

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт физики высоких технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
Кафедра общей химии и химической технологии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах для мониторинга пищевых продуктов

УДК 612.111.19:544.663:664

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Чулкова Ирина Васильевна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Эрдман С.В.	К.Х.Н		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницина З.В.	К.Т.Н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Назаренко О.Б.	Д.Т.Н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ОХХТ	Тихонов В.В.	К.Т.Н.		

Томск – 2016 г.

ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ ПО ООП

Код результата	Результат обучения
Профессиональные компетенции	
P1	Применять <i>глубокие</i> естественно-научные, математические и инженерные знания для создания <i>новых</i> материалов
P2	Применять <i>глубокие знания</i> в области современных технологий химического производства для решения <i>междисциплинарных</i> инженерных задач
P3	Ставить и решать <i>инновационные</i> задачи <i>инженерного анализа</i> , связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, <i>проектировать</i> и использовать <i>новое</i> оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на <i>мировом</i> рынке
P5	Проводить теоретические и экспериментальные <i>исследования</i> в области создания <i>новых</i> материалов, современных химических технологий, нанотехнологий
P6	Внедрять, <i>эксплуатировать</i> современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их <i>высокую эффективность</i> , соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды
Универсальные компетенции	
P7	Использовать <i>глубокие знания</i> по <i>проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной</i> инженерной деятельности с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности
P8	<i>Активно</i> владеть <i>иностранным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве <i>члена и руководителя группы</i> , состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность <i>следовать корпоративной культуре</i> организации
P10	Демонстрировать <i>глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>
P11	<i>Самостоятельно учиться</i> и непрерывно <i>повышать квалификацию</i> в течение всего периода профессиональной деятельности

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт физики высоких технологий
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
Кафедра общей химии и химической технологии

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой

(Подпись) _____ (Дата) Тихонов В.В.
(Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4В	Чулковой Ирине Васильевне

Тема работы:

Исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах для мониторинга пищевых продуктов	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	22.01.2016 г., № 283/с

Срок сдачи студентом выполненной работы:	.
--	---

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе <i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i>	Объектом исследования является холестерин, содержащийся в продуктах питания. Для определения использовался вольтамперометрический метод с использованием модификатора поверхности рабочего электрода
---	--

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов <i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i>	1. Обзор литературы 1.1. Физические и химические свойства холестерина 1.2. Биологическое значение холестерина 1.3. Необходимость определения холестерина в продуктах питания 1.4. Методы определения холестерина 1.4.1. Колориметрические методы определения 1.4.2. Применение явления флуоресценции для определения холестерина 1.4.3. Хроматографические методы 1.4.4. Спектрофотометрический метод определения холестерина 1.4.5. Ферментативные методы 1.4.6. Применение вольтамперометрического сенсора для определения холестерина 1.4.7. Метод сухой химии для определения холестерина 1.5. Применение сенсоров для определения холестерина 2. Объект и методы исследования 2.1. Аппаратура, электрохимическая ячейка и электроды, используемые в работе 2.2. Подбор материала рабочего электрода 2.3. Подбор модификатора 2.4. Условия нанесения модификатора 2.5. Условия определения холестерина 2.6. Зависимость концентрации холестерина от аналитического сигнала 2.7. Оценка закономерности окисления холестерина на химически модифицированном электроде 2.8. Спектрофотометрический метод определения холестерина как метод сравнения 2.9. Разработка методики электрохимического определения холестерина в продуктах питания 2.9.1. Пробоподготовка объектов пищевой промышленности 2.9.2. Электрохимические условия определения холестерина 3. Результаты проведенного исследования 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение 5. Социальная ответственность Заключение Список публикаций Список использованных источников
Перечень графического материала <i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i>	

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы (с указанием разделов)	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Криницына Зоя Васильевна, к.х.н., доцент
Социальная ответственность	Назаренко Ольга Брониславовна, д.т.н., профессор
Раздел на иностранном языке	Рыманова Ирина Евгеньевна, старший преподаватель
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
1.4. Методы определения холестерина	

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	
---	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Эрдман С.В.	К.Т.Н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Чулкова Ирина Васильевна		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4В	Чулковой Ирине Васильевне

Институт	ИФВТ	Кафедра	ОХХТ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Себестоимость ресурсов научного исследования составила 19049 рублей, амортизация специального оборудования 130000 рублей, итоговая плановая себестоимость НИ 593389 рублей.
2. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений	Отчисления на социальные нужды 30 %, составили 22543 рубля.

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	1.1. Потенциальные потребители результатов исследования 1.2. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения 1.3. SWOT-анализ 1.4. Оценка готовности проекта к коммерциализации 1.5. Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования
2. Разработка устава научно-технического проекта	2.1. Устав проекта 2.2. Организационная структура проекта 2.3. Ограничения и допущения проекта
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	3.1. Иерархическая структура работ проекта 3.2. Контрольные события проекта 3.3. План проекта 3.4. Бюджет научного исследования 3.5. Организационная структура проекта 3.6. Матрица ответственности 3.7. План управления коммуникациями проекта 3.8. Реестр рисков проекта
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Матрица SWOT
3. График проведения и бюджет НТИ
4. Иерархическая структура работ проекта
5. Проектная организационная структура проекта
6. Потенциальные риски

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына З.В.	К.Х.Н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Чулкова Ирина Васильевна		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4В	Чулковой Ирине Васильевне

Институт	ИФВТ	Кафедра	ОХХТ
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Химическая технология

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<i>Исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах как основа методики для мониторинга пищевых продуктов.</i>
--	---

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Производственная безопасность 1.1. Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению; 1.2. Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (<i>техника безопасности</i>):	1.1. - действие фактора на организм человека; - приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); - предлагаемые средства защиты; (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства). 1.2. - электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, молниезащита – источники, средства защиты); - правила пожарной безопасности в лаборатории (источники, средства защиты).
2. Экологическая безопасность:	- анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); - анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); - анализ воздействия объекта на литосферу (отходы).
3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	- перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; - выбор наиболее типичной ЧС; - разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; - разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.
4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:	- специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; - организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
--	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Назаренко О.Б.	Д.Т.Н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Чулкова Ирина Васильевна		

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 124 с., 24 рис., 32 табл., 39 источников, 1 прил.

Ключевые слова: холестерин, определение, электрохимия, вольтамперометрия, модификатор поверхности электрода, биологически активные вещества.

Объектом исследования является (ются) холестерин, содержащийся в продуктах питания.

Цель работы – исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах как основа методики для мониторинга пищевых продуктов.

В процессе исследования проводились подбор оптимальных вольтамперометрических условий определения холестерина, выявлялись закономерности окисления холестерина на химически модифицированном электроде, проводилось вольтамперометрическое определение холестерина в продуктах питания.

В результате исследования разработана методика вольтамперометрического определения холестерина на химически-модифицированном электроде в продуктах питания.

Основные конструктивные, технологические и технико-эксплуатационные характеристики: вольтамперометрическое определение проводилось на анализаторе универсальном АТ (ООО «ИТМ», Томск, Россия), в качестве рабочего электрода использовался стеклоуглеродный электрод, в качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения использовались хлорид серебряные электроды.

Область применения: контроль качества выпускаемой продукции на предприятиях пищевой промышленности.

В будущем планируется разработка тест-системы для определения холестерина, с целью реализации возможности контроля качества продукции пищевой промышленности как в заводской лаборатории, так и непосредственно потребителем.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

Нормативные ссылки

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

1. ГОСТ 12.1.038 – 82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
2. ГОСТ 12.4.011 – 89 ССБТ. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.
3. СП 60.13330.2012 – Свод правил. Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха.
4. ГН 2.2.5.1313-03 - Гигиенические нормативы. Химические факторы производственной среды. Предельно допустимые концентрации (пдк) вредных веществ в воздухе рабочей зоны.
5. ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

Сокращения

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ХО – холестерин оксидаза

ПХ – пероксидаза хрена

ХЭ – холестерин эстераза

ХС-ЛПВП - липопротеины высокой плотности холестерина

СУЭ – стекло-углеродный электрод

ХСЭ – хлорид серебряный электрод

ХМЭ – химически модифицированный электрод

Оглавление

Введение.....	13
1. Обзор литературы.....	15
1.1. Физические и химические свойства холестерина.....	11
1.2. Биологическое значение холестерина.....	16
1.3. Необходимость определения холестерина в продуктах питания.....	17
1.4. Методы определения холестерина.....	19
1.4.1. Колориметрические методы определения.....	19
1.4.2. Применение явления флуоресценции для определения холестерина.....	20
1.4.3. Хроматографические методы.....	22
1.4.4. Спектрофотометрический метод определения холестерина.....	25
1.4.5. Ферментативные методы.....	27
1.4.6. Применение вольтамперометрического сенсора для определения холестерина.....	30
1.4.7. Метод сухой химии для определения холестерина.....	31
1.5. Применение сенсоров для определения холестерина.....	34
2. Объект и методы исследования.....	39
2.1. Аппаратура, электрохимическая ячейка и электроды, используемые в работе.....	39
2.2. Подбор материала рабочего электрода.....	44
2.3. Подбор модификатора.....	47
2.4. Условия нанесения модификатора.....	48
2.5. Условия определения холестерина.....	49
2.6. Зависимость концентрации холестерина от аналитического сигнала.....	49
2.7. Оценка закономерности окисления холестерина на химически	

модифицированном электроде.....	50
2.8. Спектрофотометрический метод определения холестерина как метод сравнения.....	55
2.9. Разработка методики электрохимического определения холестерина в продуктах питания.....	58
2.9.1. Пробоподготовка объектов пищевой промышленности.....	58
2.9.2. Электрохимические условия определения холестерина.....	59
3. Результаты проведенного исследования.....	61
4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	62
5. Социальная ответственность.....	79
Заключение	93
Список публикаций.....	95
Список использованных источников.....	97
Приложение А.....	102

Введение

Холестерин – жизненно важное соединение в организме человека, которое участвует в синтезе витамина D, различных стероидных гормонов, женских половых гормонов эстрогена и прогестерона, мужского полового гормона тестостерона, играет важную роль в деятельности нервной и иммунной системы, кроме того холестерин участвует в липидном обмене.

Как известно, повышенное содержание холестерина в крови человека может привести к заболеваниям сердечно-сосудистой системы, а именно излишний жир не может полностью транспортироваться липопротеидами высокой плотности и выводиться из организма. Таким образом, холестерин может накапливаться на стенках кровеносных сосудов в виде бляшек, которые затрудняют движение крови, тем самым, делая сосуды более жесткими, что служит причиной развития ишемической болезни сердца, инфаркта или инсульта. По статистике Всемирной Организации Здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире, а именно, в 2008 году от сердечно-сосудистых заболеваний умерло 17,3 миллиона человек, среди которых 7,3 миллиона человек умерло от ишемической болезни сердца и 6,2 миллиона по причине инсульта. По прогнозам ученых к 2030 году около 23,3 миллионов человек могут умереть от ССЗ, в большей степени от сердечных заболеваний и инсульта, которые согласно прогнозам останутся единственной причиной смерти [1,2]. Кроме того, существует генетическое заболевание – Синдром Смита – Лемли – Опитца, обусловленное дефектом метаболизма холестерина и проявляющееся множественными врожденными аномалиями и неврологическими нарушениями. Аномалии кистей и стоп являются одним из ведущих клинических проявлений синдрома [3,4]. Одним из методов предотвращения большинства ССЗ является снижением повышенного уровня липидов. Несмотря на то, что холестерин вырабатывается организмом человека, значительное его количество поступает с пищей. Поэтому, контроль

содержания холестерина в крови человека и продуктах питания очень важен для профилактики и терапии ССЗ.

Определение холестерина хроматографическими, титриметрическими, спектрофотометрическими методами достаточно трудоемкий процесс, вследствие того что требует длительной пробоподготовки.

Применение электрохимических сенсоров упрощает задачу, вследствие способности сенсоров обеспечивать высокую экспрессность, и позволяет упростить процесс пробоподготовки.

Данная научная работа направлена на определение холестерина электрохимическим методом.

Цель работы: определение физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах как основа методики мониторинга пищевых продуктов.

Для достижения данной цели будут решаться следующие задачи:

1. Подбор оптимальных условий определения холестерина
2. Оценка закономерности окисления холестерина на химически модифицированных электродах
3. Разработка методики электрохимического определения холестерина в продуктах питания

1. Обзор литературы

1.1. Физические и химические свойства холестерина

Холестерин – вторичный спирт, мононенасыщенный стерин состава $C_{27}H_{45}OH$, существует в кристаллическом виде, температура плавления которого $149^{\circ}C$. На рисунке 1.1 представлена структурная формула холестерина. Холестерин является составной частью желчных камней, которые могут образовываться в желчных протоках человека.

Холестерин является основным стеринном организмов высших животных, а сопутствующие соединения присутствуют в крайне малых количествах и являются производными холестерина или родственны ему. К примеру, сопутствующее вещество такое, как холестанол, является продуктом гидрирования холестерина.

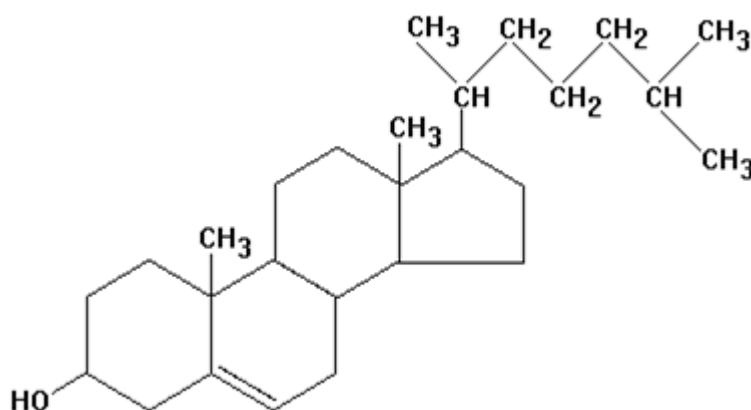


Рисунок 1.1 – Структурная формула холестерина

Несмотря на то, что холестерин получил свое название из-за патологического отложения в желчных протоках, он является составной частью всех нормально развивающихся тканей животных организмов и общее содержание его в организме человека достигает при весе 80-82 кг примерно 240 г. Это соединение частично находится в виде свободного спирта, частично в форме эфира высших жирных кислот [5, 6].

1.2. Биологическое значение холестерина

Холестерин - жизненно-важный компонент человеческого организма, который синтезируется в печени. Также холестерин поступает в организм человека с пищей, по большей части с молочными и мясными продуктами.

Холестерин нерастворим в воде, для перемещения по организму он покрывается белковой оболочкой. Соединение холестерина вместе с белковой оболочкой называется липопротеином. В кровеносной системе человека непрерывно циркулирует несколько видов липопротеинов: липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

Липопротеины высокой плотности по большей части состоят из белковой части и меньшей части холестерина. Именно они переносят излишки холестерина обратно в печень, которые в свою очередь перерабатываются в желчные кислоты. Около 30 % холестерина крови содержится в составе липопротеинов высокой плотности.

Высокие значения содержания липопротеинов высокой плотности свидетельствуют о том, что избыточный холестерин свободно удаляется из организма, тем самым способствует уменьшению риска развития бляшек в сосудах.

Липопротеины низкой плотности являются основным переносчиком холестерина в крови человека. Входящий в их состав холестерин считается «вредным». Липопротеины низкой плотности образуются из липопротеинов очень низкой плотности в процессе липолиза. Содержание высокого уровня ЛПНП в крови человека свидетельствует о риске поражения сердечно-сосудистой системы, приводит к образованию бляшек и их закупорке, и в конечном итоге к инфаркту или инсульту. Контроль содержания липопротеинов в организме человека сокращает риск развития ССЗ, тем самым снижая смертность [7].

Холестерин – предшественник витамина D₃. Как известно, витамин D₃ контролирует обмен кальция в организме человека. Кроме того, недостаток витамина D₃ у детей приводит к такому заболеванию, как рахит, которое характеризуется недостатком минерализации костей. Холестерин под действием света в коже по реакции фотолиза превращается в витамин D₃ (холекальциферол), однако небольшое количество витамина D₃ поступает в организм с пищей [6, 8].

Также данный стерин является основой для синтеза стероидных гормонов коры надпочечников, таких как гидрокортизон и альдостерон, женских и мужских половых гормонов – эстрогенов и андрогенов [9, 10]. Недостаток холестерина в организме женщины может спровоцировать аменорею.

Молоко матери насыщено холестерином. Для полноценного развития нервной системы и мозга, грудным и растущим детям необходимо потреблять богатыми жирами и холестерином продукты.

В печени человека из холестерина синтезируются желчные кислоты, которые необходимы для смешивания и всасывания в тонком кишечнике. Именно на это тратится 60-80 % вырабатываемого ежедневно холестерина в организме человека.

1.3. Необходимость определения холестерина в продуктах питания

Повышенный уровень холестерина в организме человека, а именно выше 5,6 ммоль/л принят в клинической практике терапии ССЗ за пороговую величину, свидетельствующую о необходимости мониторинга здоровья пациента и, вероятно, лечения. Такой уровень может привести к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, инфаркту инсульту и даже смерти. Как известно сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности во всем мире.

Кроме ССЗ существует Синдром Смита – Лемли – Опитца – редкое заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, связанное с нарушением метаболизма холестерина. Данный синдром характеризуется множественными врожденными аномалиями и умственной отсталостью. Симптомы синдрома Смита – Лемли – Опитца могут широко варьировать. При легкой форме заболевания наблюдаются незначительные физические и интеллектуальные нарушения. В тяжелых случаях возможны выраженные физические пороки и перинатальная смертность. Нарушение биосинтеза холестерина приводит к развитию тяжелых форм задержки внутриутробного роста и развития плода – плод не получает от матери необходимый для роста холестерин [9, 10, 11].

В терапии существует два пути снижения уровня холестерина в организме человека: изменение образа жизни пациента в виде повышения физической активности и здорового питания и применение специализированных лекарственных средств (статинов).

Лечение повышенного уровня холестерина длительный и постоянный процесс, при котором человеку нужно соблюдать сбалансированную диету, отказаться от продуктов с высоким содержанием холестерина, а именно, от цельного молока, сливок, плавленых и твердых сыров с содержанием жира больше 30 %, яичного желтка, сливочного масла, свиного жира, сала, твердого маргарина, заменив их на обезжиренное 0,5 - 1 % молоко, нежирные кисломолочные продукты, нежирный сыр, яичный белок, мясо курицы, оливковое, подсолнечное или кукурузное масло [1, 12, 13].

Содержание холестерина в некоторых продуктах питания представлено в таблице 1.1.

Таблица 1.1. – *Содержание холестерина в продуктах питания [14, 15]*

Содержание холестерина в продуктах питания (мг в 100 г продукта)	
Молоко, 2,5 %	15
Кефир	12
Йогурт	12
Масло сливочное	180
Сливки 10 %	34

1.4. Методы определения холестерина

1.4.1. Колориметрические методы определения холестерина

Наиболее изученным классическим колориметрическим методом определения холестерина является метод Либермана-Бурхарда. Данный анализ основан на измерении интенсивности зеленовато-голубой окраски, которая проявляется после обработки холестерина смесью серной кислоты и уксусного ангидрида в соотношении от 20:1 до 5:1. Многие авторы указывают, что реагент разбавляется различными растворителями, в основном, уксусной кислотой и хлороформом. В некоторых работах сообщается, что для приготовления реагента Либермана-Бурхарда смешивают один объем концентрированной серной кислоты с 20 объемами уксусного ангидрида, предварительно охлажденного ниже 10 ° С. Смесью охлаждают в течение 9 мин, затем приливают 10 объемов ледяной уксусной кислоты. С данным реагентом возможно работать в течение часа. Определяемый холестерин растворяют в этом реагенте. Скорость окрашивания и ее устойчивость зависит от температуры. Продолжительность реакции составляет 30-35 мин при 25 ° С [14]. Ганг и др. указывают о получении устойчивого реагента, который пригоден в течение месяца, при хранении его в холодильнике. Данный раствор готовится из 2 %-го раствора сульфата натрия и смеси уксусного ангидрида,

уксусной и серной кислот в соотношении 6:3:1 по объему. Этот реагент до сих пор применяется в клинической практике [15, 17].

Окрашенный исследуемый раствор характеризуется двумя максимумами поглощения при 420 и 620 нм. Чувствительность данного метода не высока, вследствие того, что многие авторы приводят молярный коэффициент поглощения для холестерина лежит в интервале 1800-2000.

По важности из колориметрических методов с методом Либермана-Бурхарда сравним только метод Златкиса-Зака. В качестве реагентов первоначальной методики используется смесь серной и уксусной кислот и хлорида железа (III). Обычно соотношение серной и уксусной кислот в конечной реакционной смеси 40:60 по объему, концентрация железа примерно 10 мг в 100 мл. Моментально возникает красная окраска и максимум поглощения наблюдается при 560 нм. Главное преимущество этого метода заключается в том, что его чувствительность приблизительно в 8 раз выше [16, 17].

Также следует отметить применение реагента Чугаева, в котором хлорид цинка и ацетил хлорид разводятся в уксусной кислоте. В присутствии холестерина и его эфиров раствор приобретает красно-розовую окраску. Максимум поглощения наблюдается при 526 нм. По чувствительности относительно холестерина реагент Чугаева занимает промежуточное положение между упомянутыми выше методами, причем в присутствии эфиров холестерина окраска менее интенсивна [15, 17].

1.4.2. Применение явления флуоресценции для определения холестерина

В предыдущем разделе обсуждался колориметрический метод определения холестерина, в котором холестерин обрабатывался реагентами, содержащими серную кислоту, с образованием окрашенных соединений,

обычно сопровождаемых флуоресценцией, которая становится более чувствительным методом.

Например, Альберт и Лоури превращали холестерин, содержащийся в экстрактах тканей, во флуоресцирующее производное при помощи обработки холестерина реагентом, подобным реагенту Либермана-Бурхарда. А именно, экстракт обрабатывали 6 мкл серной кислоты после растворения в 150 мкл смеси 1,1,2-трихлорэтана и уксусного ангидрида в соотношении 5:1. Холестерина и его эфиры дают очень близкие по интенсивности, очень устойчивые сигналы, если измерение основано на регистрации красной флуоресценции при 546 нм которая возбуждается линией ртутной лампы. Данным методом возможно определение очень небольших количеств холестерина до 1 мкг [17, 18].

Другие авторы, как Маджески и др., приводят флуориметрический вариант реакции Сальковского. Для этого смешивают в равных пропорциях раствор определяемого холестерина и концентрированную серную кислоту в дихлорметане, интенсивно перемешивают и измеряют флуоресценцию сернокислого слоя при 450 нм, используя источник возбуждения с длиной волны 415 нм. Данный метод менее чувствителен, чем предыдущий, тем не менее он пригоден для определения холестерина в 250 мкл сыворотки крови [17].

Применение смеси хлорида железа (III) и серной кислоты, предварительно растворенных в этилацетате позволяет получить чувствительный метод, способный определять 0,1-5 мкг холестерина. Его успешно применяли для определения холестерина в липопротеиновой фракции, полученной электрофорезом [17].

1.4.3. Хроматографические методы

Колоночная хроматография

Колоночная хроматография с фракционированием образца является первой стадией многих методов количественного анализа стерина. Целью этой стадии является либо отделение фракции стерина от других липидов, присутствующих в образце, либо разделение стерина для того, чтобы повысить селективность последующего определения. Многие ученые использовали колонки с силикагелем и флорисилом и градиентное элюирование с помощью растворителей, начиная с углеводов и заканчивая метанолом или смесью уксусной кислоты и диэтилового эфира. Стерины относятся к наименее полярным компонентам липидов.

Для разделения стерина, из адсорбентов чаще всего используют силикагель или (если предполагается провести разделение в соответствии со степенью ненасыщенности) те же адсорбенты, модифицированные нитратом серебра. Значение гель-хроматографии возрастает на сефадексе LH-20 или его оксиалкоксипропилпроизводном (липидексе) [17].

Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии является очень важным методом идентификации стерина, их разделения, а также отделения от других веществ с целью последующего анализа.

Так как стерины являются наименее полярным и наиболее липофильным классом стероидов, их возможно отделять от стероидов других классов и от липидов

При анализе липидов оценку содержания стерина проводят непосредственно в пятнах на тонкослойной хроматограмме [18]. Иногда достаточно полуколичественного визуального сравнения пятен стандарта и

исследуемого образца. Типичным примером количественного метода является методика Виклунда и Элиассона. С помощью которой холестерин и его эфиры отделяют от других липидов методом тонкослойной хроматографии на силикагеле G, а пластинку обрабатывают смесью диэтилового эфира и уксусной кислоты в соотношении 99:1, затем смесью гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты в соотношении 85:15:1. Далее пятна опрыскивают 70 %-ной серной кислотой, насыщенной бихроматом калия, нагревая при 180°С в течение 25 мин. Содержание индивидуальных липидов находят по площадям соответствующих пиков в денситограмме [17].

Другие ученые разделение осуществляли на силикагеле смесью петролейного эфира, диэтилового эфира и уксусной кислоты в соотношении 90:10:1. Обнаруживающим веществом является 10 %-ный раствор молибдофосфорной кислоты в 95 %-ном этаноле, далее хроматограмму холестерина сканируют, измеряя отражение при 750 нм [17].

Газовая хроматография

Газовая хроматография является важным методом количественного анализа стерина, которая основывается на ряде веских причин:

- a) Стерины – даже при повышенных температурах достаточно устойчивы, тем самым их можно хроматографировать как в исходном виде, так и в виде производных;
- b) Разрешающая способность газового хроматографа достаточна для разделения очень близких по структуре стерина;
- c) Чувствительность газовой хроматографии позволяет получить надежные результаты количественных определений стерина так как в большинстве исследуемых образцов обычно содержится достаточное количество стерина;
- d) Перед выполнением данного вида хроматографии не требуется проводить трудоемкие операции разделения и очистки.

Если целью данного метода является количественное определение стерина, то применяют метод внутреннего стандарта.

При анализе многокомпонентных смесей стеролов, процентное содержание отдельных компонентов часто рассчитываются из их площадей пиков по отношению к общей площади пика. Этот способ можно рассматривать только как грубое приближение, так как отклики детектора для индивидуальных стеринов, несмотря на их относительно близкие структуры [17, 19].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ВЭЖХ является менее важным методом. Главный ее недостаток состоит в том, что стерины плохо поглощают УФ излучение, таким образом, стерины возможно обнаружить лишь при длинах волн менее 210 нм. Такое условие является практически невыполнимым для биологических образцов [20]. Данный недостаток устраняется при разделении стеринов в форме бензоатов. В таком случае обнаружение с достаточно высокой чувствительностью можно выполнить при 230 нм [17, 21].

Впервые возможность применения метода ВЭЖХ анализа липидов, показана Картером и др., которые использовали колонки с силикагелем для разделения холестерина и его эфиров из других липидов в сыворотке крови. Был разработан точный, чувствительный, надежный и быстрый метод для определения содержания холестерина с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии. В этом методе были использованы в качестве стационарной фазы пластины с алюминиевым покрытием с обраной стороны и силикагеля 60 F254, и образцы опрыскивали с помощью КАМАГ образца аппликатора Linomat 5. Хроматограмма была разработана с подвижной фазой, состоящей из смеси хлороформ: метанол (9,5: 0,5, об./об.). Образцы были обнаружены с помощью сканера КАМАГ 4 и оценены с помощью метода, разработанного на winCATS программного обеспечения. Денситометрический

анализ холестерина проводили в режиме оптической плотности при 200 нм. В этой системе растворителей, холестерин дал компактное пятно со значением R_f $0,63 \pm 0,03$. Линейный регрессионный анализ данных по калибровочной кривой показал хорошую линейность в диапазоне концентраций от 2 - 7 мкг/пятно с регрессионным значением 0.99933 и стандартным отклонением 1,44%. Было обнаружено, что предел обнаружения и предел количественного определения составляет 100 нг/пятно и 500 нг/пятно, соответственно. С помощью разработанного метода, определена концентрация холестерина в омыленном и неомыляемом образце яичного желтка. Этот метод воспроизводим и даже может быть использован для образцов, содержащих комплексные матрицы [22].

1.4.4. Спектрофотометрический метод определения холестерина

В 70-х годах XX в. были разработаны чувствительные и простые методы для быстрого определения холестерина в биологических жидкостях. Чувствительность таких методов была увеличена за счет применения флуориметрии. Как правило, в таких методиках применяли реакцию Либермана-Бурхарда. Спектрофотометрическое определение холестерина по реакции Златкиса с хлоридом железа представлялось более простым методом, благодаря простоте исполнения качественной реакции [23]. В предлагаемом методе, более простой метод хлорного железа был сделан высокочувствительным, путем использования явления флуориметрии. Всего лишь 100 мкл спинномозговой жидкости, содержащие менее 1 г холестерина, может быть использовано, и реакционная смесь стабильна в течение 1 часа. Вмешательство было незначительным из пигментов (например, билирубина и гемоглобина), некоторых лекарственных препаратов и ионных веществ, которые можно было бы ожидать, чтобы повлиять на флуоресценцию. Кроме того, мешающее влияние пигментов (например, билирубина и гемоглобина), некоторых лекарств, и ионных веществ является незначительным [23, 25].

Флуориметрические методы, как правило, более чувствительны, чем спектрофотометрические методы. Однако долгое время существующие флуориметрические методы для определения холестерина были основаны на применении реакции Либермана-Бурхарда. Также широко применялась реакция Чугаева.

Реакция кислого хлорида железа Златкиса-Зака была выбрана в качестве чувствительного спектрофотометрического метода для определения холестерина, и не была исследована для флуориметрического определения холестерина [24].

Спектрофотометрическое определение холестерина проводилось по реакции Златкиса-Зака путем окисления холестерина хлорным железом в концентрированной уксусной и серной кислотах. Вследствие чего раствор приобретал красно-фиолетовый цвет. Данный метод может с успехом применяться в исследовании не только спинномозговая жидкость и сыворотка крови, но и продуктов питания.

Важной стадией в данном методе является этап пробоподготовки. В тест-пробирку к 1 мл изопропанола добавляется 100 мкл спинномозговой жидкости/сыворотки крови. Выделение холестерина обеспечивается устройством смешивания Vortex. Стандарты холестерина, приготавливаются таким же образом. Приготавливаются с содержанием 0,25, 0,50, 0,75 и 1 мг / 100 мл изопропанола. Также подготавливается «чистая» проба, которая содержит дистиллированную воду вместо образца. После 10 мин выдержки, извлеченную смесь центрифугируют, чтобы отделить осажденный белок. Всю надосадочную жидкость декантируют с 4 мл предварительно смешанного реагента кислого хлорида железа в центрифужные пробирки на 15 мл с притертой пробкой. Чтобы тщательно перемешать два слоя, пробирку закупоривают и тщательно и быстро встряхивают вручную. Определение осуществляется после 30 минут выдержки образцов. Калибровочная кривая холестерина используется для вычисления результатов [23].

1.4.5. Ферментативные методы

Впервые статьи по ферментативным методам были опубликованы в 1973 и 1974 году. В них было изложено об определении сывороточного холестерина, включающих ферментативное окисление холестерина и колориметрическое определение образующегося пероксида водорода [17, 24]. Этот метод быстро приобрел популярность и был опубликован во многих работах.

Данный метод характеризуется тем, что холестерин определяется косвенно по содержанию пероксида водорода, который с аналитической точки зрения является более простым соединением, чем холестерин.

Ни колориметрический, ни электроаналитические версии метода не требуют агрессивных реагентов, как это часто бывает в химических методах.

Данный метод очень чувствителен и основан на реакции (рис. 1.2):

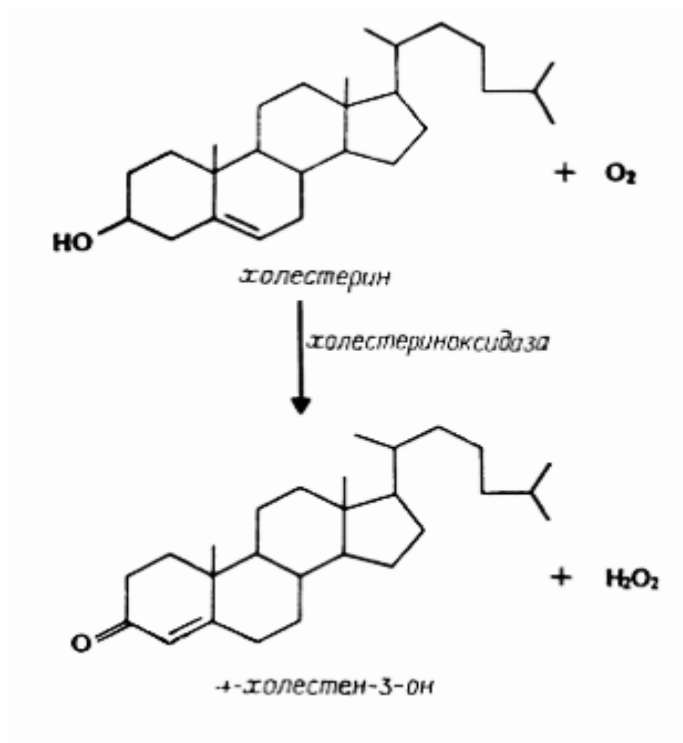
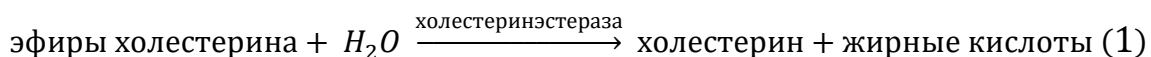


Рисунок 1.2 – Реакция ферментативного окисления холестерина

Если выполнение анализа начинают с ферментативного окисления, определить можно только общий холестерин. Количественное определение данной группы методов всегда основано на образовании пероксида водорода.

Многие исследователи основываются на реакции:



Колориметрический ферментативный метод основан на автоокислении холестерина, катализируемом холестериноксидазой. Образующийся пероксид водорода реагирует с метанолом в присутствии каталазы с образованием формальдегида, который затем подвергается циклизации с ацетилацетоном и аммиаком [17].

Для определения общего содержания холестерина, перед проведением анализа необходимо провести гидролиз эфиров холестерина.

Примером является методика Ноббса, в котором применяемый реагент содержит 550 мМ фосфатного буфера со значением рН 7,0, 1,6 мМ метанола, 19 мМ ацетилацетона, $6,4 \cdot 10^5$ МЕ каталазы, 130 МЕ холестеринэстеразы, 80 МЕ холестериноксидазы и 0,1 % оксиполиэтоксидодекана. Из смеси 0,1 мл плазмы и 0,2 мл воды отбирают 20 мкл пробы и вводят в реакцию с 500 мкл этого реагента при 37° С. Содержание холестерина рассчитывают по изменению поглощения при 405 нм в течение первых 7 мин после начала реакции [17].

Также в методиках описано, что пероксид водорода в присутствии пероксидазы окисляет гомованилиновую и п-оксифенилуксусную кислоту соответственно с образованием флуоресцирующих соединений [17].

Ферментативные электрохимические методы определения холестерина также основываются на рисунке (1) и реакции (2), в которых изменяют количество пероксида водорода, либо изменение парциального давления кислорода.

Впервые данный метод был использован в 1975 году. В этом методе образующийся пероксид водорода обрабатывали иодид ионами с применением молибденового катализатора. Уменьшение концентрации иодид-иона измеренное с помощью иодид-селективного мембранного электрода, пропорционально концентрации пероксида водорода, и следовательно,

холестерина. Калибровочный график линейный, откалиброван до концентрации холестерина примерно 5 г/л. Данные измерения можно автоматизировать при помощи автоанализатора, что делает его пригодным для серийных клинических анализов [22].

Другая методика определения холестерина основана на измерении расхода кислорода в процессе реакции. Подобные измерения проводятся амперометрически при помощи кислородного электрода.

Таким способом определена концентрация кислорода при помощи электрода Кларка – мембранного электрода, состоящего из поляризуемого при -0,6 В платинового катода и Ag/AgCl-электрода сравнения. Ячейку заполняли водным раствором хлорида калия ($\text{pH} > 7$) и отделяют проницаемой для кислорода мембраной. При восстановлении кислорода на катоде за счет последнего происходит изменение тока пропорционально изменению парциального давления/концентрации кислорода.

Другой вариант аналитического ферментативного метода определения холестерина основан на амперометрическом определении пероксида водорода, образующегося по реакции ферментативного окисления. Таким методом был определен холестерин на «холестериновом электроде» с иммобилизированным ферментом. На платиновом электроде при +0,6 В восстанавливается пероксид водорода относительно каломельного электрода. Холестериноксидазу одну или вместе с холестеринэстеразой иммобилизируют на поверхности вращающейся пористой ячейке из стекла, содержащего остатки акриламина, модифицированные глутаровым альдегидом [25]. Перемешивание осуществлялось с помощью магнитной мешалки [17].

Для определения холестерина можно использовать как кинетический метод, так и метод, основанный на измерении изменения общего тока. Устойчивый ток достигается после добавления сыворотки (15 мкл) в течение 10 мин. Для определения содержания общего и свободного холестерина, мешалка должна содержать только в иммобилизованном виде только холестериноксидазу, а в раствор ячейки добавляется холестеринэстераза.

Достоинством и преимуществом метода является то, что ферменты в таком виде очень устойчивы, и могут храниться в течение 1-2 месяцев в холодильнике и с одним образцом фермента можно выполнить большое количество анализов. Особенно это важно для клинической практики, так как данный метод позволяет проводить относительно дешевые анализы [17]. Однако, не смотря на свою дешевизну и высокую селективность, ферменты отличает низкая стабильность, и как следствие, сильная зависимость от внешних условий. Поэтому развитие методов анализа в области холестерина не остановилось на описанных методах.

1.4.6. Применение вольтамперометрического сенсора для определения холестерина

Благодаря простоте, скорости и стоимости, ферментативные процедуры постепенно заменили химические методы, основанные на классических реакциях формирования окрашенных комплексов. Но, тем не менее, прямые ферментативные методы имеют некоторые недостатки, например, неточность, вызванные условиями хранения реагентов. В то же время электрохимические сенсоры предполагают несколько отличных преимуществ. Эти устройства характеризуются небольшим размером, экономичностью, малым объемом и показывают большие перспективы для широкого спектра медико-биологических и экологических применений [25].

Электрохимические методы, основанные на использовании холестерин оксидазы (ХО) кажутся очень привлекательными для определения холестерина из-за низкой стоимости и, кроме того, отсутствия процедур подготовки проб. Некоторые биосенсоры основаны на обнаружении электроокисления перекиси водорода, которую получают каталитической реакцией окисления холестерина в присутствии ХО [26]. Как правило, такие датчики требуют высокий анодный потенциал. Это может стать началом одновременного окисления в образцах других электроактивных аналитов, например, мочевой кислоты, аскорбиновой

кислоты, а также дать ложные положительные сигналы. Именно поэтому, широко используется ферментативный биосенсор второго поколения, основанный на использовании переносчика электронов. В основном, такие датчики основаны на изучении амперометрического сигнала.

В последние годы часть исследований, посвященных конструированию электрохимических биосенсоров (в том числе и на холестерин) применяют в качестве основы прямого переноса электронов между ХО и поверхностью электродов. Тем не менее, есть некоторые трудности, которые могут ограничивать аналитическую эффективность таких датчиков. Вольтамперометрия, в качестве аналитического метода, обеспечивает большую точность, чем амперометрический метод. Именно поэтому, в работе [27] исследована вольтамперометрия на основе ХО датчика с использованием пероксидазы хрена (ПХ) в качестве вспомогательного агента нанесенного на пористый графит.

1.4.7. Метод сухой химии для определения холестерина

В настоящее время, холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛПВП) является фактором, который предотвращает развитие атеросклероза. Его концентрация измеряется с помощью лабораторных анализаторов, с применением стадии предварительной подготовки. Поскольку ХС-ЛПВП измеряются с помощью стадии предварительной подготовки во многих клинических тестах, развитие клинической диагностики требует разработки прямых методов анализа.

Ранее активное развитие «сухой химии» подтолкнуло разработку методик, основанных на параллельном выделении реагента с применением поверхностно активных веществ. Также были разработаны соответствующие анализаторы [28].

Разработанная авторами [28] методика анализа характеризуется высокой точностью, широким диапазоном линейности зависимости сигнала от

концентрации аналита и хорошую сходимость результатов, полученных с использованием метода сравнения. При изучении мешающих влияний сигнал, как правило, ниже, в присутствии высоких концентраций гемоглобина, а также конъюгированного или не конъюгированного билирубина. Введение аскорбиновой кислоты (концентрации до 20 мг/дл) и формамина (до 2100) с целью повышения мутности, серьезного влияния на отклик системы не выявлено.

Данный метод сухой химии с использованием только поверхностно-активных веществ для специфичности в прямом методе HDL-C был принят полезным для пункта оказания медицинской помощи приборов с точки зрения компактности оборудования, простоты эксплуатации и быстрого определения.

Измерение липопротеинов высокой плотности холестерина (ХС-ЛПВП) обеспечивает хороший показатель для ишемической болезни сердца и атеросклероза. Еще несколько лет назад, это было обычной практикой для измерения ХС-ЛПВП после того, как сыворотка или плазма была предварительно обработана как полианионом, так и фосфорно-вольфрамовой кислотой, сульфатом декстрана или гепарином, и ионом двухвалентного металла. В последнее время, однако, эта практика направлена на проведение анализов без стадии предварительной подготовки. Прямой анализ ХС-ЛПВП эффективен в снижении стадии подготовки образцов и сокращает время анализа. Большое количество наборов реагентов в настоящее время доступны для больших автоматизированных анализаторов.

Хотя автоматизация лаборатории в последнее время является тенденцией, которая имеет некоторые недостатки, в том числе необходимость высоких капиталовложений для оборудования и что это не может быть использовано для тестирования в пункте оказания медицинской помощи. Кроме того, липидные тестовые образцы могут подвергаться денатурации во время взятия пробы, транспортировки и хранения [28]. В попытке преодолеть эти недостатки, был разработан новый простой анализ для тестирования в пункте

оказания медицинской помощи с акцентом на испытательную скорость и простоту.

Сухой химический реагент анализа ХС-ЛПВП разработан для совмещения с SPOTCHEM EZ; SP-4430 анализатором. Реакция основана на комбинации двух видов поверхностно-активных веществ для селективной реакции с ХС-ЛПВП. Это показано на примере, поверхностно-активных веществ 1 и 2. Этот прямой реагент для анализа поставляется в виде полосы, а часть реагента полоски содержит многослойную структуру, включающую удерживающий слой образца, слой реагента и опору. Как только образец помещают сверху на образец удерживающего слоя, реакцию инициируют с растворением компонентов в образце удерживающего слоя и слоя реагента. Таким образом, полученное окрашенное вещество растекается по слою и измеряется коэффициент отражения верхнего слоя. Эта полоса состоит из слоя образца реагента и слоя реагента, включающего реактивные компоненты. Верхняя часть удерживающего слоя содержит поверхностно-активное вещество 1, которое не растворяет липопротеиды. С другой стороны, нижняя часть слоя удерживающего образец, содержит поверхностно-активное вещество 2, растворяет только специфические липопротеиды высокой плотности. В результате, поверхностно-активное вещество 2 способствует реакции холестерина ЛПВП с холестерин эстеразой (ХЭ) и холестерин оксидазой (ХО). Ни одни липопротеиды кроме ЛПВП не участвуют в ферментативной реакции. Ферменты и красители, необходимы для реакции, содержатся в нижней части слоя удерживающего образец и слоя реагента. Холестерин в пределах ЛПВП приводят к цветопередаче реакции ХЭ, ХО, пероксидазы (ПХ) в слое реагента и хромогена, а проявляющийся цвет измеряется с помощью метода отражательной способности. Таким образом, настоящий способ может быть описан как одноступенчатая реакция, не требующая предварительной подготовки, в отличие от большинства доступных реагентов в промышленном масштабе. Это сокращает время реакции до 5 мин. Калибровка может быть

выполнена путем вставки магнитной карты хранения информации в эту систему [28].

1.5. Применение сенсоров для определения холестерина

Проведение большинства анализов на определение холестерина требует достаточно большого числа различной посуды и аппаратуры, что усложняет анализ и делает его достаточно дорогостоящим. Одним из путей решения описанных проблем может послужить использованию сенсоров.

Сенсор – устройство, состоящее из селективного слоя датчика, который дает отклик на присутствие компонента и содержания и физического преобразователя - трансдюсера. Трансдюсер преобразует энергию реакции с определяемым компонентом в электрохимический или световой сигнал, измеряемые при помощи чувствительного устройства [29].

В биосенсорах в качестве активного слоя могут выступать: целые организмы, ткани, клетки, органеллы, мембраны клеток, ферменты, рецепторы, антитела, нуклеиновые кислоты [30]. Также в сенсорах в качестве активного слоя могут выступать различные модификаторы поверхности электрода (например, наночастицы золота или серебра, берлинская лазурь, метиленовый синий, малахитовый зеленый) [31, 32].

Виды преобразователей: потенциометрические, амперометрические, кондуктометрические, акустические, тепловые, оптические.

Сенсоры должны отвечать ряду требований:

- возможность прямого определения аналита в объекте без предварительной подготовки;
- возможность непрерывного мониторинга;
- возможность миниатюризации;
- низкая стоимость в случае массового производства.

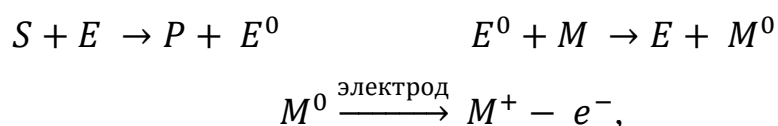
Известно, что электрохимические методы основаны на определении ряда величин, таких как сила тока, потенциал, концентрация вещества и время.

Как правило, электрохимическая ячейка состоит из: электролита в виде раствора или расплава, электрода сравнения и рабочего электрода. Также широкое применение в практике нашли трех электродные ячейки, состоящие из: электролита, электрода сравнения, вспомогательного и рабочего электрода. Такая конструкция ячейки, позволяет значительно стабилизировать сигнал в большинстве электрохимических систем.

Сенсоры первого поколения основаны на непосредственном детектировании продукта реакции, подающей анализируемый сигнал, который дает прямую информацию о составе среды или раствора [31, 32].

Сенсоры второго поколения основаны на применении медиаторов на поверхности электрода. Медиатор должен быть электрохимически активным на электроде, а также, должен быть специфическим субстратом фермента. Медиаторный механизм транспортировки электронов достаточно широко используется для проведения электрохимических ферментативных реакций [33, 34, 35].

Перенос электронов протекает при помощи диффузионно-подвижного промежуточного переносчика электронов – медиатора. Схеме процесса можно представить в виде



где E и E⁰ – окисленная и восстановленная формы активного центра фермента; M и M⁰ – окисленная и восстановленная формы медиатора. Наглядно схема представлена на рисунке 1.3 [29] .

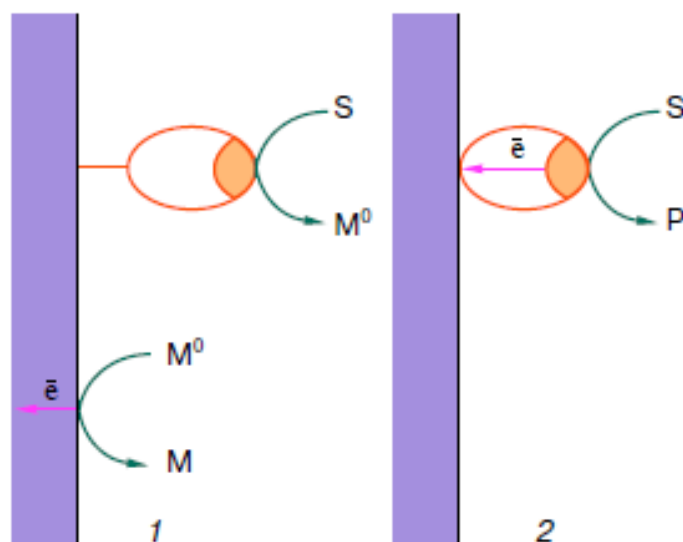


Рисунок 1.3 – Механизмы переноса электрона между активным центром фермента и электродом: 1- медиаторный перенос; 2 – прямой перенос.

По данному механизму происходит прямой электрокаталитический перенос электронов между электродом и активным центром фермента.

Сенсоры третьего поколения основаны также на ферментативной реакции, однако, фермент выступает в роли истинного электрокатализатора прямого переноса электронов. На этом основано явление биоэлектрокатализа.

Биоэлектрокатализ – это ускорение электрохимических реакций биологического катализа. В общих чертах участие ферментов в прямом биоэлектрокатализе представлено на схеме 1. Очевидно, что перенос электронов к/от электрода может быть осуществлен исключительно ферментами, катализирующими окислительно-восстановительными реакциями, так называемыми оксидо-редуктазами.

Окислительно-восстановительные реакции можно разделить на следующие группы: окисление и восстановление. Соответственно, основная задача биоэлектрокатализа может быть сформулирована как замещение одной из этих парных реакций электрохимической реакцией. Прямой биоэлектрокатализ предполагает полное отсутствие в системе медиаторов электронного переноса. Точнее, в прямом электрокатализе соответствующая зависимость ток-потенциал определяется динамикой соответствующей

катализируемой реакции, а не за счет окислительно-восстановительной активности медиатора.

Ряд ферментов, действующих по механизму пинг-понга, используют один и тот же активный центр, как для катализа, так и для переноса электронов. Как уже упоминалось, прямой биоэлектродокатализ был впервые зафиксирован для лактазы – медьсодержащей оксидазы. Активный центр этого фермента содержит четыре атома меди трех типов. Также показана возможность прямой электрохимии для нитрит-редуктаз [29, 30, 33].

Помимо меди, наличие других ионов металлов в активных центрах может указывать на возможность применения данного фермента для прямого биоэлектродокатализа. Возможность прямой электрохимии, а затем и прямого биоэлектродокатализа, также доказано для цинка и меди, содержащихся в супероксиддисмутазе. Другие простетические группы способны напрямую взаимодействовать с гемом электрода. Впервые это было показано на примере обратимой электрохимии гемма, содержащегося в цитохроме С, как часть работ по биоэлектродокатализу пероксидаз. Пероксидазы – семейство ферментов, катализирующих восстановление перекиси, содержащие одну простетическую группу, связанную и с субстратом, и с медиатором. Помимо формирования активного центра фермента, гемм может также способствовать взаимодействию с медиатором и, таким образом, с электродом. Это, видимо, впервые было показано на примере флавогемопротеина дегидрогеназы фруктозы. Установлено, что в хиногемопротеине алкогольдегидрогеназы гемм встроен в медиатор для прямого биоэлектродокатализа. Фермент дегидрогеназа целлобиозы гемм домен, связанный с флавиновым доменом. Показана возможность взаимодействия геммовых доменов с графитовыми электродами, что позволяет с успехом использовать прямой биоэлектродокатализ. Кроме того, наличие гемма послужило основанием применения для биоэлектродокатализа другого фермента: сульфит оксидазы [32].

Одним из первых изученных ферментов, в которых транспорт электронов отделен от активного центра, были гидрогеназы. Первые

простетические группы, обнаруженные кластеры железо-сера. Дальнейшие исследования показали, что активный центр для связывания молекулярного водорода отделен от кластеров железо-сера и представляет собой либо кластеры железо-железо, либо кластеры железо-никель. В то же время кластеры железо-сера (как правило, $4\text{Fe} - 4\text{S}$) задействованы в электронном переносе через молекулу белка. Дистальный кластер железо-сера способен вступать в реакцию с различными окислительно-восстановительными медиаторами и таким образом весь фермент в целом способен к прямому биоэлектрокатализу [31, 36]. Также простетической группой, способной взаимодействовать с электродными поверхностями, как предполагается, может быть пиррохинолин хинон (ПХХ). Однако большинство ПХХ – содержащих дегидрогеназ участвуют в прямом биоэлектрокатализе, что позволяет говорить о наличии также и гемма. Действительно, упомянутые фруктоза и алкогольдегидрогеназа принято обозначать, как фоавогемопротейн и хиногемопротейн (см. выше). Последние работы в области изучения ПХХ-содержащей глюкозидегидрогеназы указывают на наличие соответствующего домена, содержащего гем. Следовательно, невозможно сделать вывод относительно ПХХ в качестве концевой группы для непосредственного биоэлектрокатализа [30].

2. Объект и методы исследования

Объектом исследования данной работы является холестерин - важное соединение в организме человека, избыток которого может стать причиной развития ССЗ. Холестерин синтезируется как самим организмом, так и поступает в организм с пищей. Поэтому основной целью данной работы является разработка методики определения холестерина в пищевых продуктах. В качестве стандарта в работе использовался лиофилизированный порошок холестерина, полученного из овечьей шерсти (о.с.ч., производства Sigma Aldrich, США).

Для достижения поставленной цели в работе использовался электрохимический метод определения холестерина и спектрофотометрический метод как метод сравнения.

2.1. Аппаратура, электрохимическая ячейка и электроды, используемые в работе.

Экспериментальные исследования в данной работе проводились на вольтамперометрическом анализаторе универсальном АТ (ООО «ИТМ», Томск, Россия) и анализаторе электрохимическом ТА-Lab (ООО «Томьаналит», Томск, Россия).

Анализатор АТ предназначен для определения содержания различных веществ методом вольтамперометрии в пробах природных и техногенных объектов, лекарственных препаратов, биологических объектов, пищевых продуктов, напитков и т.п. Работает в простом режиме с постоянно-токовой формой развертки поляризующего напряжения. Особенности анализатора: одна электрохимическая ячейка с возможностью работы в трехэлектродном режиме, перемешивание раствора путем стабилизированной вибрации индикаторного электрода; электрохимический способ нанесения модификатора на подложку индикаторного электрода; надежное и удобное крепление электродов,

исключающее контакт оператора с рабочей поверхностью электрода программный способ реализации анализа. Анализатор работает в комплексе с персональным компьютером, операционная система MS Windows XP/2007. Наиболее важные технические характеристики анализатора: диапазон поляризующего напряжения от 0.0 до -1.0 В, диапазон измеряемого тока от 0 до 3.0 мА, воспроизводимость аналитических сигналов 10-15 %; продолжительность анализа проб 30 мин.

Вольтамперометрический анализатор TA-Lab

Анализатор вольтамперометрический TA-Lab предназначен для высокочувствительных измерений содержания токсичных примесей в питьевых, природных, сточных водах, водных растворах проб почв, пищевых продуктов, продовольственного сырья, биологических объектов и других материалов вольтамперометрическими методами. Анализатор TA-Lab ориентирован на удобство проведения измерений в рутинном анализе с применением малого количества реактивов.

Подготовка и проверка работы соответствующего вольтамперометрического анализатора, совмещенного с персональным компьютером производилась в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

рН растворов контролировался при помощи лабораторного рН-метра-150М (Россия), предназначенного для оперативного определения активности ионов водорода рН, окислительно-восстановительного потенциала E_p и температуры технологических растворов природных и сточных вод. рН-метр-150М комплектуется электродом ЭСКЛ-08М и автоматическим термокомпенсатором ТКА-8М. Электрод ЭСКЛ-08М, является лабораторным комбинированным стеклянным электродом общего назначения со встроенным одноключевым электродом сравнения.

Взвешивание точной навески вещества проводилось на лабораторных аналитических весах общего назначения ВЛ-210 «Госметр» (Россия) с погрешностью взвешивания ± 0.0002 г.

Установка водоподготовки «Аквадистиллятор ДЭ-4» использовалась для получения дистиллированной воды.

В качестве электрохимической ячейки использовались стаканчики из стекла вместимостью 20 см^3 , устанавливаемые на платформу анализатора в специализированное отверстие.

В работе использовалась мерная лабораторная стеклянная посуда: колбы наливные вместимостью 25.0, 50.0, 100.0 и 1000.0 см^3 ; цилиндры вместимостью 5.0 и 10.0 см^3 .

Добавки исследуемых веществ делали при помощи мерных лабораторных стеклянных пипеток вместимостью 1.0, 2.0, 5.0 и 10.0 см^3 , а также дозаторов типа «Ленпипет» (Колор 20-200 мкл; Termoscientific 1-10 мкл), с дискретностью установки доз от 1.0 мкл и погрешностью не более 5 % отн. Для каждого раствора какого-либо вещества использовали отдельную пипетку или сменный наконечник дозатора.

Электрохимическая ячейка и электроды

В работе для проведения экспериментальных исследований использовалась электрохимическая ячейка, представляющая из себя сменный стеклянный стаканчик объемом 20 см^3 , устанавливаемый на платформу анализатора в специализированное отверстие; индикаторный электрод, электрод сравнения и вспомогательный электрод.

Схема экспериментальной установки представлена на рис. 2.1.1.

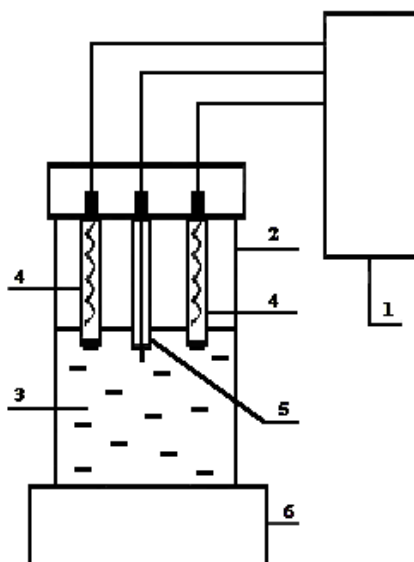


Рис. 2.1.1. Схема экспериментальной установки:

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Анализатор универсальный АТ; | 2. Электрохимическая ячейка; |
| 3. Электролит; | 4. Хлорид серебряный электрод (ХСЭ); |
| 5. Индикаторный электрод; | 6. Платформа. |

В качестве рабочего в данной работе использовался стеклоуглеродный электрод. Стеклоуглеродный электрод (СУЭ) представляет собой пластинку стеклографита, диаметром 2 мм, впаянную с медным контактным проводником в стеклянную трубочку. Площадь рабочей поверхности электрода $S = 0.075 \text{ см}^2$. Поверхность электрода перед работой шлифовалась на фильтровальной бумаге, электрод выдерживался $2 \div 5$ мин в этиловом спирте для удаления поверхностно-активных органических веществ (ПАОВ). СУЭ хранился в спиртовом растворе.

В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода в работе использовались хлорид серебряные электроды (ХСЭ). Хлорид серебряный электрод представлял собой полый цилиндр, заполненный насыщенным раствором хлорида калия KCl, в который опущена серебряная проволока, покрытая труднорастворимой солью хлорида серебра. Вновь приготовленный ХСЭ выдерживался не менее 2 часов в насыщенном растворе KCl для установления равновесного значения потенциала. Готовый ХСЭ хранился в насыщенном растворе KCl и перед работой ополаскивался дистиллированной водой.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis (производства Agilent Technologies, США), подключенном к персональному компьютеру. Данное оборудование позволяет производить измерения в спектральном диапазоне от 190 до 1100 нм, максимальная скорость сканирования составляет 24000 нм/мин. Воспроизводимость длины волны составляет $\pm 0,1$ нм, точность установки длины волны равна $\pm 0,5$ нм. Фотометрический диапазон составляет 3,3 А. Данное оборудование предназначено как для выполнения рутинного анализа, так и для исследовательских задач.

Контроль pH осуществлялся лабораторный pH-метр-150М (производства РУП «Гомельский завод измерительных приборов», Республика Беларусь), предназначенный для определения активности ионов водорода pH. pH-метр-106М контролируется электродом ЭСКЛ-08М и автоматическим термокомпенсатором ТКА-8М. Электрод ЭСКЛ-08М представляет собой лабораторный комбинированный стеклянный электрод общего назначения со встроенным одноключевым электродом сравнения.

Приготовление фоновых и исследуемых растворов

Работа с малыми концентрациями накладывает высокие требования на чистоту растворов и реактивов.

Для приготовления водных фоновых растворов с заданным значением pH использовался набор стандарт-титров для pH-метрии для приготовления образцовых буферных растворов 2-го и 3-го разрядов. Все фоновые растворы готовились растворением содержимого ампулы дистиллированной водой в колбе на 1000.0 см³.

Буферные растворы Бриттона-Робинсона готовились путем смешения 0,04 М растворов фосфорной, уксусной и борной кислот с 0,2 М NaOH в разных концентрациях. Интервал pH от 3 до 11.

Растворы исследуемого вещества готовились растворением навесок холестерина (Sigma Aldrich, Германия, чистота – 99,9% и Carl Roth, Германия,

чистота – 95%), взвешенных с погрешностью не более 0.0002 г, в подходящем растворителе. Поскольку холестерин гидрофобен, в качестве растворителя применяли Triton X-100 (Sigma Aldrich, Германия, чистота – 99,9% и Carl Roth, Германия, чистота – 95%). Также поскольку изопропанол способен к селективной экстракции холестерина из биообъектов, в качестве растворителя применялась смесь Triton X-100 и изопропанола (Sigma Aldrich, Германия, чистота 95%) в соотношении 1:1. Более низкие концентрации получались последовательным разбавлением этих растворов. Все используемые растворы хранились в пластиковых эппендорфах при температуре 4 °C, в защищенном от солнечного света месте.

2.2. Подбор материала рабочего электрода

В данной работе исследовалась возможность применения материалов рабочего электрода: стеклоуглеродного (СУЭ), графитового, композитного углеродсодержащего электрода с обновляемой поверхностью и их влияние на аналитический сигнал. Также в работе рассматривалась возможность применения платинового электрода, модифицированного фталцианином кобальта. Однако получить устойчивый воспроизводимый сигнал в данном случае не удалось.

Для сравнения брался графитовый пористый электрод, который, как предполагалось, за счет пор (и, как следствие, более развитой поверхности) должен адсорбировать модификатор эффективнее стеклоуглерода.

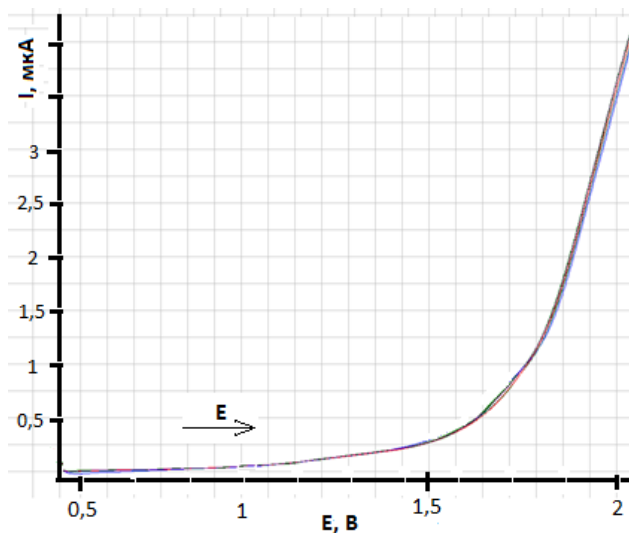


Рисунок 2.2 – Вольтамперограмма электроокисления холестерина на модифицированном графитовом электроде: 1 – фоновый электролит, 2 – в присутствии 5 мкмоль/дм³ холестерина, 3 – в присутствии 10 мкмоль/дм³ холестерина

Показано, что при электрохимическом нанесении модификатора на графитовый электрод не наблюдается пик электроокисления холестерина (рисунок 2.2), в то время как на стеклоуглероде пик наблюдается (рисунок 2.3). В связи с чем в качестве рабочего электрода в данной работе применялся СУЭ.

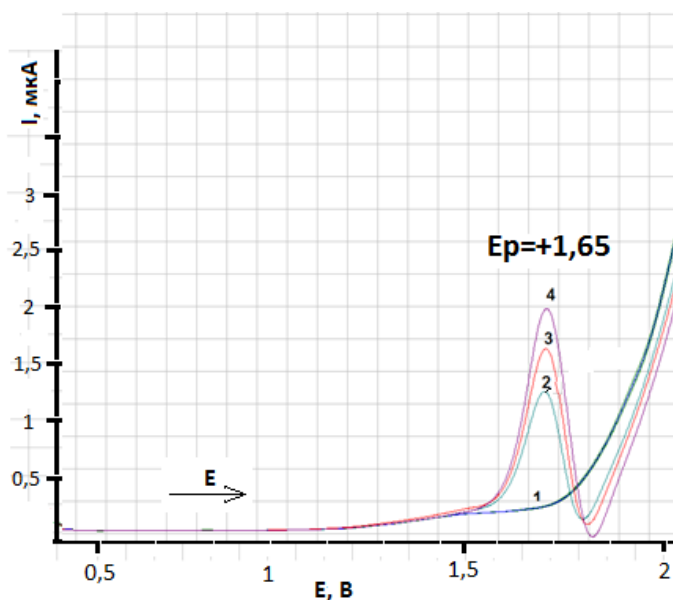


Рисунок 2.3 - Вольтамперограмма электроокисления холестерина на модифицированном стеклоуглеродном электроде: без холестерина (1), с 5 мкмоль/дм³ холестерина (2), с 10 мкмоль/дм³ холестерина (3), с 15 мкмоль/дм³ холестерина (4)

Помимо этого, в работе проводилось исследование возможности применения композитных углеродсодержащих электродов с обновляемой поверхностью. Данные электроды производства ООО «Томьяналит» состоят из чистого пиролитического графита, смешанного с полиэтиленом высокого давления и запрессованного в пластиковый корпус. Для обновления поверхности использовался специальный резак. Возможность обновления поверхности позволяет снизить влияние адсорбционных явлений на процесс. Тем не менее, при каждом срезании мы формируем совершенно новую электродную поверхность, что оказывает негативное влияние на воспроизводимость аналитического сигнала. Вольтамперограмма с использованием модифицированного композитного электрода представлена на рисунке 2.4.

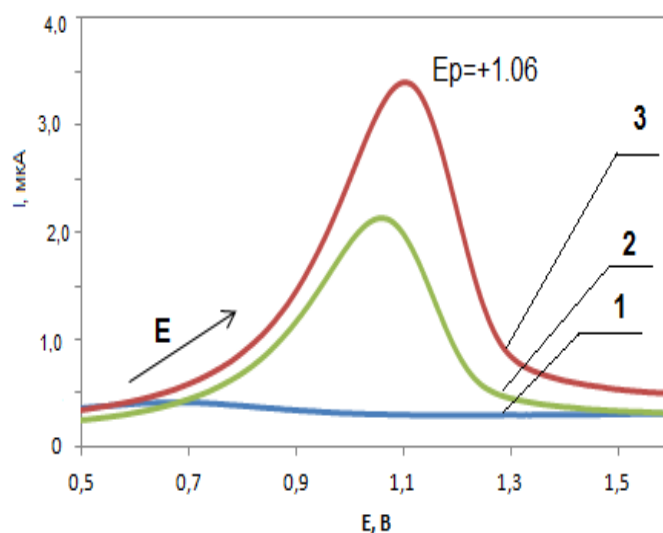


Рисунок 2.4 - Вольтамперограмма электроокисления холестерина на модифицированном композитном электроде: 1 – фоновый электролит, 2 – в присутствии 5 мкмоль/дм³ холестерина, 3 – в присутствии 10 мкмоль/дм³ холестерина

Следует обратить внимание, что для уменьшения ошибки эксперимента, все используемые в работе проводилась предварительная поляризация индикаторных электродов в области потенциалов: $E = + 2 \div -2$ В, для СУЭ в течение 5-10 мин.

2.3. Подбор модификатора

Как известно, сам холестерин электрохимически неактивен, поэтому уделяется большое внимание подбору модификатора поверхности рабочего электрода.

В данной работе была рассмотрена возможность применения модификаторов: ди-2,6-N-ацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифос-фоновой кислоты на стеклоуглероде и углеродсодержащем электроде, и фталцианина кобальта на платиновом электроде.

Порошок фталцианина растворялся в концентрированной серной кислоте. Поверхность платинового электрода погружалась в этот раствор и находилась в нем до двух суток. Затем электрод вынимался и очищался от остатка серной кислоты быстрым окунанием в дистиллированную воду. Применение промывания позволяло удалить кислоту и фиксировать комплекс кобальта на поверхности электрода. Предполагалось, что фталцианины кобальта будут селективно взаимодействовать с холестерином и давать аналитический сигнал. Однако получить воспроизводимый аналитический отклик не удалось.

Напротив, модификатор - ди-2,6-N-ацетил-2,4,6,8- тетраазабицикло [3.3.0]октан-3,7-дион-дифос-фоновая кислота (ДТОДДК) (рис. 2.5.), нанесенный электрохимически при потенциале -1,4 В на поверхность стеклоуглеродного электрода дал селективный отклик. Порошок ди-2,6-N-ацетил-2,4,6,8- тетраазабицикло [3.3.0]октан-3,7-дион-дифос-фоновой кислоты растворялся в дистиллированной воде. Затем данная кислота адсорбировалась электрохимически на поверхности электрода, и электрод сушился на воздухе. После чего, проводился эксперимент с данным модифицированным электродом. Был зафиксирован сигнал от стандарта холестерина, который увеличивался с увеличением концентрации холестерина в электрохимической ячейке. Предположительный механизм реакции взаимодействия холестерина и модификатора представлен на рисунке 2.6.

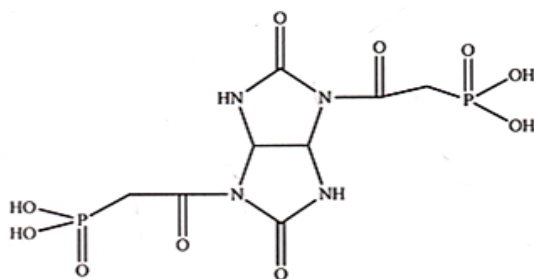


Рисунок 2.5 - Структурная формула 2,6-диацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0.]октан-3,7-дион-дифосфоновой кислоты (ДТОДПК)

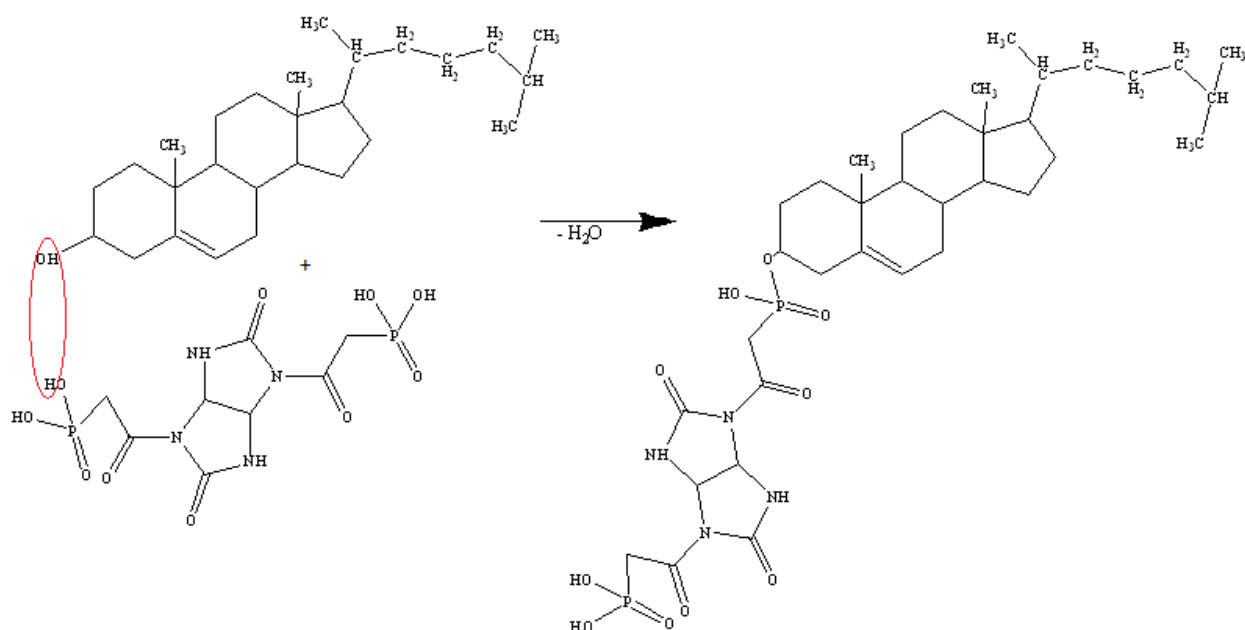


Рисунок 2.6 – Предположительный механизм реакции взаимодействия холестерина и модификатора

Поскольку холестерин относится к классу спиртов, а модификатор – к классу кислот, предполагается наличие кислотного-основного взаимодействия с образованием сложного эфира и воды.

2.4. Условия нанесения модификатора

Нанесение модификатора, а именно, ди-2,6-N-ацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифос-фоновой кислоты, осуществляли электрохимически, что предпочтительнее нанесения посредством физической

адсорбции за счет сил Ван-дер-Ваальса. Нанесение производилось при - 1,4 В, поскольку модификатор дает собственный электрохимический сигнал при указанном потенциале. Время нанесения составляло 20 с. Для нанесения рабочий электрод погружали в раствор модификатора и на ячейку накладывали соответствующий потенциал. После чего рабочий электрод высушивался в течение получаса при комнатной температуре. О наличии на поверхности модификатора свидетельствовало изменение окраски рабочего электрода.

2.5. Условия определения холестерина

Для определения холестерина была применена следующая методика:

- 1) Подготовка фонового раствора при потенциале 0В, в течение 10 с, сопровождающаяся перемешиванием при 80 рад/с. Перемешивание осуществляется посредством вибрации рабочего электрода.
- 2) Успокоение системы при 0В, в течение 20 с. Без перемешивания.
- 3) Развертка со скоростью 30 мВ/с в интервале потенциалов от 0 В до 2 В. Съемка проводится в анодной области. Условия подобраны так, чтобы избежать восстановления кислорода, дабы избежать его мешающее влияния.

2.6. Зависимость концентрации холестерина от аналитического сигнала

По данным проведения экспериментов был построен градуировочный график зависимости аналитического сигнала от концентрации холестерина (рисунок 2.7).

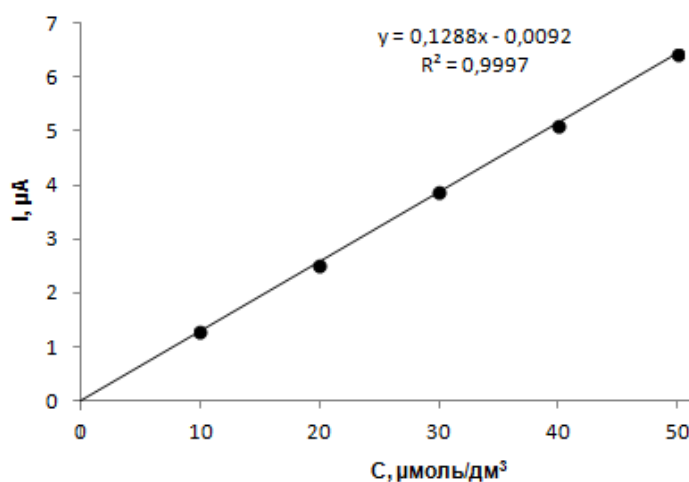


Рисунок 2.7 - Зависимость сигнала от концентрации холестерина в электрохимической ячейке (рабочий диапазон концентраций при работе с продуктами питания)

Из рисунка видно, что данная зависимость линейна. Предел определения: $0,7 \text{ мкмоль/дм}^3$.

2.7. Оценка закономерности окисления холестерина на химически модифицированном электроде

Известно, что холестерин не дает селективного отклика, поэтому для детекции холестерина применялся модификатор поверхности рабочего электрода. В качестве модификатора использовалась ди-2,6-N-ацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифос-фоновая кислота, способная селективно взаимодействовать с холестерином. Нанесение модификатора осуществлялось электрохимически, благодаря модификатору удалось получить отклик при потенциале $1,65 \text{ В}$ в анодной области. При увеличении концентрации холестерина в ячейке наблюдается сдвиг потенциала, что объясняется образованием комплекса при взаимодействии холестерина и модификатора.

Помимо этого проводилось исследование влияния pH среды на величину сигнала. В данной работе проводилось исследование влияния pH электролитов

разной природы. Для этого приготавливались растворы «Стандарт-титров» с заданным значением pH и растворы Бриттона-Робинсона. Зависимость величины отклика от pH среды разных электролитов представлены на рисунках 2.8 и 2.9.

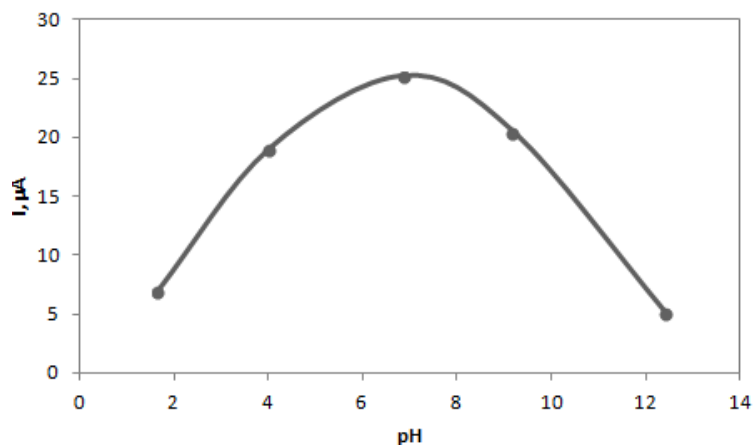


Рисунок 2.8 – Зависимость величины отклика от pH среды (фоновые электролиты приготовлены из набора «Стандарт-титр», использованы буферные растворы, 3 разряд)

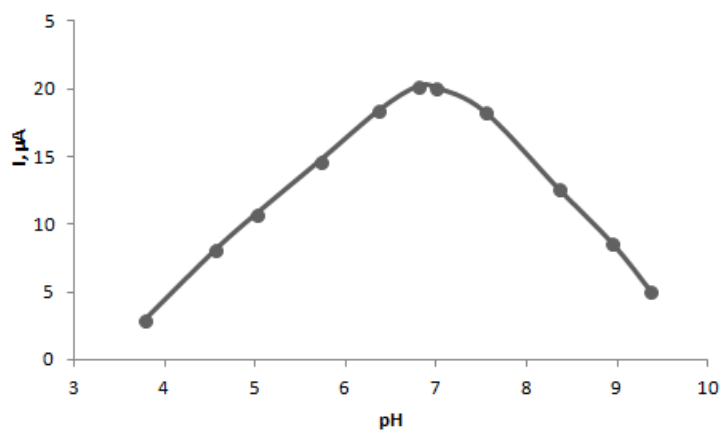


Рисунок 2.9 – Зависимость величины отклика от pH среды (фоновые электролиты приготовлены на основе универсальной буферной смеси Бриттона-Робинса)

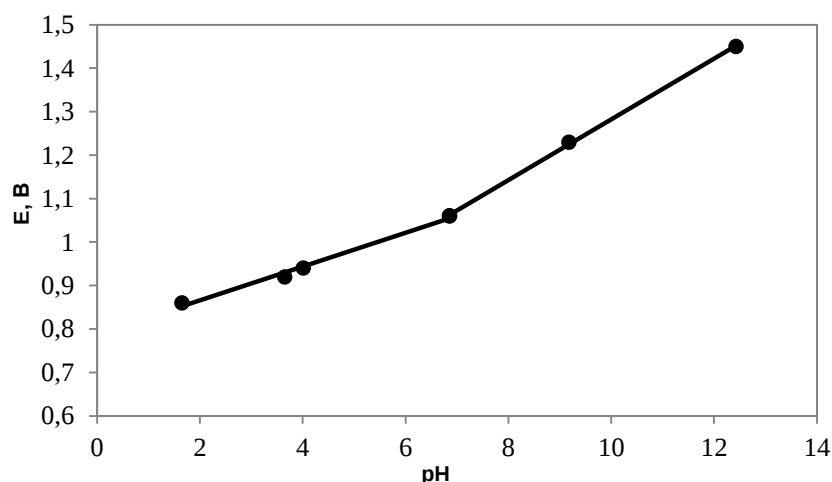


Рисунок 2.10 - Зависимость потенциала пика окисления холестерина на ХМЭ при разных значениях pH среды

Из рисунка 2.10 видно, что значение предельного тока анодного окисления растет в интервале значений pH от 1.65 до 6.86. В точке, соответствующей значению водородного показателя 6.86, ток электроокисления холестерина проходит максимум. Подобное поведение характерно для амфолитов, что соответствует природе применяемого для пробоподготовки неиногенного детергента.

Характер полученных в ходе исследования зависимостей позволяет сделать вывод о том, что природа электролита не влияет на аналитический сигнал и наибольший отклик системы наблюдается при pH около 7, что соответствует «Стандарт титру» pH 6,86. Таким образом, данный pH был принят в качестве рабочего.

Также по результатам данных исследований было установлено влияние скорости развертки на величину сигнала.

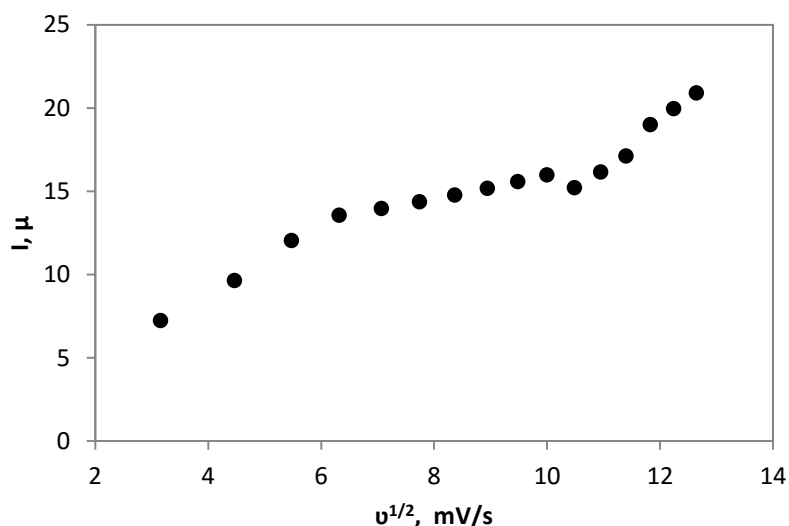


Рисунок 2.11 – Исследование влияния зависимости аналитического сигнала от скорости развертки (определение термодинамических критериев обратимости процесса)

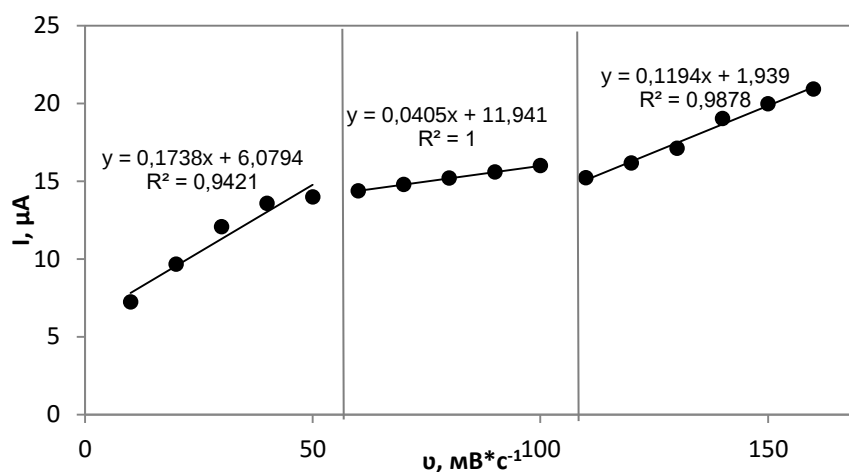


Рисунок 2.12 - Зависимость предельного тока окисления холестерина на ХМЭ при разных значениях скорости развертки потенциала. Концентрация холестерина $10 \cdot \text{мкмол/дм}^3$

Согласно рисунку 2.11, зависимость отклика от значения квадратного корня из величины скорости развертки нелинейна. Следовательно, процесс электроокисления холестерина является квазиобратимым. Таким образом, данный процесс управляется как диффузией вещества в приэлектродном пространстве, так и электрохимической реакцией.

Согласно рисунку 2.12, зависимость величины тока пика от скорости развертки нелинейна, что позволяет сделать вывод об отсутствии адсорбционной составляющей аналитического сигнала.

Помимо этого, зависимость $E = \lg(v^{1/2})$ носит линейный характер (рис. 2.13).

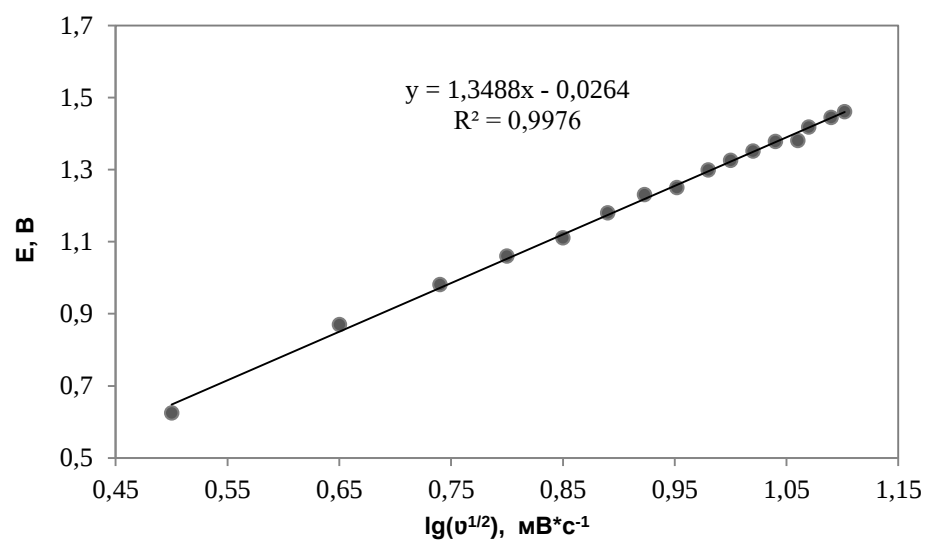


Рисунок 2.13 - Зависимость потенциала пика окисления холестерина на ХМЭ при разных значениях скорости развертки потенциала. Концентрация холестерина 10·мкмол/дм3

На рисунке 2.14 представлена Тафелевская зависимость тока окисления от потенциала. Полученная зависимость носит линейный характер.

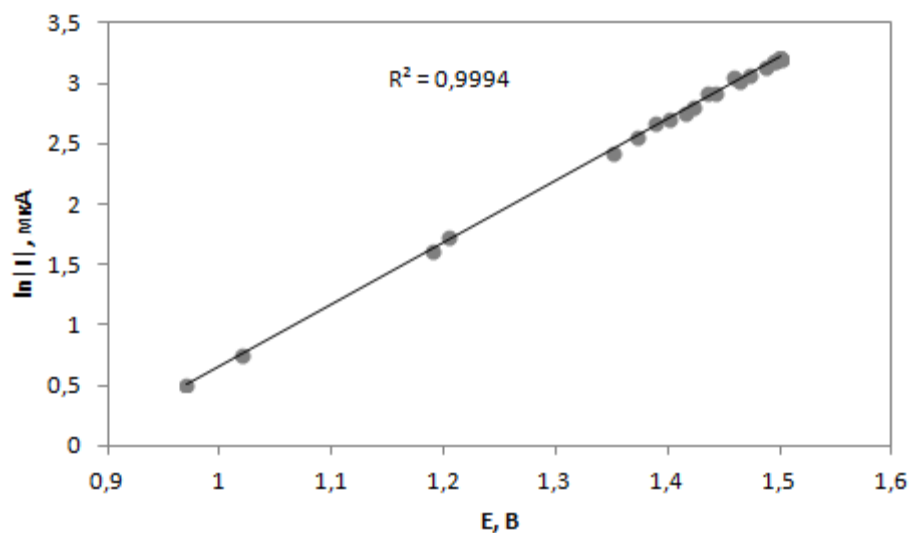


Рисунок 2.14 - Зависимость тока окисления от потенциала. Концентрация стандартного образца холестерина в электролитической ячейке составляет 10 мкмоль/дм3. $v = 0,05$ В/с

Согласно, уравнениям Тафелевской зависимости для процесса окисления, коэффициент переноса (β) прямо пропорционален току окисления и обратно пропорционален потенциалу [37].

$$\beta = \frac{RT}{F} \frac{\partial \ln |I_{\text{окисл}}|}{\partial E} \quad (2.1)$$

Таким образом, наклон полученной зависимости (рис. 2.14) позволяет рассчитать β по уравнению 2.

$$\text{Наклон} = \frac{\beta F}{RT} \quad (2.2)$$

Исходя из данных зависимости, представленной на рис. 2.14, рассчитано значение β , составившее 0,5. Известно выражение:

$$\alpha + \beta = 1 \quad (2.3),$$

Откуда $\alpha = 0,5$, что соответствует переносу 1 электрона в электрохимической реакции.

2.8. Спектрофотометрический метод определения холестерина как метод сравнения

В качестве методики сравнения в данной работе использовался спектрофотометрический метод по реакции Златкиса - Зака. Данный метод основан на окислении холестерина хлорным железом в концентрированных уксусной и серной кислотах, вследствие чего раствор приобретает красно-фиолетовый цвет. Схема реакции Златкиса - Зака представлена на рисунке 2.15.

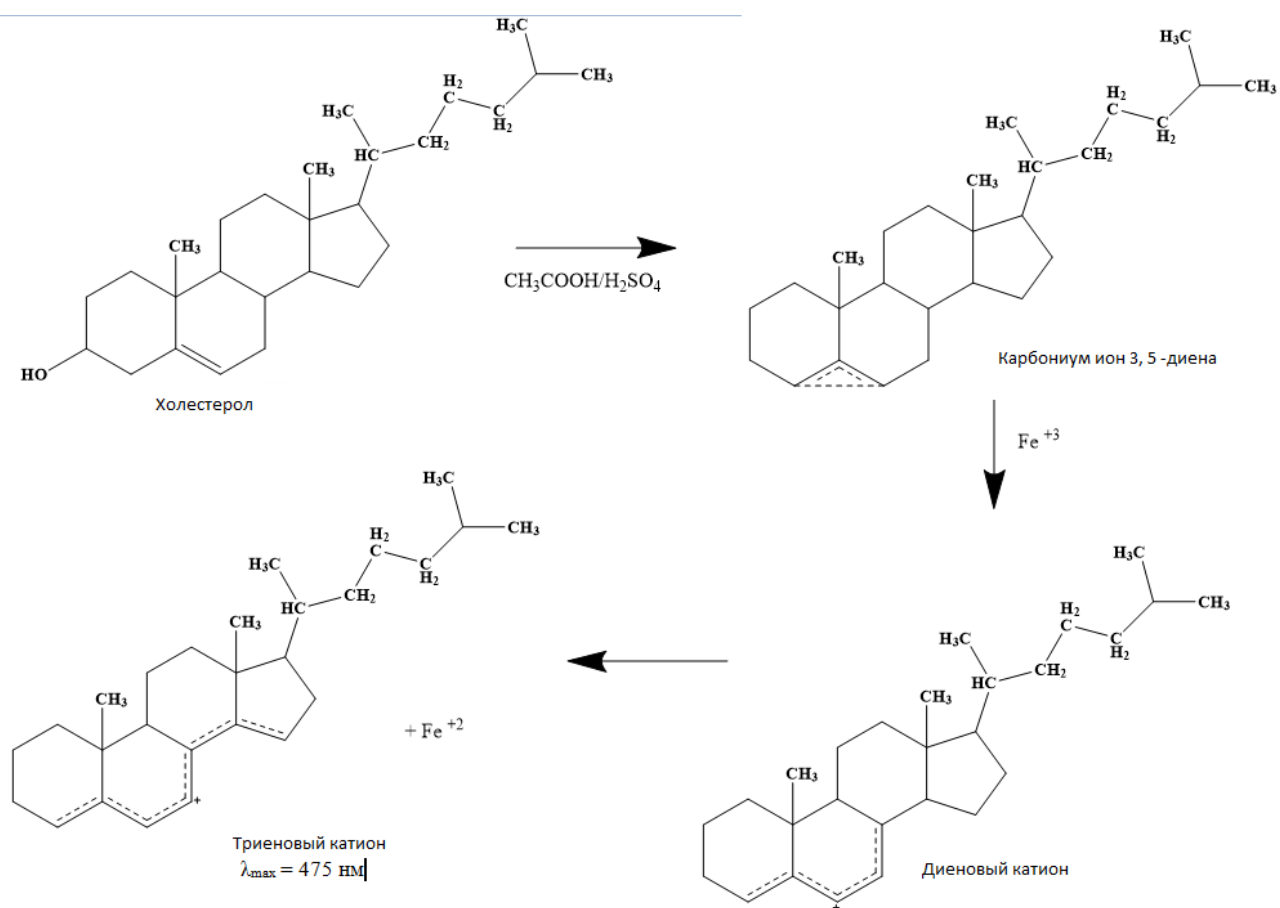


Рисунок 2.15 - Схема реакции Златкиса – Зака

С увеличением концентрации холестерина увеличивается интенсивность окрашенного раствора. Спектр поглощения стандарта холестерина наблюдался при 475 нм (рисунок 2.16). Увеличение пика при увеличении концентрации стандарта холестерина при длине волны 475 нм представлено на рисунке 2.17.

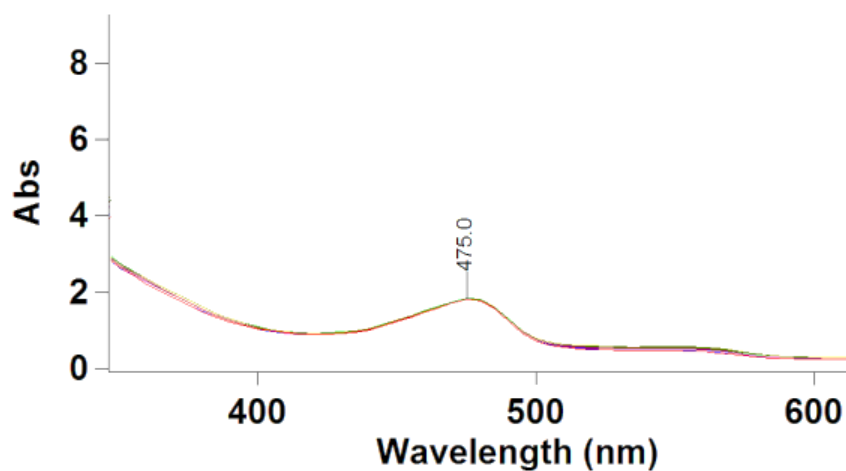


Рисунок 2.16 - Спектр поглощения окрашенного комплекса холестерина с железом (III): концентрация стандартного вещества 1 ммоль/дм³ холестерина

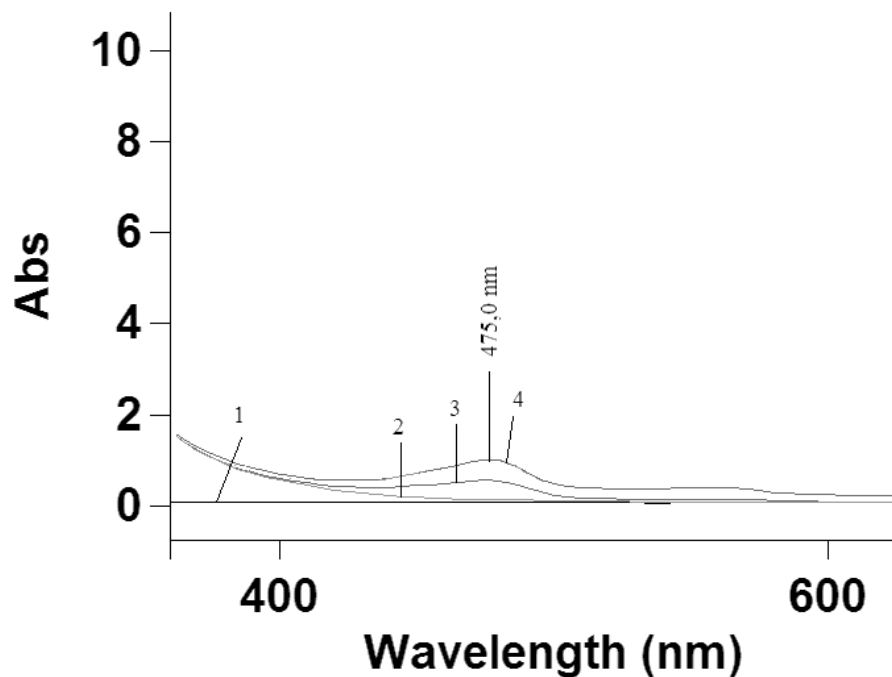


Рисунок 2.17 - Спектр поглощения окрашенного комплекса холестерина с железом (III) при увеличении концентрации анализируемого вещества:

1 – H_2O ;

2- раствор хлорнокислого железа в концентрированной уксусной и серной кислотах;

3 - в присутствии $0,3 \text{ ммоль/дм}^3$ холестерина;

4 - в присутствии $0,6 \text{ ммоль/дм}^3$ холестерина

Для данного метода был построен градуировочный график зависимости концентрации холестерина от аналитического сигнала (рисунок 2.18). Из графика видно, что зависимость линейная.

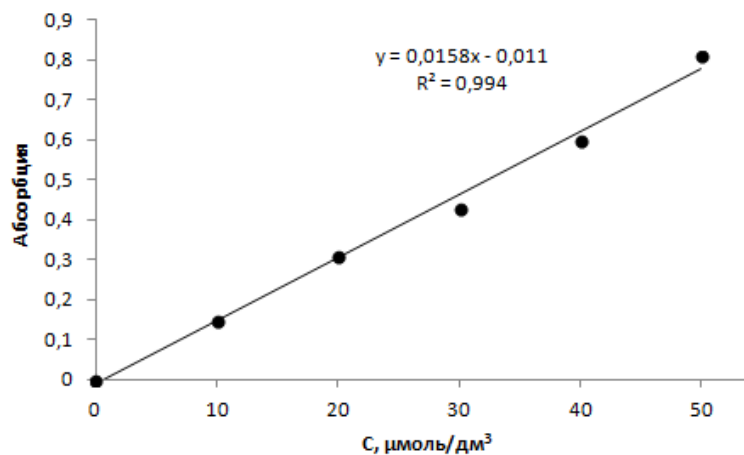


Рисунок 2.18 - Зависимости концентрации холестерина от аналитического сигнала

2.9. Разработка методики электрохимического определения холестерина в продуктах питания

2.9.1. Пробоподготовка объектов пищевой промышленности

Большое число пищевых продуктов содержит холестерин и в основном это продукты животного происхождения. Это кисломолочные продукты, мясо, рыба, сыры, колбасы и т.д. В данной работе определялся холестерин в сливочном масле, кисломолочных продуктах: «Снежке», сливках и курином яйце.

Сливочное масло

Из упаковки сливочного масла стерильным шпателем отбирается 15-20 г масла и помещается в термостойкий стакан. Затем масло топится на водяной бане при температуре 40 °С до жидкого состояния. После чего дозатором отбирается и переносится в эппендорф и разбавляется изопропиловым спиртом в соотношении 1:1. Тщательно перемешивается с помощью вибрационного смесителя Vortex. И затем центрифугируется в течение 30 мин при 4400 об./мин. Осветленная часть декантируется и используется для определения концентрации холестерина.

Молоко и кисломолочные продукт («Снежок», сливки).

Пробоподготовка жидких молочных продуктов облегчена по сравнению с пробоподготовкой сливочного масла, так как не требует предварительного перевода пробы в жидкое состояние.

Выбранный для анализа молочный продукт отбирается дозатором, переносится в эппендорф и разбавляется изопропиловым спиртом в соотношении 1:1. Тщательно перемешивается с помощью вибрационного смесителя Vortex. И затем центрифугируется в течение 30 мин при 4400 об./мин. Осветленная часть декантируется и используется для определения концентрации холестерина.

Куриное яйцо

Желток сырого куриного яйца отделяется от белка, и переносится в стеклянный стакан. Тщательно перемешивается стеклянной палочкой и переносится в эппендорфы. Затем осуществляется разбавление изопропиловым спиртом в соотношении 1:2. Тщательно перемешивается с помощью вибрационного смесителя Vortex. И затем центрифугируется в течение 30 мин при 4400 об./мин. Осветленная часть декантируется и используется для определения концентрации холестерина.

Для пробоподготовки всех продуктов был выбран изопропанол, так как он способен селективно экстрагировать холестерин и омылять, содержащиеся в составе пробы белки с выпадением в осадок.

Поскольку холестерин гидрофобен, необходимо применение транспортных веществ. В данной работе при определении холестерина электрохимическим методом с этой целью применялся неионный растворитель Triton X-100 (п-1,1,3,3-тетраметилбутил-фенил-поли-оксиэтилен). Поэтому подготовленная проба смешивается в равных пропорциях с Triton X-100, после чего, проводится определение аналита.

При определении холестерина спектрофотометрическим методом 1мл подготовленной пробы смешивается с 3 мл хлорного железа растворенного в концентрированных серной и уксусной кислотах, переносится в кювету и проводится определение.

2.9.2. Электрохимические условия определения холестерина

Электрохимическое определение 5-холестен-3 β -ола проводилось в несколько этапов:

1. Модификатор наносился на поверхность СУЭ электрохимическим осаждением при потенциале -1,4 В. Время нанесения 20 с. Для нанесения

рабочий электрод погружали в раствор модификатора и на ячейку накладывали соответствующий потенциал. После чего рабочий электрод высушивался в течение получаса при комнатной температуре. О наличии на поверхности модификатора свидетельствовало изменение окраски рабочего электрода.

2. Подготовка фонового раствора при потенциале 0В, в течение 10 с, сопровождающаяся перемешиванием при 80 рад/с. Перемешивание осуществляется посредством вибрации рабочего электрода.
3. Успокоение системы при 0В, в течение 20 с. Без перемешивания.
4. Развертка со скоростью 30 мВ/с в интервале потенциалов от 0 В до 2 В. Съемка проводится в анодной области. Условия подобраны так, чтобы избежать восстановления кислорода, с целью избегания его мешающего влияния.

3. Результаты проведенного исследования

По результатам проведенного исследования была разработана методика вольтамперометрического определения холестерина на модифицированном электроде в пищевых продуктах:

1. В качестве рабочего электрода был выбран стеклоуглеродный электрод, позволяющий получить стабильный отклик системы.

2. В качестве модификатора поверхности рабочего электрода был выбран модификатор ди-2,6-N-ацетил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифос-оновая кислота (ДТОДДК).

3. Определены условия нанесения модификатора на поверхность электрода: электрохимическое нанесение при потенциале -1,4 В. Результатом взаимодействия холестерина и модификатора являлся отклик системы при потенциале 1,65 В. С увеличением концентрации холестерина увеличивается аналитический сигнал.

4. Подобраны электрохимические условия определения холестерина.

5. В качестве методики сравнения был выбран известный спектрофотометрический метод основанный на реакции Златкиса-Зака. Разрабатываемым электрохимическим и известным спектрофотометрическим - методом сравнения было определено содержание холестерина в некоторых кисломолочных продуктах. Результаты представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - *Результаты определения холестерина (мкмоль/дм³) в продуктах питания вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами. n = 6, p = 0,95, t_{таб} = 2,57.*

Образец	Вольтамперометрический метод	Спектрофотометрический метод	Концентрация холестерина в продукте, согласно литературным данным, приведена с учетом пробоподготовки
Молоко «Деревенское молочко», 3,5 %	9,03±0,59	10,08±0,86	4-12
Молоко «Простоквашино», 3,2 %	8,58±0,61	13,60±1,11	
Молоко «Домик в деревне», 3,2%	4,09±0,23	4,37±0,14	
Масло сливочное «Деревенское молочко», 72,5 %	44,15±1,23	43,87±1,04	43-46
Масло сливочное «Простоквашино», 72,5 %	43,26±1,14	43,20±1,14	

4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1. Предпроектный анализ

4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования

Как говорилось выше, холестерин, а точнее его повышенное содержание в крови человека является маркером развития сердечнососудистых заболеваний, таких как инфаркт, инсульт, ишемическая болезнь сердца. Данные заболевания нередко приводят к летальным исходам и по статистике всемирной организации здравоохранения являются одной из основных причин смерти во всем мире.

Холестерин вырабатывается самостоятельно организмом человека в печени. Кроме того холестерин поступает в организм с пищей животного происхождения. К таким продуктам относятся кисломолочные продукты, сыры, колбасы, мясо, куриные яйца и т.д. Таким образом, если установлено, что у пациента повышенное содержание холестерина в крови, ему следует соблюдать диету, ограничивающую пищу с повышенным содержанием холестерина.

В современной клинической практике применяются различные методы определения холестерина. К ним относятся ферментативный, колориметрический (основанный на реакции Либермана-Бухарда), флюориметрический и др. Но, к сожалению, все методы не совершенны, что приводит к созданию новых альтернативных методик имеющих ряд преимуществ.

Целевым рынком разработанной методики вольтамперометрического определения холестерина являются различные медицинские учреждения проводящие анализы крови, а также организации контролирующие качество продуктов питания. Результаты НИР, так же могут быть использованы в научно-исследовательских лабораториях, НИИ Питания и здравоохранения.

4.1.2. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения позволяет провести оценку сравнительной эффективности научной разработки и определить направления для ее будущего повышения [38]. Целесообразно проводить данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Точность определения	0,2	5	5	3	1,5	1,5	0,9
2. Экспрессность	0,2	5	3	5	1,5	0,9	1,5
3. Простота эксплуатации	0,2	4	3	3	0,8	0,6	0,6
Экономические критерии оценки эффективности							
4. Цена	0,2	5	3	4	1	0,6	0,8
5. Предполагаемый срок эксплуатации	0,1	4	3	4	0,4	0,3	0,4
6. Срок выхода на рынок	0,1	4	3	4	0,4	0,3	0,4
Итого	1				5,6	4,2	4,6

Б_ф- наша разработка;

Б_{к1}- НИИ ПРОБЛЕМ ХРАНЕНИЯ (лаборатория экспертизы пищевых продуктов);

Б_{к2}- «Центр Экспертиза».

К конкурентным преимуществам разрабатываемой методики, можно отнести: точность определения и экспрессность. Эти критерии являются основополагающими и влияющими на качество проведения анализа.

4.1.3. SWOT-анализ

SWOT – Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы) – представляет собой комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ

применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта [38].
Результаты первого этапа SWOT-анализа представлять в таблице 4.2.

Таблица 4.2 - Матрица SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Заявленная точность определения. С2. Более низкая стоимость методики по сравнению с другими. С3. Наличие бюджетного финансирования.	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Отсутствие у потенциальных потребителей квалифицированных кадров по работе с научной разработкой Сл2. Большой срок поставок материалов используемых при проведении научного исследования
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление дополнительного спроса на новый продукт В3. Повышение стоимости конкурентных разработок		
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые методики У2. Развитая конкуренция методик У3. Ограниченный круг потребителей У4. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции У5. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства		

Интерактивные матрицы проекта, отражающие второй этап, представлены в таблицах 4.3, 4.4, 4.5, 4.6.

Таблица 4.3- Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и возможности»

Сильные стороны проекта				
Возможности проекта		С1	С2	С3
	В1	+	+	+
	В2	+	+	0
	В3	+	+	-

Таблица 4.4- Интерактивная матрица проекта « Слабые стороны и возможности»

Слабые стороны проекта			
Возможности проекта		Сл1	Сл2
	В1	-	-
	В2	-	-
	В3	-	-

Таблица 4.5- Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и угрозы»

Сильные стороны проекта				
Угрозы		С1	С2	С3
	У1	-	-	-
	У2	-	+	-
	У3	-	-	-
	У4	-	-	+
	У5	-	-	+

Таблица 4.6- Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и угрозы»

Слабые стороны проекта			
Угрозы		Сл1	Сл2
	У1	+	-
	У2	+	+
	У3	+	+
	У4	-	-
	У5	-	-

В рамках третьего этапа составлена итоговая матрица SWOT-анализа, которая приводится в табл. 4.7.

Таблица 4.7 - Итоговая матрица SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Заявленная точность определения. С2. Более низкая стоимость методики по сравнению с другими. С3. Наличие бюджетного финансирования.	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Отсутствие у потенциальных потребителей квалифицированных кадров по работе с научной разработкой Сл2. Большой срок поставок материалов используемых при проведении научного исследования
Возможности: В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ В2. Появление дополнительного спроса на новый продукт В3. Повышение стоимости конкурентных разработок	Точность определения, низкая стоимость, наличие прототипа научной разработки достигаются с использованием инновационной структуры ТПУ и бюджетного финансирования.	Использование инновационной инфраструктуры ТПУ, появление спроса на новую разработку, повышение стоимости конкурентных разработок дает огромные возможности для данного проекта. Но отсутствие у потребителя квалифицированных кадров и долгий срок поставок материалов и оборудования могут негативно сказаться на предложенном проекте.
Угрозы: У1. Отсутствие спроса на новые методики У2. Развитая конкуренция методик У3. Ограниченный круг потребителей У4. Введения дополнительных государственных требований к сертификации продукции У5. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства	Заявленная точность и низкая стоимость, могут сделать предлагаемую методику конкурентоспособной.	Отсутствие спроса на новые методы и развитая конкуренция методов обусловлено тем, что данный продукт разрабатывается без прототипа научной разработки. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования приводит к тому, что для проведения испытаний и опытов не хватает оборудования и реактивов, которые приводят к большим затратам времени на проведение научных исследований.

4.1.4. Оценка готовности проекта к коммерциализации

На данной стадии жизненного цикла научной разработки была оценена ее степень готовности к коммерциализации и выяснен уровень собственных знаний для ее проведения.

Для этого была заполнена специальная форма, содержащая показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и

компетенциям разработчика научного проекта. Перечень вопросов приведен в табл. 4.8.

Таблица 4.8 - Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	5	4
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	4
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	4
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	3	4
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	4
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	2	3
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	1	1
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	3
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	3	4
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	1	1
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	3	4
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	3
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	3
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	3	3
ИТОГО БАЛЛОВ		46	48

Суммарное значение баллов данной таблицы позволяет говорить о готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации выше среднего.

4.1.5. Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования

Существуют различные методы коммерциализации научных разработок. На данной стадии представленной научной разработки успешному продвижению способствует торговля патентными лицензиями, с помощью которой будет достигнута передача третьим лицам интеллектуальной собственности на лицензионной основе.

4.2. Инициация проекта

4.2.1. Устав проекта

Устав проекта сформирован в таблице 4.9 - заинтересованные стороны проекта, в таблице 4.10 – цели и результаты проекта.

Таблица 4.9 - *Заинтересованные стороны проекта*

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Государство	Усовершенствование существующих методик определения холестерина в крови человека и продуктах питания, внедрение на производство.
Разработчики	Гарантия достоверности получаемых результатов анализа.

Таблица 4.10 - *Цели и результат проекта*

Цели проекта:	Определение холестерина в модельных средах и продуктах питания методом вольтамперометрии.
Ожидаемые результаты проекта	Создание тест-системы для мониторинга содержания холестерина в пищевых продуктах.
Критерии приемки результата проекта:	Не использование вредных реактивов, получение новой методики определения содержания холестерина в пищевых продуктах
Требования к результату проекта:	Требование: Разработка новой методики определения содержания холестерина в пищевых продуктах; Точность определения данной методики; Экспрессность получения результатов.

4.2.2. Организационная структура проекта

Организационная структура проекта представлена в таблице 4.11.

Таблица 4.11 - *Рабочая группа проекта*

№, п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
1	Проф. Каф. ФАХ, ИПР Короткова Е.И.	Руководитель	Распределение обязанностей, корреляция выполнения плана, формирует цели проекта, ограничения проекта по срокам и затратам (бюджету), Контроль над ходом выполнения проекта	72
2	Ассистент каф. ФАХ, инженер Дёрина К.В.	Консультант	Контроль над ходом выполнения проекта, консультации по поводу проведения эксперимента, получения и анализа результатов НИР	109
3	Чулкова И.В.	Исполнитель	Выполнение проекта (проведение эксперимента, получение и анализ результатов НИР)	459
ИТОГО:				640

4.2.3. Ограничения и допущения проекта

Ограничения и допущения проекта представлены в таблице 4.12.

Таблица 4.12 - *Ограничения проекта*

Фактор	Ограничения/ допущения
3.1. Бюджет проекта, руб.	593389
3.1.1. Источник финансирования	НИ ТПУ
3.2. Сроки проекта:	01.06.2015 г. – 31.05.2016 г.
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	01.06.2015 г.
3.2.2. Дата завершения проекта	15.06.2016 г.

4.3. Планирование управления научно-техническим проектом

Группа процессов планирования состоит из процессов, осуществляемых для определения общего содержания работ, уточнения целей и разработки последовательности действий, требуемых для достижения данных целей.

План управления научным проектом должен включать в себя следующие элементы:

4.3.1. Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. На рис. 4.1 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.

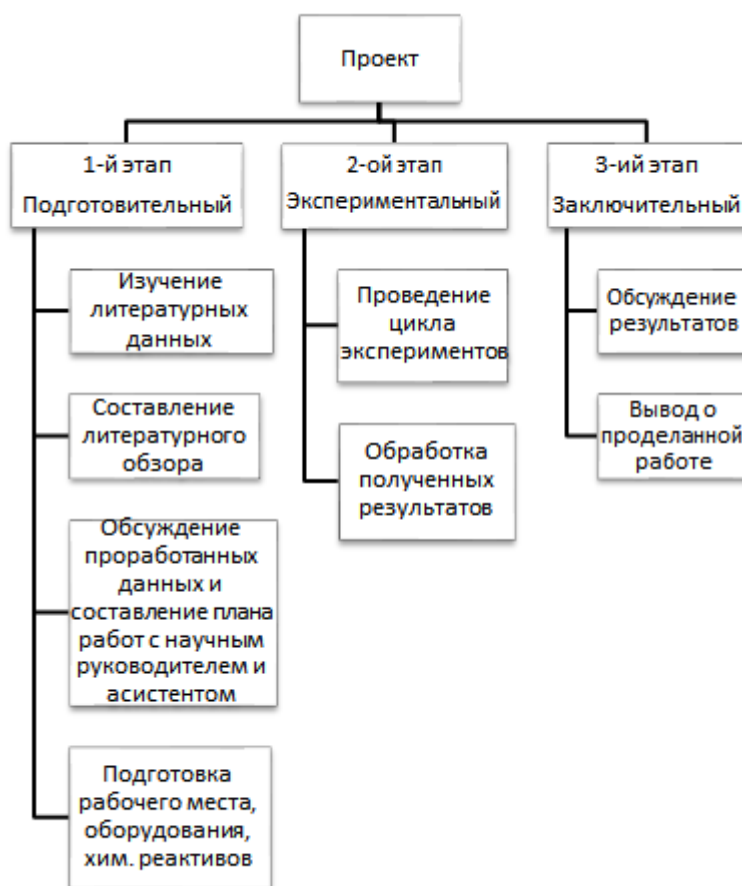


Рисунок 4.1 – Иерархическая структура работ проекта

4.3.2. Контрольные события проекта

Контрольные события проекта представлены в таблице 4.13.

Таблица 4.13 - *Контрольные события проекта*

№, п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Литературный обзор по теме проекта	Июнь, 2015 г.	Литературный обзор в ВКР
2	Постановка цели и задач	Июль, 2015 г.	Раздел цели и задачи в ВКР
3	Разработка плана экспериментальных работ	Август, 2015 г.	План работ
4	Подбор материала рабочего электрода	Сентябрь, 2015 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
5	Подбор модификатора	Октябрь, 2015	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
6	Подбор условий нанесения слоя модификатора на поверхность рабочего электрода	Ноябрь, 2015	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
7	Подбор электрохимических условий определения холестерина	Декабрь, 2015	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
8	Исследование кинетических и термодинамических параметров процесса.	Январь , 2016	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
9	Обсуждение результатов Доработка экспериментальной части ВКР	Февраль - март, 2016	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
10	Оформление ВКР	Апрель - июнь, 2016	Результаты экспериментов, представленных в ВКР

4.3.3. План проекта

В рамках планирования научного проекта построены календарный и сетевой графики проекта.

Линейный график представляется в виде таблицы (табл. 4.14).

Таблица 4.14 - Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)
1	Литературный обзор по теме проекта	30	01.06.15	31.07.15	Инженер (дипломник)
2	Постановка цели и задач	5	15.07.15	20.07.15	Научный руководитель, ассистент, инженер (дипломник)
3	Разработка плана экспериментальных работ	5	01.08.15	05.08.15	Научный руководитель, ассистент, инженер (дипломник)
4	Подбор материала рабочего электрода	30	01.09.15	31.09.15	Ассистент, инженер (дипломник)
5	Подбор модификатора	30	01.10.15	31.10.15	Ассистент, инженер (дипломник)
6	Подбор условий нанесения слоя модификатора на поверхность рабочего электрода	30	01.11.15	31.11.15	Ассистент, инженер (дипломник)
7	Подбор электрохимических условий определения холестерина	30	01.12.15	31.12.15	Ассистент, инженер (дипломник)
8	Исследование кинетических и термодинамических параметров процесса.	45	01.01.16	15.02.16	Ассистент, инженер (дипломник)
9	Обсуждение результатов. Доработка экспериментальной части ВКР	45	15.02.16	31.03.16	Научный руководитель, ассистент, инженер (дипломник)
10	Оформление ВКР	75	01.04.16	15.06.16	Инженер (дипломник)

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

График приведен в таблице 4.15.

4.3.4. Бюджет научного исследования

Бюджет затрат на выполнение НИР составлялся с учетом проведения НИР за один год (365 дней). Затраты на НИР рассчитывали по статьям калькуляции, которые включают две группы затрат прямые затраты и накладные затраты.

Прямые затраты – это затраты на сырье, энергию, амортизацию оборудования.

Накладные затраты включали лабораторные затраты, связанные с освещением, отоплением, содержанием персонала.

Основными статьями калькуляции являются:

- 1) Затраты на сырье и материалы;
- 2) Фонд заработной платы исполнителей;
- 3) Амортизация оборудования;
- 4) Накладные расходы, включающие затраты на содержание административно-управленческого аппарата, по охране труда и.т.п.;
- 5) Прочие затраты.

Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов)

В эту статью включаются затраты на приобретение всех видов материалов, комплектующих изделий и полуфабрикатов, необходимых для выполнения работ по данной теме. Количество потребных материальных ценностей определяется по нормам расхода.

Сырье и материалы

В эту статью включены затраты на приобретение всех видов реактивов и материалов необходимых для выполнения НИР по данной теме. Расчет стоимости материальных затрат производился по действующим прейскурантам и ценам с учетом НДС. В стоимость материальных затрат включили транспортно-заготовительные расходы (3 – 5 % от цены). В эту же статью

включили затраты на оформление документации. Результаты расчета затрат на сырье, материалы и покупные изделия в процессе проведения НИР представлены в таблице 4.16.

Таблица 4.16 – Расчет затрат по статье «Сырье и материалы»

Наименование	Марка, размер	Количество	Ед. изм.	Цена за единицу, руб. (ссылка на поставщика)	Сумма, руб.
Фосфатный буферный раствор рН 1,65	Производство Россия	1	шт	240	240
Фосфатный буферный раствор рН 4,01	Производство Россия	1	шт	240	240
Фосфатный буферный раствор рН 6,85	Производство Россия	1	шт	240	240
Фосфатный буферный раствор рН 9,18	Производство Россия	1	шт	240	240
Калий хлорид насыщенный	ГОСТ 4234-77	500	г	34	34
Холестерин	Sigma Aldrich, Германия чистота – 99,9%	0,005	г	9 144	9 144
Triton X-100	Sigma Aldrich, Германия	50	мл	3732	3732
Спирт изопропиловый	ГОСТ 9805-84	500	мл	150	150
Уксусная кислота	ГОСТ 19814-74	500	мл	100	100
Кислота серная	ГОСТ 4204-77	1000	мл	100	100
Хлорид железа (III) 6-водный	ГОСТ 4147-74	500	г	45	45
Лабораторная химическая посуда - колбы мерные на 50 и 100 см ³ - цилиндры мерные с носиком на 25, 50, 100 см ³ - Пипетки, градуированные на 5, 10 см ³ - Стаканы на 25, 50, 100 см ³ - стеклянные палочки - стеклянные воронки - пробирки -эппендорф 2 см ³	ГОСТ 1770-74	30 5 10 4 2 3 8 1	шт шт шт шт шт шт шт уп (250 шт)	1200 100 50 152 7 600 20 1548	3877
Транспортные расходы (5%)					907
ИТОГО:					19049

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры), необходимого для проведения работ по теме НИР. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам с учетом НДС. При приобретении спецоборудования учтены затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Расчет затрат представлен в таблице 4.17.

Таблица 4.17 – *Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»*

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования, руб.	Общая стоимость оборудования, руб.
1	Дистиллятор для приготовления воды очищенной (Россия, ЧЗБТ)	1	35000	35000
2	Весы аналитические (класс точности 0,0001 г., Россия)	1	38000	38000
3	pH – метр (Mettler Toledo, Швейцария)	1	26500	26500
4	Дозатор 1-канальный, переменного объема 1-5 мл (Россия);	1	5780	5780
5	Дозатор 1-канальный, переменного объема 10-100 мкл (Россия);	1	7906	7906
6	Вольтамперометрический анализатор TA-Lab	1	157000	157000
7	Хлорид серебряный электрод	2	760	1520
8	Углеродсодержащий электрод	1	790	790
Итого				272496

Стоимость оборудования, используемого при выполнении НИР имеющегося на кафедре ФАХ стоимостью свыше 40 тыс. рублей, учитывалось в виде амортизационных отчислений. Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования» представлена в таблице 4.18.

Таблица 4.18 - Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	Цена оборудования, руб.	Эксплуатации оборудования, количество лет	А, руб.
Спектрофотометр универсальный Agilent Cary 60 (производство Германия). (http://spectronlab.ru/equipment/Spectrophotometers)	650000	5	130000
ИТОГО			130000

Основная заработная плата исполнителей темы

В настоящую статью включается основная заработная плата научных и инженерно-технических работников, рабочих макетных мастерских и опытных производств, непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме. Величина расходов по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда. В состав основной заработной платы включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы (размер определяется Положением об оплате труда).

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением проекта, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату.

$$C_{\text{зп}} = Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}, \quad (4.1)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата;

$Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата.

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) руководителя (лаборанта, инженера) от предприятия (при наличии руководителя от предприятия) рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (4.2)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника;

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

$Z_{дн}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (4.3)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 24 раб. дня $M = 11,2$ месяца, 5-дневная неделя;

при отпуске в 48 раб. дней $M = 10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн.

Расчет заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта проводили с учетом работы 3-х человек – научного руководителя, консультанта и исполнителя. На выполнение НИР понадобилось 258 рабочих дней. Баланс рабочего времени исполнителей представлен в таблице 4.19.

Таблица 4.19 - Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Ассистент	Инженер (дипломник)
Календарное число дней	365	365	365
Количество нерабочих дней	83	83	83
- выходные дни	66	66	66
- праздничные дни	17	17	17
Потери рабочего времени	24	24	24
- отпуск	24	24	24
- невыходы по болезни	-	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	258	258	258

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_б \cdot (k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (4.4)$$

где $Z_б$ – базовый оклад, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда);

k_d – коэффициент доплат и надбавок (в НИИ и на промышленных предприятиях – за расширение сфер обслуживания, за профессиональное мастерство, за вредные условия: определяется Положением об оплате труда);

k_p – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

При расчете заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта учитывались месячные должностные оклады работников, которые рассчитывались по формуле:

$$Z_m = Z_b * K_p \quad (4.5)$$

Где Z_b – базовый оклад, руб.;

K_p – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Расчет основной заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта проводился без учета премиального коэффициента $K_{пр}$ (определяется Положением об оплате труда) и коэффициент доплат и надбавок K_d .

Согласно информации сайта Томского политехнического университета должностной оклад (ППС) профессора доктора наук в 2014 году без учета РК составил 33162,87 руб., консультанта – 14584,32 руб., исполнителя – 7914,43 руб. Расчет основной заработной платы приведен в табл. 4.20.

Таблица 4.20 - *Расчёт основной заработной платы*

Исполнители	Z_b , руб.	$k_{пр}$	k_d	k_p	Z_m , руб.	$Z_{дн}$, руб.	T_p , раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
Руководитель	33162,87	-	-	1,3	43111,7	1871,5	2,5	4678,8
Ассистент (инженер)	14584,32	-	-	1,3	18959,6	823	12,5	10281,5
Инженер дипломник	7914,43	-	-	1,3	10288,8	446,6	132	58951,2

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

В данную статью включается сумма выплат, предусмотренных законодательством о труде, например, оплата очередных и дополнительных отпусков; оплата времени, связанного с выполнением государственных и общественных обязанностей; выплата вознаграждения за выслугу лет и т.п. (в среднем – 12 % от суммы основной заработной платы).

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$З_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot З_{\text{осн}} \quad (4.6)$$

где $З_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата, руб.;

$k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной зарплаты;

$З_{\text{осн}}$ – основная заработная плата, руб.

В табл. 4.21 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 4.21 - Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Ассистент (инженер)	Инженер (дипломник)
Основная зарплата, руб.	4678,8	10281,5	58951,2
Дополнительная зарплата, руб.	561	1234	7074
Итого по статье $C_{\text{зн}}$, руб.	5240	11516	66025

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} \cdot (З_{\text{осн}}) \quad (4.7)$$

Где $K_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.)

Отчисления на социальные нужды составляет 30,5 % от суммы заработной платы всех сотрудников. Отчисления на социальные нужды составляют отчисления в пенсионный фонд 22 %, отчисление на социальное страхование 2,9%, отчисления на медицинское страхование 5,1 %, страхование от несчастного случая 0,5 %.

Затраты на отчисления на социальные нужды рассчитывали по формуле:

$$З_{\text{о.с.н.}} = 0,305 \cdot З_{\text{осн}} \quad (4.8)$$

Где $З_{\text{о.с.н.}}$ – затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

Накладные расходы

В эту статью включены затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему. Расчет накладных расходов провели по следующей формуле:

$$C_{\text{накл}} = K_{\text{накл}} * (Z_{\text{осн}}) \quad (4.9)$$

Где $K_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов составил 0,9.

Затраты на проведение НИР

На основании полученных данных по отдельным статьям затрат составляется калькуляция плановой себестоимости НИР. В проекте не предусмотрены затраты, связанные с выплатой дополнительной заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта, научными и производственными командировками, оплатой работ, выполняемых другими организациями и предприятиями. Смета затрат приведена в таблице 4.22.

Таблица 4.22 - *Смета затрат на выполнение НИР*

Статьи затрат	Затраты, руб.
Сырье и материалы	19049
Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	272496
Фонд заработной платы	82781
Отчисления на социальные нужды	22543
Накладные расходы	66520
Амортизация оборудования	130000
Итого	593389

Проанализировав смету затрат на выполнение научно – исследовательской работы позволило сделать вывод, что существующий вариант решения, поставленной в магистерской диссертации химической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности является наиболее приемлемым.

4.3.5. Организационная структура проекта

Данный проект представлен в виде проектной организационной структуры. Проектная организационная структура проекта представлена на рисунке 4.2.

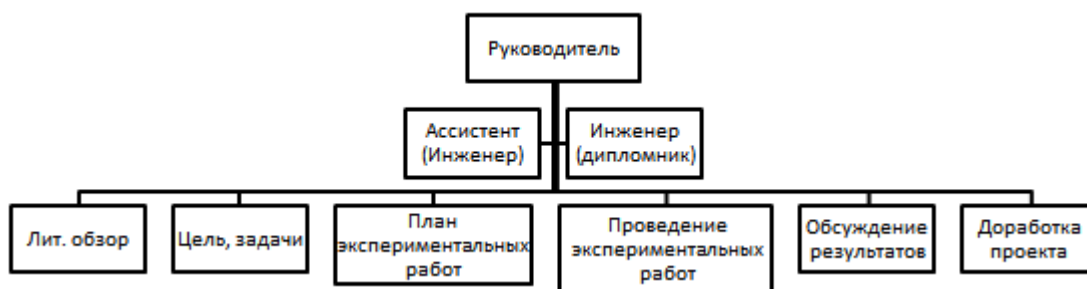


Рисунок 4.2 - Проектная организационная структура проекта

4.3.6. Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (табл. 4.23).

Таблица 4.23 - Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель	Ассистент (инженер)	Инженер (дипломник)
Литературный обзор по теме проекта			О
Постановка цели и задач	У, С	О	И
Разработка плана экспериментальных работ	У, С	О	И
Подбор материала рабочего электрода	О	И	И
Подбор модификатора	О	И	И
Подбор условий нанесения слоя модификатора на поверхность рабочего электрода	О	И	И
Подбор электрохимических условий определения холестерина	О	И	И
Исследование кинетических и термодинамических параметров процесса.	О	И	И
Обсуждение результатов Доработка экспериментальной части ВКР	У, С	О	И
Оформление ВКР			И

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

Ответственный (О)– лицо, отвечающее за реализацию этапа проекта и контролирующее его ход.

Исполнитель (И) – лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта.

Утверждающее лицо (У) – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение).

Согласующее лицо (С) – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

4.3.7. План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. План управления коммуникациями приведен в табл. 4.24.

Таблица 4.24 - *План управления коммуникациями*

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Статус проекта	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Еженедельно (понедельник)
2.	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель проекта	Участникам проекта	Еженедельно (пятница)
3.	Документы и информация по проекту	Исполнитель проекта,	Руководителю проекта	Не позже сроков графиков и к. точек
4.	О выполнении контрольной точки	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже дня контрольного события по плану управления

4.3.8. Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включают в себя возможные неопределенные события, которые могут возникнуть в проекте и вызвать последствия, которые повлекут за собой нежелательные эффекты.

Возможные риски проекта приведены на рис. 4.3.

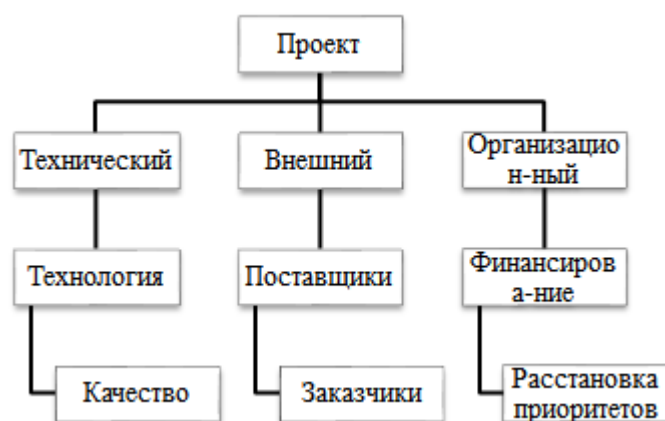


Рисунок 4.3 – Возможные риски проекта

4. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

4.4.1. Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трех (или более) вариантов исполнения научного исследования (табл. 4.25). Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчета (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}, \quad (4.10)$$

где I_{ϕ}^p - интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i-го варианта исполнения;

$\Phi_{\max}$ – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (4.11)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i^a , b_i^p – балльная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы (табл. 4.25).

Таблица 4.25 - Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Вольтамперометрическая методика с использованием модификатора Текущий проект	Спектрофотометрическая методика Аналог 1
Точность определения	0,5	5	4,5
Скорость определения	0,3	4	4
Простота эксплуатации	0,2	5	4
Итого	1,00	4,7	4,25

$$I_{\text{ТП}} = 5 \cdot 0,5 + 4 \cdot 0,3 + 5 \cdot 0,2 = 3,94$$

$$\text{Аналог 1} = 4,5 \cdot 0,5 + 4 \cdot 0,3 + 4 \cdot 0,2 = 4,25$$

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять и выбрать более эффективный вариант решения поставленной в магистерской работе технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности, то есть разработка с применением вольтамперометрической методики с использованием модификатора более эффективна, так как она более точна и проста в эксплуатации.

5. Социальная ответственность

Введение

В разделе «Социальная ответственность» рассмотрены вопросы охраны труда, связанные с работой в химической лаборатории, а также мероприятий по предотвращению воздействия на здоровье опасных и вредных факторов для работников лаборатории и создания безопасных условий труда для обслуживающего персонала в ходе выполнения работ по исследованию физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах [39]. При исследовании холестерина одной из основных задач является внедрение на всех рабочих местах совершенных средств техники безопасности и безвредных условий труда, обеспечения санитарно-гигиенических условий, устраняющих производственный травматизм и профессиональные заболевания.

В рамках выпускной квалификационной работы (ВКР) и в соответствии с темой работы «Исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах для мониторинга пищевых продуктов» рабочим местом является лаборатория № 115 химического корпуса ТПУ размером 36 м², где и выполнялась данная работа. Рабочей зоной лаборатории считаем пространство высотой 3 м от уровня пола. Рабочее место можно считать постоянным, т.к. работающий находится в нем не менее половины рабочего времени или более двух часов непрерывно. В лаборатории установлена отопительная система.

В соответствии с СП 60.13330.2012, устанавливается объем производственного помещения не менее 15 м³ на одного работника, для обеспечения нормальных условий труда. В лаборатории № 115 работает 4 работника, что удовлетворяет правилам.

В Федеральном законе РФ от 28 декабря 2013 г. N 426-ФЗ "О специальной оценке условий труда" Статья 3. Специальная оценка условий

труда говорится, что необходимо выявить все вредные и опасные факторы для оценки их влияния на работника. Выполнение научно-исследовательской работы по данной тематике требует четкого соблюдения правил по технике безопасности и охраны труда работников: при работе с химическими реактивами; едкими и ядовитыми веществами, при работе с электрооборудованием и т.п.

5.1. Профессиональная социальная безопасность

Опасные и вредные факторы при работах по исследованию окисления холестерина на химически-модифицированных электродах представлены в таблице 5.1

Таблица 5.1 - Основные элементы производственного процесса, формирующие опасные и вредные факторы.

Наименование видов работ и параметров производственного процесса	Ф а к т о р ы (ГОСТ 12.0.003-74 ССБТ)		Нормативные документы
	Вредные	Опасные	
1	2	3	4
Работа с электрическими приборами (электроплита, анализатор)	- отклонение показателей микроклимата в помещении; - шум.	- Электрический ток;	-ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности. -СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений. - СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий. – М.: Госкомсанэпиднадзор, 2003.
Работа с химическими реактивами	токсические; раздражающие; сенсibilизирующие; канцерогенные; мутагенные; влияющие на репродуктивную функцию; по пути проникания в организм человека через:		-ГОСТ 12.1.005–88 (с изм. №1 от 2000 г.). ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны (01. 01.89). СанПиН 2.1.6.1032-01. -Гигиенические требования к обеспечению качества атмосферного воздуха населенных мест. – М.: Госкомсанэпиднадзор России, 2001.

	органы дыхания; желудочно-кишечный тракт; кожные покровы и слизистые оболочки; -освещенность рабочего места.		
--	--	--	--

5.1.1. Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению

Работа в аналитической лаборатории требует соблюдение техники безопасности, охраны труда работников, индивидуальной защиты. Условия труда должны быть максимально безвредными.

Научно-исследовательская работа по теме: «Исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах для мониторинга пищевых продуктов» связана с химическими реактивами, и посудой, электроприборами. Используются вредные и опасные химические вещества, при несоблюдении мер безопасности они могут причинить вред здоровью и угрозу жизни.

В аналитической лаборатории химик - аналитик подвергается физическим факторам: параметры микроклимата (температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха), параметры световой среды (искусственное освещение (освещенность) рабочей поверхности).

При нарушении санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории на работников могут воздействовать неблагоприятные факторы производственной среды. Основными из них являются, прежде всего, контакт с токсичными химическими веществами, значительное напряжение зрения при выполнении анализов, работе с приборами и взвешивании на аналитических весах. Характеристика химических веществ, используемых при выполнении НИР, согласно ГН 2.2.5.1313-03, представлена в таблице 5.2.

Таблица 5.2 - Характеристика химических веществ

№	Наименование	Физические свойства	Величина ПДК, мг/м ³	Класс опасности	Токсическое действие
1	Конц. серная кислота	Бесцветная маслянистая жидкость, переходящая при 10, 4°С в твёрдую кристаллическую массу	1	2	Поражает дыхательные пути, кожу, слизистые оболочки. Вызывает затруднение дыхания, кашель, нередко ларингит, трахеит, бронхит.
2	Конц. уксусная кислота	Бесцветная вязкая маслянистая жидкость со специфическим запахом.	5	3	Вызывает серьезное раздражение дыхательных путей и кожи с возможными ожогами

Минимизировать возможный незначительный риск для здоровья в процессе выполнения работы и снизить содержание реактивов в воздухе рабочей зоны позволили следующие мероприятия:

1. Использование средства индивидуальной защиты (очки, щитки, маски, респираторы, резиновые перчатки, спецодежда).
2. Герметизация тары хранения и оборудования для проведения реакции.
3. Вытяжная система вентиляции (вытяжной шкаф). Так как работа связана с малыми количествами опасных веществ, и не превышает ПДК веществ, указанных в таблице 2, то меры безопасности являются: соблюдение техники безопасности, использование индивидуальных средств защиты, работа в вытяжном шкафу, наличие вентиляции.

Микроклимат

Показателями метеорологических условий производственной среды согласно ГОСТ 12.1.005 – 89 являются температура, относительная влажность и скорость движения воздуха. Негативные значения показателей микроклимата становятся причиной уменьшения производственных показателей в работе, простуды, радикулита, хронического бронхита и многих других заболеваний. Устанавливаются оптимальные и допустимые значения этих параметров с

учетом избытка теплоты, тяжести выполнения работ и сезонов года. В таблице 5.3 представлены нормы показателей метеорологических условий в рабочей зоне, которые соблюдаются в данной лаборатории.

В соответствии с СанПиН 2.2.4.548–96, работа в лаборатории, выполняемая в положении стоя или сидя, и требующая определенного физического напряжения, связанная с постоянной ходьбой, перемещение мелких (до 1 кг) изделий или предметов относится к физической работе (категория IIa).

Таблица 5.3 – *Оптимальные нормы микроклимата в рабочей зоне производственных помещений*

Сезон года	Категория тяжести выполняемых работ	Температура, °С		Относительная влажность, %		Скорость движения, м/с	
		Фактич.	Опт.	Фактич.	Опт.	Фактич.	Опт.
Холодный	IIa	18	19-21	50-40	60-40	0,2	0,2
Теплый	IIa	24	20-22	50-40	60-40	0,2	0,2

К средствам коллективной защиты можно отнести установки кондиционирования воздуха, основная задача которых поддерживать параметры воздуха в установленных пределах, для обеспечения надежной работы и комфортных условий для работников.

В лаборатории необходимо создать приток свежего воздуха. Воздух, который используется для вентиляции лаборатории, должен быть очищен от пыли.

Для обеспечения допустимых норм микроклимата в рабочей зоне необходимо установить в холодный период времени отопительную систему.

Освещенность

О важности вопросов производственного освещения в лаборатории говорит то, что условия деятельности персонала связаны с преобладанием зрительной информации. Неудовлетворительное и некачественное освещение утомляет зрение, может стать причиной его снижения, реже слепоты. Плохо освещенные участки рабочего места могут стать причиной травматизма.

Источник естественного освещения – поток энергии солнца. Естественное освещение является наиболее гигиеничным. Однако по условиям зрительной работы в лаборатории естественного освещения, как правило, недостаточно, поэтому на рабочих местах оказывается задействованным и искусственное освещение.

Оно может быть обеспечено с помощью люминесцентных ламп ЛВ (белого цвета) мощностью 20, 40, 80 Вт. Для рабочих мест с искусственным освещением регламентирована допустимая освещенность, согласно действующим санитарным нормам и правилам СП 52.13330.2011.

Согласно СП 52.13330.2011, лаборатория, в которой проводятся работы, относится к I группе помещений по задачам зрительной работы, в которых производится различение объектов зрительной работы, при фиксированном направлении линии зрения работающих на рабочую поверхность, а именно взвешивание малых количеств веществ (стандарта холестерина).

В таблице 5.4 приведены нормы искусственного освещения.

Таблица 5.4 – Нормы искусственного освещения

Характеристика зрительной работы	Разряд зрительной работы	Искусственное освещение	
		Освещенность, лк	
		При комбинир. освещении	При общем освещении
Наивысшей точности	I	5000	1500

Шум

Шум является одним из наиболее распространенных вредных факторов на производстве, он крайне негативно влияет на здоровье человека. Длительное воздействие шума вызывает ухудшение слуха, реже приводит к глухоте, но также уменьшается внимание и увеличивается расход энергии человеком при выполнении какого – либо вида работ.

Согласно ГОСТ 12.1.003 – 83, нормируемой шумовой характеристикой рабочих мест при шуме являются уровни звуковых давлений в децибелах в октавных полосах. В таблице 5.5 приведены допустимые уровни звукового давления на рабочем месте.

Для рабочего места характерно наличие шумов: установки кондиционирования создают аэродинамический шум, преобразователи напряжения – электрический.

Таблица 5.5 – *Допустимы уровни звукового давления на рабочем месте*

Вид деятельности	Частота, Гц							
	Уровень звукового давления, дБ							
	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000
Научная деятельность	71	61	54	49	45	42	40	38

В соответствии с ГОСТ 12.1.003 – 83 должны проводиться работы по снижению шума в помещениях лаборатории. Для подобных целей используются шумобезопасная техника, звукоизоляция, звукопоглощение, рациональная планировка помещения и т.д.

5.1.2. Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (*техника безопасности*)

Электробезопасность

Электробезопасность установок, к которым относится оборудование, представляют предмет особого внимания.

Влияние тока на человеческий организм можно описать с позиции:

- 1) термического действия – вызывает ожоги, нагрев внутренних тканей;
- 2) электролитического действия – характеризуется разложением органических жидкостей (крови);
- 3) механического действия – характеризуется разрывом тканей, перелом костей;
- 4) биологического действия – раздражение и возбуждение живых тканей в организме, нарушение внутренних биоэлектрических процессов и т.д.

Строгое выполнение организационных и технических мероприятий при проведении работ с электроустановками, очень важно в целях предупреждения электротравматизма, кроме этого используют средства защиты, к которым относятся: электрическая изоляция токоведущих частей, защитное заземление и отключение, электрическое разделение сети. Использование этих средств позволяет обеспечить защиту людей от прикосновения к токоведущим частям, от опасности перехода напряжения к металлическим нетоковедущим частям, от шагового напряжения.

Преднамеренное соединение с землей металлических нетоковедущих частей, которые могут оказываться под напряжением, называют защитным заземлением (ГОСТ 12.1.009 – 76). Чтобы защитить человека от поражения электрическим током, защитное заземление должно удовлетворять ряду требований, изложенных в ПУЭ и ГОСТ 12.1.030 – 81 “ССВТ. Электробезопасность. Защитное заземление. Зануление”. Эти требования зависят от напряжения электроустановок и мощности источника питания.

Особое внимание необходимо уделять защите от статического электричества. Для его снижения применяют специальное покрытие полов, которое выполнено из линолеума антистатического поливинилхлоридного. К другому методу защиты можно отнести нейтрализацию зарядов ионизированным воздухом.

При выполнении данной научно-исследовательской работы использовались следующие электроприборы: весы аналитические лабораторные, спектрофотометр, анализатор TA-Lab и т.д.

Все помещения лаборатории соответствуют требованиям электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79.

Все электрооборудование с напряжением свыше 36 В, а также оборудование и механизмы, которые могут оказаться под напряжением, заземлены.

Помещение лаборатории согласно ГОСТ Р12.1.019-2009 является помещением без повышенной опасности по условиям опасности поражения электрическим током, в котором отсутствуют условия, создающие повышенную или особую опасность. Для предотвращения воздействия тока на человека в лаборатории выполнялись следующие условия:

1. ограждения токоведущих частей;
2. применение блокировки аппаратов и ограждающих устройств для предотвращения ошибочных операций и доступа к токоведущим частям;
3. применение предупреждающей сигнализации, надписей;
4. целостность электрооборудования.

Кроме того, для адекватной работы приборов в помещении поддерживались следующие условия:

1. температура окружающей среды 20 °С;
2. относительная влажность 40 - 50%;
3. окружающая среда — невзрывоопасна, не содержащая значительного количества токопроводящей пыли, агрессивных газов.

Безопасность работы обеспечена в конструкции электрооборудования. Металлический корпус приборов исключает возможность прикосновения к токоведущим частям, имеется зануление (класс защиты 1). В электрической схеме оборудования предусмотрен выключатель со световой сигнализацией для включения прибора.

Правила пожарной безопасности в лаборатории

При работе в лаборатории опасность пожаров и взрывов зависит от физико-химических свойств и количества имеющихся в лаборатории материалов, веществ, от конструктивных особенностей и режима работы оборудования, а также от наличия источников загорания и условий для быстрого распространения огня.

В Национальном Исследовательском Томском политехническом университете, где проводились исследования, предприняты все необходимые по нормативным документам меры для предотвращения возникновения пожаров. При возникновении пожара необходимо принять все меры по его локализации и тушению. Для этого всегда обеспечен проход между лабораторными столами, выходы не загромождены. При возникновении загорания все сотрудники знают инструкции и план эвакуации, в соответствии с заранее разработанной программой.

Для тушения возможного загорания и пожаров лаборатория оснащена специальным оборудованием:

1. огнетушитель углекислотный газовый типа ОУ-2 для тушения всех видов горючих веществ и электроустановок, кроме веществ, горящих без доступа воздуха;
2. ручной пенный огнетушитель ОХП, применяемый для тушения установок, находящихся под напряжением.
3. порошковый огнетушитель ОПС-10, предназначен для тушения небольших очагов возгорания щелочных металлов.
4. асбестовое одеяло, которое используется при тушении обесточенных электропроводов, горячей одежды.
5. ящик с песком для тушения обесточенных горящих на горизонтальной поверхности проводов.

Для обнаружения пожара, оповещения и эвакуации людей установлена система пожарной сигнализации и разработан план эвакуации (рисунок 5.1), с которым ознакомлены сотрудники лаборатории.

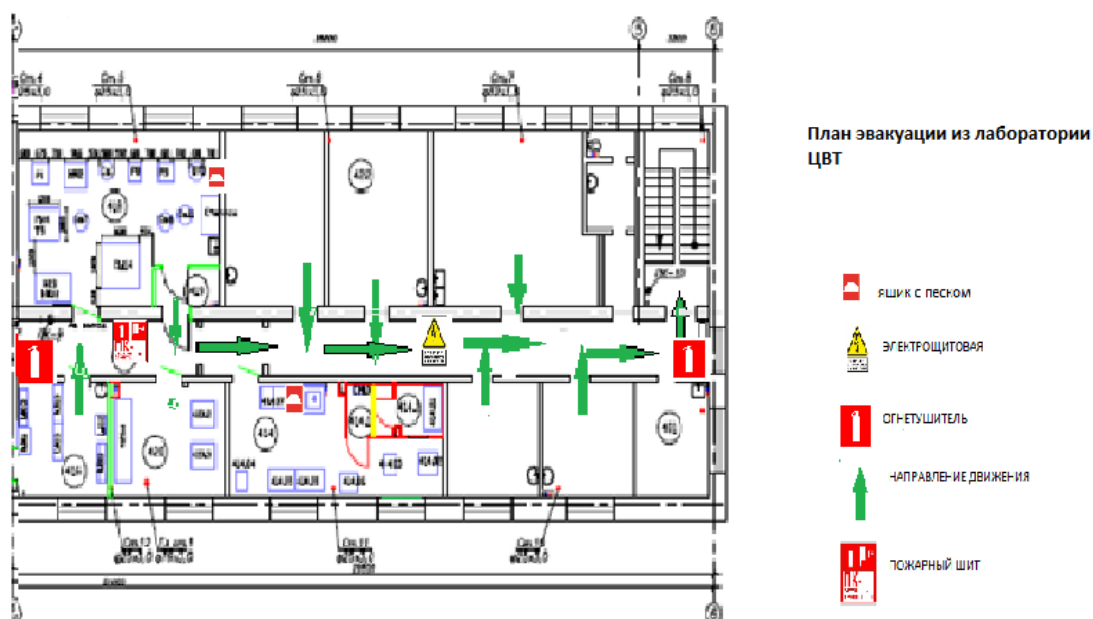


Рисунок 5.1 - План эвакуации при возникновении пожара в лаборатории № 115 в Томском политехническом университете, корпус №2.

Таким образом, лаборатория, оснащена всеми противопожарными устройствами и соответствует требованиям пожарной безопасности.

5.2. Экологическая безопасность (охрана окружающей среды)

Аналитическая деятельность по определению холестерина не связана с выбросом вредных веществ, следовательно, выбросов в атмосферу и литосферу нет. Что касается сбросов в гидросферу, то канализационные стоки от деятельности сбрасываются в общегородскую канализацию.

В случае поломки основного оборудования лаборатории — электроприборов, оргтехники и т.д, не подлежащей ремонту, их должны рационально складировать и провести захоронение отходов, обезвреживание и их утилизацию.

Для случая люминесцентных ламп, необходимо заключить договор с фирмой, занимающейся их утилизацией, чтобы своевременно поставлять вышедшие из строя или перегоревшие лампы, с целью уменьшения вреда окружающей среды из-за наличия в лампах такого опасного вещества, как ртуть.

5.3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Чрезвычайная ситуация (ЧС) – это неожиданная, внезапно возникшая обстановка на определенной территории или объекте в результате аварии, катастрофы, опасного природного явления или стихийного бедствия, которые могут привести к человеческим жертвам, ущербу здоровью людей или окружающей среде, материальным потерям и нарушению условий жизни людей.

Техногенные ЧС связаны с техническими объектами. К ним относят: взрывы, пожары, аварии на химически опасных объектах, выбросы радиоактивных веществ, на радиационно-опасных объектах, обрушение зданий, аварии на системах жизнеобеспечения и др.

Своевременное и грамотное использование средств защиты является эффективной защитой человека в ЧС. К средствам защиты относят средства индивидуальной защиты (СИЗ) и коллективные средства защиты (КСЗ).

По назначению СИЗ классифицируют для защиты органов дыхания и кожи, а по принципу действия на фильтрующие и изолирующие.

Для защиты от поражающих факторов ЧС, используются КСЗ. К поражающим факторам относят высокие температуры, вредные газы при пожаре, взрывоопасные, радиоактивные, сильнодействующие ядовитые и отравляющие вещества; ударная волна.

В результате каких – либо неисправностей оборудования может возникнуть аварийная ситуация. Создание лаборатории, размещенной в

высотном здании, с большим штатом работающих, придает значение вопросам вынужденной эвакуации из них людей при пожаре и в ситуациях иного рода.

Одной из основных причин гибели людей при пожаре является ни огонь и температура, а токсичные продукты горения. Поэтому противодымная защита зданий, направленная на не задымлённость эвакуационных путей, отдельных помещений и удаление продуктов горения в определенном направлении, является первостепенной задачей противопожарной профилактики. В надлежащих местах должны быть вывешены планы эвакуации людей из здания.

Стихийные бедствия возникают внезапно и характеризуются возможностью гибели людей, возможностью разрушения населенных пунктов и объектов народного хозяйства. В климатической зоне г.Томска возможны ураганы, сильные грозы, паводки и ливни. Т.к. химический корпус находится в отдаленной зоне от разлива реки, то паводок ему не грозит.

В результате порывов ветра могут быть обрывы линий электропитания, из-за чего возможны перебои в электроснабжении; перегрузки, которые могут стать причиной пожара. Для предотвращения подобных ситуаций необходима организация системы аварийного электропитания, по возможности проведение линии электроснабжения под землей.

5.4. Правовые вопросы обеспечения безопасности

Разработка ВКР занимает немало времени, но в тоже время она совмещена с учебным процессом студента, в связи с чем по трудовому законодательству Российской Федерации было принято допущение, что выполнение ВКР считается за работу по совместительству, т.е. не более 4 часов в день или 20 часов в неделю при пятидневном графике работы.

Работа в лаборатории не относится к вредной, поэтому не предусматривается никаких компенсаций, применение спецпитания и особого лечебно-профилактического обслуживания. Также работники не привлекаются ни к работе в ночное время, ни к сменному графику работы. Все работники без

исключения подлежат обязательному медицинскому страхованию, пенсионному обеспечению.

С точки зрения охраны окружающей среды, выполнение работы на тему “Исследование физико-химических закономерностей окисления холестерина на химически модифицированных электродах для мониторинга пищевых продуктов”, не оказывает никакого влияния на окружающую среду и нет необходимости в его контроле со стороны служб производственного контроля санитарных правил и норм, и служб общественного экологического контроля.

Для решения вопросов о чрезвычайных ситуациях, создана комиссия, которая занимается финансовыми, продовольственными, медицинскими и информационными проблемами, связанными с возникновением чрезвычайной ситуации.

Заключение

В настоящее время для определения холестерина в биологически жидкостях человека наиболее часто в клинической практике применяются ферментативные наборы, основанные на принципах «сухой химии» и спектрофотометрические анализаторы с применением ферментативных систем. Для определения содержания холестерина в продуктах питания Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) рекомендует применение высокоэффективной жидкостной хроматографии с реверсивной фазой и УФ-детектированием при 210 нм. Применение электрохимических методов анализа позволяет разработать универсальную методику определения холестерина, подходящую для работы с объектами различной природы. Кроме того, такие достоинства вольтамперометрии, как простота аппаратного оформления, возможность автоматизации и минитюаризации, а также экспрессность — позволяют изготавливать тест-системы для индивидуального point-of-care мониторинга.

Одним из важнейших этапов создания любой методики является оценка влияния различных факторов на аналитический сигнал исследуемого вещества. В вольтамперометрии с применением ХМЭ к таким факторам относят: прежде всего, материал рабочего электрода, природа модификатора, природа фонового электролита и pH рабочей среды.

В практике электрохимических исследований и анализа получили распространение различные материалы индикаторных электродов. Выбор материала электрода напрямую зависит от поставленной задачи, природы определяемого вещества, определяемой концентрации, природы фонового электролита. Одним из основных требований к материалу рабочего электрода является возможность получения воспроизводимого аналитического сигнала с применением данного электрода. При исследовании электрохимического поведения холестерина в качестве материалов индикаторного электрода были исследованы стеклоуглеродный электрод и углеродсодержащий электрод с

обновляемой поверхностью. В ходе проведения исследований был обнаружен четкий и воспроизводимый аналитический сигнал холестерина на стеклоуглеродном электроде, на УЭОП также получен сигнал, однако из-за особенностей поверхности (необходимость периодического обновления) полученный сигнал обладает более низкой по сравнению с сигналом на СУЭ воспроизводимостью. Поэтому, в дальнейшем, для создания методики использовали более стеклоуглеродный электрод.

Данная работа была направлена на определение холестерина электрохимическим методом с использованием ХМЭ и разработку методики определения его в пищевых продуктах.

Вследствие чего были подобраны оптимальные условия определения холестерина на химически модифицированном электроде, выявлены закономерности окисления холестерина, разработана методика.

Список публикаций

1. Чулкова (Головнина) И. В. Определение холестерина как социальная проблема современности [Электронный ресурс] // Современные техника и технологии: сборник трудов XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: в 2 т, Томск, 5-9 Октября 2015. - Томск: ТПУ, 2015 - Т. 2 - С. 335-338.
2. Dyorina K. V. , Dorozhko E. V. , Voronova O. A. , Golovnina (Chulkova) I. V. , Korotkova E. I. Cholesterol determination in food by voltammetry on modified carbon electrodes // XVIII Euro Food Chem - 2015, Madrid, October 13-16, 2015. - Madrid: Complutense University of Madrid, 2015 - p. 96.
3. Golovnina (Chulkova) I. V. , Dyorina K. V. , Tayshibekova E. K. The modified electrode for the determination of cholesterol // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. - Томск: ТПУ, 2015 - Т. 2 - С. 195-196 .
4. Dyorina K. V. , Golovnina (Chulkova) I. V. , Dorozhko E. V. , Korotkova E. I. , Tayshibekova E. K. Comparison of enzymatic and nonenzymatic sensors for cholesterol detection // Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи - 2015: тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне, Иркутск, 18-22 Мая 2015. - Иркутск: ИрГУ, 2015 - С. 291-292.
5. Чулкова (Головнина) И. В. , Тайшибекова Е. К. , Дёрина К. В. Определение содержания холестерина при помощи некоторых гетероциклических соединений [Электронный ресурс] // Ломоносов - 2015: материалы Международного молодежного научного форума, Москва, 13-17 Апреля 2015. - Москва: МАКС Пресс, 2015 - С. 53.
6. Чулкова (Головнина) И.В., Дёрина К.В. Сравнительные характеристики не ферментативных методик определения холестерина в

пищевых продуктах // Ломоносов - 2016: материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Москва, 11-13 Апреля 2016. - Москва: МАКС Пресс, 2016 - С. 33

Список использованных источников

1. G.A. Roth, S.D. Fihn, A.H. Mokdad, W. Aekplakorn, T. Hasegawa, S.S. Lim High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries//Bulletin of the World Health Organization, Feb 1, 2011; 89(2): p. 92–101.
2. Моисеев В.С. Сердечно-сосудистый риск и хроническая болезнь почек: стратегии кардио-нефропротекции / Моисеев В.С., Мухин Н.А., Смирнов А.В., Кобалава Ж.Д., Бобкова И.Н., Виллевальде С.В., Ефремовцева М.А., Козловская Л.В., Швецов М.Ю., Шестакова М.В. Российский кардиологический журнал – 2014 – Т.8, №112 – С. 7–37.
3. Н.А. Коваленко-Клычкова, В.М. Кенис, И.Ю. Клычкова. Пороки развития кистей и стоп при синдроме Смита – Лемли – Опитца. Травматология и ортопедия России. 2013-3(69). с. 143.
4. Al-Owain M. Smith-Lemli-Opitz syndrome among Arabs/ Al-Owain M., Imtiaz F., Shuaib T.// Clin. Genet. – 2012 – Vol. 82(2) – pp.165-172
5. Л. Физер, М. Физер. Стероиды. Перевод с английского. Изд. «Мир»., М. – 1964, 983 с.
6. Т. Березов, Б.Коровкин Биологическая химия. Москва: «Медицина», 2008, 704 с.
7. Российское кардиологическое общество [Электронный ресурс] Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза URL: http://scardio.ru/content/Guidelines/rek_lipid_2012.pdf, свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус. Дата обращения: 15.03.2016 г.
8. S. Sitaula, T.P. Burris Cholesterol and Other Steroids / Encyclopedia of Cell Biology – 2016 – Vol. 1: Molecular Cell Biology – pp. 173–179.

9. T. Róg, I. Vattulainen Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes? / // Chem. Phys. Lipids – Vol. 184 – 2014 – pp. 82–104.
10. A. Norman, H. Henry Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis, and Metabolism, Hormones, London: Academic Press – 2015 – pp. 27-53.
11. H. Giang, M. Schick On the puzzling distribution of cholesterol in the plasma membrane / Chemistry and Physics of Lipids, In Press, Corrected Proof, Available online 24 December 2015.
12. G. Ness Physiological feedback regulation of cholesterol biosynthesis: Role of translational control of hepatic HMG-CoA reductase and possible involvement of oxysterols / Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids – Vol. 1851, Iss. 5 – 2015 – pp. 667–673.
13. R. Hamm, Y.-R. Chen, E. Seo, M. Zeino, C. Wu, R. Müller, N.-S. Yang, T. Efferth Induction of cholesterol biosynthesis by archazolid B in T24 bladder cancer cells / // Biochemical Pharmacology – Vol. 91, Iss. 1 – 2014 – pp.18–30.
14. Genowefa Bonczar. Effect of dairy animal species and of the type of starter cultures on the cholesterol content of manufactured fermented milks. Small Ruminant Research 136 (2016) pp. 22–26
15. Холестерин в продуктах питания [Электронный ресурс]. URL: http://www.fat-down.ru/table_cholesterol, свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус. Дата обращения: 15.03.2016 г.
16. J. W. Morzycki Recent advances in cholesterol chemistry / Steroids –Vol. 83 – 2014 – pp. 62-79
17. Гёрёг Ш. Количественный анализ стероидов: Пер. с англ.- М.: Мир, 1985.-504 с. Ил.
18. T. Dinh Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination / T. Dinh, L. Thompson // Reference Module in Food Science, from Encyclopedia of Food and Health, 2016, Pages 60-69

19. Yan-Zong Chen, Shih-Yao Kao, Hao-Cheng Jian, Yu-Man Yu, Ju-Ying Li, Wei-Hsienang, Chung-Wei Tsai. Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry / Journal of Food and Drug Analysis. 2015. Vol. 23, Iss. 4, pp. 636–644.
20. T. Gonçalves Albuquerque, M. Oliveira, A. Sanches-Silva, H. S. Costa Albuquerque Cholesterol determination in foods: Comparison between high performance and ultra-high performance liquid chromatography // Food Chemistry – Vol. 193 – 2016 – pp. 18–25
21. F. Jeanneret, D. Tonoli , M. F. Rossier, M. Saugy, J. Boccard, S. Rudaz Evaluation of steroidomics by liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry as a powerful analytical strategy for measuring human steroid perturbations //Journal of Chromatography A – Vol.1430 – 2016 – pp.97–112
22. Jinu John. Development and validation of a high-performance thin layer chromatography method for the determination of cholesterol concentration. Journal of food and drug analysis 23 (2015) 219 – 224. Published by Elsevier, Taiwan.
23. Elizabeth B. Solow, L. W. Freeman. A fluorometric ferric chloride method for determining cholesterol in cerebrospinal fluid and serum. CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 16, No. 6, pp. 472-476, 1970.
24. S. R. Mikkelsen Bioanalytical chemistry / S. R. Mikkelsen, E. Corton, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, P.361
25. Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств//Соросовский образовательный журнал, №3, выпуск 10, 1998/под. ред. Сойфер В.Н.
26. U.Saxena Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: Key roles and design approaches / U. Saxena, A. Bikas Das // Biosensors and Bioelectronics – Vol. 75 – 2016 – pp.196–206
27. Ksenia V. Derina et al. Voltammetric sensor for total cholesterol determination. Procedia Chemistry 10 (2014) pp. 513 – 518.

28. Tetsuaki Yamada. Simple high-density lipoprotein cholesterol assay based on dry chemistry. *Clinica Chimica Acta* 320 (2002) pp. 79–88
29. Варфоломеев С. Д. Биосенсоры, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 1997
30. Arkady A. Karyakin Principles of direct (mediator free) bioelectrocatalysis//*Bioelectrochemistry* 88 (2012), p. 70–75.
31. P.N. Bartlett *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental techniques and Applications* / P.N. Bartlett, Wiley&Sons, Ltd. 2008, P. 478
32. M.V. Mirkin *Nanoelectrochemistry* / M.V. Mirkin, S. Amemiya, CRC Press Taylor&Francis Group, LLC, Abingdon, 2015, P. 506
33. K. Santoro *Biosensors* / K. Santoro, C. Ricciardi// *Encyclopedia of Food and Health*, New York:Academic Press, 2016 – 500p.
34. A.K. Upadhyay, Tzu-Wei Ting, Shen-Ming Chen Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on coimmobilized horseradish peroxidase and methylene green in ormosils matrix with multiwalled carbon nanotubes // *Talanta* – Vol. 79 – 2009 –pp. 38–45
35. L. Lin An electrochemical biosensor for determination of hydrogen peroxide using nanocomposite of methylene blue / L. Lin, C.-Y. Yin, S.-M. Chen // *Sensors and Actuators B: Chemical* – Vol. 157, Iss. 1 – 2011 – pp. 202–210
36. K. B. Oldham *Electrochemical Science and Technology: Fundamentals and applications* / K. B. Oldham, J. C. Myland, A. M. Bond – New York: John Wiley & Sons – 456 p.
37. Галюс З. Теоретические основы электрохимического анализа. М.: Мир, 1974. - 552. с.
38. Гаврикова Н.А. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение: учебно-методическое пособие / Н.А. Гаврикова, Л.Р. Тухватулина, И.Г. Видяев, Г.Н. Серикова, Н.В. Шаповалова; Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2014. – 73 с.

39. Крепша Н.В. Методические указания по разработке раздела «Социальная ответственность» выпускной квалификационной работы бакалавров и магистров Института природных ресурсов /Сост. Н.В. Крепша. – Томск: Изд-во ТПУ, 2014. – 53 с.

Приложение А

1.4. Methods for determination of cholesterol

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4В	Чулкова Ирина Васильевна		

Консультант кафедры ФАХ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Короткова Е.И.	Д.Х.Н.		

Консультант – лингвист кафедры ОХХТ :

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Рыманова И.Е.			

1.4. Methods for determination of cholesterol

1.4.1. Colorimetric methods for the determination of cholesterol

Of the classical colorimetric methods for the determination of sterols (in most cases cholesterol), the procedure known as the Liebermann-Burchard method is undoubtedly the most significant. The assay is based on measurement of the greenish-blue colour formed when cholesterol is treated with an acetic anhydride-sulphuric acid reagent. The proportion of acetic anhydride to sulphuric acid varies between 20:1 and 5:1, and many papers report dilution of the reagent with various solvents (mainly chloroform and acetic acid). The reagent of Abell *et al.*, which seems to be the most widely used variant of the Liebermann-Burchard reagent, is prepared by mixing 1 volume of concentrated sulphuric acid with 20 volumes of acetic anhydride chilled below 10°C, followed by adding 10 volumes of glacial acetic acid to the cold mixture after it has stood for 9 min. The reagent should be used within 1 h. The sterol to be determined is dissolved directly in this reagent. The rate of colour development and the stability of the colour depend on the temperature employed. The above workers suggest a reaction time of 30-35 min at 25°C [14]. Huang *et al.* obtained a stable reagent (usable for a month if kept in a refrigerator) by preparing a 2% solution of sodium sulphate in a 6:3:1 mixture (by volume) of acetic anhydride, acetic acid and sulphuric acid. The use of this reagent has often been referred to up to the present [15, 17].

The coloured product exhibits two absorption maxima, at about 420 and 620 nm. The sensitivity of the method is rather low: molar absorptivities ranging between 1800 and 2000 can be calculated for cholesterol from the absorbances presented by various authors.

Of the other colorimetric methods, only that of Zlatkis, Zak *et al.* is of comparable importance to the Liebermann-Burchard procedure. The reagents in the numerous modifications of the original procedure contain acetic acid, sulphuric acid and iron (III) chloride. The proportion of sulphuric and acetic acids in the final

reaction mixture is usually about 40:60 by volume, and the concentration of iron about 10 mg per 100 ml. A purple colour with absorption maximum at 560 nm is formed almost instantaneously, the molar absorptivities of cholesterol and its esters being identical. The main advantage of this method as compared to the Liebermann-Burchard procedure is that its sensitivity is about eight times higher [16, 17].

The application of the Chuagev reagent (zinc chloride and acetyl chloride in acetic acid) is also worth mentioning. A red-pink colour with absorption maximum at 526 nm. The intensity of the maximum for cholesterol is between those of the previously discussed two methods [15, 17].

1.4.2. Application fluorescence phenomena to determine cholesterol

During the treatment of cholesterol with reagents containing high concentrations of sulphuric acid, with the aim of its colorimetric determination (discussed in the preceding section), the formation of colour is usually accompanied by fluorescence, which serves as the basis of much more sensitive methods than the original colorimetric procedures.

For example, Albers and Lowry transformed cholesterol in tissue extracts to fluorophoric derivative by treating it with a Liebermann-Burchard-like reagent (the extract is treated with 6 μ l sulphuric acid after having been dissolved in 150 μ l of a 5:1 mixture of 1,1,2-trichloroethane and acetic anhydride). Cholesterol and its esters give very similar, fairly stable fluorescence intensities when the measurement is based on the red fluorescence emitted with the 546 nm mercury line as the exciting source. As little as 0.1 μ g cholesterol can be determined by this method [17, 18].

Recently, Majeski et al. described the fluorimetric version of the Salkowski reaction. Equal volumes of concentrated sulphuric acid and of dichloromethane containing the cholesterol to be determined are mixed and vigorously shaken, and the fluorescence of the sulphuric acid layer is measured at 450 nm, the wavelength of the exciting light being 415 nm. This method is much less sensitive than the above Albers-Lowry method, but it still allows cholesterol to be determined in 250 μ g

samples of serum [17].

The application of the iron (III) chloride-sulphuric acid reagent (dissolved in ethyl acetate) affords a sensitive method for the determination of 0.1-5 gg cholesterol. This method has been successfully applied to the determination of cholesterol in the lipoprotein fractions obtained by agarose gel electrophoresis [17].

1.4.3. Chromatographic methods

Column chromatography

A large proportion of the methods for the quantitative analysis of sterols begin with column chromatographic fractionation of the sample. The aim of this step may be the separation of the sterol fraction from other lipids in the sample, or fractionation of the sterols to increase the selectivity of the subsequent analysis. Fractionation at this stage is useful even if the analysis is carried out by highly selective methods such as high-performance liquid chromatography or gas chromatography: without the preliminary fractionation, the chromatograms of complex sterol mixtures would be too crowded.

The most frequently used adsorbents for the fractionation of sterols are silica gel, alumina or (if the separation is intended to be carried out according to the degree of unsaturation) the same adsorbents coated with silver nitrate. Gel chromatography on Sephadex-LH-20 or its hydroxy-alkoxypropyl derivative (Lipidex) has also gained great importance [17].

Thin-layer chromatography

Thin-layer chromatography is a very important method for the identification of sterols, as well as their separation from other materials and also from each other for subsequent analysis.

As sterols are the least polar and most lipophilic group of steroids, it is relatively easy to separate them from other groups of steroids and also from other lipids.

Direct densitometric evaluation of sterols on thin-layer plates is often performed too, mainly in the analysis of various lipids [18]. In some instances the semiquantitative visual comparison of sample and reference spots is sufficient. Of the quantitative densitometric methods, the procedure of Wiklund and Eliasson is a typical example. Cholesterol and its esters are separated from other lipids by TLC on Silica gel G, the plate being developed twice (diethyl ether-acetic acid 99:1, followed by hexane-diethyl ether-acetic acid 85:15:1). The spots are visualized with 70% sulphuric acid saturated with potassium dichromate, coupled with heating at 180°C for 25 min [17].

Other scientists in the method the separation is achieved on silica gel, using a 90:10:1 mixture of light petroleum, diethyl ether and acetic acid. The spray reagent is a 10% solution of phosphomolybdic acid in 95% ethanol, and the chromatogram of cholesterol, its esters and other lipids is scanned in the reflectance mode at 750 nm [17].

Gas chromatography

Since that time, several hundred papers have appeared on this subject, and gas chromatography can now be regarded as undoubtedly the most important chromatographic technique in the quantitative analysis of sterols. The reasons for this are as follows:

- (a) Sterols are relatively stable compounds, even at elevated temperatures, and hence they can easily be chromatographed, in both underivatized and derivatized forms.
- (b) The resolving power of gas chromatography is good enough to separate even structurally closely related sterols and epimeric pairs (with the exception of some “difficult” pairs).

(c) Most of the samples to be analysed for sterols usually contain them in considerable amounts, so that gas chromatography (even if only a flame- ionization detector is used) is sensitive enough for reliable quantitative analyses.

(d) Lengthy separation and clean-up procedures are usually not required before the gas chromatographic analysis.

When the aim of the assay is the quantitative determination of individual sterols, the internal standard technique is usually applied.

In the analysis of multicomponent sterol mixtures, the percentages of the individual components are often calculated from their peak areas relative to the total peak area. This approach, however, can be regarded only as a rough approximation, as the relative responses of the flame-ionization detector for the individual sterols show considerable differences, in spite of their closely related structures [17, 19].

High performance liquid chromatography (HPLC)

The main drawback of HPLC in sterol analysis is that as most of the sterols possess only isolated double bond(s) they are poor UV absorbers: their detection with a sufficient sensitivity can be carried out only below 210 nm, which is a problematic wavelength when samples of biological origin are chromatographed [20]. This difficulty can be overcome by forming the benzoates of the sterols to be separated. In this instance sensitive detection can be achieved at 230 nm, but the resolution decreases [17, 21].

For the rare practical applications of the HPLC method in lipid analysis, reference may be made to Carter et al., who used silica gel columns for the separation of cholesterol and its esters from other serum lipids. An accurate, sensitive, precise, reliable, and quick method for the determination of cholesterol content by high-performance thin layer chromatography is developed. In this method, aluminum-backed precoated silica gel 60 F254 plates were used as the stationary phase and the samples were sprayed with the help of CAMAG sample applicator Linomat 5. The chromatogram was developed with the mobile phase consisting of

chloroform:methanol (9.5:0.5, v/v). The samples were detected using CAMAG Scanner 4 and evaluated using the method developed on winCATS software. Densitometric analysis of cholesterol was performed in absorbance mode at 200 nm. In this solvent system, cholesterol gave a compact spot with an R_f value of 0.63 ± 0.03 . The linear regression analysis of data for the calibration curve showed good linearity over a concentration range of 2 - 7 $\mu\text{g/spot}$ with a regression value of 0.99933 and standard deviation of 1.44%. The limit of detection and limit of quantification were found to be 100 ng/spot and 500 ng/spot, respectively. Using the developed method, the concentration of cholesterol in the saponified and unsaponified egg yolk sample was determined. This method was found to be reproducible and can even be used for samples containing complex matrices [22].

1.4.4. Spectrophotometric method for determination of cholesterol

Sensitive or simple methods for the rapid determination of cholesterol in biological fluids have been developed. Sensitivity has been increased by fluorimetry of the Lieberman-Burchard reaction for cholesterol. Measurement of the reaction of cholesterol with ferric chloride is simpler [23]. Still, there are great differences between the results when different methods are used to measure the microquantities of cholesterol present in small volumes of serum or cerebrospinal fluid. In the proposed method, the simpler ferric chloride technique has been made highly sensitive by use of fluorimetry. As little as 100 μl of cerebrospinal fluid, containing less than 1 g of cholesterol, may be used, and the reaction is stable for as long as 1 h. Interference was negligible from pigments (such as bilirubin and hemoglobin), certain drugs, and ionic substances that might be expected to affect fluorescence [23, 25].

Fluorometric methods are generally more sensitive than spectrophotometric methods, and existing fluorometric methods for cholesterol were modifications of the tedious Lieberman-Burchard reaction. The Tschugaeff reaction also has been applied to fluorimetry. Although the acidferric chloride reaction of Zlatkis et al. has

been accepted as a sensitive spectrophotometric method for the determination of cholesterol, a fluorometric application of this reaction has not been investigated previously [24].

Spectrophotometric determination of cholesterol is carried out according to the reaction-Zack Zlatkis ferric chloride by oxidation of cholesterol in concentrated sulfuric and acetic acids. The result is that the solution becomes red-violet color.

This method examines not only the cerebrospinal fluid and blood serum, but also food.

An important step in this method is the sample preparation stage.

To 1 ml of 2-propanol in a 10 X 75 mm test tube, 100 μ l of cerebrospinal fluid was added. Extraction was facilitated with a Vortex mixing device. Cholesterol standards, treated in the same way as spinal fluid, were diluted to contain 0.25, 0.50, 0.75, and 1 mg/100 ml of 2-propanol. A reagent blank was included, which contained distilled water in place of sample. After 10 min, the extraction mixture was centrifuged to pack the precipitated protein. The entire supernatant fluid was decanted into 4 ml of the premixed acid-ferric chloride reagent in 15-ml glass-stoppered centrifuge tubes. The centrifuge tube was tilted, and the extract allowed to run down the side of the tube. To thoroughly mix the two layers, the test tube was stoppered and promptly shaken by hand. Readings of each tube were taken after exactly 30 min. A cholesterol standard curve was used to calculate the results [23].

1.4.5. Enzymatic methods

In 1973 and 1974 were published papers on the determination of cholesterol in serum, based on enzymatic oxidation and colorimetric determination of the simultaneously formed hydrogen peroxide [17, 24]. This method quickly gained popularity and has been published in many papers.

The analysis of cholesterol is achieved indirectly, via hydrogen peroxide, which is a much less “difficult” compound than cholesterol itself from the analytical point of view.

Neither the colorimetric nor the electroanalytical versions of the method require aggressive reagents, as is often the case with chemical procedures.

The methods are highly sensitive.

This method is based on the following reaction (fig. 1.2):

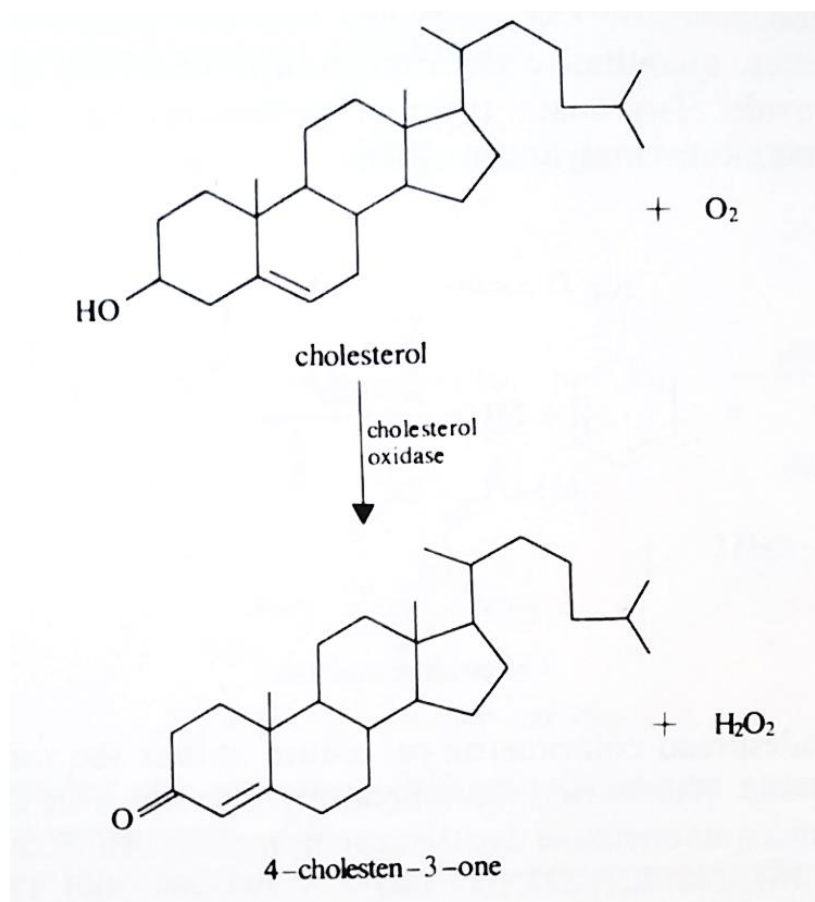
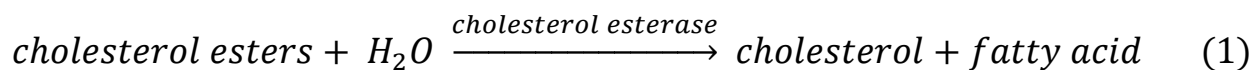


Figure 1.2 - The reaction of the enzymatic oxidation of cholesterol

When the assay procedure is begun with enzymatic oxidation, obviously only free cholesterol is determined. To obtain the total cholesterol content, its esters have to be hydrolysed prior to the oxidation. This is carried out by most workers with cholesterol esterase:



Colorimetric method based on fermentative autooxidation of cholesterol, cholesterol oxidase catalyzed. The resulting hydrogen peroxide is reacted with methanol in the presence of catalase to form formaldehyde which is then subjected to cyclization with ammonia and acetylacetone [17].

For the determination of total cholesterol, prior to analysis is necessary to conduct the hydrolysis of cholesterol esters.

An example is the method of Nobbs. The procedure of Nobbs et al. will be briefly described as a typical example. In this method the reagent contains 550 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1.6 mM methanol, 19 mM acetylacetone, $6.4 \cdot 10^5$ IU catalase, 130 IU cholesterol esterase, 80 IU cholesterol oxidase and 0.1% hydroxypolyethoxydodecane. A 20- μ l sample taken from a mixture of 0.1 ml of plasma and 0.2 ml of water is subjected to reaction with 500 μ l of this reagent at 37°C, and the total cholesterol content is calculated from the change in absorbance at 405 nm within the first 7 min of reaction[17].

Also written in the methods that the presence of hydrogen peroxide and peroxidase oxidizes homovanillic acid n-oksifeniluksusnuyu respectively to form fluorescent compounds [17].

Enzymatic electrochemical methods based determination of cholesterol as in Figure (1) and reaction (2) in which the change amount of hydrogen peroxide or oxygen partial pressure change.

The first possibility was exploited in 1975. In this method the hydrogen peroxide formed is treated with iodide ions [catalyst Mo(VI)]. The decrease in the iodide ion concentration, measured with a iodide-selective membrane electrode, is directly proportional to the concentration of hydrogen peroxide, and hence to that of cholesterol. The calibration graph is linear up to about 5g/l of cholesterol. The reproducibility is comparable to that achieved in the colorimetric procedures, and the measurement can be automated using the AutoAnalyzer system; accordingly, the method seems to be suitable for the routine analysis of serum samples [22].

In another type of measurement the oxygen consumption during reaction 1 is monitored by amperometry, using an oxygen electrode. The dissolved oxygen in the aqueous buffer taken as the solvent for the enzymatic reactions is in excess of the stoichiometric amount of oxygen consumed by cholesterol in reaction 1.

The monitoring of the concentration of oxygen can be carried out using Clark's oxygen electrode, which is a membrane electrode, where the platinum cathode is polarized to about -0.6 V, the reference electrode is Ag/AgCl, the cell is filled with aqueous potassium chloride solution at an alkaline pH and the membrane is permeable to oxygen. When oxygen is reduced at the cathode it is depolarized, resulting in a change in the current, the extent of which is proportional to the change in the partial pressure (concentration) of oxygen.

A third possibility for the electroanalytical-enzymatic determination of cholesterol is the amperometric determination of hydrogen peroxide formed during enzymatic oxidation. This is the basis of the method developed by Huang et al., who devised a "cholesterol electrode" with which the enzymes are used in immobilized form. Hydrogen peroxide is reduced at a platinum electrode at +0.6V vs. a standard calomel electrode. Cholesterol oxidase, alone or together with cholesterol esterase, is immobilized on the surface of a glutaraldehyde-derivatized alkylamine glass and the immobilized enzymes are placed in a porous rotating cell, which is stirred at 1080 rpm with the aid of a built-in bar magnet [25]. Both the kinetic and the total current change methods can be used to determine cholesterol.

The time required to reach a stable current after the addition of the serum sample (15 μ l) is about 10 min. If both free and total cholesterol have to be determined, the stirrer contains only cholesterol oxidase in immobilized form: cholesterol esterase is added in solution to the cell in the second step, as described above. The great advantage of this method is that the immobilized enzymes are very stable (1-2 months when stored refrigerated) and several hundred analyses can be performed with the same enzyme sample. This permits extremely economical analyses to be carried out in routine clinical work [17]. The use of this principle can be expected to undergo rapid development in the near future.

1.4.6. An electrochemical sensor for determination of cholesterol

Due to the simplicity, rapidity and cost, enzymatic procedures have gradually replaced chemical methods based on classical reactions concerning colored complexes formation. But, nevertheless, direct enzymatic methods have some disadvantages, for example, inaccuracy caused by storage conditions of reagents. At the same time electrochemical sensors propose several distinct advantages. These devices are uniquely qualified for meeting a small size, cost effectiveness, low volume and show great promise for a wide range of biomedical and environmental applications [25].

Electrochemical methods based on the use of cholesterol oxidase (ChOx) seem to be very attractive for cholesterol determination because of low prices and, besides, absence of sample preparation procedures. Some biosensors are based on the detection of hydrogen peroxide electrooxidation which is produced while a catalytic oxidation reaction of cholesterol is in the presence of ChOx [26]. Normally, such sensors require a high anodic potential. That may start simultaneous oxidation of other electroactive analytes in the samples, for example, uric acid, ascorbic acid, and produce false positive signals as well. That is why, the second-generation enzyme biosensor, based on the use of an electron mediator, is widely used. Mostly, such sensors are based on the study of an amperometric signal. In recent years, some cholesterol electrochemical biosensor researches focused on the direct electron transfer between ChOx and electrode surfaces. However, there are some difficulties which may restrict analytical efficiency of such sensors. Voltammetry, as an analytical technique, provides more accuracy than amperometric methods. That is why, a voltammetric ChOx [27] based sensor with the use of HRP as a supporting agent on porous graphite has been studied.

1.4.7. Cholesterol determination by the method of dry chemistry

Currently, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), a factor which prevents progression of arteriosclerosis, is measured using laboratory-based chemistry analyzers without a pretreatment step. Because HDL-C is measured with a pretreatment step in many point-of-care testing systems, a direct assay is needed.

A dry-chemistry based assay using surfactants has recently been developed in parallel with the development of a dedicated reagent. A simple analyzer that accepts whole blood samples was also developed [28]. The assay demonstrated excellent precision, dilution linearity and intermethod comparison. In an interference test, assay values tended to be lower in the presence of high concentrations of hemoglobin, conjugated or unconjugated bilirubin. Neither ascorbic acid up to 20 mg/dl, nor formazin turbidity up to 2100, had an effect on the assay.

This dry-chemistry assay using only surfactants for specificity in the direct HDL-C method was judged useful for point-of-care instrumentation in terms of equipment compactness, operational simplicity and rapid responsiveness.

Measurement of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) provides a good index for ischemic heart disease and arteriosclerosis. Until several years ago, it was common practice to measure HDL-C after serum or plasma had been pretreated with both a polyanion, such as of phosphotungstic acid, dextran sulfate or heparin, and a divalent metal ion. Recently, however, the practice has shifted towards assays without a pretreatment step. A direct HDL-C assay is effective in reducing sample processing and reducing assay time. A large number of reagent kits are now available for large automated analyzers.

Although laboratory automation has recently been the trend, it has some drawbacks, including the necessity of high capital investment for equipment and that it cannot be used for point-of-care testing. In addition, lipid test samples are likely to undergo denaturation during sample transportation and storage [28]. In an attempt to overcome these drawbacks, we developed a new simple assay for point-of-care testing focusing on test speed and simplicity.

Dry-chemistry reagent of HDL-C assay is designed to be compatible with the SPOTCHEM EZ; SP-4430 analyzer. The reaction is based on a combination of two kinds of surfactants for selective reactions with HDL-C. It is shown by Surfactants 1 and 2. This direct assay reagent is supplied in strip form, and the reagent portion of the strip comprises a multilayer structure including a sample retention layer, a reagent layer and a support. As soon as the sample is placed on the sample-retention layer from the top, the reaction is initiated with dissolving components in sample-retention layer and reagent layer. Thus, the produced coloring matter spreads over the sample-retention layer and reflectance from the top is measured. This strip is composed of sample-retention layer and reagent layer including reactive ingredients. The upper portion of the sample retention layer contains. Surfactant 1 which does not dissolve lipoproteins. On the other hand, the lower portion of the sample retention layer contains Surfactant 2 dissolves only HDL specifically. Consequentially, Surfactant 2 promotes the reaction of cholesterol in HDL with cholesterol esterase (CE) and cholesterol oxidase (CO). No lipoprotein other than HDL participate in an enzyme reaction. The enzymes and coloring agents required for the reaction are contained in the lower portion of the sample retention layer and the reagent layer. Cholesterol within HDL is brought into a color developing reaction by CE, CO, peroxidase (PO) in the reagent layer and a chromogen, and the developed color is measured using the reflectance method. As such, the present method can be described as a single-step reaction not requiring pretreatment, in contrast to most commercially available reagents. This reduces the reaction time to 5 min. Calibration can be performed by inserting the magnetic card storing the lot information in this system [28].