

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Николаевой Алёны Андреевны

«Определение хинина и индигокармина в продукции пищевой и фармацевтической промышленности методом флуориметрии»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 - аналитическая химия

Оценка актуальности диссертационной работы

В последнее время для придания определенных вкусовых характеристик и благоприятного цветового восприятия пищевых продуктов широко используются различные пищевые добавки: красители, ароматизаторы. Для придания цвета различным пищевым продуктам (алкогольные и безалкогольные напитки, конфеты, кондитерские изделия) и фармацевтическим препаратам (таблетки, капсулы) широко используются синтетические пищевые красители, отличающиеся от натуральных высокой устойчивостью к фото- и биodeградации. Вкусоароматические добавки или усилители вкуса и аромата часто добавляются в пищевые продукты для придания им особых вкусовых качеств, а также для устранения неприятных запахов, улучшения характеристик, которые приобретаются в результате длительного хранения пищевых продуктов. Негативное влияние, оказываемое синтетическими пищевыми красителями и различными пищевыми добавками, в том числе и ароматизаторами, на живые организмы, и в первую очередь, на человека, ставит задачу разработки простых и экспрессных методик их определения.

За исключением редких случаев в пищевые продукты добавляется один - два пищевых красителя или ароматизатора, поэтому для их определения возможно использование молекулярно-спектроскопических методов анализа, таких как спектрофотометрия и люминесценция, отличающихся простотой выполнения определения и не требующих использования дорогостоящего оборудования. Люминесцентный метод характеризуется большей чувствительностью и селективностью определения органических соединений и находит широкое применение в биологии и медицине.

В этой связи диссертационная работа Николаевой А.А., посвященная разработке методик флуоресцентного определения вкусоароматической пищевой добавки - хинина и синтетического пищевого красителя -

индигокармина в пищевой и фармацевтической продукции, является *актуальной*.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц, 30 рисунков, состоит из введения, 5 глав, выводов и списка литературы из 110 источников и приложения.

Во введении приведена актуальность диссертационной работы, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, изложены положения, выносимые на защиту.

В первой главе (литературный обзор) приведена классификация применяемых пищевых добавок, особое внимание уделено хинину и индигокармину. Рассмотрены методы выделения и концентрирования пищевых добавок методами сорбции (твердофазной экстракции), экстракции органическими растворителями, гомогенной экстракции в точке помутнения. Приведены основные методы определения хинина и индигокармина: спектрофотометрические, флуориметрические, электрохимические, хроматографические и метод капиллярного электрофореза.

При рассмотрении опубликованных данных соискатель делает вывод о недостаточно широком использовании высокочувствительного и селективного люминесцентного метода определения пищевых добавок.

Во второй главе приведено подробное описание устройства и принципа работы спектрофлуориметра «Флюорат-02-Панорма», как основного прибора, используемого в работе, приведены реактивы и объекты исследования, методика проведения эксперимента.

Третья глава посвящена исследованию спектрально-люминесцентных свойств хинина (спектры возбуждения люминесценции и люминесценции, время жизни и квантовый выход люминесценции), влиянию сопутствующих компонентов пищевой и фармацевтической продукции на флуориметрическое определение хинина, разработке методики определения хинина и оценке ее метрологических характеристик.

Четвертая глава посвящена разработке подхода к определению индигокармина в виде его лейкоформы. Приведены данные по исследованию влияния концентрации гидроксида натрия, времени выдерживания и

температуры на достижение максимального сигнала люминесценции лейкоформы индигокармина. Приведены спектрально-люминесцентные свойства лейкосоединения индигокармина (спектры возбуждения люминесценции и люминесценции, время жизни и квантовый выход люминесценции), влияние сопутствующих компонентов пищевой и фармацевтической продукции на его флуориметрическое определение, разработке методики определения индигокармина в виде его лейкоформы и оценке ее метрологических характеристик.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Научная новизна состоит в систематическом исследовании спектрально-люминесцентных характеристик хинина и лейкоформы индигокармина для их люминесцентного определения, а также исследовании влияния сопутствующих компонентов пищевой и фармацевтической промышленности на их определение.

Особая новизна состоит в подходе, основанном на определении интенсивно окрашенного и нелюминесцирующего красителя индигокармина в виде его бесцветной люминесцирующей лейкоформы.

Практическая значимость работы

Разработаны высокочувствительные и селективные методики флуориметрического определения хинина и индигокармина в виде его лейкоформы в пищевых и фармацевтических препаратах.

Предложены подходы и рекомендации при определении хинина и индигокармина в присутствии интенсивно окрашенных синтетических пищевых красителей и ряда других пищевых добавок.

Достоверность полученных результатов

Достоверность основных результатов не вызывает сомнений. Эксперимент выполнен на достаточно хорошем уровне. Объем проведенных исследований достаточен для обоснования выносимых на защиту положений. Применяемые приборы, реактивы и методы исследования, в целом, адекватны намеченной цели и задачам. Для оценки правильности полученных результатов использованы традиционные способы: проведение исследований на модельных растворах, использование метода «введено-найденно», сопоставление полученных результатов с результатами, полученными другими независимыми методами анализа: при определении

хинина использован независимый метод спектрофотометрии, а при определении индигокармина – хроматографический метод. Полученные данные сопоставлены с другими известными решениями, на которые в тексте диссертации имеются соответствующие ссылки.

Обоснованность положений, выносимых на защиту, и выводов по работе

Положения, выносимые на защиту, не вызывают возражений, имеют определенную научную новизну, теоретически обоснованы в тексте диссертации и экспериментально доказаны. Выводы по работе соответствуют ее содержанию, базируются на достаточно большом экспериментальном материале и не противоречат имеющимся литературным данным. Разработанные методики определения хинина и индигокармина проверены при анализе реальных пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

Значение результатов диссертации для науки и производства

Полученные в диссертационной работе Николаевой А.А. результаты имеют теоретическое и практическое значение в области использования флуоресцентной спектроскопии для определения пищевых добавок в продуктах пищевой и фармацевтической промышленности. Возможность определения интенсивно окрашенных синтетических пищевых красителей в виде их лейкоформ может быть применена и для определения других красителей, имеющих интенсивную окраску. Поскольку в напитках и продуктах, а также фармацевтических препаратах, наиболее часто используются и другие пищевые добавки, особое значение приобретает возможность флуориметрического определения хинина и индигокармина на их фоне.

Научные и прикладные результаты диссертации могут быть рекомендованы для использования в аналитических лабораториях предприятий, занимающихся контролем содержания различных добавок в пищевой и фармацевтической продукции: организации Роспотребнадзора, Госсанэпиднадзора и др. Результаты исследования представляют несомненный интерес для специалистов научно-исследовательских организаций и высших учебных заведений, занимающихся разработкой методик флуоресцентного определения органических соединений.

По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, входящих в базы цитирования Scopus

и Web of Science. Основные результаты работы доложены на конференциях различного уровня и опубликованы в 16 тезисах докладов.

Аннотация полностью раскрывает содержание диссертации.

Оформление диссертации и аннотации соответствует установленным требованиям, а сама диссертационная работа логично изложена и аккуратно оформлена.

К диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. Глубочайшие сомнения вызывает правильность и достоверность определения времени жизни люминесценции и соответственно отнесение люминесценции исследуемых соединений к тому или иному типу: фосфоресценции или флуоресценции. **Во-первых**, используемый в работе спектрофлуориметр не позволяет определять времена жизни менее чем 10^{-6} с, поскольку используемая в приборе импульсная ксеноновая лампа позволяет генерировать импульсы с длительностью 1 мкс, о чем есть соответствующее упоминание на стр. 39 диссертации. Таким образом, времена жизни люминесценции порядка 10^{-9} - 10^{-8} с, характерные для флуоресценции, на данном приборе зарегистрировать невозможно. **Во-вторых**, определение времен жизни люминесценции хинина в 0,01 М H_2SO_4 и лейкоформы индигокармина в 1 М NaOH по «площади под кривыми затухания», приведенными на рис. 8 и рис. 22 (стр. 50 и 75 диссертации) и рис. 3 и рис. 8 (стр. 10 и 16 аннотации) **неверно и недопустимо**. Время жизни люминесценции определяется из экспоненциального закона затухания люминесценции $I_t = I_0 \cdot e^{-t/\tau}$, где I_0 , I_t - интенсивности свечения в моменты прекращения возбуждения люминесценции и времени t соответственно; τ - среднее время жизни возбужденного состояния. Таким образом, время жизни люминесценции будет соответствовать времени, при котором интенсивность свечения снизится в e раз. Неверное использование прибора и неверный подход к определению времени жизни люминесценции приводит к абсурдным заключениям, в частности, к отнесению свечения хинина к фосфоресценции. Хинин в течение многих десятилетий известен как флуоресцентный стандарт. Определен квантовый выход его свечения (0,55) и время жизни люминесценции - 10^{-8} с. Даже если проанализировать кривую затухания свечения хинина, приведенную на рис. 8 диссертации и рис. 3 аннотации, с точки зрения закона затухания люминесценции, то получается, что время жизни составляет $2 \cdot 10^{-6}$ с, но никак не $7,94 \cdot 10^{-4}$ с, поскольку интенсивность свечения хинина имеет минимальное значение при 4 мкс. Аналогичные сомнения вызывает и определение

время жизни свечения лейкоформы индигокармина $10,0 \cdot 10^{-7}$ с. Судя по кривой затухания (рис. 22 диссертации и рис. 8 автореферата), в указанное время наблюдается максимальная интенсивность ее свечения.

2. Не понятно, зачем автор использовал синхронный режим сканирования для определения длины возбуждения люминесценции и люминесценции. На рис. 6 (стр. 43 диссертации), очевидно видны максимумы спектров возбуждения люминесценции и люминесценции хинина, расположенные при 350 и 450 нм, соответственно. Аналогичное замечание относится и к определению максимумов спектров возбуждения люминесценции и люминесценции лейкоформы индигокармина. Из рис. 18 диссертации также достаточно точно можно определить максимумы соответствующих спектров.
3. При определении квантового выхода люминесценции хинина в растворах с различной концентрацией серной кислоты в табл. 2 (стр. 44 диссертации) значения квантового выхода приведены с точностью до третьего знака после запятой, однако в таблице отсутствуют данные о погрешности определения квантового выхода. Приведение погрешности определения квантового выхода могло бы ответить на вопрос об идентичности значений квантового выхода 0,57 и 0,61, а приведенное значение квантового выхода хинина в 0,05 М кислоте, скорее всего, оказалось бы грубой ошибкой или промахом. Аналогичное замечание относится и для определения квантового выхода лейкоформы индигокармина, для которого квантовый выход приведен с пятью знаками после запятой, хотя значащей, наиболее вероятно является третья цифра после запятой. Следует отметить, что для большинства результатов, за редким исключением, не соблюдается правило значащих цифр.
4. Исходя из приведенных значений квантовых выходов возникает вопрос: почему пределы обнаружения хинина и лейкоформы индигокармина отличаются незначительно и составляют 0,0012 мг/л и 0,0033 мг/л, соответственно, при отличии квантовых выходов практически в 300 раз?
5. В табл. 8 (стр. 59 диссертации) и табл. 3 (стр. 13 автореферата) приведены аномально высокие значения относительного стандартного отклонения (S_r). Если значение S_r , как величину, характеризующую воспроизводимость результатов, перевести в проценты, то оказывается, что воспроизводимость флуориметрического определения хинина в напитке «Schweppes Bitter lemon» составляет 75%, а воспроизводимость его определения фотометрическим методом – 211%. Таким образом, на основании этих результатов нельзя заключить, что «...наблюдается хорошая сходимость результатов...»,

как это написано на стр.59 диссертации. Причем приведенные в табл. 8 диссертации значения S_r совершенно не соответствуют приведенному доверительному интервалу. Совершенно непонятно каким образом были рассчитаны значения S_r , приведенные в таблице. Так, для образца безалкогольного напитка, если рассчитать значение среднеквадратичного отклонения из приведенного доверительного интервала для флуориметрической методики, а затем рассчитать значение S_r , то оно равно 0,035, что не совпадает ни по порядку, ни по цифрам приведенному в таблице значению S_r . И это наблюдается для всех исследуемых объектов, приведенных в таблице. Однако, значения S_r определения индигокармина, приведенные в табл. 18 на стр. 84 диссертации и табл. 7 на стр. 20 автореферата, имеют разумную величину и обратный пересчет величины S_r , по крайней мере, для флуориметрического определения индигокармина в витамине «Пиковит», приводит к величине S_r , близкому к значению приведенному в таблице 18, но при условии использования значения t для $n=3$ равного 3,18, а не значения $t=2,78$, приведенного в подписи к таблице.

6. В тексте диссертации встречаются некорректные формулировки, в частности на стр. 60 диссертации приведена фраза «Для установления минимально определяемой концентрации хинина флуориметрическим методом рассчитывали предел обнаружения хинина...». Очевидно, что минимально определяемая концентрация и предел обнаружения – это совершенно разные величины и определяются по-разному.

Заключение

За исключением досадной ошибки, допущенной при определении времени жизни люминесценции, сделанные замечания, не являются принципиальными, особенно в части аналитического применения разработанных методик, и не снижают общей положительной оценки диссертации. Поставленная цель достигнута, а задачи исследования выполнены. В работе представлен достаточный объем экспериментальных данных, интерпретация которых подтверждает обоснованность выводов.

Работа выполнена на достаточно высоком профессиональном уровне, содержит большой экспериментальный материал и проработки научной новизны и практической значимости. На основании выполненных автором исследований решены задачи флуориметрического определения хинина и индигокармина в виде его лейкоформы в пищевых и фармацевтических препаратах.

По объему, актуальности, уровню научных и практических результатов представленная диссертационная работа «Определение хинина и индигокармина в продукции пищевой и фармацевтической промышленности методом флуориметрии» соответствует критериям п.8, п.9, п.10 «Порядка присуждения ученых степеней в Национальном исследовательском Томском политехническом университете», утвержденного приказом ректора №93/од от 06.12.2018 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Николаева Алёна Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

профессор кафедры
композиционных материалов и
физикохимии металлургических процессов
ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный
университет»,
доктор химических наук,
профессор



Лосев Владимир Николаевич

Подпись Лосева В.Н. заверяю
Ученый секретарь
Ученого Совета СФУ



И.И. Морозова

27.02.2020

Тел. раб: (391)206-20-10

e-mail: losevvn@gmail.com

660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, Научно-исследовательский инженерный центр «Кристалл» Сибирского федерального университета.