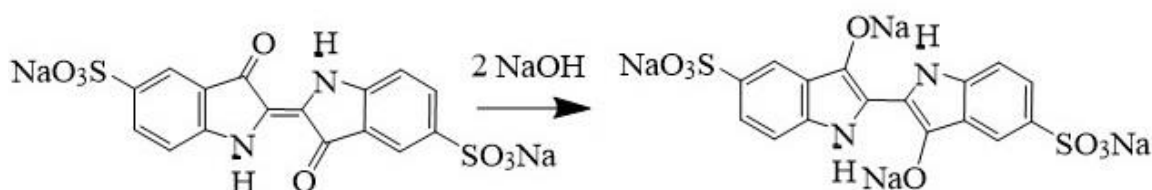


Рисунок 16 – Схема образования лейкосоединения индигокармина в щелочной среде

Сам краситель E132 в водном растворе не люминесцирует, но при растворении индигокармина в щелочи установлена люминесценция образующегося ЛС ИК [106, 107], что и явилось идеей определения синтетического красителя индигокармина в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах методом флуориметрии.

4.1. Поиск рабочих условий определения индигокармина в модельных средах методом флуориметрии

Для поиска всех возможных длин волн возбуждения ЛС, образовавшегося при реакции красителя индигокармина с щелочью, сканировали раствор ЛС в синхронном режиме при различных смещениях монохроматора от 20 до 160 нм (Рис. 17).

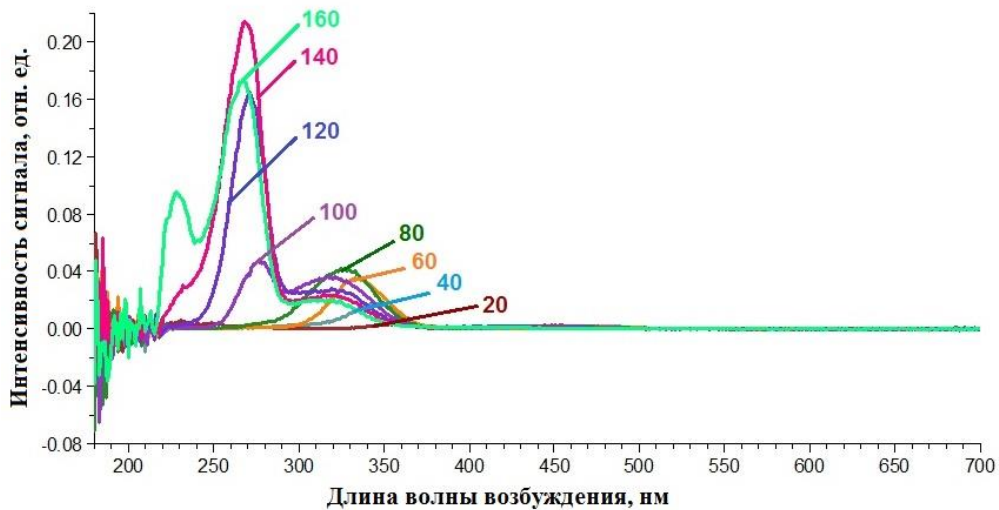


Рисунок 17 – Синхронный режим сканирования лейко соединения синтетического пищевого красителя индигокармина E132 ($C=10 \text{ мг/дм}^3$) в NaOH

Из синхронного режима сканирования установили оптимальную длину волны возбуждения 270 нм, при которой наблюдали наиболее интенсивную люминесценцию ЛС ИК на длине волны 410 нм (Рис 18).

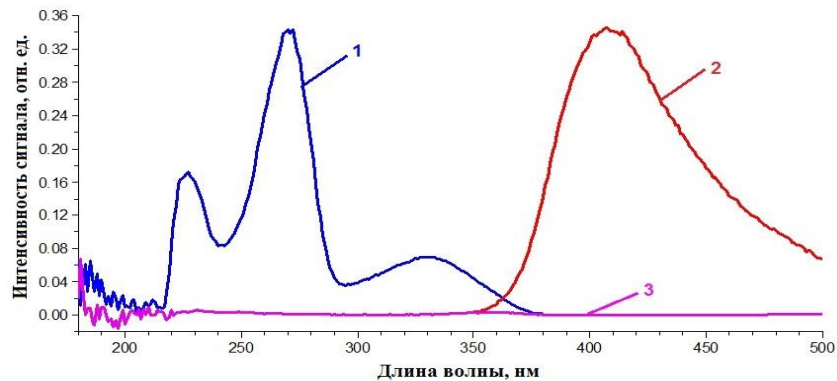


Рисунок 18 – Спектры возбуждения (1) и люминесценции (2) лейко соединения синтетического пищевого красителя индигокармина (E132), 3 – NaOH

Для увеличения точности разрабатываемой флуориметрической методики при найденной длине волны возбуждения 270 нм подбирали наиболее оптимальную концентрацию щелочи NaOH, в которой наблюдается наибольшая интенсивность сигнала люминесценции ЛС ИК на длине волны 410 нм. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Исследование люминесцентных свойств синтетического пищевого красителя индигокармина (E132) в растворах NaOH различной концентрации

| Концентрация NaOH, М | Интенсивность сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина (С = 0,1 мг/дм ³) в щелочи, отн.ед. | Интенсивность сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина (С = 1 мг/дм ³) в щелочи, отн. ед. | Интенсивность сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина (С = 10 мг/дм ³) в щелочи, отн. ед. | Квантовый выход ЛС ИК в щелочи, отн. ед. |
|----------------------|---|--|---|--|
| 0,1 | 0,0113 | 0,0842 | 0,6570 | 0,0024 |
| 0,5 | 0,0730 | 0,1201 | 0,4118 | 0,0047 |
| 1,0 | 0,0145 | 0,1301 | 0,9074 | 0,0061 |
| 2,0 | 0,0151 | 0,1306 | 0,9003 | 0,0060 |
| 3,0 | 0,0140 | 0,1307 | 0,8706 | 0,0051 |
| 5,0 | 0,0138 | 0,1312 | 0,8653 | 0,0043 |

Как видно из таблицы 11 с увеличением концентрации щелочи от 0,10 до 1,00 М интенсивность люминесценции ЛС ИК растет, но с дальнейшим увеличением концентрации щелочи больше 1,00 М интенсивность сигнала люминесценции ЛС постепенно падает. Поэтому для дальнейших исследований выбрана рабочая концентрация щелочи NaOH – 1,00 М.

Еще одной стадией поиска рабочих условий определения ИК методом флуориметрии явилась стадия подбора необходимого количества щелочи для полного растворения в ней ИК и полного его перехода в ЛС. Для этого из разных концентраций водного раствора ИК готовили щелочной раствор его ЛС. Результаты данных исследований приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Исследование люминесценции лейкосоединения индигокармина, приготовленного из водных растворов индигокармина различной концентрации

| Концентрация водного раствора E132, мг/дм ³ | Интенсивность сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина различной концентрации в 1М NaOH, мг/дм ³ | | |
|--|--|--------|--------|
| | 0,1 | 1,0 | 10,0 |
| 1000 | 0,0119 | 0,1077 | 0,8221 |
| 100 | 0,0132 | 0,1186 | 0,9522 |
| 10 | 0,0148 | 0,1314 | - |

Из полученных результатов, представленных в таблице 12, можно сделать вывод, что наиболее эффективным является использование избытка щелочи. При приготовлении рабочих щелочных растворов ЛС из менее концентрированного водного раствора E132 ($C=10$ мг/дм³) интенсивность сигнала люминесценции ЛС ИК выше, чем сигнал люминесценции ЛС, приготовленного из более концентрированного водного раствора E132. Это означает, что в избытке щелочи вероятность перехода (полного реагирования E132 до ЛС) ИК в ЛС выше, отсюда точность результатов количественного анализа также выше. Поэтому в дальнейшем все градуировочные растворы были приготовлены из водного раствора E132 с концентрацией 10 мг/дм³.

Необходимо отметить, что образование ЛС ИК в щелочной среде происходит не сразу, на это требуется время. Поэтому был проведен эксперимент по исследованию времени протекания реакции образования ЛС ИК при комнатной температуре. Для этого измеряли интенсивность люминесценции раствора ИК в 1 М NaOH сразу после приготовления и далее каждые 10 минут на длине волны регистрации 410 нм при возбуждении длиной волны 270 нм (чувствительность прибора – низкая) (Рис.19). Общее время эксперимента составило 5 часов.

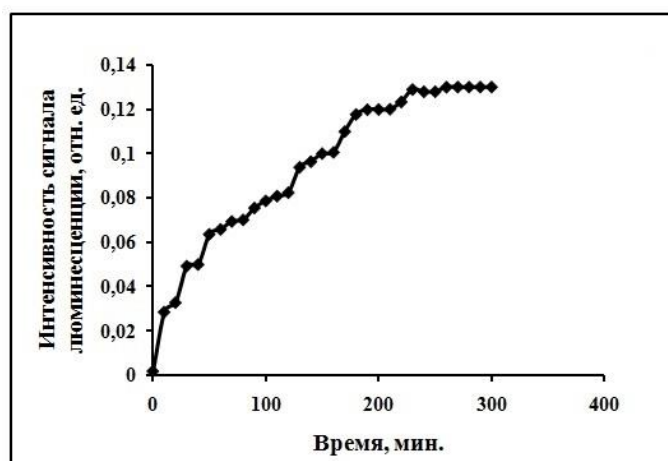


Рисунок 19 – Исследование времени реакции образования лейкосоединения индигокармина ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в щелочной среде при комнатной температуре

Как видно из рисунка 19, не смотря на мгновенное обесцвечивание голубого раствора ИК в щелочной среде, интенсивность сигнала люминесценции постоянно растет. Далее, примерно через 3 часа 30 минут, при комнатной температуре начинается процесс установления равновесия в реакции образования ЛС ИК в щелочной среде, то есть интенсивность сигнала остается практически постоянной. Из рисунка 19 можно сделать вывод о том, что ЛС ИК в щелочной среде полностью образуется через 4 часа 30 минут. Отсюда можно установить, что ИК с щелочью полностью прореагирует через 5 часов с образованием ЛС при комнатной температуре.

Для аналитической методики время анализа является важным фактором и длительная химическая реакция зачастую недопустима. Поэтому были проведены исследования по сокращению времени образования ЛС ИК в щелочной среде. Самым простым способом ускорить химическую реакцию является процесс нагревания раствора. В связи с этим щелочной раствор ИК нагревали до кипения. Измерение интенсивности люминесценции образующегося ЛС ИК в щелочи проводили каждые 5 минут. При этом перед измерением интенсивности люминесценции ЛС растворы охлаждали до комнатной температуры, так как высокая температура является причиной тушения люминесценции, т.н. температурное тушение [108-110]. Результаты исследования образования ЛС ИК при нагревании раствора до закипания представлены на рисунке 20.

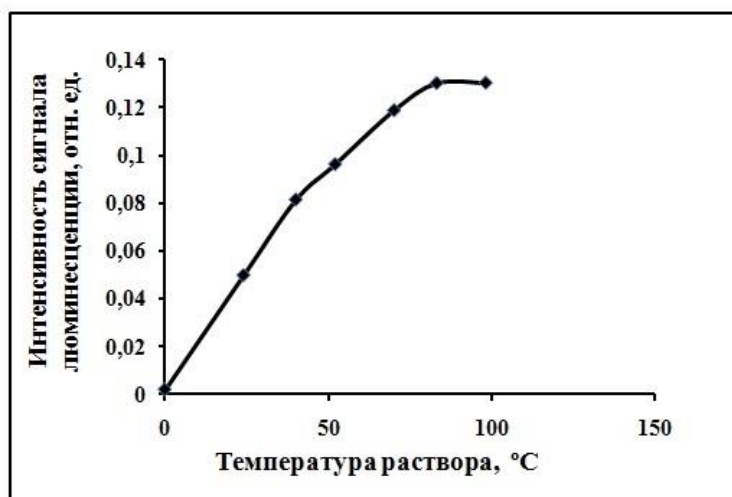


Рисунок 20 – Исследование времени реакции образования лейкосоединения индигокармина ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в щелочной среде при нагревании раствора до 98°C (измерение люминесценции после охлаждения до 24°C)

Как видно из рисунка 20 нагревание раствора значительно ускоряет реакцию образования ЛС ИК в 1 М NaOH. Щелочной раствор достигает температуры 98°C на 15-ой минуте эксперимента, то есть через 15 минут раствор начинает закипать. Это означает, что при кипении раствора происходит его испарение, то есть концентрирование, и интенсивность сигнала люминесценции продолжает расти, так как концентрация раствора увеличивается. Из рисунка 20 видно, что необходимой интенсивности сигнала люминесценции раствор достигает при нагревании в течение 15 минут, это означает, что при нагревании щелочного раствора ИК до закипания приводит к полному образованию ЛС ИК. Далее, после 20 минут нагревания, раствор начинает испаряться.

Из проделанных исследований можно сделать вывод, что для сокращения времени разрабатываемой флуориметрической методики, необходимо нагревать раствор ИК в 1 М NaOH в течение 15 минут (зависит от мощности нагревательного прибора) до закипания раствора. Этого достаточно для образования ЛС ИК в щелочной среде. Регистрацию интенсивности сигнала люминесценции ЛС ИК необходимо производить только после охлаждения раствора до комнатной температуры.

Дополнительно необходимо отметить образование ЛС ИК при выдерживании щелочного раствора ИК в течение не менее 5-ти часов в закрытой колбе. Данная стадия также имеет место быть при удобстве подготовки исследуемых растворов для определения ИК флуориметрическим методом заранее накануне анализа.

4.2. Расчет квантового выхода люминесценции индигокармина

По аналогии расчета квантового выхода хинина (раздел 3.2.) был рассчитан квантовый выход ЛС ИК. В качестве стандарта выбран раствор хинина в 0,1 М серной кислоте, квантовый выход которого известен и составляет 0,55. Хинин выбран по принципу ближайшего расположения его спектра люминесценции на длине волны 452 нм к спектру люминесценции исследуемого вещества ЛС ИК, спектр люминесценции которого расположен на длине волны 410 нм.

Для правильности расчетов предварительно подбирали концентрации стандарта (хинин) и исследуемого (ЛС ИК) веществ так, чтобы их оптическая плотность была ниже 0,1.

Для этого рассчитывали оптические плотности исследуемого и стандартного растворов веществ. Проводили сканирование растворов веществ и фоновых растворов в режиме регистрации сигнала от 290 до 530 нм. После сканирования растворов все данные переносили в программу Excel и средствами данной программы усредняли значения измерений пропускания раствора при длине волны возбуждения (табл. 13).

Таблица 13 – Расчет оптической плотности растворов стандарта и исследуемого веществ

| Длина волны | 0,1 М H ₂ SO ₄ | | Хинин в 0,1 М H ₂ SO ₄ , C=5 мг/дм ³ | | 0,1 М NaOH | | ЛС ИК в 0,1 М NaOH, C=3 мг/дм ³ | |
|-------------|--------------------------------------|---------------------|---|---------------------|------------|---------------------|--|---------------------|
| | T, % | T _{ср} , % | T, % | T _{ср} , % | T, % | T _{ср} , % | T, % | T _{ср} , % |
| 290 | 0,824966 | 0,826725 | 0,660186 | 0,658488 | 0,796195 | 0,79278 | 0,640362 | 0,640895 |
| 291 | 0,824292 | | 0,658369 | | 0,794619 | | 0,641419 | |
| 292 | 0,826017 | | 0,659054 | | 0,802243 | | 0,642515 | |
| 293 | 0,826171 | | 0,659116 | | 0,798912 | | 0,639548 | |
| 294 | 0,824442 | | 0,656815 | | 0,796153 | | 0,642243 | |
| 295 | 0,823554 | | 0,660102 | | 0,796491 | | 0,638764 | |
| 296 | 0,825489 | | 0,658297 | | 0,795250 | | 0,642958 | |
| 297 | 0,826044 | | 0,656457 | | 0,796984 | | 0,640365 | |
| | | | | | | | | |
| 529 | 0,825188 | | 0,659399 | | 0,792387 | | 0,640069 | |
| 530 | 0,825998 | | 0,659532 | | 0,790975 | | 0,641289 | |

По полученным данным произведен расчет оптической плотности исследуемого и стандартного растворов согласно формуле (1):

для стандартного вещества (хинин): $D = \lg (0,826725/0,658488) = 0,098$

для исследуемого вещества (ЛС ИК): $D = \lg (0,79278/0,640895) = 0,092$

Из полученных расчетов можно сделать вывод о том, что подобранные концентрации стандартного и исследуемого веществ подходят для дальнейшего расчета квантового выхода.

По аналогии с хинином концентрации исследуемых и стандартных растворов подбирали до тех пор, пока оптическая плотность не станет меньше 0,1. После подбора установлены следующие концентрации растворов исследуемого и стандартного веществ: хинин – 5 мг/дм³, ЛС ИК – 3 мг/дм³.

Далее получали исправленные на фон спектры люминесценции исследуемого и стандартного веществ. Для этого для каждой длины волны

вычитали интенсивность люминесценции фонового спектра из интенсивности люминесценции самого вещества (исследуемого и стандарта).

После получения исправленных на фон спектров люминесценции средствами Excel численным интегрированием методом трапеций рассчитывали площади под этими исправленными спектрами люминесценции. Для этого для каждого значения испускания рассчитывали значение площади элементарной трапеции под кривой испускания по формуле (2).

Исправленные на фон спектры люминесценции и площади элементарных трапеций для расчета квантового выхода ЛС ИК представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Квантовый выход люминесценции лейко соединения индигокармина в 0,1 М NaOH

| Длина волны | Хинин в 0,1 М H ₂ SO ₄ , C=5 мг/дм ³ | | | | | ЛС ИК в 0,1 М NaOH, C=3 мг/дм ³ | | | | |
|-------------|--|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| | I _{фон} | I _{р-ра} | I _i | S _i | S _{ст} | I _{фон} | I _{р-ра} | I _i | S _i | S _{исслед} |
| 290 | 0,00106 | 0,00284 | 0,00178 | 0,00193 | 201,445 | 0,00152 | 0,00197 | 0,00045 | 3,7E-05 | 1,262 |
| 291 | 0,00176 | 0,00349 | 0,00172 | 0,00194 | | 0,00241 | 0,00275 | 0,00034 | 2,1E-05 | |
| 292 | 0,00231 | 0,00411 | 0,00180 | 0,00189 | | 0,00344 | 0,00354 | 0,00011 | 5,4E-05 | |
| 293 | 0,00285 | 0,00449 | 0,00164 | 0,00112 | | 0,00338 | 0,00441 | 0,00104 | 0,00014 | |
| 294 | 0,00391 | 0,00430 | 0,00040 | 0,00042 | | 0,00399 | 0,00580 | 0,00181 | 0,00012 | |
| 295 | 0,00469 | 0,00586 | 0,00116 | 0,00088 | | 0,00500 | 0,00580 | 0,00080 | 0,00008 | |
| 296 | 0,00537 | 0,00581 | 0,00044 | 0,00055 | | 0,00563 | 0,00656 | 0,00093 | 5,4E-05 | |
| 297 | 0,00558 | 0,00614 | 0,00056 | 0,00119 | | 0,00647 | 0,00668 | 0,00021 | 9,2E-05 | |
| | | | | | | | | | | |
| 529 | 0,00391 | 0,47591 | 0,47120 | 0,51345 | | 0,00844 | 0,01254 | 0,00411 | 0,00032 | |
| 530 | 0,00703 | 0,46857 | 0,46154 | | | 0,01224 | 0,01485 | 0,00260 | | |

По полученным данным квантовый выход ЛС ИК в 0,1 М NaOH рассчитан по формуле (3):

$$\varphi_{исслед} = \frac{(1-10^{-0,098}) * 1,262 * 1,47^2}{(1-10^{-0,092}) * 201,445 * 1,397^2} * 0,55 = 0,00204$$

Аналогично приведенному выше алгоритму рассчитаны квантовые выходы ЛС ИК в 0,5 М, 1М, 2М, 3М и 5М растворах щелочи. Результаты представлены в таблице 11.

4.3. Исследование природы сигнала люминесценции индигокармина

Для увеличения чувствительности и точности определения красителя индигокармина в исследуемых объектах подбирали параметры строба – время задержки и длительности сигнала (Рис. 21).

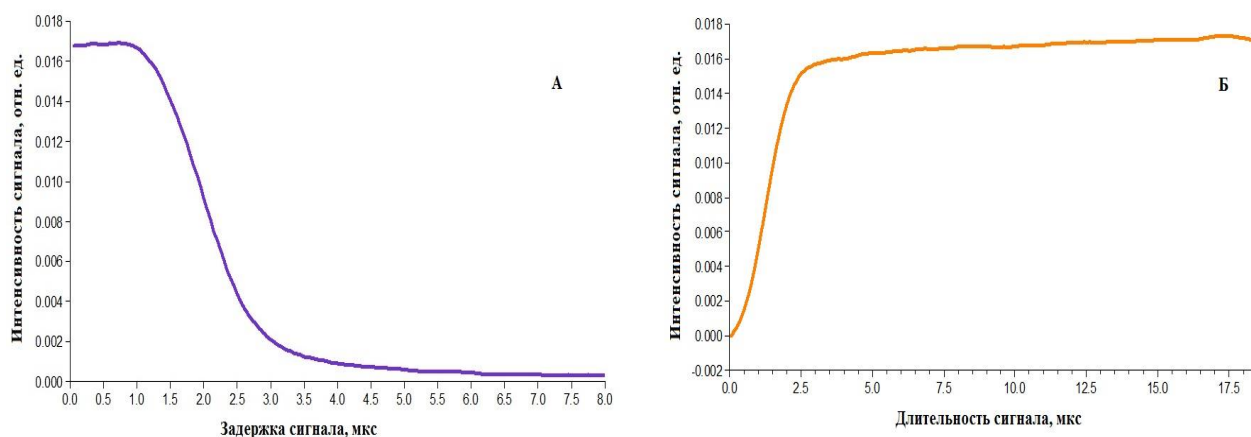


Рисунок 21 – Зависимость интенсивности сигнала люминесценции лейкосоединения индигокармина от параметров строба: А – задержка сигнала, Б – длительность сигнала

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 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 ЛС в 1 М растворе NaOH.

Для установления вида процесса люминесценции индигокармина в 1М NaOH строили зависимость интенсивности сигнала люминесценции от времени сигнала (Рис.22).

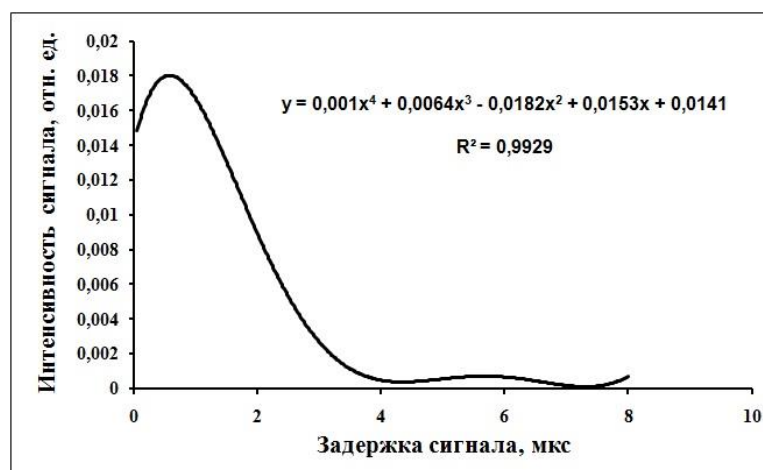


Рисунок 22 – Кривая кинетики затухания лейкосоединения индигокармина в 1М NaOH

С помощью полученной кривой затухания индигокармина в 1 М NaOH высчитывали среднее время жизни люминесценции ЛС ИК через площадь под кривой затухания (определенный интеграл от 0 до 4 мкс для функции):

$$\int_0^4 (0,001x^4 + 0,0064x^3 - 0,0182x^2 + 0,0153x + 0,0141)dx$$

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

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

Как уже было сказано ранее, определение исследуемого вещества в присутствии сопутствующих компонентов пищевой матрицы не только упрощает и ускоряет химический анализ, но и снижает его себестоимость.

Поэтому одной из важных стадий разработки флуориметрической методики определения СПК ИК в продуктах питания явилось исследование влияния

сопутствующих компонентов матрицы объектов пищевой промышленности. Конечно, самыми распространенными компонентами в продуктах питания являются сахар и лимонная кислота. Было проанализировано влияние на сигнал люминесценции ЛС ИК 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 15.

Таблица 15 – Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов пищевой матрицы на флуориметрическое определение индигокармина ($n = 3$, $p = 0,95$)

| Введено ИК (E132), мг/дм ³ | Сопутствующий пищевой компонент | Содержание сопутствующего компонента на 100 мл, г | Найдено ИК (E132), мг/дм ³ | Лабораторное смещение, % |
|---------------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------|
| 0,50 | сахар | 5 | 0,46 ± 0,11 | 11 |
| | | 10 | 0,46 ± 0,04 | |
| | | 15 | 0,44 ± 0,08 | |
| | Лимонная кислота | 5 | 0,53 ± 0,06 | 9 |
| | | 10 | 0,56 ± 0,05 | |
| | | 15 | 0,57 ± 0,08 | |
| | сахар + лимонная кислота | 5 и 5 | 0,47 ± 0,06 | 11 |
| | | 10 и 10 | 0,46 ± 0,12 | |
| | | 15 и 15 | 0,42 ± 0,08 | |

Как видно из таблицы 15 значительного мешающего влияния на сигнал люминесценции ЛС ИК максимальное содержание сахара и лимонной кислоты, а также их двукратное превышение максимального содержания не оказывает. При трехкратном превышении максимального количества сахара и лимонной кислоты наблюдается небольшая погрешность измерений. Данную проблему можно устранить разбавлением анализируемого объекта. Кроме этого, для исследования мешающего влияния компонентов пищевой матрицы была взята очень маленькая концентрация ИК 0,5 мг/дм³, что практически не встречается в пищевых продуктах, так как их стараются окрашивать в яркие цвета от 3 мг/дм³ и выше.

Кроме пищевых продуктов СПК ИК нашел широкое применение в окрашивании фармацевтических препаратов. Поэтому исследование мешающего влияния компонентов фармацевтической матрицы на сигнал люминесценции ЛС ИК также стало важным этапом данной работы. Влияние основных компонентов матрицы фармацевтических препаратов на сигнал люминесценции ЛС ИК представлено в таблице 16.

Таблица 16 – Исследование мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы фармацевтических препаратов на флуориметрическое определение индигокармина (E132) ($n = 3, p = 0,95$)

| Введено E132, мг/дм ³ | Сопутствующий фармацевтический компонент | Содержание сопутствующего компонента, мг | Найдено E132, мг/дм ³ | Лабораторное смещение, % |
|----------------------------------|--|--|----------------------------------|--------------------------|
| 0,60 | левомецетин | 50 | $0,56 \pm 0,07$ | 23 |
| | | 100 | $0,48 \pm 0,13$ | |
| | | 200 | $0,33 \pm 0,14$ | |
| | рибофлавин (витамин В ₂) | 30 | $0,75 \pm 0,16$ | 18 |
| | | 60 | $0,71 \pm 0,12$ | |
| | | 90 | $0,73 \pm 0,18$ | |
| | аскорбиновая кислота | 10 | $0,56 \pm 0,04$ | 12 |
| | | 20 | $0,51 \pm 0,08$ | |
| | | 30 | $0,51 \pm 0,06$ | |

Как видно из таблицы 16 значительного мешающего влияния на сигнал люминесценции ЛК ИК компоненты матрицы фармацевтических препаратов, такие как левомецетин, рибофлавин и аскорбиновая кислота не оказывают. Но можно сделать вывод, что рибофлавин увеличивает сигнал люминесценции ЛС ИК, а аскорбиновая кислота и левомецетин напротив, тушат сигнал люминесценции ЛС ИК. Кроме этого левомецетин в больших количествах сильно тушит сигнал люминесценции ЛС ИК, поэтому при флуориметрическом определении ИК в таблетках левомецетина рекомендуется растворять только оболочку таблетки для снижения мешающего влияния левомецетина.

4.5. Исследование мешающего влияния пищевых красителей на сигнал люминесценции индигокармина

Кроме сахара, лимонной кислоты, различных кислот и витаминов в продуктах питания и фармацевтических препаратах производители постоянно используют всевозможные пищевые красители, как синтетические, так и натуральные. В большинстве аналитических методов анализа, кроме хроматографии, определение конкретного пищевого красителя становится достаточно затруднено, если в исследуемом объекте присутствуют другие пищевые красители.

Индигокармин широко используется как самостоятельный краситель во многих лекарственных препаратах. Но в большинстве пищевых продуктов ИК используют совместно с другими пищевыми красителями для достижения разнообразных оттенков. Очень часто синий краситель ИК смешивают с красителями желтых оттенков для получения зеленого цвета. Так производители исследуемых в работе витаминов «Пиковит» смешивали синий краситель ИК (E132) с желтым красителем хинолиновым желтым (E104) для окрашивания этих витамин в зеленый цвет. Спектры люминесценции ИК в присутствии красителя хинолинового желтого представлены на рисунке 23.

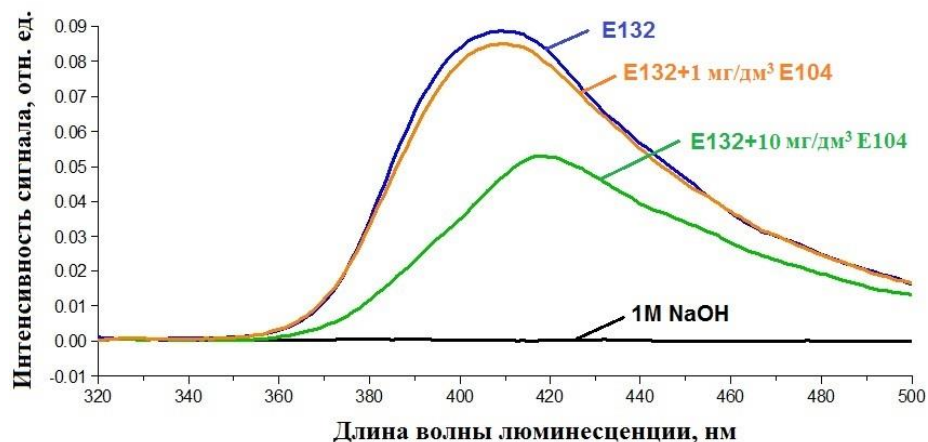
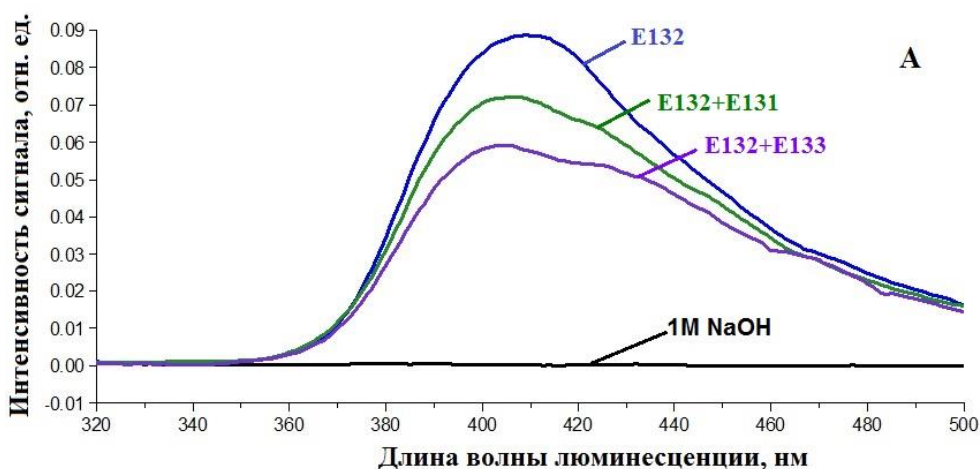


Рисунок 23 – Спектр люминесценции индигокармина (E132) в 1M NaOH ($C=1$ мг/дм³) в присутствии синтетического пищевого красителя хинолинового желтого E104 различной концентрации

Как видно из рисунка 21, при интенсивно окрашенном растворе (концентрация E104 равна 10 мг/дм^3) наблюдается тушение люминесценции ЛС ИК. При присутствии в растворе красителя E104 в меньшей концентрации (1 мг/дм^3 и менее) флуориметрическому определению ИК данный краситель не мешает, так как отсутствует перепоглощение света окрашенным раствором.

Так же как и при определении пищевой добавки хинина методом флуориметрии в присутствии большого содержания пищевых красителей, эту проблему удалось решить разбавлением исследуемых растворов с красителями до получения практически бесцветных растворов и для ИК. Уменьшение влияния пищевых красителей при разбавлении анализируемого раствора до его обесцвечивания продемонстрировано на рисунке 24 Б.

Важной задачей при разработке флуориметрической методики определения ИК является оценка селективности этой разрабатываемой методики. Для достижения этой цели была проведена серия экспериментов по флуориметрическому определению ИК (E132) в присутствии других синих красителей – патентованный синий (E131) и синий блестящий (E133). На рисунке 24А представлены спектры люминесценции ЛС ИК в присутствии различных концентраций других синих красителей. В отличие от ИК другие СПК такие, как E131 и E133 в растворе щелочи не образуют ЛС и не обесцвечиваются.



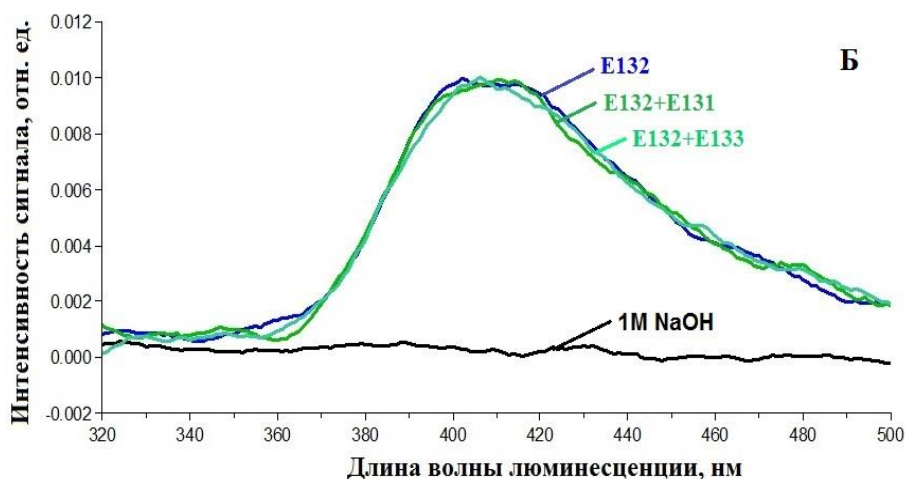


Рисунок 24 – Спектры люминесценции синтетического пищевого красителя E132 ($C=1 \text{ мг/дм}^3$) в присутствии других красителей E132 и E133 синего цвета ($C=10 \text{ мг/дм}^3$)

А – исходный раствор, Б – исходный раствор, разбавленный в 10 раз

Как видно из рисунка 24Б наличие синих СПК в растворе тушит люминесценцию ЛС ИК, что оказывает мешающее влияние на флуориметрическое определение ИК. Как было уже сказано выше, данная проблема решена с помощью разбавления исходного раствора до обесцвечивания, в данном случае в 10 раз.

Кроме синих и желтого красителей, исследовано мешающее влияние СПК других цветов: красного азокрасителя азорубина (кармуазина, E122), оранжевого азокрасителя понсо 4R (E124) и натурального красителя розового оттенка красного свекольного (E162). Результаты количественных исследований мешающего влияния шести различных пищевых красителей на сигнал люминесценции СПК ИК (E132) представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Исследование мешающего влияния различных пищевых красителей на флуориметрическое определение индигокармина

| Введено ИК E132, мг/дм ³ | Пищевой краситель | Исходный раствор | | | Исходный раствор, разбавленный в 10 раз | |
|-------------------------------------|-------------------|--|-------------------------------------|--|---|--|
| | | Введено пищевого красителя, мг/дм ³ | Найдено ИК E132, мг/дм ³ | Длина волны люминесценции λ , нм | Найдено ИК E132, мг/дм ³ | Длина волны люминесценции λ , нм |
| 1 | E131 | 10 | 0,62 ± 0,01 | 405 | 0,99 ± 0,01 | 410 |
| | | 1 | 0,99 ± 0,01 | 410 | | |
| 1 | E133 | 10 | 0,72 ± 0,04 | 405 | 0,99 ± 0,01 | 410 |
| | | 1 | 0,99 ± 0,02 | 410 | | |
| 1 | E104 | 10 | 0,56 ± 0,02 | 420 | 0,98 ± 0,02 | 410 |
| | | 1 | 0,92 ± 0,07 | 410 | | |
| 1 | E124 | 10 | 0,54 ± 0,04 | 407 | 0,82 ± 0,09 | 410 |
| | | 1 | 0,98 ± 0,03 | 410 | | |
| 1 | E122 | 10 | 0,73 ± 0,02 | 407 | 0,99 ± 0,01 | 410 |
| | | 1 | 0,99 ± 0,01 | 410 | | |
| 1 | E162 | 1000 | 0,78 ± 0,01 | 410 | 1,01 ± 0,02 | 410 |
| | | 100 | 0,99 ± 0,01 | 410 | | |

Как видно из таблицы 17 во всех ярко окрашенных растворах наблюдается гашение сигнала люминесценции ЛС ИК, присутствие красителей в меньшей концентрации (слабоокрашенные растворы) или разбавление исходных растворов до снижения интенсивности окраски не оказывает мешающего влияния на флуориметрическое определение ИК. Помимо этого все красители, кроме натурального красного свекольного E162, смещают спектр люминесценции ЛС ИК. Наличие в растворе красителей E131, E133, E122 и E124 смещает спектр люминесценции ЛС ИК в гипсохромную область. В присутствии красителя E104 наблюдается батохромный сдвиг – смещение спектра люминесценции ЛС ИК в длинноволновую область.

4.6. Разработка методики количественного определения индигокармина в исследуемых объектах

Для количественного определения синтетического пищевого красителя E132 строили градуировочный график зависимости интенсивности люминесцентного сигнала от концентрации ЛС ИК в 1,00 М NaOH в диапазоне концентраций от 0,10 до 1,00 мг/дм³ (Рис. 25).

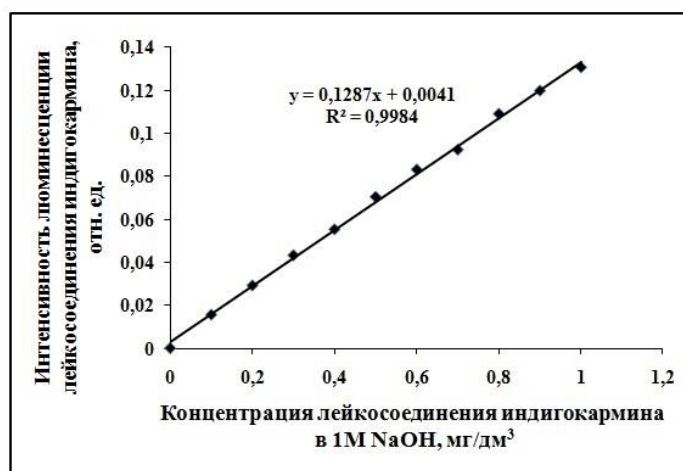


Рисунок 25 – Градуировочная зависимость интенсивности сигнала люминесценции от концентрации лейкосоединения индигокармина в 1,00 М NaOH

Для оценки правильности результатов разрабатываемой флуориметрической методики использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на 610 нм (Рис. 25). Среднее время удерживания составило 5,101 мин. В методе сравнения использовали водный раствор СПК ИК, то есть фиксировали сигнал от самого красителя ИК. Применяли спектрофотометрический детектор на длине волны поглощения синего красителя ИК 610 нм.



Рисунок 26 – Хроматограмма водного раствора красителя индигокармина ($C=10,00 \text{ мг/дм}^3$)

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. 27).

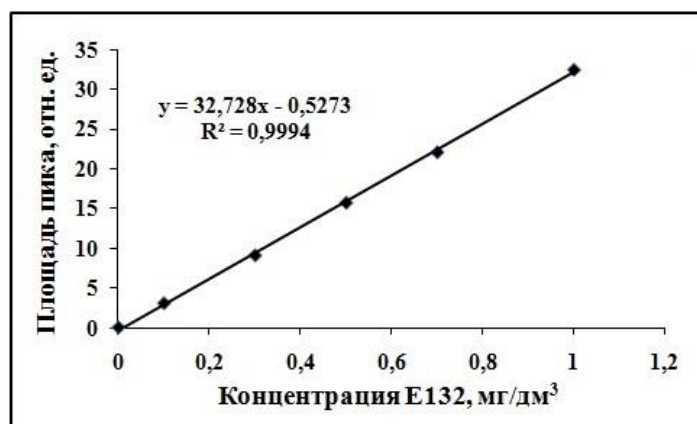


Рисунок 27 – Градуировочная зависимость площади пика от концентрации водного раствора красителя индигокармина E132

Результаты определения синтетического пищевого красителя индигокармина (E132) в исследуемых пищевых продуктах и фармацевтических препаратах двумя методами анализа представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты определения содержания синтетического красителя индигокармина (E132) в продуктах питания и фармацевтических препаратах методом флуориметрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (n=5, p=0,95, $t_{\text{табл}}=2,78$)

| Объект исследования | Флуориметрическая методика, мг | Sr | Хроматографическая методика, мг | Sr | $t_{\text{эсп}}$ |
|------------------------|--------------------------------|-------|---------------------------------|-------|------------------|
| 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 18 наблюдается хорошая сходимость результатов разрабатываемого флуориметрического метода определения индигокармина по сигналу люминесценции его ЛС 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.

4.7. Оценка метрологических характеристик методики определения индигокармина в исследуемых объектах

После проведения пробоподготовки, описанной в главе 2, проводили определение количества содержания индигокармина в исследуемых продуктах пищевой и фармацевтической промышленности по градуировочную графику $y=0,1287x+0,0041$ ($R^2=0,9984$). Для построения градуировочного графика готовили серию стандартов раствора ИК в 1М NaOH и регистрировали сигнал люминесценции ИК на 410 нм в одинаковых условиях. Строили график зависимости интенсивности люминесценции в 1М NaOH на длине волны 410 нм от его концентрации в щелочи.

При определении концентрации ИК в исследуемых образцах, фиксировали интенсивность сигнала анализируемой пробы и находили его концентрацию по соответствующему значению градуировочного графика.

Разбавление исходной пробы анализируемого раствора производили таким образом, чтоб концентрация исследуемого ИК соответствовала примерно середине градуировочного графика.

При разработке данной флуориметрической методики были определены следующие метрологические характеристики:

1. Показатель повторяемости (σ_r);
2. Показатель внутрилабораторной прецизионности ($\sigma_{Rл}$);
3. Показатель правильности ($\pm\Delta_c$);
4. Показатель точности ($\pm\Delta$).

Подробный расчет перечисленных метрологических показателей представлен в Приложении 2.

Обобщенные результаты полученных метрологических характеристик разрабатываемой флуориметрической методики определения ИК в модельных растворах, в присутствии компонентов матрицы исследуемых объектов, представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Метрологические характеристики флуориметрической методики определения индигокармина Е132 (P=0,95, n=2, L=10)

| Концентрация хинина, мг/дм ³ | Показатель повторяемости σ_r , % | Показатель внутрилабораторной прецизионности $\sigma_{Rл}$, % | Показатель правильности $\pm\Delta_c$, % | Показатель точности $\pm\Delta$, % |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 1 | 11 | 7 | 32 |
| 0,2 | 3 | 6 | 5 | 27 |
| 0,4 | 4 | 9 | 6 | 27 |
| 0,6 | 2 | 4 | 4 | 15 |
| 0,8 | 2 | 5 | 4 | 10 |
| 1,0 | 1 | 4 | 4 | 8 |

Из полученных метрологических характеристик разрабатываемой флуориметрической методики определения ИК в присутствии сахара и лимонной кислоты (матрица исследуемых объектов), представленных в таблице 19, можно сделать вывод, что показатель точности не превышает 35 %, а показатели повторяемости и воспроизводимости не превышают 5 %.

Необходимо отметить, что при возрастании концентрации ИК происходит увеличение таких показателей, как точность, правильность и воспроизводимость (Рис. 28).



Рисунок 28 – Изменение показателя точности флуориметрической методики определения индигокармина от его концентрации в 1 М NaOH в модельных растворах

Как видно из рисунка 28, что зависимость показателя точности от концентрации исследуемого вещества ИК не носит линейный характер, поэтому целесообразно разбить оценку показателя точности на несколько интервалов концентраций и каждому интервалу приписать соответствующие количественные характеристики (Таблица 20).

Таблица 20 – Диапазон измерений метрологических характеристик флуориметрической методики определения индигокармина ($P=0,95$, $n=2$, $L=10$)

| Диапазон измерений, мг/дм ³ | Показатели прецизионности | | Показатель точности $\pm\Delta$, % |
|--|---|--|-------------------------------------|
| | Показатель повторяемости σ_r , % | Показатель воспроизводимости $\sigma_{Rл}$, % | |
| 0,1 ÷ 0,6 | 4 | 11 | 32 |
| 0,6 ÷ 1,0 | 2 | 5 | 15 |

Из таблицы 20 можно установить, что при определении ИК в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,6 мг/дм³ показатель точности не превышает 32 %. Данная систематическая погрешность в области малых концентраций обусловлена мешающим влиянием компонентов матрицы исследуемых объектов. С возрастанием концентрации анализируемого вещества ИК систематическая погрешность уменьшается, что можно наблюдать в диапазоне концентраций от 0,6 до 1,0 мг/дм³, где показатель точности не превышает 15 %.

Полученные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов, полученных при соблюдении требований методики 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. 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.

3. Разработана флуориметрическая методика определения пищевой вкусоароматической добавки хинина в продукции пищевой и фармацевтической промышленности.

4. Разработан новый подход для флуориметрического определения синтетического пищевого красителя индигокармина в пищевых продуктах и лекарственных препаратах по сигналу люминесценции его лейкосоединения в щелочи. Рассчитаны основные метрологические характеристики разрабатываемых методик.

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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФАО/ВОЗ – Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (Food and Agriculture Organization of the United Nations) / Всемирная организация здравоохранения

БАД – биологически активная добавка

FDA – Управление по контролю за продуктами и лекарствами (США)

СК – синтетический краситель

СПК – синтетический пищевой краситель

ИК – индигокармин

ЛС – лейкосоединение

УФ – ультрафиолет

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

СКО – среднее квадратичное отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martins F.C.O.L. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications / Martins F.C.O.L., Sentanin M.A., Souza D. De // Food Chemistry – 2019. – Т. 272 – С.732–750.
2. Blekas G.A. Food Additives: Classification, Uses and Regulation / G. A. Blekas – Elsevier Ltd., 2015. Ed. 1– 731–736с.
3. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 18.04.2003 N 59 О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.3.2.1293-03 (с изменениями и дополнениями) – М.: Минздрав России, 2003. – 416 с.
4. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 18 января 2005 года N 1 О запрещении использования пищевых добавок – М.: Минздрав России, 2005. – 314 с.
5. Федеральный закон №52-ФЗ от 30 марта 1999 г. "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" – М.: Минздрав России, 46 с.
6. Федеральный закон "О качестве и безопасности пищевых продуктов" от 02.01.2000 N 29-ФЗ – М.: Минздрав России, 2018. – 23с.
7. Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан (утв. ВС РФ 22.07.1993 N 5487-1 ред. от 07.12.2011) – М.: Минздрав России, 2011. – 47с.
8. Tylewicz U. Food aroma compounds / U. Tylewicz, R. Inchingolo, M. T. Rodriguez-Estrada – Elsevier Inc., 2017.– 297–334с.
9. Schrankel K.R. Safety evaluation of food flavorings / Schrankel K.R. // Toxicology – 2004. – Т. 198 – № 1–3 – С.203–211.
10. Усилитель вкуса и аромата [Электронный ресурс]. URL: https://prodobavki.com/tags/usilitel_vkusa_i_aromata_3.html (accessed: 11.09.2019).
11. Kaur G. Mechanisms of toxicity and biomarkers of flavoring and flavor enhancing chemicals in emerging tobacco and non-tobacco products / Kaur G., Muthumalage T., Rahman I. // Toxicology Letters – 2018. – Т. 288 – С.143–155.

12. Bitzer Z.T. Effect of flavoring chemicals on free radical formation in electronic cigarette aerosols / Bitzer Z.T., Goel R., Reilly S.M., Elias R.J., Silakov A., Foulds J., Muscat J., Richie J.P. // *Free Radical Biology and Medicine* – 2018. – T. 120 – № November 2017 – C.72–79.
13. Odoh U.E. Medicinal plants used by the people of Nsukka Local Government Area, south-eastern Nigeria for the treatment of malaria: An ethnobotanical survey / Odoh U.E., Uzor P.F., Eze C.L., Akunne T.C., Onyegbulam C.M., Osadebe P.O. // *Journal of Ethnopharmacology* – 2018. – T. 218 – № June 2017 – C.1–15.
14. Samanidou V.F. Simple and rapid HPLC method for the determination of quinine in soft drinks using fluorescence detection / Samanidou V.F., Evaggelopoulos E.N., Papadoyannis I.N. // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* – 2004. – T. 27 – № 15 – C.2397–2406.
15. Gopi P. Effective water mediated green synthesis of polysubstituted quinolines without energy expenditure / Gopi P., Sarveswari S. // *Monatshefte fur Chemie* – 2017. – T. 148 – № 6 – C.1043–1049.
16. Drewitt P.N. Toxicity threshold of quinine hydrochloride following low-level repeated dosing in healthy volunteers. / Drewitt P.N., Butterworth K.R., Springall C.D., Walters D.G., Raglan E.M. // *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* – 1993. – T. 31 – № 4 – C.235–45.
17. Gbotolorun S.C. Quinine inhibits ovulation and produces oxidative stress in the ovary of cyclic sprague-dawley rats / Gbotolorun S.C., Inikori O., Bamisi O.D., Osinubi A.A.A., Okanlawon A.O. // *African Health Sciences* – 2018. – T. 18 – № 2 – C.253–259.
18. Donovan J.L. Dietary levels of quinine in tonic water do not inhibit CYP2D6 in vivo / Donovan J.L., DeVane C.L., Boulton D., Dodd S., Markowitz J.S. // *Food and Chemical Toxicology* – 2003. – T. 41 – № 8 – C.1199–1201.
19. Chen Q.C. Determination of quinine in drinks by reversed-phase ion-pair chromatography / Chen Q.C., Wang J. // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* – 2001. – T. 24 – № 9 – C.1341–1352.

20. Chmurzyński L. High-performance liquid chromatographic determination of quinine in rat biological fluids / Chmurzyński L. // *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* – 1997. – Т. 693 – № 2 – С.423–429.
21. ГОСТ Р 52481–2010 Красители пищевые. Термины и определения – М.: Стандартинформ, 2011. – 16с.
22. ГОСТ Р 52499-2005 Добавки пищевые. Термины и определения – М.: Стандартинформ, 2006. – 20с
23. Смирнов, Е.В. Пищевые Красители. Справочник / Е.В . Смирнов – СПб.: Издательство "Профессия", 2009.– 352с.
24. Feketea G. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? / G. Feketea, S. Tsabouri, – 2017.– 578–588с.
25. Болотов, В.М. Пищевые красители: классификация, свойства, анализ, применение / В.М. Болотов, А.П. Нечаев, Л.А. Сарафанова. – СПб.: ГИОРД, 2008.– 240 с.
26. Сарафанова Л.А. Пищевые добавки: Энциклопедия. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2004.– 808 с.
27. Mittal A. Batch and bulk removal of hazardous dye, indigo carmine from wastewater through adsorption / Mittal A., Mittal J., Kurup L. // *Journal of Hazardous Materials* – 2006. – Т. 137 – № 1 – С.591–602.
28. Шестопалова Н.Б. Системы НПАВ – H₂O – электролиты в мицеллярной экстракции и фотометрическом определении синтетических пищевых красителей: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. / Шестопалова Наталия Борисовна. – Саратов, 2014. – 203 с.
29. Рамазанова Г.Р. Сорбционно-спектроскопическое определение синтетических анионных пищевых красителей: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. / Рамазанова Гюльселем Рамисовна. – Москва, 2016 – 186 с.
30. Kirschbaum J. Liquid chromatographic quantification of synthetic colorants in fish roe and caviar / Kirschbaum J., Krause C., Brückner H. // *European Food Research and Technology* – 2006. – Т. 222 – № 5–6 – С.572–579.
31. Jaworska M. Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system:

Application to pharmaceutical analysis / Jaworska M., Szulińska Z., Wilk M., Anuszevska E. // *Journal of Chromatography A* – 2005. – T. 1081 – № 1 SPEC. ISS. – C.42–47.

32. Ni Y. Simultaneous kinetic spectrophotometric analysis of five synthetic food colorants with the aid of chemometrics / Ni Y., Wang Y., Kokot S. // *Talanta* – 2009. – T. 78 – № 2 – C.432–441.

33. Capitán-Vallvey L.F. Simultaneous determination of the colorants tartrazine, ponceau 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid phase spectrophotometry using partial least squares multivariate calibration / Capitán-Vallvey L.F., Fernández M.D., Orbe I. De, Avidad R. // *Talanta* – 1998. – T. 47 – № 4 – C.861–868.

34. Johansen K.T. Alkaloid analysis by high-performance liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance: New strategies going beyond the standard / Johansen K.T., Ebild S.J., Christensen S.B., Godejohann M., Jaroszewski J.W. // *Journal of Chromatography A* – 2012. – T. 1270 – C.171–177.

35. Soylak M. Solid-phase extraction of tartrazine on multiwalled carbon nanotubes for separation and enrichment / Soylak M., Cihan Z. // *Toxicological and Environmental Chemistry* – 2013. – T. 95 – № 4 – C.559–566.

36. Madrakian T. Removal of some cationic dyes from aqueous solutions using magnetic-modified multi-walled carbon nanotubes / Madrakian T., Afkhami A., Ahmadi M., Bagheri H. // *Journal of Hazardous Materials* – 2011. – T. 196 – C.109–114.

37. Duman O. Removal of triphenylmethane and reactive azo dyes from aqueous solution by magnetic carbon nanotube- κ -carrageenan-Fe₃O₄nanocomposite / Duman O., Tunç S., Bozoğlan B.K., Polat T.G. // *Journal of Alloys and Compounds* – 2016. – T. 687 – C.370–383.

38. Arciniega Cano O. Catalytic activity of palladium nanocubes/multiwalled carbon nanotubes structures for methyl orange dye removal / Arciniega Cano O., Rodríguez González C.A., Hernández Paz J.F., Amezaga Madrid P., García Casillas P.E., Martínez Hernández A.L., Martínez Pérez C.A. // *Catalysis Today* – 2017. – T. 282 – C.168–173.

39. Vidotti E.C. Simultaneous determination of food dyes by first derivative

spectrophotometry with sorption onto polyurethane foam / Vidotti E.C., Cancino J.C., Oliveira C.C., Rollemberg M.D.C.E. // *Analytical Sciences* – 2005. – T. 21 – № 2 – C.149–153.

40. Coelho T.M. Photoacoustic spectroscopy as a tool for determination of food dyes: Comparison with first derivative spectrophotometry / Coelho T.M., Vidotti E.C., Rollemberg M.C., Medina A.N., Baesso M.L., Cella N., Bento A.C. // *Talanta* – 2010. – T. 81 – № 1–2 – C.202–207.

41. Góes M.M. Polyurethane foams synthesized from cellulose-based wastes: Kinetics studies of dye adsorption / Góes M.M., Keller M., Masiero Oliveira V., Villalobos L.D.G., Moraes J.C.G., Carvalho G.M. // *Industrial Crops and Products* – 2016. – T. 85 – C.149–158.

42. Hofer K. Quick spectrophotometric identification of synthetic food colorants by linear regression analysis / Hofer K., Jenewein D. // *European Food Research and Technology* – 1997. – T. 204 – № 1 – C.32–38.

43. Sorouraddin M.H. A simple fabrication of portable diffuse reflectometer for simultaneous analysis of common food dyes / Sorouraddin M.H., Saadati M. // *Sensors and Actuators, B: Chemical* – 2010. – T. 145 – № 1 – C.367–372.

44. Cretescu I. Low-cost sorbents for the removal of acid dyes from aqueous solutions / Cretescu I., Lupascu T., Buciscanu I., Balau-Mindru T., Soreanu G. // *Process Safety and Environmental Protection* – 2017. – T. 108 – C.57–66.

45. Sun H. Development of Multiresidue Analysis for 21 Synthetic Colorants in Meat by Microwave-Assisted Extraction-Solid-Phase Extraction-Reversed-Phase Ultrahigh Performance Liquid Chromatography / Sun H., Sun N., Li H., Zhang J., Yang Y. // *Food Analytical Methods* – 2013. – T. 6 – № 5 – C.1291–1299.

46. Andrade F.I. De Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC / Andrade F.I. De, Florindo Guedes M.I., Pinto Vieira Í.G., Pereira Mendes F.N., Salmito Rodrigues P.A., Costa Maia C.S., Marques Ávila M.M., Matos Ribeiro L. De // *Food Chemistry* – 2014. – T. 157 – C.193–198.

47. Tavakoli M. Magnetic Mixed Hemimicelles Solid-Phase Extraction of Three Food Colorants from Real Samples / Tavakoli M., Shemirani F., Hajimahmoodi M. // *Food*

Analytical Methods – 2014. – Т. 7 – № 1 – С.100–108.

48. Liu F.J. Dispersive solid-phase microextraction and capillary electrophoresis separation of food colorants in beverages using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as both extractant and pseudostationary phase / Liu F.J., Liu C.T., Li W., Tang A.N. // *Talanta* – 2015. – Т. 132 – С.366–372.

49. Zhang Y. Simultaneous determination of seven synthetic colorants in wine by dispersive micro-solid-phase extraction coupled with reversed-phase high-performance liquid chromatography / Zhang Y., Zhou H., Wang Y., Wu X., Zhao Y. // *Journal of Chromatographic Science* – 2015. – Т. 53 – № 2 – С.210–218.

50. Pourreza N. Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles / Pourreza N., Rastegarzadeh S., Larki A. // *Food Chemistry* – 2011. – Т. 126 – № 3 – С.1465–1469.

51. El-Shahawi M.S. A new method for analysis of sunset yellow in food samples based on cloud point extraction prior to spectrophotometric determination / El-Shahawi M.S., Hamza A., Al-Sibaai A.A., Bashammakh A.S., Al-Saidi H.M. // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* – 2013. – Т. 19 – № 2 – С.529–535.

52. Шкинев В.М. Водорастворимые полимеры в методах разделения и концентрирования веществ: дис. ... д-ра. хим. наук: 02.00.04/ Шкинев Валерий Михайлович. – М., 2013 – 260 с.

53. Benavides J. Aqueous Two-Phase Systems / Benavides J., Rito-Palomares M., Asenjo J.A. // *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* – 2011. – Т. 2 – С.697–713.

54. Fan Y. Effective extraction of quinine and gramine from water by hydrophobic ionic liquids: The role of anion / Fan Y., Li X., Song L., Li J., Zhang L. // *Chemical Engineering Research and Design* – 2017. – Т. 119 – С.58–65.

55. Cláudio A.F.M. Development of back-extraction and recyclability routes for ionic-liquid-based aqueous two-phase systems / Cláudio A.F.M., Marques C.F.C., Boal-Palheiros I., Freire M.G., Coutinho J.A.P. // *Green Chemistry* – 2014. – Т. 16 – № 1 – С.259–268.

56. Ma W. Application of ionic liquids based microwave-assisted extraction of three

- alkaloids N-nornuciferine, O-nornuciferine, and nuciferine from lotus leaf / Ma W., Lu Y., Hu R., Chen J., Zhang Z., Pan Y. // *Talanta* – 2010. – T. 80 – № 3 – C.1292–1297.
57. Freire M.G. High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids / Freire M.G., Neves C.M.S.S., Marrucho I.M., Canongia Lopes J.N., Rebelo L.P.N., Coutinho J.A.P. // *Green Chemistry* – 2010. – T. 12 – № 10 – C.1715–1718.
58. Yang L. Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions / Yang L., Wang H., Zu Y. gang, Zhao C., Zhang L., Chen X., Zhang Z. // *Chemical Engineering Journal* – 2011. – T. 172 – № 2–3 – C.705–712.
59. Flieger J. Aqueous two phase system based on ionic liquid for isolation of quinine from human plasma sample / Flieger J., Czajkowska-Zelazko A. // *Food Chemistry* – 2015. – T. 166 – C.150–157.
60. Wu H. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography / Wu H., Guo J.B., Du L.M., Tian H., Hao C.X., Wang Z.F., Wang J.Y. // *Food Chemistry* – 2013. – T. 141 – № 1 – C.182–186.
61. Pourreza N. Simultaneous cloud point extraction and spectrophotometric determination of carmoisine and brilliant blue FCF in food samples / Pourreza N., Ghomi M. // *Talanta* – 2011. – T. 84 – № 1 – C.240–243.
62. Kaur A. The review on spectrophotometric determination of synthetic food dyes and lakes / Kaur A., Gupta U. // *Gazi University Journal of Science* – 2012. – T. 25 – № 3 – C.579–588.
63. Bozdogan A. Simultaneous determination of Sunset Yellow and Ponceau 4R in gelatin powder by derivative spectrophotometry and partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration / Bozdogan A., Ozgur M.U., Koyuncu I. // *Analytical Letters* – 2000. – T. 33 – № 14 – C.2975–2982.
64. Gianotti V. Chemometrically assisted development of IP-RP-HPLC and spectrophotometric methods for the identification and determination of synthetic dyes in

- commercial soft drinks / Gianotti V., Angioi S., Gosetti F., Marengo E., Gennaro M.C. // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* – 2005. – Т. 28 – № 6 – С.923–937.
65. Üstün Özgür M. The simultaneous determination of Quinoline Yellow (E-104) and Sunset Yellow (E-110) in syrups and tablets by second derivative spectrophotometry / Üstün Özgür M., Koyuncu I. // *Turkish Journal of Chemistry* – 2002. – Т. 26 – № 4 – С.501–508.
66. Dinç E. Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods / Dinç E., Baydan E., Kanbur M., Onur F. // *Talanta* – 2002. – Т. 58 – № 3 – С.579–594.
67. В.А. Малеев, В.М. Безпальченко О.А.С. Определение красителей синтетического происхождения в продуктах питания фотоколориметрическим методом / В.А. Малеев, В.М. Безпальченко О.А.С. // *Вестник Херсонского национального технического университета* – 2015. – Т. 2 – № 53 – С.43–47.
68. Altinöz S. Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry / Altinöz S., Toptan S. // *Journal of Food Composition and Analysis* – 2003. – Т. 16 – № 4 – С.517–530.
69. Zheng H.L. Catalytic spectrophotometric determination of trace aluminium with indigo carmine / Zheng H.L., Xiong W.Q., Gong Y.K., Peng D.J., Li L.C. // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* – 2007. – Т. 66 – № 4–5 – С.1243–1247.
70. Mikuš P. Determination of quinine in beverages by online coupling capillary isotachopheresis to capillary zone electrophoresis with UV spectrophotometric detection / Mikuš P., Maráková K., Veizerová L., Piešť'Anský J. // *Journal of Separation Science* – 2011. – Т. 34 – № 23 – С.3392–3398.
71. Combeau S. Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: Application to soft drinks / Combeau S., Chatelut M., Vittori O. // *Talanta* – 2002. – Т. 56 – № 1 – С.115–122.

72. Chanlon S. Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography / Chanlon S., Joly-Pottuz L., Chatelut M., Vittori O., Cretier J.L. // *Journal of Food Composition and Analysis* – 2005. – T. 18 – № 6 – C.503–515.
73. Alghamdi A.H. Applications of stripping voltammetric techniques in food analysis / Alghamdi A.H. // *Arabian Journal of Chemistry* – 2010. – T. 3 – № 1 – C.1–7.
74. Abu Shawish H.M. Development of novel potentiometric sensors for determination of tartrazine dye concentration in foodstuff products / Abu Shawish H.M., Ghalwa N.A., Saadeh S.M., Harazeen H. El // *Food Chemistry* – 2013. – T. 138 – № 1 – C.126–132.
75. Dar R.A. Electrochemical studies of quinine in surfactant media using hanging mercury drop electrode: A cyclic voltammetric study / Dar R.A., Brahman P.K., Tiwari S., Pitre K.S. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2012. – T. 98 – C.72–79.
76. Buleandra M. Rapid voltammetric method for quinine determination in soft drinks / Buleandra M., Rabinca A.A., Cheregi M.C., Ciucu A.A. // *Food Chemistry* – 2018. – T. 253 – № June 2017 – C.1–4.
77. Zhao L. Preparation and application of sunset yellow imprinted ionic liquid polymer - Ionic liquid functionalized graphene composite film coated glassy carbon electrodes / Zhao L., Zhao F., Zeng B. // *Electrochimica Acta* – 2014. – T. 115 – C.247–254.
78. Prado M.A. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis / Prado M.A., Boas L.F.V., Bronze M.R., Godoy H.T. // *Journal of Chromatography A* – 2006. – T. 1136 – № 2 – C.231–236.
79. Suzuki S. Determination of synthetic food dyes by capillary electrophoresis / Suzuki S., Shirao M., Aizawa M., Nakazawa H., Sasa K., Sasagawa H. // *Journal of Chromatography A* – 1994. – T. 680 – № 2 – C.541–547.
80. Komissarchik S. Test systems and a method for express detection of synthetic food dyes in drinks / Komissarchik S., Nyanikova G. // *LWT - Food Science and Technology* – 2014. – T. 58 – № 2 – C.315–320.
81. Reijenga J.C. Determination of quinine in beverages, pharmaceutical preparations

and urine by isotachopheresis / Reijenga J.C., Aben G.V.A., Lemmens A.A.G., Verheggen T.P.E.M., Bruijn C.H.M.M. De, Everaerts F.M. // *Journal of Chromatography A* – 1985. – T. 320 – № 1 – C.245–252.

82. Zhao W. Determination of Cinchona Alkaloids by Capillary Electrophoresis with Novel Complex Formation / Zhao W., Li Y., Zhang Y., Zhang H., Yu H., Chen A. // *Analytical Letters* – 2016. – T. 49 – № 8 – C.1176–1183.

83. Kucharska M. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes / Kucharska M., Grabka J. // *Talanta* – 2010. – T. 80 – № 3 – C.1045–1051.

84. Feng F. Highly sensitive and accurate screening of 40 dyes in soft drinks by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / Feng F., Zhao Y., Yong W., Sun L., Jiang G., Chu X. // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* – 2011. – T. 879 – № 20 – C.1813–1818.

85. Razmara R.S. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction / Razmara R.S., Daneshfar A., Sahrai R. // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* – 2011. – T. 17 – № 3 – C.533–536.

86. Li X.Q. Identification and determination of 34 water-soluble synthetic dyes in foodstuff by high performance liquid chromatography-diode array detection-ion trap time-of-flight tandem mass spectrometry / Li X.Q., Zhang Q.H., Ma K., Li H.M., Guo Z. // *Food Chemistry* – 2015. – T. 182 – C.316–326.

87. Luo X. Novel molecularly imprinted polymer using 1-(α -methyl acrylate)-3-methylimidazolium bromide as functional monomer for simultaneous extraction and determination of water-soluble acid dyes in wastewater and soft drink by solid phase extraction and high perf / Luo X., Zhan Y., Tu X., Huang Y., Luo S., Yan L. // *Journal of Chromatography A* – 2011. – T. 1218 – № 8 – C.1115–1121.

88. Kluska M. Analytics of Quinine and its Derivatives / Kluska M., Marciniuk-Kluska A., Prukała D., Prukała W. // *Critical Reviews in Analytical Chemistry* – 2016. – T. 46 – № 2 – C.139–145.

89. Mustafa A.M. Simultaneous Determination of 18 Bioactive Compounds in Italian Bitter Liqueurs by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Diode

- Array Detection / Mustafa A.M., Ricciutelli M., Maggi F., Sagratini G., Vittori S., Caprioli G. // *Food Analytical Methods* – 2014. – Т. 7 – № 3 – С.697–705.
90. Kudláček K. Historical injection solutions of quinine analyzed by HPLC/MS / Kudláček K., Nesměrák K., Štícha M., Kozlík P., Babica J. // *Monatshefte für Chemie* – 2017. – Т. 148 – № 9 – С.1613–1618.
91. Fallis A.. Determination and identification of synthetic food colors based on fluorescence spectroscopy and radial basis function neural networks / Fallis A.. // *Journal of Chemical Information and Modeling* – 2013. – Т. 53 – № 9 – С.1689–1699.
92. Feás X. Fast and sensitive new high performance liquid chromatography laser induced fluorescence (HPLC-LIF) method for quinine. Comparative study in soft drinks / Feás X., Fente C.A., Cepeda A. // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* – 2009. – Т. 32 – № 17 – С.2600–2614.
93. Wang J. Identification of tartrazine and sunset yellow by fluorescence spectroscopy combined with radial basis function neural network / Wang J., Chen G., Zhu T., Gao S., Wei B., Bi L. // *Chinese Optics Letters* – 2009. – Т. 7 – № 11 – С.1058–1060.
94. Lawson-Wood K. Quinine Fluorescence Determination of Quinine in Tonic Water / Lawson-Wood K., Evans K. // *PerkinElmer Application Note - Fluorescence Spectroscopy* – 2013.
95. O'Reilly J.E. Fluorescence experiments with quinine / O'Reilly J.E. // *Journal of Chemical Education* – 1975. – Т. 52 – № 9 – С.610–612.
96. Dian J. Functionalized materials with fluorescent dyes for chemosensor applications / Dian J., Jindřich J., Jelínek I. // *Monatshefte für Chemie* – 2017. – Т. 148 – № 11 – С.1929–1935.
97. Басова Е.М., Иванов В.М. А.О.К. Возможности спектрофлуориметра “Флюорат-02-Панорама” в анализе смеси флуоресцентных красителей / Басова Е.М., Иванов В.М. А.О.К. // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия.* – 2014. – Т. Т.55, №5 – С.281–295.
98. Infante C.M.C. Development of a fluorimetric sequential injection analysis (SIA) methodology for determination of quinine / Infante C.M.C., Masini J.C. // *Journal of the Brazilian Chemical Society* – 2011. – Т. 22 – № 10 – С.1888–1893.

99. Пацаева, С.В. Электронные спектры сложных молекул / С. В. Пацаева, В.И. Южаков – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2010.– 34с.
100. Кулакова, И.И. Методы оптической спектроскопии / Кулакова И.И., Фёдорова О.А., Хорошутин А.В. – Москва, 2015. Вып. Московский– 117с.
101. Kumar A. Molecular vibration assisted triplet-triplet annihilation nir-upconversion luminescence of fluorescein / Kumar A., Pinto da Silva L., Esteves da Silva J.C.G., Kumar K. // *Optical Materials* – 2019. – Т. 96 – № July – С.109286.
102. Yamaguchi S. Spectroscopic study of fluorescein immobilized on anodic porous alumina in aqueous solutions of different pH / Yamaguchi S., Shimada K., Matsui K. // *Dyes and Pigments* – 2020. – Т. 173 – № October 2019 – С.107944.
103. ГОСТ 908-2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия (с Поправкой), ГОСТ от 17 ноября 2004 года №908-2004 [Электронный ресурс]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200037682> (accessed: 24.11.2019).
104. Гайдук, О.В. Быстрый титриметрический метод определения кобальта (III, IV) индигокармином / О.В. Гайдук, Р.П. Пантелер. – 2010. – Т.14, № 1 – С.25–28.
105. XuMuK.ru - Индигоидные красители - Химическая энциклопедия [Электронный ресурс]. URL: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/1679.html> (accessed: 11.09.2019).
106. Stockert J.C. Selective fluorescence reaction of indigocarmine stained eosinophil leucocyte granules induced by alkaline reduction of the bound dye to its leuco derivative / Stockert J.C., Trigoso C.I. // *Acta Histochemica* – 1994. – Т. 96 – № 1 – С.8–14.
107. Seixas De Melo J. Photophysical and spectroscopic studies of indigo derivatives in their keto and leuco forms / Seixas De Melo J., Moura A.P., Melo M.J. // *Journal of Physical Chemistry A* – 2004. – Т. 108 – № 34 – С.6975–6981.
108. Махов, В.Н. Температурное тушение люминесценции / В.Н. Махов, Т.В. Уварова, Кирм С.В. М.: – 2016. – С.8–13.
109. Zhou T. Concentration effect and temperature quenching of upconversion luminescence in BaGd₂ZnO₅:Er³⁺/Yb³⁺ phosphor / Zhou T., Zhang Y., Wu Z., Chen B. // *Journal of Rare Earths* – 2015. – Т. 33 – № 7 – С.686–692.

110. Bayart A. Upconversion luminescence properties and thermal quenching mechanisms in the layered perovskite $\text{La}_{1.9}\text{Er}_{0.1}\text{Ti}_2\text{O}_7$ towards an application as optical temperature sensor / Bayart A., Szczepanski F., Blach J.F., Rousseau J., Katelnikovas A., Saitzek S. // *Journal of Alloys and Compounds* – 2018. – T. 744 – C.516–527.

Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) методики анализа хинина

1. Оценка показателя повторяемости

Для оценки показателя повторяемости необходимо рассчитать среднее арифметическое результатов единичного анализа компонента (C_{cp}) по формуле:

$$C_{cp} = \frac{\sum C_{i,N}}{N},$$

где N – число параллельных определений.

Далее необходимо рассчитать выборочную дисперсию для каждой серии анализа в условиях повторяемости:

$$S_l^2 = \frac{\sum (C_{l,n} - C_{cp})^2}{N - 1}$$

Затем необходимо проверить, можно ли пренебречь разбросом между сериями. Данную гипотезу проверяют по критерию Кохрена. Для этого необходимо из всех серий дисперсий выбрать наибольшее значение S_{max}^2 и найти сумму всех дисперсий $\sum S_l^2$.

Расчетные значения критерия Кохрена находят по формуле:

$$G_{расч} = \frac{S_{max}^2}{\sum S_l^2}$$

Табличное значение критерия Кохрена находят для принятой доверительной вероятности $P=0,95$, числа степеней свободы $v=N-1$ и $f=L$, где L – число суммируемых дисперсий.

Необходимо сравнить расчетное значение критерия Кохрена с табличным значением.

При $G_{расч} > G_{табл}$, значение S_{max}^2 исключают из расчетов и повторяют процедуру до следующего значения S_{max}^2 . Если при следующем максимальном

значении дисперсии значение расчетного критерия Кохрена вновь больше табличного, то процедуру расчетов вновь повторяют, исключая текущее S_{max}^2 . Процедуру расчетов повторяют до тех пор, пока $G_{расч}$ не станет меньше или равно $G_{табл}$.

Оставшиеся (не исключенные) значения S_l^2 принимают однородными и далее оценивают по ним среднеквадратичные отклонения. По данным СКО устанавливают значение показателя повторяемости для полученных в конкретной лаборатории результатов анализа:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum S_l^2}{L'}}$$

где L' - количество серий, оставшееся после проверки на однородность.

Полученное значение является СКО повторяемости $S_r = \sigma_r$.

2. Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности

Для оценки показателя внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) производят расчет общего среднего арифметического результатов анализа по формуле:

$$C = \frac{\sum C_l}{L'}$$

Далее в условиях промежуточной прецизионности рассчитывают СКО:

$$S_{Rл} = \sqrt{\frac{\sum (C_{l,n} - C_l)^2}{L' - 1}}$$

Полученное значение $S_{Rл} = \sigma_{Rл}$ является показателем внутрилабораторной прецизионности.

3. Оценка показателя правильности (систематическая погрешность методики)

Для оценки показателя правильности разрабатываемой методики необходимо оценить систематическую погрешность при реализации данной методики.

Для этого необходимо рассчитать разность между средним значением, полученным в лаборатории, и аттестованным значением образца (стандартный раствор):

$$\Theta = X - C$$

Далее необходимо проверить значимость полученного значения по критерию Стьюдента. Для этого нужно рассчитать значение t-критерия ($t_{\text{расч}}$) и сравнить его с табличным значением ($t_{\text{табл}}$):

$$t_{\text{расч}} = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L'} + \frac{A_0^2}{3}}}$$

$\frac{S_{Rл}^2}{L'}$ - дисперсия общего среднего результата

A_0 – погрешность аттестованного значения раствора

Рассчитанное значение t-критерия ($t_{\text{расч}}$) сравнивают с табличным значением ($t_{\text{табл}}$) при числе степеней свободы $f=L'-1$ для доверительной вероятности $P=0,95$.

При $t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}$ систематическая погрешность Θ не значима на фоне случайного разброса, и в данном случае ее принимают равной нулю, а оценку систематической погрешности проводят по формуле:

$$\Delta_{в,с}^* = \Delta_{н,с}^* = |\Delta_c^*| = |\Delta_c| = 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L'} + \frac{A_0^2}{3}} = 1,96 \cdot \sigma_c^*$$

Где σ_c^* - СКО не исключенной систематической погрешности.

При $t_{расч.} > t_{табл.}$ систематическая погрешность Θ значима на фоне случайного разброса, поэтому ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах:

$$\Delta_{с(в,н)}^* = \Theta \pm 1,96 \cdot \sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L'} + \frac{A_0^2}{3}} = \Theta \pm 1,96 \cdot \sigma_c^*$$

После расчета верхней и нижней границ систематической погрешности, выбирают максимальное по модулю значение $|\Delta_{max}^*| = |\Delta_{с,н}^*, \Delta_{с,в}^*| = \Delta_c^*$ и тогда можно записать:

$$\pm \Delta_c^* = \pm \Delta_c = \Theta + 1,96 \cdot \sigma_c^*$$

4. Оценка показателя точности (характеристики погрешности методики)

Для оценки показателя точности разрабатываемой методики необходимо рассчитать границы, в которых погрешность любого из совокупности результатов измерений при реализации методики находится принятой $P=0,95$. В данном случае дисперсия погрешности формируется из дисперсий случайной и систематической погрешностей.

Характеристику погрешности рассчитывают по формуле:

$$\Delta_{в}^* = \Delta_{н}^* = |\Delta^*| = |\Delta| = \Theta + 1,96 \cdot \sqrt{(\sigma_{Rл}^*)^2 + (\sigma_c^*)^2}$$

Для оценки метрологических показателей разрабатываемой флуориметрической методики определения хинина в продуктах пищевой и фармацевтической промышленности выбрана прямолинейная область градуировочной зависимости интенсивности сигнала люминесценции хинина от его концентрации в серной кислоте (рис.29).

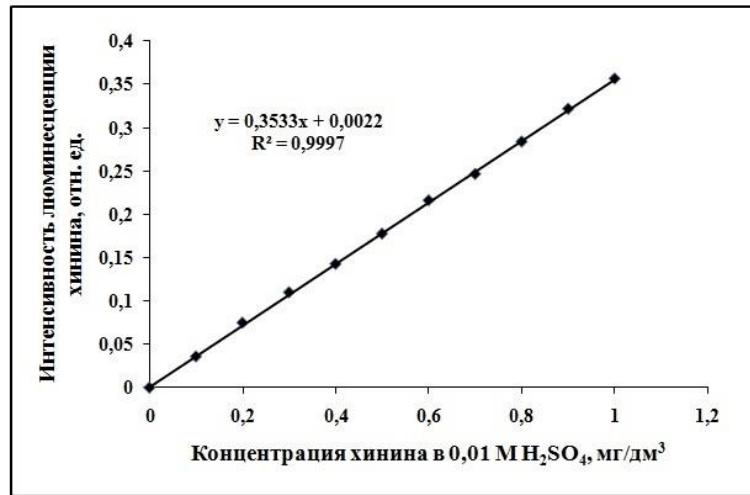


Рисунок 1.1 – Градуировочная зависимость интенсивности сигнала люминесценции хинина в 0,01M H₂SO₄ от его концентрации

1. Содержание хинина 0,1 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра хинина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,1 | 0,0030 | 1 | 0,0901 | 0,1025 | 0,0963 | 7,6595E-05 |
| | | 2 | 0,1026 | 0,1011 | 0,1018 | 1,1205E-06 |
| | | 3 | 0,1107 | 0,1098 | 0,1102 | 4,1770E-07 |
| | | 4 | 0,1230 | 0,1199 | 0,1214 | 4,4910E-06 |
| | | 5 | 0,1102 | 0,1109 | 0,1106 | 2,4012E-07 |
| | | 6 | 0,1077 | 0,1108 | 0,1092 | 4,5965E-06 |
| | | 7 | 0,1041 | 0,1019 | 0,1030 | 2,3263E-06 |
| | | 8 | 0,1107 | 0,1089 | 0,1098 | 1,6562E-06 |
| | | 9 | 0,1082 | 0,1102 | 0,1092 | 1,9543E-06 |
| | | 10 | 0,1022 | 0,0927 | 0,0975 | 4,5125E-05 |

| S^2_{\max} | $\sum S^2$ | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------|------------|--------|--------|--|
| 7,6595E-05 | 0,0001 | 0,5529 | 0,6020 | 0,0037 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,1069 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R,л} = \sigma_{R,л}$ | 0,0074 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0069 | 2,3604 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0012 | 0,0126 | 0,0126 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0157$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием хинина 0,1 мг/дм³.

| σ_r^* , мг/дм ³ | σ_r^* , % | $\sigma_{R,л}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{R,л}^*$, % | $\pm \Delta^* c$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^* c$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|--|-----------------------|
| 0,0037 | 3 | 0,0074 | 7 | 0,0057 | 6 | 0,0226 | 23 |

2. Содержание хинина 0,2 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра хинина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,2 | 0,0060 | 1 | 0,2160 | 0,2188 | 0,2174 | 3,8642E-06 |
| | | 2 | 0,2205 | 0,2290 | 0,2248 | 3,6295E-05 |
| | | 3 | 0,2087 | 0,2107 | 0,2097 | 2E-06 |
| | | 4 | 0,2390 | 0,2297 | 0,2344 | 4,3152E-05 |
| | | 5 | 0,2268 | 0,2277 | 0,2273 | 4,608E-07 |
| | | 6 | 0,2066 | 0,2087 | 0,2076 | 2,1013E-06 |
| | | 7 | 0,2101 | 0,2095 | 0,2098 | 1,3005E-07 |
| | | 8 | 0,2197 | 0,2197 | 0,2197 | 5E-11 |
| | | 9 | 0,2159 | 0,2180 | 0,2169 | 2,205E-06 |
| | | 10 | 0,2180 | 0,2178 | 0,2179 | 2,42E-08 |

| S^2_{\max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------|--------------|--------|--------|--|
| 4,3152E-05 | 9,0233E-05 | 0,4782 | 0,6020 | 0,0030 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,2185 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{RЛ} = \sigma_{RЛ}$ | 0,0085 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0185 | 4,2199 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0099 | 0,0272 | 0,0272 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0187$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием хинина 0,2 мг/дм³.

| $\sigma_{\text{г}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{г}}^*$, % | $\sigma_{\text{Rл}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{Rл}}^*$, % | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm\Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*$, % |
|---|------------------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 0,0030 | 1 | 0,0085 | 4 | 0,0086 | 4 | 0,0372 | 19 |

3. Содержание хинина 0,4 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра хинина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,4 | 0,0121 | 1 | 0,4220 | 0,4267 | 0,4244 | 1,0998E-05 |
| | | 2 | 0,4337 | 0,4388 | 0,4362 | 1,2600E-05 |
| | | 3 | 0,4378 | 0,4401 | 0,4389 | 2,6912E-06 |
| | | 4 | 0,4211 | 0,4201 | 0,4206 | 5,2020E-07 |
| | | 5 | 0,4042 | 0,4009 | 0,4025 | 5,6112E-06 |
| | | 6 | 0,4110 | 0,4098 | 0,4104 | 6,7280E-07 |
| | | 7 | 0,4481 | 0,4456 | 0,4468 | 3,1250E-06 |
| | | 8 | 0,4392 | 0,4390 | 0,4391 | 1,6200E-08 |
| | | 9 | 0,4212 | 0,4310 | 0,4261 | 4,8020E-05 |
| | | 10 | 0,4101 | 0,4012 | 0,4056 | 3,9694E-05 |

| S^2_{max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_{\text{г}} = \sigma_{\text{г}}^*$ |
|--------------------|--------------|--------|-------|--|
| 4,802E-05 | 0,00012 | 0,3874 | 0,602 | 0,0035 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,4251 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{\text{Rл}} = \sigma_{\text{Rл}}$ | 0,0153 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0251 | 2,9531 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
|--|--|------------------|
| 0,0084 | 0,0417 | 0,0417 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0343$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием хинина 0,4 мг/дм³.

| $\sigma_{\text{г}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{г}}^*$, % | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, % | $\pm \Delta^* c$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^* c$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
|---|------------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------|--|-----------------------|
| 0,0035 | 1 | 0,0153 | 4 | 0,0166 | 4 | 0,0594 | 15 |

4. Содержание хинина 0,6 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра хинина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,6 | 0,0148 | 1 | 0,6447 | 0,6449 | 0,6447 | 1,2800E-08 |
| | | 2 | 0,6527 | 0,6603 | 0,6565 | 2,9414E-05 |
| | | 3 | 0,6409 | 0,6250 | 0,6330 | 0,00012529 |
| | | 4 | 0,6523 | 0,6501 | 0,6512 | 2,4865E-06 |
| | | 5 | 0,6409 | 0,6458 | 0,6433 | 1,2005E-05 |
| | | 6 | 0,6401 | 0,6577 | 0,6489 | 0,00015558 |
| | | 7 | 0,6099 | 0,6008 | 0,6054 | 4,1314E-05 |
| | | 8 | 0,6399 | 0,6400 | 0,6400 | 1,2500E-09 |
| | | 9 | 0,6303 | 0,6387 | 0,6345 | 3,4611E-05 |
| | | 10 | 0,6080 | 0,6123 | 0,6102 | 9,3312E-06 |

| S^2_{\max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------|--------------|--------|-------|--|
| 0,0002 | 0,0004 | 0,3794 | 0,602 | 0,0064 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,6368 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{RЛ} = \sigma_{RЛ}$ | 0,0169 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0368 | 3,6472 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0170 | 0,0565 | 0,0565 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0386$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием хинина 0,6 мг/дм³.

| σ_r^* , мг/дм ³ | σ_r^* , % | $\sigma_{\text{РЛ}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{РЛ}}^*$, % | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm\Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*$, % |
|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 0,0064 | 1 | 0,0169 | 3 | 0,0197 | 3 | 0,0754 | 13 |

5. Содержание хинина 0,8 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра хинина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,8 | 0,0198 | 1 | 0,8470 | 0,8454 | 0,8462 | 1,1705E-06 |
| | | 2 | 0,8560 | 0,8569 | 0,8564 | 4,0500E-07 |
| | | 3 | 0,8600 | 0,8592 | 0,8596 | 3,2805E-07 |
| | | 4 | 0,8540 | 0,8504 | 0,8522 | 6,5161E-06 |
| | | 5 | 0,8204 | 0,8234 | 0,8219 | 4,3218E-06 |
| | | 6 | 0,8029 | 0,8058 | 0,8043 | 4,2632E-06 |
| | | 7 | 0,8447 | 0,8399 | 0,8423 | 1,1424E-05 |
| | | 8 | 0,8570 | 0,8503 | 0,8537 | 2,2445E-05 |
| | | 9 | 0,8381 | 0,8400 | 0,8390 | 1,8432E-06 |
| | | 10 | 0,8023 | 0,8033 | 0,8028 | 4,9005E-07 |

| S^2_{max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------------|--------------|--------|--------|--|
| 2,2445E-05 | 5,3207E-05 | 0,4218 | 0,6020 | 0,0023 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,8379 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{\text{РЛ}} = \sigma_{\text{РЛ}}$ | 0,0210 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0379 | 2,4510 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0076 | 0,0681 | 0,0681 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_B = \Delta^*_H = \Delta^* = 0,0511$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием хинина 0,8 мг/дм³.

| σ_r^* , мг/дм ³ | σ_r^* , % | $\sigma_{Rл}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{Rл}^*$, % | $\pm \Delta^* c$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^* c$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
|--------------------------------------|---------------------|---|------------------------|--|-------------------------|--|-----------------------|
| 0,0023 | 1 | 0,0210 | 3 | 0,0303 | 4 | 0,0890 | 11 |

6. Содержание хинина 1,0 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра хинина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|---------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 1,0 | 0,0302 | 1 | 1,0354 | 1,03565 | 1,035525 | 3,125E-08 |
| | | 2 | 1,0204 | 1,02052 | 1,02046 | 7,2E-09 |
| | | 3 | 1,0203 | 1,01805 | 1,019175 | 2,5313E-06 |
| | | 4 | 0,9408 | 0,96011 | 0,950455 | 0,00018644 |
| | | 5 | 1,0218 | 1,02076 | 1,02128 | 5,408E-07 |
| | | 6 | 1,0206 | 1,01862 | 1,01961 | 1,9602E-06 |
| | | 7 | 1,0161 | 1,01429 | 1,015195 | 1,6381E-06 |
| | | 8 | 1,0442 | 1,03872 | 1,04146 | 1,5015E-05 |
| | | 9 | 0,9731 | 0,99062 | 0,98186 | 0,00015348 |
| | | 10 | 1,0325 | 1,03022 | 1,03136 | 2,5992E-06 |

| S^2_{\max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------|--------------|--------|-------|--|
| 0,0002 | 0,0004 | 0,5119 | 0,602 | 0,0060 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 1,0136 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R_{л}} = \sigma_{R_{л}}$ | 0,0274 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0136 | 0,7009 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность не значима и ее принимаем равной нулю.

Границы, в которых находится не исключенная погрешность с принятой вероятностью 0,95:

| |
|------------------|
| $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0381 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0658$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием хинина 1,0 мг/дм³.

| σ_r^* , мг/дм ³ | σ_r^* , % | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, % | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm\Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*$, % |
|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 0,0006 | 1 | 0,0273 | 3 | 0,0381 | 4 | 0,0654 | 7 |

Оценка показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) методики анализа индигокармина

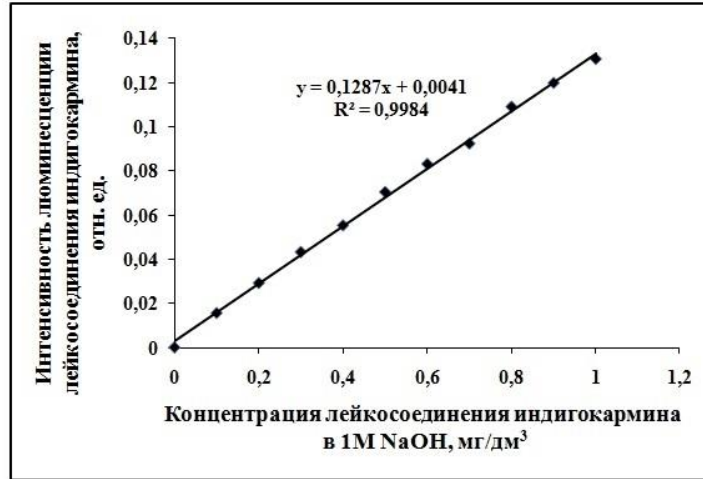


Рисунок 2.1 – Градуировочная зависимость интенсивности сигнала люминесценции от концентрации лейкосоединения индигокармина в 1,00 М NaOH

1. Содержание индигокармина 0,1 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра индигокармина, мг/дм³ | Погрешность станд. р-ра Δm, мг/дм³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S² |
|--|------------------------------------|-------------|--------------------------------------|--------|--|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,1 | 0,0030 | 1 | 0,1005 | 0,1004 | 0,1005 | 6,8445E-09 |
| | | 2 | 0,0795 | 0,0782 | 0,0789 | 7,7626E-07 |
| | | 3 | 0,0850 | 0,0851 | 0,0850 | 5E-09 |
| | | 4 | 0,0796 | 0,0810 | 0,0803 | 9,8421E-07 |
| | | 5 | 0,1016 | 0,1037 | 0,1026 | 2,1903E-06 |
| | | 6 | 0,0816 | 0,0814 | 0,0815 | 1,2961E-08 |
| | | 7 | 0,0840 | 0,0831 | 0,0836 | 4,1405E-07 |
| | | 8 | 0,0807 | 0,0791 | 0,0799 | 1,1997E-06 |
| | | 9 | 0,1003 | 0,1002 | 0,1002 | 5E-09 |
| | | 10 | 0,0904 | 0,0891 | 0,0898 | 8,6856E-07 |

| S²max | ΣS² | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости S _r = σ _r * |
|------------|------------|--------|--------|---|
| 2,1903E-06 | 6,4629E-06 | 0,3389 | 0,6020 | 0,0008 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,0882 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{Rл} = \sigma_{Rл}$ | 0,0094 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|-------------|
| | $t_{расч.}$ | $t_{табл.}$ |
| 0,0118 | 3,4065 | 2,2622 |

Так как $t_{расч.} > t_{табл.}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96 * \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96 * \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0050 | 0,0185 | 0,0185 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{в} = \Delta^*_{н} = \Delta^* = 0,01969$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием индигокармина 0,1 мг/дм³.

| σ_r^* , мг/дм ³ | σ_r^* , % | $\sigma_{Rл}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{Rл}^*$, % | $\pm \Delta^* c$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^* c$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
|--------------------------------------|---------------------|---|------------------------|--|-------------------------|--|-----------------------|
| 0,0008 | 1 | 0,0094 | 11 | 0,0068 | 7 | 0,0315 | 32 |

2. Содержание индигокармина 0,2 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра индигокармина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,2 | 0,0060 | 1 | 0,1580 | 0,1600 | 0,1590 | 2,1383E-06 |
| | | 2 | 0,1905 | 0,1776 | 0,1840 | 8,2909E-05 |
| | | 3 | 0,1653 | 0,1595 | 0,1624 | 1,6722E-05 |
| | | 4 | 0,1745 | 0,1680 | 0,1713 | 2,0969E-05 |
| | | 5 | 0,1648 | 0,1599 | 0,1623 | 1,2118E-05 |
| | | 6 | 0,1589 | 0,1525 | 0,1557 | 2,0499E-05 |
| | | 7 | 0,1600 | 0,1577 | 0,1589 | 2,6912E-06 |
| | | 8 | 0,1590 | 0,1584 | 0,1587 | 1,9657E-07 |
| | | 9 | 0,1702 | 0,1657 | 0,1679 | 1,0415E-05 |
| | | 10 | 0,1810 | 0,1783 | 0,1796 | 3,5139E-06 |

| S^2_{\max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------|--------------|--------|--------|--|
| 8,2909E-05 | 0,0002 | 0,4815 | 0,6020 | 0,0041 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,1660 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{RЛ} = \sigma_{RЛ}$ | 0,0042 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0340 | 7,3577 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0249 | 0,0431 | 0,0431 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0209$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием индигокармина 0,2 мг/дм³.

| $\sigma_{\text{г}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{г}}^*$, % | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, % | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm\Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*$, % |
|---|------------------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 0,0042 | 3 | 0,0096 | 6 | 0,0091 | 5 | 0,0549 | 27 |

3. Содержание индигокармина 0,4 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра индигокармина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,4 | 0,0121 | 1 | 0,3401 | 0,3390 | 0,3396 | 5,9296E-07 |
| | | 2 | 0,3410 | 0,3210 | 0,3310 | 0,0002001 |
| | | 3 | 0,3903 | 0,4090 | 0,3997 | 0,0001746 |
| | | 4 | 0,3998 | 0,4055 | 0,4027 | 1,6177E-05 |
| | | 5 | 0,3446 | 0,3349 | 0,3397 | 4,6958E-05 |
| | | 6 | 0,3909 | 0,4110 | 0,4009 | 0,0002024 |
| | | 7 | 0,3310 | 0,3512 | 0,3411 | 0,0002042 |
| | | 8 | 0,3321 | 0,3561 | 0,3441 | 0,0002876 |
| | | 9 | 0,3490 | 0,3109 | 0,3299 | 0,0007258 |
| | | 10 | 0,3504 | 0,3310 | 0,3407 | 0,0001887 |

| S^2_{max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_{\text{г}} = \sigma_{\text{г}}^*$ |
|--------------------|--------------|--------|--------|--|
| 0,0007 | 0,0020 | 0,3545 | 0,6020 | 0,0143 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,3569 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{\text{Рл}} = \sigma_{\text{Рл}}$ | 0,0308 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0431 | 3,5957 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0196 | 0,0665 | 0,0665 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0648$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием индигокармина 0,4 мг/дм³.

| | | | | | | | |
|---|------------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------|--|-----------------------|
| $\sigma_{\text{г}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{г}}^*$, % | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{Рл}}^*$, % | $\pm \Delta^* c$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^* c$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
| 0,0143 | 4 | 0,0308 | 9 | 0,0235 | 6 | 0,1078 | 27 |

4. Содержание индигокармина 0,6 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра индигокармина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,6 | 0,0181 | 1 | 0,5680 | 0,5408 | 0,5544 | 0,00036989 |
| | | 2 | 0,5535 | 0,5230 | 0,5383 | 0,00046424 |
| | | 3 | 0,5290 | 0,5097 | 0,5194 | 0,00018669 |
| | | 4 | 0,5903 | 0,5870 | 0,5887 | 5,4483E-06 |
| | | 5 | 0,5730 | 0,5609 | 0,5669 | 7,3496E-05 |
| | | 6 | 0,5688 | 0,5399 | 0,5544 | 0,00041590 |
| | | 7 | 0,5870 | 0,5760 | 0,5815 | 6,0963E-05 |
| | | 8 | 0,5621 | 0,5540 | 0,5581 | 3,2781E-05 |
| | | 9 | 0,5591 | 0,5383 | 0,5487 | 0,00021732 |
| | | 10 | 0,5807 | 0,5703 | 0,5755 | 5,3634E-05 |

| S^2_{\max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
|--------------|--------------|--------|--------|--|
| 0,0005 | 0,0019 | 0,2469 | 0,6020 | 0,0137 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,5586 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{R_{Л}} = \sigma_{R_{Л}}$ | 0,0207 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0414 | 3,3551 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность значима на фоне случайного разброса и ее необходимо учитывать в дальнейших расчетах.

Рассчитываем верхнюю и нижнюю границы не исключенной систематической погрешности и выбираем максимальное по модулю значение:

| | | |
|--|--|------------------|
| $\Delta c(n) = \Theta - 1,96^* \sigma c$ | $\Delta c(n) = \Theta + 1,96^* \sigma c$ | $\pm \Delta^* c$ |
| 0,0172 | 0,0656 | 0,0656 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0473$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием индигокармина 0,6 мг/дм³.

| $\sigma_{\text{г}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{г}}^*$, % | $\sigma_{\text{Rл}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{Rл}}^*$, % | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm\Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm\Delta^*$, % |
|---|------------------------------|--|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 0,0137 | 2 | 0,0207 | 4 | 0,0242 | 4 | 0,0887 | 15 |

5. Содержание индигокармина 0,8 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра индигокармина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 0,8 | 0,0241 | 1 | 0,8140 | 0,8102 | 0,8121 | 7,5039E-06 |
| | | 2 | 0,7501 | 0,7203 | 0,7352 | 0,00044483 |
| | | 3 | 0,7441 | 0,7323 | 0,7382 | 6,9490E-05 |
| | | 4 | 0,7551 | 0,7889 | 0,7720 | 0,00057196 |
| | | 5 | 0,7909 | 0,7921 | 0,7915 | 7,8626E-07 |
| | | 6 | 0,7300 | 0,7500 | 0,7400 | 0,00019932 |
| | | 7 | 0,8102 | 0,8011 | 0,8057 | 4,1459E-05 |
| | | 8 | 0,7410 | 0,7019 | 0,7215 | 0,00075984 |
| | | 9 | 0,8002 | 0,8060 | 0,8031 | 1,6808E-05 |
| | | 10 | 0,7834 | 0,7811 | 0,7822 | 2,6912E-06 |

| S^2_{max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_{\text{г}} = \sigma_{\text{г}}^*$ |
|--------------------|--------------|--------|--------|--|
| 0,0008 | 0,0021 | 0,3593 | 0,6020 | 0,0145 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,7702 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{\text{Rл}} = \sigma_{\text{Rл}}$ | 0,0370 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0298 | 1,6391 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность не значима и ее принимаем равной нулю.

Границы, в которых находится не исключенная погрешность с принятой вероятностью 0,95:

| |
|---------------------------|
| $\pm \Delta^*_{\text{с}}$ |
| 0,0357 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0809$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием индигокармина 0,8 мг/дм³.

| $\sigma_{\text{г}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{г}}^*$, % | $\sigma_{\text{РЛ}}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{\text{РЛ}}^*$, % | $\pm \Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
|---|------------------------------|--|-------------------------------|---|----------------------------------|--|-----------------------|
| 0,0145 | 2 | 0,0370 | 5 | 0,0357 | 4 | 0,0809 | 10 |

1. Содержание индигокармина 1,0 мг/дм³

Повторяемость

| Концентрация станд. р-ра индигокармина, мг/дм ³ | Погрешность станд. р-ра Δm , мг/дм ³ | Номер серии | Результаты параллельного определения | | Результат измерения (среднее арифметическое) | Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, S^2 |
|---|---|----------------|--|--------|---|---|
| | | | 1 | 2 | | |
| 1,0 | 0,0302 | 1 | 1,0079 | 1,0031 | 1,0055 | 1,1563E-05 |
| | | 2 | 0,9844 | 0,9880 | 0,9862 | 6,6905E-06 |
| | | 3 | 0,9111 | 0,9201 | 0,9156 | 4,0204E-05 |
| | | 4 | 0,9461 | 0,9401 | 0,9431 | 1,8144E-05 |
| | | 5 | 0,9561 | 0,9391 | 0,9476 | 0,00014544 |
| | | 6 | 0,9638 | 0,9480 | 0,9559 | 0,00012477 |
| | | 7 | 0,9703 | 0,9688 | 0,9696 | 1,1552E-06 |
| | | 8 | 0,9605 | 0,9481 | 0,9543 | 7,7825E-05 |
| | | 9 | 1,0204 | 1,0126 | 1,0165 | 3,0117E-05 |
| | | 10 | 1,0171 | 1,0205 | 1,0188 | 5,9685E-06 |

| | | | | |
|--------------|--------------|--------|--------|--|
| S^2_{\max} | ΣS^2 | Грасч | Гтабл | СКО повторяемости $S_r = \sigma_r^*$ |
| 0,0001 | 0,0004 | 0,3149 | 0,6020 | 0,0068 |

Внутрилабораторная прецизионность:

| | |
|--|--------|
| Общее среднее арифметическое по 10 сериям | 0,9713 |
| СКО в условиях промежуточной прецизионности $S_{Rл} = \sigma_{Rл}$ | 0,0345 |

Оценивание систематической погрешности:

| Θ^* | Значимость по критерию Стьюдента | |
|------------|----------------------------------|--------------------|
| | $t_{\text{расч.}}$ | $t_{\text{табл.}}$ |
| 0,0287 | 1,3957 | 2,2622 |

Так как $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, систематическая погрешность не значима и ее принимаем равной нулю.

Границы, в которых находится не исключенная погрешность с принятой вероятностью 0,95:

| |
|---------------------------|
| $\pm \Delta^*_{\text{с}}$ |
| 0,0403 |

Оценку характеристики погрешности рассчитываем как сумму дисперсий случайной и систематической погрешностей:

$$\Delta^*_{\text{в}} = \Delta^*_{\text{н}} = \Delta^* = 0,0786$$

Обобщаем полученные в данной лаборатории результаты для диапазона концентраций с содержанием индигокармина 1,0 мг/дм³.

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------|---|------------------------|---|----------------------------------|--|-----------------------|
| σ_r^* , мг/дм ³ | σ_r^* , % | $\sigma_{Rл}^*$, мг/дм ³ | $\sigma_{Rл}^*$, % | $\pm \Delta^*_{\text{с}}$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*_{\text{с}}$, % | $\pm \Delta^*$, мг/дм ³ | $\pm \Delta^*$, % |
| 0,0068 | 1 | 0,0345 | 4 | 0,0402 | 4 | 0,0786 | 8 |