

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

Институт природных ресурсов
Направление подготовки: химическая технология
Кафедра физической и аналитической химии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы	
Определение глутатиона в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии	
УДК 543.645.4	

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Райфегерст Ксения Владимировна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор каф. ФАХ	Короткова Е.И.	д.х.н., профессор		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Криницына З.В.	к.т.н., доцент		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Шеховцова Н.С.	к.х.н., доцент		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ФАХ ИПР	Пестряков А.Н.	д.х.н., профессор		

Планируемые результаты обучения по ООП

Код результата	Результат обучения
Профессиональные компетенции	
P1	готов применять аналитические методы решения задач, пользоваться информационными технологиями, проводить обработку информации с использованием различных программ
P2	способен применять нормативные документы по качеству, стандартизации и сертификации продуктов и изделий
P3	готов обосновывать результаты при исследовании поставленной задачи
Универсальные компетенции	
P4	способен к восприятию информации, постановке цели и выбору путей её достижения
P5	способен аргументировано строить устную и письменную речь, способен в письменной и устной речи правильно оформить результаты
P6	стремится к самореализации
P7	готов к работе с коллективом
P8	способен оценить свои достоинства и недостатки

Реферат

Выпускная квалификационная работа изложена на 119 страницах, включая 37 рисунков, 21 таблицу, 58 литературных источников и 1 приложения.

Ключевые слова: электрохимические методы анализа, вольтамперометрия, вольтамперограмма, ртутно-пленочный электрод, углеродсодержащий электрод, градуировочная зависимость, глутатион, модельные растворы, сыворотка крови человека.

Объектом исследования является модельный раствор: L-глутатиона. Для определения содержания глутатиона в биологических объектах была применена сыворотка крови людей без аномалий.

Целью работы является: определить глутатион в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии.

В процессе исследования были подобраны оптимальные условия определения глутатиона в модельных растворах и в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии на ртутно-пленочном электроде и углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра. Проведено сравнительное определение глутатиона в сыворотке крови человека на ртутно-пленочном электроде и углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра. Проведена оценка экономической эффективности данного процесса и рассмотрено воздействие разработанных аспектов деятельности с точки зрения социальной ответственности на человека и окружающую среду.

Степень внедрения: результаты данной выпускной квалификационной работы могут быть использованы в качестве методики исследования содержания глутатиона в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии.

Область применения: в настоящее время данную методику определения содержания глутатиона в сыворотке крови человека можно рекомендовать для проведения анализов в клинических биохимических лабораториях.

Оглавление

Введение.....	12
1 Обзор литературы.....	14
1.1 Структура и свойства глутатиона.....	14
1.2 Фармакологические свойства глутатиона.....	17
1.3 Методы определения глутатиона.....	19
1.4 Вольтамперометрический метод анализа.....	34
2 Экспериментальная часть.....	37
2.1 Аппаратура, ячейки, электроды.....	37
2.2 Реактивы.....	40
2.3 Объекты исследования.....	40
2.4 Вольтамперометрический метод определения глутатиона в модельных растворах и в сыворотке крови человека на ртутно-пленочном электроде..	40
2.4.1 Исследование электрохимических свойств глутатиона на ртутно-пленочном электроде.....	40
2.4.1.1 Исследование влияния природы фонового электролита на токи окисления и восстановления глутатиона на ртутно-пленочном электроде.....	44
2.4.1.2 Исследование влияния pH фонового электролита среды Бриттона-Робинсона на токи окисления глутатиона на ртутно-пленочном электроде.....	52
2.4.1.3 Предположительный механизм окисления-восстановления глутатиона на ртутно-пленочном электроде.....	54
2.4.1.4 Подбор оптимальных параметров времени накопления и потенциала накопления для определения глутатиона в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде.....	55
2.4.2 Электрохимические свойства цистина, цистеина, глицина.....	56
2.4.3 Вольтамперометрический метод определения глутатиона в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде.....	59
2.5 Вольтамперометрический метод определения глутатиона в модельных	

растворах на углеродсодержащем электроде.....	62
2.5.1 Исследование влияния природы фонового электролита на токи окисления серебра в присутствии глутатиона на углеродсодержащем электроде.....	63
2.5.2 Исследование оптимальных параметров потенциала накопления и времени накопления на ток окисления серебра в присутствии глутатиона на углеродсодержащем электроде.....	65
2.5.3 Исследование зависимостей ΔI от концентрации глутатиона в растворе на углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра.....	67
2.6 Сравнительное определение суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на глутатион методом вольтамперометрии на ртутно-пленочном электроде и углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра.....	70
3 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение..	72
3.1 Предпроектный анализ.....	72
3.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования.....	72
3.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.....	72
3.1.3 SWOT-анализ.....	73
3.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации.....	74
3.1.5 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования.....	76
3.2 Инициация проекта.....	76
3.2.1 Устав проекта.....	76
3.2.2 Организационная структура проекта.....	77
3.2.3 Ограничения и допущения проекта.....	77
3.3 Планирование управления научно-техническим проектом.....	78
3.3.1 Иерархическая структура работ проекта.....	78
3.3.2 План проекта.....	80
3.3.3 Бюджет научного исследования.....	82

3.4 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	89
3.4.1 Оценка сравнительной эффективности исследования.....	89
4 Социальная ответственность.....	92
4.1 Производственная безопасность.....	92
4.1.1 Анализ вредных и опасных факторов, которые может создать объект исследования.....	92
4.2 Экологическая безопасность.....	99
4.2.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду.....	99
4.2.2 Мероприятия по защите окружающей среды.....	99
4.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	99
4.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности...104	
4.4.1 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.....104	
Заключение.....	106
Список использованных источников.....	108
Приложение А. Английская часть.....	114

Введение

В последние годы в научных медицинских публикациях все чаще встречается термин «оксидативный стресс», который широко применяется при описании патогенеза многих заболеваний и мишеней действия лекарственных средств. Под оксидативным стрессом подразумевается нарушение баланса окислительных и восстановительных реакций в организме (ткани, клетке, ее отдельных органеллах) в сторону избыточного образования свободных радикалов, которые являются сильными окислителями и способны повреждать жизненно важные молекулы – ферменты, белки, фосфолипиды мембран, нуклеиновых кислот. В настоящее время в отношении более чем 60 заболеваний выявлена патогенетическая связь с оксидативным стрессом. Любые болезни, связанные с инфекцией, воспалением, синдромом ишемии/реперфузии, эндотелиальной дисфункцией, а также онкологическая патология и сахарный диабет сопровождаются массивным образованием свободных радикалов.

В норме образование свободных радикалов и недоокисленных продуктов метаболизма происходит во время биохимических реакций организма непрерывно. Баланс поддерживается антиоксидантными ферментами, способными нейтрализовать молекулы с высоким окислительным потенциалом. В организме существует четыре линии антиоксидантной защиты, которые последовательно восстанавливают активные формы кислорода (свободные радикалы), продукты перекисного окисления жиров и белков. Основным внутриклеточным антиоксидантом с мощным детоксикационным действием является глутатион.

Целью данной работы является определить глутатион в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии

В рамках этой цели были сформулированы следующие задачи:

- подобрать оптимальные условия определения глутатиона в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде: выбор диапазона потенциала; выбор рН буферных растворов (фосфатный, боратный,

Бриттона-Робинсона буферные растворы); выбор скорости развертки потенциала (W , мВ/с); диапазон линейной зависимости тока I_p , мкА от концентрации C , моль/л;

- подобрать оптимальные условия определения на углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра: выбор pH буферных растворов; выбор скорости развертки потенциала (W , мВ/с); диапазон линейной зависимости тока I_p , мкА от концентрации C , моль/л;
- провести сравнительное определение в сыворотке крови человека на ртутно-пленочном и углеродсодержащем электродах в присутствии ионов серебра

1 Обзор литературы

1.1 Структура и свойства глутатиона

Фармакологическая группа: пептиды; антиоксиданты

ИЮПАК название: (2S)-2-амино-4-((1S)-1-карбоксиметил-2-сульфанилэтил)карбамоил-2-бутановая кислота

Молекулярная формула: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$

Молярная масса: 307,32 г/моль

Температура плавления: 195 °C; 383 °F; 468 K

Растворимость в воде: легко растворим

Растворимость в метаноле, диэтиловом эфире: нерастворим [1]

Глутатион (2-амино-5-[[2-[(карбоксиметил)амино]-1-(меркаптометил)-2-оксоэтил]амино]-5-оксопентановая кислота, англ. glutathione, GSH) – это трипептид γ -глутамилцистеинилглицин. Глутатион содержит необычную пептидную связь между аминогруппой цистеина и карбоксильной группой боковой цепи глутамата. [2]

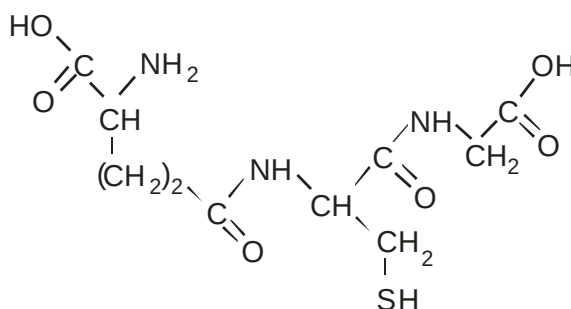


Рисунок 1 – Структурная формула глутатиона

Глутатион – это уникальный пептид, содержащийся в клетках не только всех эукариотических организмов, но и многих прокариотов. В отличие от других пептидов, образующихся путем матричного синтеза или посттрансляционной модификации, он имеет собственный метаболический путь. Это соединение играет важную роль в клеточном обмене, участвуя в поддержании окислительно-восстановительного потенциала, в процессах детоксикации ксенобиотиков эндо- и экзогенного происхождения, как непосредственно, так и в качестве субстрата для целого ряда ферментов биотрансформации. Возрастные изменения, стимуляции иммунных реакций,

развитие острых и хронических заболеваний ассоциированы с синтезом глутатиона. В частности, почти все основные болезни человека сопровождаются вариабельностью уровня глутатиона и окислительного статуса в клетках.

Глутатион существует в организме в двух формах: окисленной (GSSG, неактивной) и восстановленной (GSH, активной). Соотношение концентраций восстановленного и окисленного глутатиона в норме составляет 10/1, а уменьшение соотношения является маркером оксидативного стресса. Среднее содержание глутатиона в восстановленной форме (GSH) в сыворотке здоровых людей – $4,50 \pm 0,65$ мМ, в окисленной (GSSG) – $0,19 \pm 0,12$ мМ [3]. При избыточной продукции свободных радикалов наблюдается резкое истощение запасов восстановленного глутатиона. Наличие достаточной концентрации восстановленного глутатиона является критическим фактором выживания клеток в условиях оксидативного стресса [4].

Основу клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, с помощью которого может поддерживаться редокс-состояние тиольных групп белков, составляет отношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона, присутствующего в большинстве клеток в миллимолярной концентрации [5, 6]. Восстановленный глутатион (GSH) – является самым распространенным небелковым тиолом в клетках животных. Его начальный и восстановленный синтез служит для поддержания пониженной клеточной среды и трипептид является кофактором для многих цитоплазматических ферментов и может также выступать в качестве важной пост-трансляционной модификации в ряде клеточных белков. Сохранение оптимального для клетки соотношения восстановленного глутатиона к окисленному (GSSG) – GSH/GSSG в клетке имеет решающее значение для выживания, следовательно, плотное регулирование системы является обязательным условием. Дефицит GSH приводит к окислительному повреждению клетки. Дисбаланс GSH наблюдается в широком диапазоне

патологий, в том числе рак, нейродегенеративные расстройства, кистозный фиброз, ВИЧ-инфекции и старение [7].

Важное значение GSH в редокс-зависимых процессах определяется его участием в регуляции клеточного редокс-зависимого сигналинга и активности транскрипционных факторов, а также тем фактом, что он является внутриклеточным антиоксидантом, играя роль «ловушки» свободных радикалов, косубстрата в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых глутатионпероксидазой (GPx) и глутатионтрансферазой (GST), и выступает в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин (Grx), необходимый для восстановления дисульфидов [8, 9].

Антиоксидантные свойства глутатиона

В норме образование свободных радикалов и недоокисленных продуктов метаболизма происходит во время биохимических реакций организма непрерывно. Баланс поддерживается антиоксидантными ферментами, способными нейтрализовать молекулы с высоким окислительным потенциалом. В организме существует четыре линии антиоксидантной защиты, которые последовательно восстанавливают активные формы кислорода (свободные радикалы), продукты перекисного окисления жиров и белков. Основным внутриклеточным антиоксидантом с мощным детоксикационным действием является глутатион [4].

Пероксид водорода восстанавливается до воды глутатионпероксидазой с использованием GSH в качестве косубстрата. Восстановление органических гидроперекисей до соответствующих спиртов может осуществляться не только благодаря каталитической активности GPx, но и пероксидазной активности Se-независимой глутатион S-трансферазы, также использующей GSH в качестве косубстрата:



GSH служит для восстановления окисленной формы глутаредоксина,

образующейся в результате восстановления дисульфидов [9].

Глутатион является низкомолекулярным антиоксидантом и может участвовать в неферментативной антиоксидантной защите, выступая эффективным скэвенджером («ловушкой») свободных радикалов [10, 11].

1.2 Фармакологические свойства глутатиона

Абсорбция

Глутатион, будучи небольшой пептидной молекулой, подлежит гидролизу (расщеплению) в тонком кишечнике, как правило, с помощью γ -глутамилтрансферазы в щеточной каемке тощей кишки [12], где преобладают ферменты. Там также может происходить гидролизная пост-абсорбция, так как глутатион, в основном, расщепляется на составляющие его аминокислоты, увеличивая концентрации Л-цистеина в сыворотке крови [13]. В клетках кишечника человека находится так называемый «транспортёр для поглощения глутатиона» [14]. Содержание глутатиона повышается в сыворотке крови и тканях у крыс, когда глутатион использовался в качестве пищевой добавки. В целом, действие глутатиона из пищевых добавок в организме человека не совпадает с действием этого вещества из пищи. Диетический (содержащийся в пище) глутатион или глутатион в чистом виде, при глотании может быть расщеплен на составные аминокислоты в кишечнике и в крови, хотя существует возможность того, что глутатион может расщепиться с помощью абсорбции в кишечнике.

Иммунная сыворотка (сыворотка крови)

Употребление в пищу 3 грамм глутатиона (0,15 / кг) в форме раствора здоровыми субъектами не показало увеличения концентрации циркулирующего глутатиона в течение следующих 270 минут, в сравнении с исходной концентрации [15]. Четыре недели употребления добавок по 1000 мг не повлияли на количество эритроцитов, и вливание (в форме настоя) глутатиона показало, что увеличение в сыворотке крови Л-цистеина, приблизительно эквивалентно количеству Л-цистеина в глутатионе [16] (в

его обычной форме), а это предполагает расщепление вещества в сыворотке крови. Глутатион нестабилен в крови, и с помощью перорального или внутривенного введения, глутатион будет легко восстанавливаться в Л-цистеин или другие молекулы, содержащие серу.

Клеточная динамика

Глутатион синтезируется внутриклеточно, и в то время как это может привести к оттоку вещества из клетки, глутатион все равно стремится к гидролизу, чтобы расщепиться на составные аминокислоты, дабы потом быть поглощенным клетками и повторно синтезироваться внутри клетки в глутатион (основное вещество). Глутамилтранспептидаза расщепляет химическую связь γ -глутамила в глутатион, производя цистеин-глицин дипептид и фрагмент γ -глутамила, который связан с другой аминокислотой (обычно это цистин, продукт объединения двух молекул Л-цистеина [17]) для внеклеточной транспортировки, и при достижении γ -глутамил аминокислоты другой ткани, дипептид расщепляется с помощью энзима, отвечающего за транспорт веществ от клетки к клетке. Таким образом, освобождаются аминокислоты, которые, в свою очередь, помогают произвести циклическую форму глутаминовой кислоты (5-оксопролин), которая преобразуется в глутамин с помощью 5-оксопролина [18]. Так как глутатион является трипептидом, может произойти эманация его из клетки, он не может быть поглощен обратно в большинство интактных клеток. Это приводит к базовому количеству содержания глутатиона в сыворотке крови, нормальный диапазон которого составляет 3.8-5.5 μM с периодом полураспада около 14,1 +/- 9,2 мин. Клетки, которые были отмечены как способные поглощать глутатион в его нетронutom состоянии, включают гепатоциты (HepG2 [19]), кишечные клетки слизистой оболочки [20], и клетки сетчатки. Глутатион может быть экспортирован из клеток, где он синтезируется, и, таким образом он, в какой-то степени, существует в своей интактной форме в крови. Большинство клеток, однако, должны расщеплять это вещество, чтобы иметь возможность его абсорбировать.

Вторая фаза взаимодействия ферментов

Глутатион может быть конъюгирован с другими молекулами, участвующими во второй фазе взаимодействия ферментов. Этот процесс обычно называют «процессом детоксикации», так как эти соединения «помечают» определенные молекулы для их удаления с помощью печени и почек [21]. В некоторых случаях соединения глутатиона служат для биоактивации целевых молекул. Этот процесс применим как к ксенобиотикам (процессы, происходящие из вне тела), а также к некоторым эндогенным молекулам, таким как стероиды и простагландины [22]. Эти ферменты являются глутатион S-трансферазами (GSTs), и их соединительная реакция аналогична антиоксидантной реакции, где глутатион выполняет нуклеонную атаку (отдает пару электронов) по отношению к электрофильным (свободным для приема электронов) молекулам в процессе слияния. После конъюгации, она либо выталкивается сразу из печени в кишечник (образуя фекальный метаболит), либо продолжает свой путь через почки, где, в конечном счете, выводится с мочой в виде ацетилированного L-цистеина, более известного как меркаптуровая кислота. Глутатион использует ферменты глутатион S-трансферазы (GST) для того, чтобы соединять вместе определенные молекулы. Это слияние изменяет структуру молекул, и в то время как, в большинстве случаев, этот процесс играет роль детоксикации, помогая удалять конкретные молекулы из тела, в нескольких случаях так же было отмечено, что процесс может повысить действие/ токсичность молекул.

1.3 Методы определения глутатиона

Существует целый ряд методов определения глутатиона в разных объектах искусственного и природного происхождения (сыворотка и плазма крови, клетки печени и легких животных, модельные растворы, фармацевтические препараты). Их можно разделить на спектральные, хроматографические и электрохимические методы.

Хроматографические методы определения глутатиона

Разработан и оценен метод ВЭЖХ [23] для определения восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона в плазме крови, цельной крови и гепатоците крыс. Восстановленный глутатион реагирует с ортофталальдегидом (OPA) с образованием стабильного, сильно флуоресцентного трициклического производного при pH=8, в то время как GSSG реагирует с OPA при pH=12. При измерении GSSG, GSH смешали с N-этилмалеимидом. Для разделения были использованы колонки с обращенной фазой Discovery C18, 150 мм*4 мм, 5 мкм. Смесь метанола и 25 мМ гидрофосфата натрия (15:85), pH=6.0, использовали в качестве подвижной фазы. Аналитическая эффективность этого метода является удовлетворительной для GSH и GSSG. В пределах анализа коэффициенты вариации составили 1,8 и 2,1% для цельной крови, 2,0 и 1,9% для гепатоцитов крыс, 4,3 и 5,2% для плазмы. Коэффициенты между анализами вариации составляли 5,8 и 6,2% для цельной крови, 6,6 и 7,1% для гепатоцитов крыс, 6,9 и 7,8% для плазмы. Выход распределился следующим образом: 98,2% (3,5%) и 101,5% (4,2%) для цельной крови, 99,1% (2,5%) и 102,3 (4,4%) для гепатоцитов крысы, 94,1% (7,5%) и 103,5 (8,5%) для плазмы. Калибровочная кривая была линейной во всем исследованном диапазоне. Предел обнаружения был 14,0 и 5,6 фмоль, соответственно. Предварительные эталонные диапазоны восстановленного и окисленного глутатиона в группе доноров крови являются $(4,69 \pm 0,93)$ и $(0,28 \pm 0,12)$ мкмоль/г для цельной крови, $(1,82 \pm 0,55)$ и $(0,154 \pm 0,044)$ мкМ для плазмы.

Был описан быстрый и чувствительный высокоэффективный метод жидкостной хроматографии для определения наномолярного количества глутатиона, глутатион дисульфида, цистеина смешанного с глутатион дисульфидом и 20 родственных серосодержащих аминокислот или их производных. Процедура основана на начальной стадии формирования производных S-карбоксиметильных свободных тиолов иодуксусной кислоты с последующим превращением свободных аминогрупп к производным 2,4-

динитрофенил путем реакции с 1-фтор-2,4-динитробензол. После хроматографии реакционной смеси без выделения образца находится на 3-aminopropylsilane дериватизированной колонке с диоксидом кремния, элюируя градиентом ацетата натрия или аммония в растворителе вода-метанол-уксусная кислота при pH=4,5. Описано определение наномолярного глутатиона, глутатион дисульфида и цистеина смешанного с глутатион дисульфидом в биологических образцах [24].

Метод был разработан [25], чтобы количественно оценить одновременно восстановленный и окисленный глутатион, цистеин, цистин и другие SH/SS в различных тканях, в том числе человеческой крови и плазмы, печени и гиппокампе крысы, комара и листьев шпината. Оптимальные условия были определены для типовой обработки и анализа, используя метафосфорическую кислоту и ВЭЖХ-DEC. Подлинные стандарты 10 общих составов SH/SS были определены и элюированы в течение 15 минут, и все стандартные кривые были линейны от 5 до 1600 пмоль. Проверка была основана в следующем: Во-первых, размеры ткани были пропорциональны площади пиков в восьмикратном диапазоне. Во-вторых, восстановление SH/SS, добавленного к образцам перед обработкой, составляло 96-101%. Наконец, результаты были эквивалентны и коррелируют сильно со значениями для общей SH с помощью 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ) анализа ($r^2=0,996$), а также для общего глутатиона редуктазы анализа ДТНБ-GSSG ($r^2=0,998$). Продолжительность жизни электрода Au/Hg была ограничена 200-500 образцами, основанными на линейном диапазоне стандартных кривых. На основе этих результатов полагают, что этот метод удовлетворит давнюю потребность в одновременном определении SH/SS в биологических тканях.

Новый быстрый и высокочувствительный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с орто-фталевым альдегидом (OPA) предварительной дериватизации колонки был разработан для определения восстановленного глутатиона (GSH) и общего глутатиона (GSht) в

эритроцитах человека и культивируемых фибробластах. Производные ортофталальдегида разделяли на колонке ВЭЖХ с обращенной фазой с градиентной системой, ацетат натрия обнаружен флюориметрически. Внутренний стандарт (этиловый эфир глутатиона) добавляют для облегчения количественного определения. Весь глутатион определяется после восстановления дисульфидных групп с дитиотреитолом; концентрация окисленного глутатиона (GSSG) вычисляется путем вычитания уровня GSH от уровня GSHt. Анализ показывает высокую чувствительность (50 фмоль на инъекцию, что является самой низкой), хорошую точность ($<5,0\%$), аналитическое восстановление GSH и GSSG близка к 100%, и линейности ($r>0,999$). Этот метод ВЭЖХ является очень простым и быстрым. Его широкая применимость и высокая чувствительность делает этот метод удобным и надежным для определения глутатиона в различных биологических образцах [26].

Исследования представляют быстрый, проверенный ВЭЖХ-электрохимический метод определения GSH и GSSG в небольших образцах, таких как те, из микродиссекции дыхательных путей у мышей, содержащих 50-200 мкг белка, который подходит для повседневного использования. GSH и GSSG могут быть измерены на уровнях 1 и 2 пмоль в колонке, соответственно, с приемлемой точностью и без необходимости генерировать производные. В микродиссекции дыхательные пути от мыши, коэффициент внутридневного анализа вариации для GSH варьировала от 4,7 до 5,9%, а за GSSG составил 4,4 до 5,7%. Междневной коэффициент изменчивости испытания колебался от 6,0 до 7,6% для GSH и 5,5 до 23% для GSSG. Добавление GSH или GSSG в образцах увеличилась площадь пиков соответственно, без изменения формы пика, время удерживания, или площадь пика, соответствующего восстановленного (окисленные) тиола. Соотношение GSH/GSSG в замороженной печени колебалась от 46 до 248, в то время как ткань печени, которая была гомогенизирована, были отношения

GSH/GSSG 62–150. Техника, кажется, способна к восстанавливаемому измерению GSH и GSSG в небольших количествах непеченочной ткани [27].

Прочный метод ЖХ-МС/МС был разработан для количественного определения окисленной и восстановленной формы глутатиона (GSH и GSSG соответственно) в гепатоцитах крыс. Кроме того, конъюгаты GSH могут быть обнаружены, охарактеризованы и измерены в том же самом анализе. Образцы обрабатывали ацетонитрилом и йодуксусной кислотой для осаждения белков и ловушкой свободного GSH. Эти сильно полярные аналиты были разделены с помощью ионообменной хроматографии с использованием условий, которые были разработаны, чтобы поддавать ионизацию электрораспылением и обеспечивать базовый уровень хроматографического разрешения. Градиент растворителей с общим временем работы 13 мин был использован для вымывания аналитов, а также любые сильно удерживаемые компоненты в образцах, которые в противном случае оседают на колонку для ВЭЖХ и ухудшают хроматографии. Аналиты были обнаружены, используя или отобранный контроль иона (SIM), используя массовый спектрометр ловушки иона или отобранный контроль реакции (SRM), используя тройной спектрометр массы четырехполюсника. Диапазоны для определения количества GSH и GSSG использование ловушки иона были 0.651–488 μM и 0.817–327 μM , соответственно. Используя SRM с тройным инструментом четырехполюсника, диапазоны определения количества для GSH и GSSG были 0.163–163 μM и 0.0816–81.6 μM , соответственно. Точность для обоих методов была в пределах 15%. Этот аналитический метод имеет общую полезность для одновременного исследования потенциала тестируемых соединений вызывать как окислительный стресс от окислительно-восстановительных свойств в пробирке и образование GSH конъюгатов [28].

Цель разработки метода ВЭЖХ, это определение содержания глутатиона в плазме человека. Образцы крови немедленно вводили в пробирки с гепарином, предварительно обработанных с

дифференцированием реагента DTNB и центрифугировали в течение 25 минут после забора. Пеницилламин был использован в качестве внутреннего стандарта. 10% хлорной кислоты добавляли для осаждения белков. 20 мкл надосадочной жидкости, вводили в систему ВЭЖХ. Образцы были разделены на колонке SUPELCOSILLC-18 (150 мм*4,6 мм, 5 мкм) с использованием подвижной фазы, состоящей из 0,05 mol·L⁻¹ ацетата натрия буфера (pH=5,6) и метанола (100:8). Скорость потока составляла 1 mL·min⁻¹ с длиной волны детектирования при 320 нм. Результаты: Стандартная кривая была линейной в диапазоне от 2 до 200 μmol·L⁻¹ (r=0,999 7, n=6). Предел обнаружения составил 1 мкмоль л⁻¹. Внутриденной и междневной RSDs были ниже 10%. Извлечение контрольных проб низких, средних и высоких концентраций были в диапазоне от 95% до 105%. Метод является точным, быстрым, точным, и подходит для фармакокинетических исследований глутатиона [29].

Представлен способ одновременного определения глутатиона и его предшественников цистеина, цистеинил-глицин и гомоцистеина в слюне. Процедура включает восстановительное превращение дисульфидов в тиолы, дериватизации к их производным 2-S-хинолина с 2-хлор-1-methylquinolinium тетрафторбората и количественный анализ разделения методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при длине волны 355 нм. Калибровка выполняется с образцами слюны, обогащенная тиоловыми дисульфидами, в диапазонах концентраций, показал линейный отклик детектора. Метод, применяемый к образцам слюны, пожертвованные добровольцами, показал среднюю концентрацию (SD, n=8) цистеина, цистеинил-глицин, глутатиона и гомоцистеина: 26,5 (31,6), 6,05 (5,12), 16,97 (7,68), 3,64 (1,34) нмоль/мл соответственно [30].

Спектрофотометрические методы определения глутатиона

Эта работа посвящена разработке простого, надежного, автоматизированного последовательного анализа впрыска (SIA) системы для ферментативного определения общего (tGSH) и окисленного (GSSG)

глутатиона в цельной крови человека. Концентрация восстановленного (GSH) глутатиона получают как разность между концентрациями tGSH и GSSG. Определение основано на анализе переработки редуктазы ДТНБ-GSSG, который соединяет специфичность GSSG-редуктазы (ГР) и усиливает отклик на глутатиона, с последующим спектрофотометрическим детектированием на 2-нитро-5-тиобензойной кислоты (TNB) ($\lambda=412$ нм). Осуществление этой реакции в проточной системе с SIA стратегии разведения в линии допускаются необходимые различные диапазоны применения для tGSH и для GSSG. Это также гарантирует точные сроки жидкостных манипуляций и точного контроля условий реакции. Осуществление этой реакции в проточной системе с SIA стратегии разведения в линии допускаются необходимые различные диапазоны применения для tGSH и для GSSG. Это также гарантирует точные сроки жидкостных манипуляций и точного контроля условий реакции.

Было изучено влияние таких параметров, как концентрация реагентов, температура, pH, скорость потока буферного раствора носителя, а также реакция длины катушки, и др., на чувствительность и производительность системы СИА, впоследствии были выбраны оптимальные условия реакции. Линейные калибровочные зависимости были получены для GSH и GSSG в концентрациях от 3,00 до 1,50 мкМ, с пределом обнаружения 0,031 и 0,014 мкМ, соответственно. Разработанная методика показала хорошую точность, с относительным стандартным отклонением $<5.0\%$ ($n=10$) для определения обеих форм глутатиона. Статистическая оценка показала хорошее соответствие, вероятностью 95%, между результатами, полученными системой SIA и данными, предоставляемыми для сравнение процесса [31].

Метод спектрофотометрический/автоматический фотометр для микропланшет для анализа глутатиона (GSH) включает в себя окисление GSH по сульфгидрильному реагенту 5,5'-дитио-бис (2-нитробензойной кислоты) (DTNB) с образованием желтого производного 5'-тио-2-нитробензойной кислоты (TNB), измеренное при 412 нм. Образованный

дисульфид глутатиона (GSSG), может быть повторно использован в GSH глутатион-редуктазы в присутствии НАДФН. Анализ состоит из двух частей: приготовления клеточных экстрактов цитозольных / тканей и обнаружение общего глутатиона (GSH и GSSG). Метод прост, удобен, чувствителен и точен. Самое низкое обнаружение для GSH и GSSG составляет 0.103 нм в 96-луночный планшет. Этот метод является быстрым, и целая процедура не занимает больше, чем 15 минут включая подготовку реактива. Метод может оценить GSH в целой крови, плазме, сыворотке, легкой промывной жидкости, спинномозговой жидкости, моче, ткани и извлечения клетки может быть использован для открытия/фармакологии препарата и протоколов токсикологии, чтобы изучить эффекты наркотиков и токсичных составов на метаболизм глутатиона [32].

Был разработан способ анализа нанограммового количества глутатиона, который основан на каталитическом действии GSH или GSSG в восстановлении реактива Элмана (DTNB) смесью TPNH и дрожжей глутатионредуктазы. В отличие от предыдущих методов анализа процедура, описанная здесь эффективно измеряет полный глутатиона (GSH + GSSG) содержание неизвестных смесей и не подлежит существенному вмешательству в присутствии других тиоловых компонентов. Предполагается, что каталитическое действие глутатиона в этой системе находится в постоянной ферментативной регенерации GSH, присутствующих первоначально или отформованного ферментативно из GSSG, после его взаимодействия с сульфгидрильным реагентом.

Чувствительность метода такова, что допускает определение общего глутатиона в жидкостях внеклеточных тканевых, таких как плазма, слюна, моча и, как правило, содержащих очень низкие уровни этого материала, по существу, без предварительной обработки образца. То же самое справедливо для определения глутатиона цельной крови, в которой предварительная процедура сводится к подготовке 1:100 гемолизата от всего лишь 10 мкл образца.

После опубликованных процедур, предварительная обработка ткани экстрактов с NEM с образованием ферментативного неактивного комплекса со свободным GSH позволила определить низкий уровень окисленного глутатиона, обычно присутствующего в нем. Использование вышеупомянутого аналитического метода в определении общего и окисленного глутатиона, содержащего в крови крыс, почек и печени, получили значения, которые хорошо согласуются с результатами, полученными предыдущими исследователями [33].

Описан простой и чувствительный спектрофотометрический метод, подходящий для контроля за стабильностью фармацевтических форм дозировки, содержащих глутатион (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine), GSH. Помимо GSH, метод количественно определяет окисленный глутатион GSSG. Получены цветные реакции GSH и GSSG с аммонием тетрахлорпалладат, были изучены оптимальные условия реакции, спектральные характеристики и состав желтого водорастворимого комплекса. Результаты анализа фармацевтических составов показали хорошую точность и в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-5}$ – $6 \cdot 10^{-4}$ М GSH [34].

Способ количественного колориметрического определения восстановленного глутатиона в крови. Способ включает смешивание пробы крови с реагентом, содержащим стабилизированную вольфрамовую кислоту, этанол и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты). Смесь центрифугируют и измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости. Супернатант смешивают с буфером, чтобы получить конечный pH от примерно 7 до 10, и оптическую плотность снова измеряют. Концентрация глутатиона определяется из измерений оптической плотности [35].

Был разработан высокоспецифичный, чувствительный и простой метод для определения малого количества глутатиона. GSH реагирует при pH=8 с орто-фталевым альдегидом, полученный продукт, флуоресценция которого в 420 нм линейна от 0.065 до 32.5 ммоль/мл. В соответствии с указанными условиями реакции, снижение или отсутствие флуоресценции получают из

окисленного глутатиона, сульфгидрильных, содержащих аминокислоты, пептидов, пуринов, или других родственных смесей [36].

Электрохимические методы определения глутатиона

Был разработан способ определения глутатиона методом вольтамперометрии и кулонометрическим титрованием с электрогенерированными окислителем с использованием биамперометрического указания на конечную точку титрования. Обсуждаются возможные механизмы реакции глутатиона с электрогенерированными галогенами. Микрограммовое количество глутатиона может быть определено в модельных растворах с РСД на 1-2%. Волна окисления глутатиона на вольтамперограмме наблюдается при 0,95 В. При более высоких концентрациях глутатиона, волна принимает форму пика. Концентрация глутатиона в пределах от $9,15 \cdot 10^{-5}$ и $2,14 \cdot 10^{-3}$ М является линейной функцией от высоты волны окисления на стационарном платиновом электроде в 0,05 М в растворе H_2SO_4 . Предел обнаружения для глутатиона составляет $1,9 \cdot 10^{-5}$ М. Был предложен способ определения глутатиона в крови человека [37].

Простой, чувствительный и быстрый метод обнаружения глутатиона с помощью циклической вольтамперометрии с использованием голого стекловидного углеродного электрода, в котором глутатион образует 1:1 комплексное соединение с ионами меди (II). Это комплексное соединение адсорбируется на поверхности электрода и подвергается электрохимическому окислению при характерном окислительном потенциале -0,20 В против стандартной эталонной ртути / сульфат ртути электрода, который используется для обнаружения концентрации глутатиона. Линейный динамический диапазон получен при концентрации глутатиона от 1 мкМ до 12,5 мкМ, а чувствительность находится на уровне $0,1 \pm 0,002$ мкА, мкМ⁻¹. Низкий предел обнаружения (n=3) до 0,14 мкМ и точность 1.8% достигается с помощью простых, немодифицированных электродов. Надежность данной

методики подтверждается успешным количественным анализом глутатиона в присутствии цистеина [38].

Чувствительный и селективный электрохимический метод был разработан для определения глутатиона (GSH) в гемолизе эритроцита, используя ферроцен дикарбоновых кислот, модифицированного углеродными нанотрубками пастового электрода (FDCCNTPE). Циклическая вольтамперометрия (ЦВ), двойной шаговый потенциал хроноамперометрии и дифференциальная импульсная вольтамперометрия (ДПВ) были использованы для исследования пригодности ферроцена дикарбоновой кислоты на поверхности многостенных углеродных нанотрубок электрода в качестве посредника для электрокаталитических окислений глутатиона в водных растворах с различными pH. Результаты показали, что FDCCNTPE имеет высокую электрокаталитическую активность для электроокисления глутатиона. При оптимальных условиях (pH=7,00), окисление GSH происходит при потенциале около 230 мВ и является менее положительным, чем потенциал немодифицированных углеродных нанотрубок электрода. Константа скорости каталитической реакции, K_h рассчитывалась ($1,98 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) с использованием хроноамперометрии. Электрокаталитический пик окисления тока GSH показал два линейных динамических диапазона с пределом обнаружения $0,2 \text{ мкмоль L}^{-1}$ GSH. Линейные диапазоны калибровки были получены между $0,5\text{--}24 \text{ мкмоль L}^{-1}$ и $24\text{--}122 \text{ мкмоль L}^{-1}$ GSH с использованием метода ДПВ. И наконец, предлагаемый метод также был рассмотрен в качестве селективного, простого и точного электрохимического способа для определения GSH в реальных образцах, таких как гемолиза эритроцита [39].

В данном исследовании описан синтез и применение нанокомпозита FePt/CNTs в качестве высокочувствительного датчика и нового амидного лиганда (9,10-дигидро-9,10-этаноантрацен-11,12-dicarboximido) -4-этилбензол-1, 2-диол в качестве посредника для определения глутатиона (GSH), никотинамидадениндинуклеотид (NADH) и триптофан (Trp).

Синтезированные материалы были охарактеризованы с помощью различных методов, таких как ЯМР, ИК-спектроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, рентгеновской дифракции, FESEM, циклическая вольтамперометрия, электрохимическая импедансная спектроскопия и квадратно-волновая вольтамперометрия (SWV). Модифицированный электрод показывает активное поведение электронов с последующим разделением пиков окисления GSH, NADH и триптофаном. Пиковые токи линейно зависели от концентрации GSH, NADH и Trp в диапазоне 0.08-220, 1.0-400 и 5,0-500 мкмоль L^{-1} , при этом пределы обнаружения 0,05, 0,8 и 1,0 мкмоль L^{-1} соответственно. Модифицированный электрод был использован для определения этих соединений в реальных образцах [40].

В данном исследовании рассматривается разработка электрохимической характеристики с использованием новых модифицированных н-(4-гидроксифенил)-3, 5-dinitrobenzamide- FePt/CNTs электрода для электрокаталитического определения глутатиона (GSH) в присутствии пироксикама (PXM) в первый раз. Синтезированный наноккомпозит характеризуется различными методами, такими как TEM и XRD. Модифицированный электрод был показан мощный и постоянный электронный опосредующих поведение с последующим хорошо разделенных пиков окисления GSH и PXM. Пиковые токи были линейно зависимы от GSH и PXM в диапазоне концентраций 0.004-340 и 0.5-550 мкмоль L^{-1} , при этом пределы обнаружения 1,0 нмоль L^{-1} и 0,1 мкмоль L^{-1} , соответственно. Модифицированный электрод был успешно использован для определения аналитов в реальных образцах с удовлетворительными результатами [41].

Химически модифицированный электрод готовят путем включения п-аминофенола в углеродные нанотрубки, вставленные в многослойную матрицу. Циклическая вольтамперометрия (ЦВ), инверсионная вольтамперометрия, двойной шаговый потенциал хроноамперометрии и дифференциальная импульсная вольтамперометрия (ДПВ) были использованы для исследования электрохимического поведения глутатиона

на химически модифицированном электроде. Согласно результатам, *p*-аминофенола многостенных углеродных нанотрубок электрода (*p*-APMWCNTPE) показал высокую электрокаталитическую активность для окисления глутатиона, производя резкий пик тока окисления около +0.285 против Ag/AgCl электрода сравнения при pH=5,0. Хроноамперометрия также была использована для определения константы каталитической скорости глутатиона и коэффициент диффузии в *p*-APMWCNTPE. Квадратно-волновой вольтамперометрический пиковый ток глутатиона линейно возрастает с концентрацией глутатиона в диапазоне от $2,0 \cdot 10^{-7}$ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль L^{-1} с пределом обнаружения $9,0 \cdot 10^{-8}$ моль L^{-1} . Этот метод был успешно использован в качестве селективного, простого и точного метода для определения глутатиона в гемолизе эритроцита, таблетках, и образцов мочи [42].

Электрокаталитическое окисление глутатиона (GSH) было изучено на поверхности ферроцен-модифицированного пастового углеродного электрода (FMCPE). Циклическая вольтамперометрия (ЦВ), двойной шаговый потенциал хроноамперометрии, и дифференциально импульсная вольтамперометрия (ДПВ) использовались для изучения целесообразности включения в FMCPE ферроцена в качестве медиатора для электрокаталитического окисления GSH в буферизованном водном растворе. Результаты показали, что pH=7,00 является наиболее подходящим для этой цели. В оптимальном состоянии (pH=7,00), электрокаталитическая способность около 480 мВ и постоянную скорость гетерогенной каталитической реакции рассчитывали как $k'h=1,83 \cdot 10^{-1}$ см S^{-1} $k'h=1,83 \cdot 10^{-1}$ см s^{-1} . Кроме того, был установлен коэффициент диффузии глутатиона $D=3,61 \cdot 10^{-5}$ см² s^{-1} . Электрокаталитический пик тока окисления глутатиона на поверхности этого модифицированного электрода был линейно зависим от концентрации GSH и линейные аналитические кривые были получены в диапазонах $3,2 \cdot 10^{-5}$ М– $1,6 \cdot 10^{-3}$ М и $2,2 \cdot 10^{-6}$ М– $3,5 \cdot 10^{-3}$ М с циклическим методом вольтамперометрии и дифференциально импульсной

вольтамперограммой соответственно. Были определены пределы обнаружения (3σ) как $1,8 \cdot 10^{-5}$ М и $2,1 \cdot 10^{-6}$ М с использованием ЦВ и ДИВ соответственно. И, наконец, электрокаталитическое окисление GSH на поверхности этого модифицированного электрода можно использовать в качестве нового метода вольтамперометрического определения глутатиона в реальных образцах, таких как человеческой плазмы [43].

Электроокисление глутатиона (GSH) было изучено на поверхности 2,7-бис (этил) ферроценил флуорен-9-модифицированного пастового углеродного электрода (2,7-BFEFMCPE). ЦВА, двойной шаговый потенциал хроноамперометрии, и дифференциально импульсная вольтамперометрия были использованы для исследования пригодности этой производной ферроцена в качестве посредника для электрокаталитического окисления GSH в водных растворах с различными pH. Результаты показали, что pH=7,00 является наиболее подходящим pH для этой цели. При оптимальном pH, окисление GSH на поверхности этого модифицированного электрода происходит при потенциале около 0,410 В относительно Ag | AgCl | KCl_{sat}. Определены кинетические параметры, такие как коэффициент переноса электрона, $\alpha=0,6$, константы скорости химической реакции между GSH и окислительно-восстановительного участка в 2,7-BFEFMCPE, $k_h=1,73 \cdot 10^3 \text{ см}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$, также были определены с использованием электрохимической подходы. Кроме того, было обнаружено, что кажущийся коэффициент диффузии, D для GSH $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ в водном буферном растворе. Электрокаталитический пик окисления тока GSH показал линейную зависимость от концентрации глутатиона, а кривые линейной калибровки были получены в диапазонах $5,2 \cdot 10^{-5}$ М до $4,1 \cdot 10^{-3}$ М и $9,2 \cdot 10^{-7}$ М до $1,1 \cdot 10^{-5}$ М с циклической вольтамперометрией и дифференциально импульсной вольтамперометрии соответственно. Пределы обнаружения (3σ) были определены как $1,4 \cdot 10^{-5}$ М и $5,1 \cdot 10^{-7}$ М для методов ЦВ и ДИВ соответственно. Этот метод был также рассмотрен в качестве селективного,

простого и точного нового метода вольтамперометрического определения GSH в реальном образце, таких как гемолизе эритроцита [44].

Описан электрохимический сенсор для одновременного определения глутатиона (GSH) и никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Датчик основан на углеродном пастовом электроде (CPE), модифицированного производным бензамида и многостенных углеродных нанотрубок. Эта смесь делает модифицированный электрод, который чувствителен к электрохимическому детектированию этих соединений. При оптимальных условиях pH=7,0 окисление GSH происходит при потенциале около 330 мВ менее положительным, чем у немодифицированного CPE. Вольтамперометрические пиковые токи линейно зависят от GSH и концентрации NADH в диапазонах 0.09-300 мкмоль L⁻¹ GSH и 5.0-600 мкмоль L⁻¹ NADH. Были найдены пределы обнаружения для GSH и NADH 0,05 мкмоль L⁻¹ и 1,0 мкмоль L⁻¹, соответственно. Электрохимический датчик был также использован для определения GSH в моче, фармацевтической и гемолизе образцов эритроцитов [45].

Прямое одновременное электрохимическое определение глутатиона (GSH) и глутатион дисульфида (GSSG) было представлено с использованием наноразмерного медного углерода гидроокиси ионной жидкости композитного электрода. Насколько нам известно, это первый доклад об одновременном определении этих двух биологически важных соединений на основе их прямого электрохимического окисления. Объединение наноструктуры гидроокиси меди (II) в сложном электроде приводит к комплексообразованию меди (II) с тиоловой группой GSH и приводят к значительному уменьшению в сверхпотенциале окисления GSH, в то время как анодный пик, соответствующий прямому окислению GSSG как продукт окисления GSH, наблюдается при более высоких перенапряжениях. Низкие пределы обнаружения 30 нМ для GSH и 15 нМ для GSSG были получены на основе соотношения сигнал к шуму как 1:3. Предложенный метод является свободным от вмешательства цистеина, гомоцистеина, аскорбиновой

кислоты (AA) и мочевой кислоты (UA). Не наблюдалось на поверхности электрода обрастание во время последовательных сканирований. Стабильность, высокая чувствительность и низкий предел обнаружения сделали предложенный электрод применимым для анализа биологических жидкостей [46].

1.4 Вольтамперометрический метод анализа

В основе электрохимических методов исследования и анализа лежит изучение и использование процессов, протекающих на поверхности электрода или в межэлектродном пространстве. Аналитический сигнал возникает в результате электрохимической реакции, то есть гетерогенной реакции переноса электронов или ионов через границу раздела электропроводящих фаз [47].

Вольтамперометрия – высокочувствительный метод анализа неорганических и органических веществ в химических, биологических, геологических, экологических и других объектах.

Метод основан на получении и изучении вольтамперных (поляризационных) кривых, отражающих зависимость силы тока (I), протекающего через электрохимическую ячейку от приложенного к ячейке напряжения (E). Поляризацией называют смещение потенциала электрода от равновесного значения под действием прилагаемого напряжения [48]. Вольтамперометрия – высокочувствительный метод анализа неорганических и органических веществ в химических, биологических, геологических, экологических и других объектах.

Метод основан на получении и изучении вольтамперных (поляризационных) кривых, отражающих зависимость силы тока (I), протекающего через электрохимическую ячейку от приложенного к ячейке напряжения (E). Поляризацией называют смещение потенциала электрода от равновесного значения под действием прилагаемого напряжения [48].

Метод инверсионной вольтамперометрии

Метод инверсионной вольтамперометрии состоит в выделении электролизом определяемого элемента из разбавленного раствора на стационарном индикаторном электроде с последующим анодным растворением принятой амальгамы и регистрацией вольтамперной кривой. Этот вариант метода называют анодной инверсионной вольтамперометрией.

Процесс электролиза (накопления) проводят при постоянном потенциале, соответствующем предельному току (E_z), в перемешиваемом растворе фонового электролита. Анодное окисление полученной амальгамы исполняют при линейно-меняющемся потенциале. Вольтамперная кривая имеет при этом форму пика

Так как определяемое вещество переходит при электролизе из достаточно большого объема раствора в достаточно маленький объем ртутной капли, концентрация его на поверхности электрода на несколько порядков выше, чем в растворе, т.е. происходит его концентрирование, что приводит к повышению анодного тока окисления по сравнению с током электролиза. Чувствительность метода инверсионной вольтамперометрии на 2-3 порядка выше, чем в полярографии. Этим методом можно определять концентрации веществ в диапазоне $10^{-8} \div 10^{-6}$ моль/л, а в некоторых случаях до $10^{-10} \div 10^{-9}$ моль/л.

В качестве индикаторных электродов используются: стационарная ртутная капля на серебряной подложке (РКЭ); ртутно-пленочные электроды (РПЭ) – пленка ртути, осажденная на серебряной проволочке; графитовые электроды (ГЭ); ртутно-графитовые электроды (РГЭ) – тонкая пленка ртути на графитовой подложке; металлические электроды и др.

Ячейки, используемые в методе инверсионной вольтамперометрии, могут быть различной конструкции.

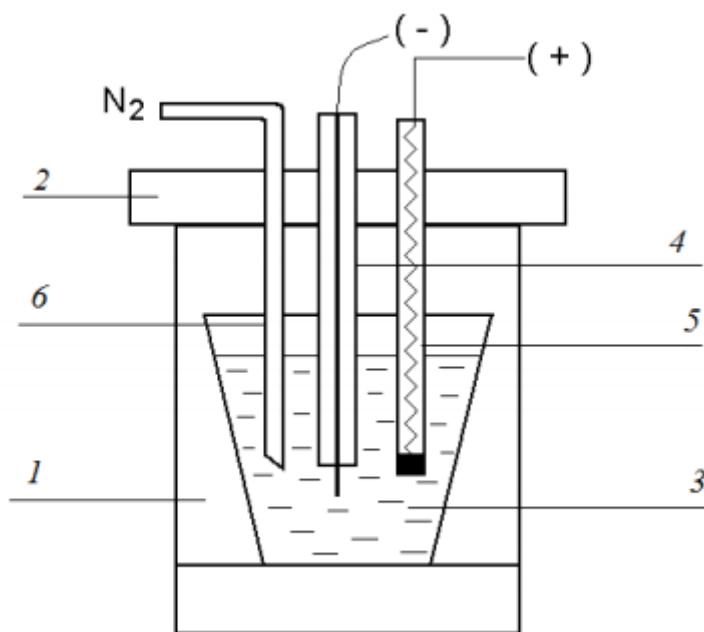


Рисунок 2 – Схема электрохимической ячейки

1 – корпус ячейки; 2 – съемная крышка с отверстиями; 3 – вставной кварцевый стаканчик с фоновым электролитом, содержащим пробу с определяемыми элементами; 4 – индикаторный электрод; 5 – электрод сравнения; 6 – трубка для ввода в фоновый электролит инертного газа

В стакан со съемной крышкой вмещается кварцевый стаканчик с раствором фонового электролита. Через отверстие в крышке в ячейку устанавливаются 2 электрода: индикаторный и электрод сравнения, и стеклянная трубочка для пропускания инертного газа. В качестве электрода сравнения применяется насыщенный каломельный электрод, хлоридсеребряный или другие типы электродов [49].

2. Экспериментальная часть

2.1 Аппаратура, ячейки, электроды

Исследование электрохимических свойств глутатиона проводилось на компьютеризованном вольтамперометрическом анализаторе ТА-Lab («Томьаналит» г. Томск).

Анализатор вольтамперометрический ТА-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 ТА-Lab ориентирован на удобство проведения измерений в рутинном анализе с применением малого количества реактивов. Имеет четыре формы разверток поляризующего напряжения: постоянно-токовую, ступенчатую, квадратно-волновую и дифференциально-импульсную. Может работать в простом и дифференциальном режимах. Особенности анализатора: одновременный анализ 3-х разных проб; перемешивание раствора путем стабилизированной вибрации индикаторного электрода; эффективный способ отмывки электрохимической ячейки; возможность обработки анализируемых растворов инертным газом и озоном; программный способ реализации анализа; надежное и удобное крепление электродов, исключающее контакт оператора с рабочей поверхностью электрода; встроенная УФ-лампа для устранения мешающего влияния O_2 и разрушения органических веществ; возможность работы в двух- и трехэлектродном режимах. Наиболее важные технические характеристики анализатора: чувствительность $5 \cdot 10^{-11}$ А; воспроизводимость аналитических сигналов 1-5%; продолжительность одновременного анализа трех подготовленных проб 5-30 мин.

Вольтамперометрический анализатор ТА-Lab, совмещенного с ПК производили в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Характеристики вольтамперограмм (высота пика, потенциал пика) осуществляли в компьютерной программе ASSAER.

Перемешивание растворов осуществляли при путем стабилизированной вибрации индикаторного электрода.

Для удаления кислорода в растворе подавали газообразный азот из баллона под давлением через силиконовый шланг, со съемной стеклянной трубкой с оттянутым концом.

pH растворов определяли с помощью pH-метра (Mettler Toledo, Швейцария).

Взвешивание точной навески вещества проводили на лабораторных аналитических весах общего назначения (класс точности 0,0001 г., Россия).

В работе использовали мерную лабораторную стеклянную посуду: колбы наливные вместимостью 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 и 1000,0 см³; цилиндры вместимостью 5,0 и 10,0 см³.

Добавки исследуемых веществ проводили при помощи мерных лабораторных стеклянных пипеток вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; и 10,0 см³, а также дозаторов типа ДП-1-50, ДП-1-200, ДП-1-1000 с дискретностью установки доз 1,0 мкл и погрешностью не более 5 % отн. Для каждого раствора какого-либо вещества использовали отдельную пипетку или сменный наконечник дозатора.

Сменные стаканчики из кварцевого стекла отмывали концентрированной серной или азотной кислотами с последующим кипячением в течение 10÷15 мин на плитке с закрытой спиралью. Чистоту проверяли методом вольтамперометрии. Перед началом каждой серии опытов снимали «холостой» опыт в фоновом электролите с целью контроля чистоты фонового электролита и чистоты посуды. В случае отсутствия пиков металлов на анодно-катодных вольтамперограммах, а также пиков адсорбции-десорбции на емкостных кривых, используя методы инверсионной и переменноточковой вольтамперометрии, посуда и фоновый электролит считались чистыми.

При работе на TA-Lab электрохимическая ячейка представляла собой стеклянный стаканчик, устанавливаемый на подвижную платформу в специализированное отверстие.

В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода в работе использовали хлоридсеребряный электрод (ХСЭ). ХСЭ представлял собой полый цилиндр, заполненный раствором хлорида калия, в который опущена серебряная проволока, покрытая труднорастворимой солью хлорида серебра. Готовый ХСЭ хранили в насыщенном растворе KCl и перед работой ополаскивали бидистиллированной водой.

В работе использовали следующие индикаторные электроды:

1. Ртутный пленочный электрод (РПЭ) с серебряным контактом. Представлял собой проволочку диаметром 1 мм и длиной 6 мм из чистого серебра, припаянную к медному контактному проводнику. Площадь рабочей поверхности электрода $S=0,196 \text{ см}^2$. На его рабочую поверхность наносили тонкую пленку ртути при помощи электролиза из насыщенного раствора азотнокислой закисной ртути $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ или механическим путем обычным обмакиванием. Процедуру амальгамирования рабочей поверхности электрода повторяли при появлении незаамальгированных участков на поверхности электрода. Готовый РПЭ хранили в бидистиллированной воде. Перед работой электрод протирали фильтровальной бумагой и промывали бидистиллированной водой. Рабочий диапазон потенциалов от 0 до -1,6 В.

2. Углеродсодержащий электрод состоит из полиэтиленового корпуса, который заполнен электропроводящей смесью полиэтилена с техническим углеродом, и является твердым композитным электродом. Путем модифицирования поверхности электрода получают микроэлектродные ансамбли, отличающиеся высокими чувствительностью и стабильностью работы. Регенерация рабочей поверхности электрода осуществляется путем срезания тонкого слоя (0,1-0,3 мм) специальным резакон. Перед работой электрод протирали фильтровальной бумагой и промывали бидистиллированной водой. Рабочий диапазон потенциалов от -2 до +2 В.

2.2 Реактивы

В данной работе использовались следующие реактивы:

- L-глутатион восстановленный (Fluka, Германия);
- Стандарт-титры для приготовления стандартных буферных растворов:
 - тетраоксалат калия 2-водный $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ с $\text{pH}=1,65$;
 - гидрофталат калия $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ с $\text{pH}=4,01$;
 - эквимольная смесь дигидрофосфата калия KH_2PO_4 и гидрофосфата натрия Na_2HPO_4 с $\text{pH}=6,86$;
 - тетраборат натрия 1-водный $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ с $\text{pH}=9,18$
- L-цистеин (Fluka, Германия);
- L-глицин (Fluka, Германия);
- L-цистин (Fluka, Германия);
- - нитрат серебра (AgNO_3) (Лабтех, Россия), квалификация ч.д.а.;

2.3. Объекты исследования

Модельной системы для поиска аналитического сигнала тиолового соединения был рассмотрен модельный раствор: L-глутатиона.

Для определения содержания глутатиона в биологических объектах была применена сыворотка крови людей без аномалий.

2.4 Вольтамперометрический метод определения глутатиона в модельных растворах и в сыворотке крови человека на ртутно-пленочном электроде

2.4.1 Исследование электрохимических свойств глутатиона на ртутно-пленочном электроде

Первым этапом были исследованы электрохимические свойства глутатиона (GSH) на разных фоновых электролитах на ртутно-пленочном электроде (РПЭ).

В электрохимическую ячейку помещали 5 мл раствора фонового электролита и 5 мл воды. В качестве фонового электролита использовали

буферные растворы с $\text{pH}=4,01$, $\text{pH}=6,86$ и $\text{pH}=9,18$. Собирали трехэлектродную ячейку, состоящую из рабочего РПЭ, ХСЭ использовались в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода. Электроды опускали в раствор фонового электролита и подключали к анализатору ТА-Lab. Использовался постоянноточковый режим циклической вольтамперометрии, скорость развертки потенциала составляла $W=40\text{мВ/с}$, рабочий диапазон потенциалов от $-1,4$ до 0 В. Перемешивали раствор с помощью вибрации электродов 20 сек., затем 10 с. осуществляли успокоение раствора. Далее снимали циклическую вольтамперограмму фонового электролита. Повторяли съемку вольтамперограмм не менее пяти раз. После получения доказательств отсутствия загрязнителей в фоновом растворе и воспроизводимой фоновой кривой переходили к работе с исследуемым веществом. Далее вносили определенный объем исследуемого раствора GSH и проводили съемку вольтамперограмм в соответствии последовательности описанной выше.

На рисунках 3-5 представлены циклические вольтамперограммы восстановления-окисления GSH на РПЭ в разных буферных растворах: гидрофталат калия ($\text{pH}=4,01$); эквимольная смесь дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия ($\text{pH}=6,86$); тетраборат натрия 1-водный ($\text{pH}=9,18$).

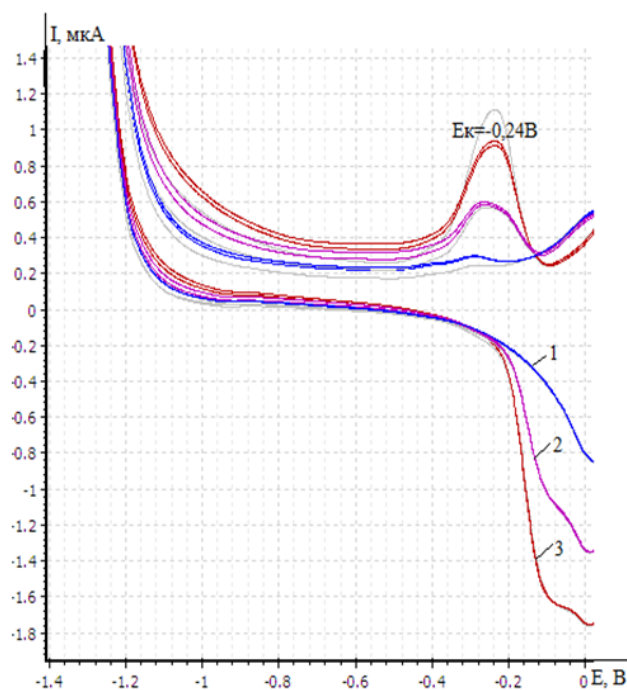


Рисунок 3 – Циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления GSH на РПЭ

1- фон $pH=4,01$; 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

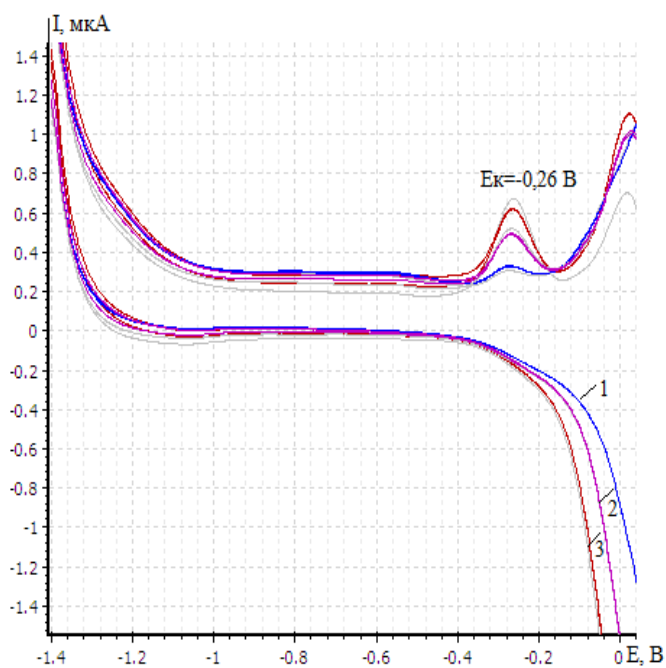


Рисунок 4 – Циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления GSH на РПЭ

1- фон $pH=6,86$; 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

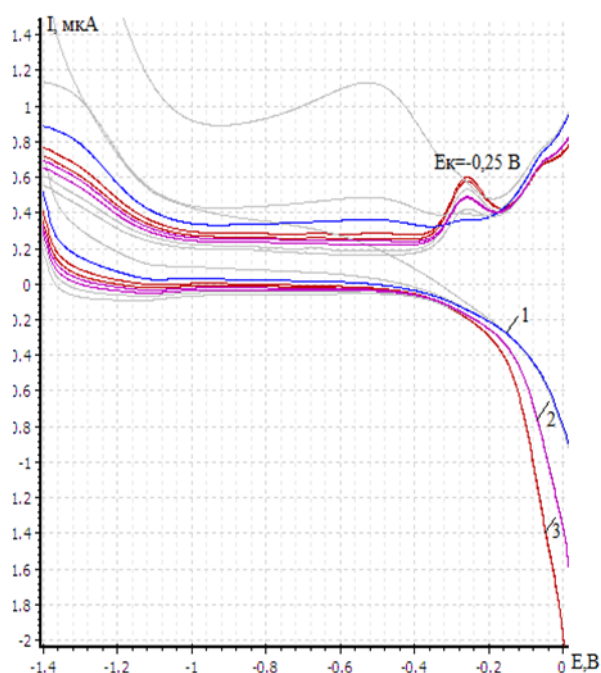


Рисунок 5 – Циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления GSH на РПЭ

1- фон $pH=6,86$; 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

При исследовании электрохимических свойств GSH был получен электрохимический сигнал на разных буферных растворах на РПЭ при потенциалах указанных в таблице 1.

Таблица 1 – Электрохимический сигнал на разных буферных растворах на РПЭ при анодных и катодных потенциалах

Фоновый электролит	Ек, В	Еа, В	Іпк, мкА
pH=4,01	-0,24	-0,14	0,918
pH=6,86	-0,26	-	0,605
pH=9,18	-0,25	-	0,590

Исходя из данных вольтамерограмм, наблюдаем катодные и анодные токи на буфере гидрофталат калия, на других буферных растворах анодные токи отсутствуют, вероятно, они смещены в сторону положительных потенциалов. Максимальный ток от GSH наблюдался для фона гидрофталат калия (pH=4,01).

На электродах из других материалов (PtЭ, СУЭ) в данной области потенциалов при данных условиях эксперимента GSH оказался электрохимически неактивен.

2.4.1.1 Исследование влияния природы фонового электролита на токи окисления и восстановления глутатиона на ртутно-пленочном электроде

Исследование электрохимических свойств GSH проводилось в катодных (в области потенциалов от 0 В до -0,6 В) и анодных (в области потенциалов от -0,6 до 0 В) областях в соответствии последовательности описанной выше. В катодной области для полного удаления кислорода подавали газообразный азот из баллона под давлением через силиконовый шланг. После убеждения отсутствия сигнала кислорода вводили добавки GSH с увеличением его концентрации в электрохимическую ячейку.

На рисунках 6-9 представлены вольтамперограммы восстановления GSH с увеличением его концентрации в растворе в дифференциальном режиме изменения потенциала при использовании разных фоновых электролитов.

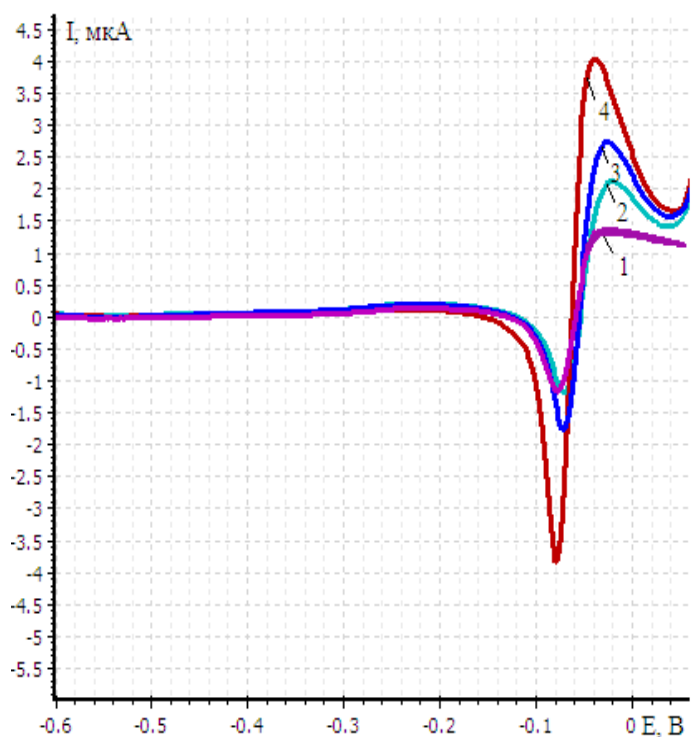


Рисунок 6 – Катодная вольтамперограмма GSH на РПЭ
 1- фон $pH=1,65$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
 4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

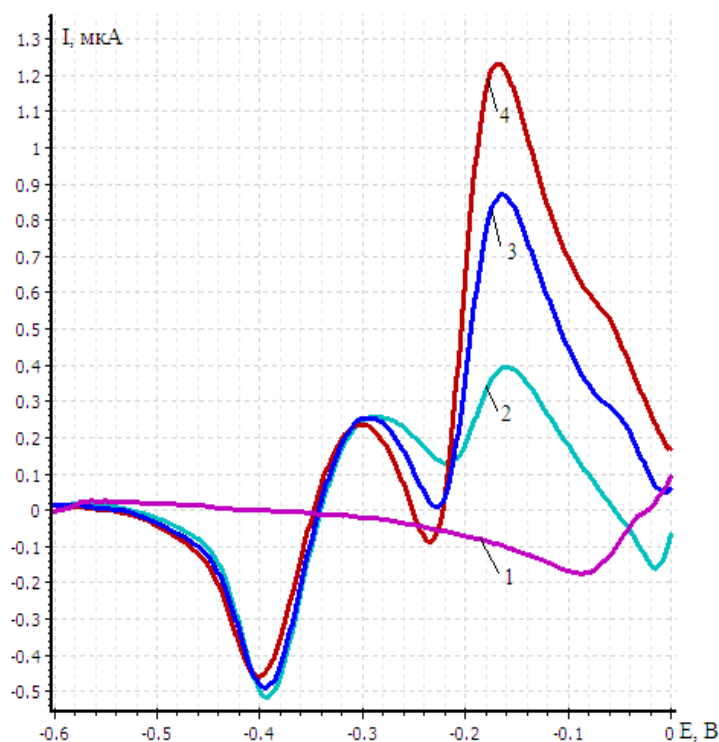


Рисунок 7 – Катодная вольтамперограмма GSH на РПЭ
 1- фон $pH=4,01$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
 4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

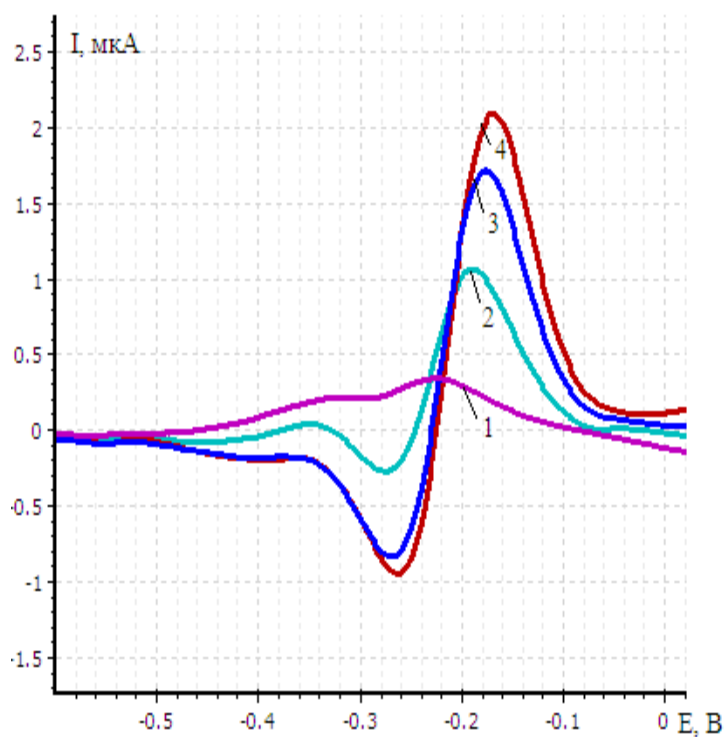


Рисунок 8 – Катодная вольтамперограмма GSH на РПЭ

1- фон $pH=6,86$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

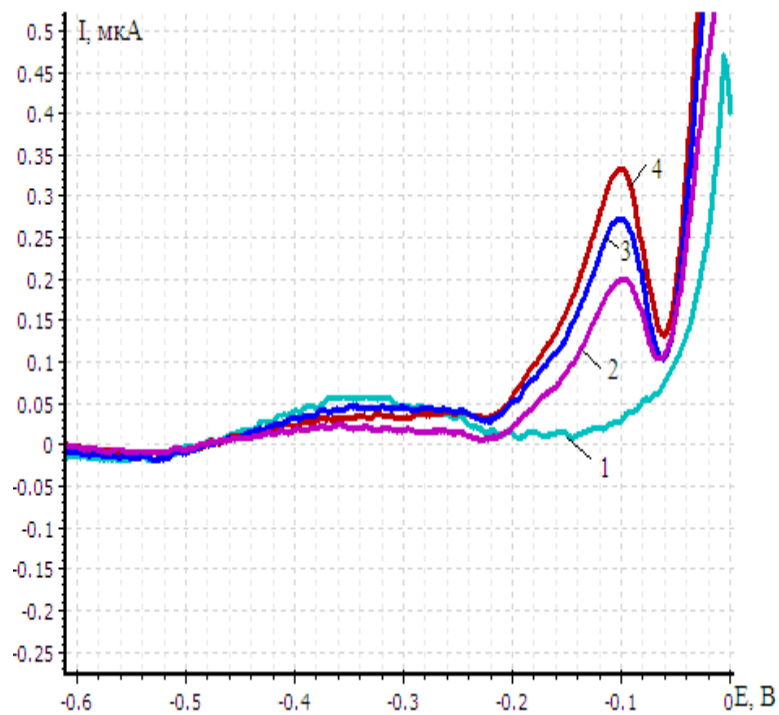


Рисунок 9 – Катодная вольтамперограмма GSH на РПЭ

1- фон $pH=9,18$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

На рисунках 10-13 представлены вольтамперограммы окисления GSH с увеличением его концентрации в растворе дифференциальном режиме изменения потенциала при использовании разных фоновых электролитов.

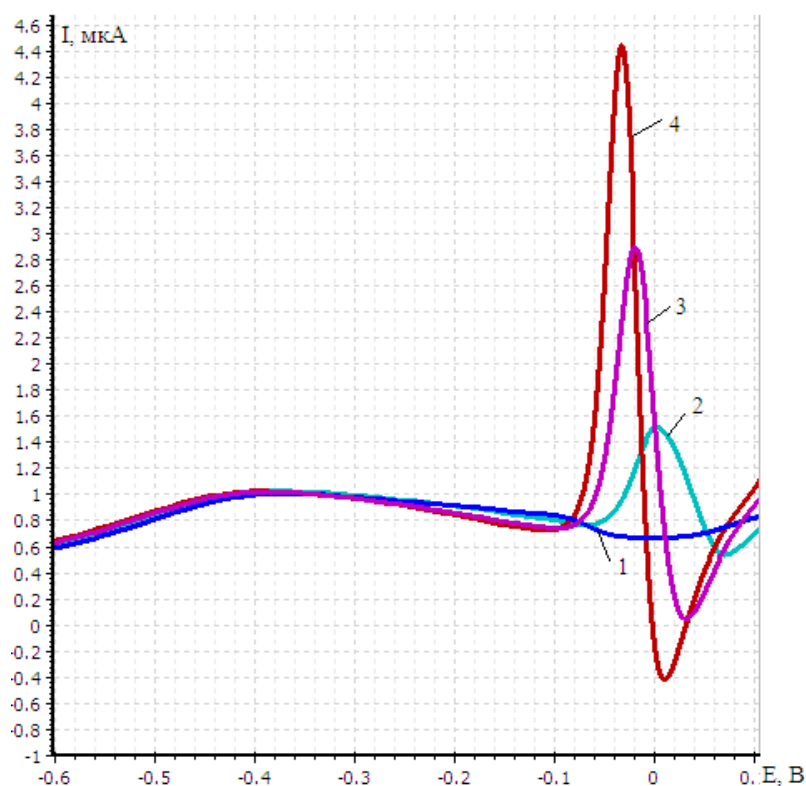


Рисунок 10 – Анодная вольтамперограмма GSH на РПЭ

1- фон $pH=1,65$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

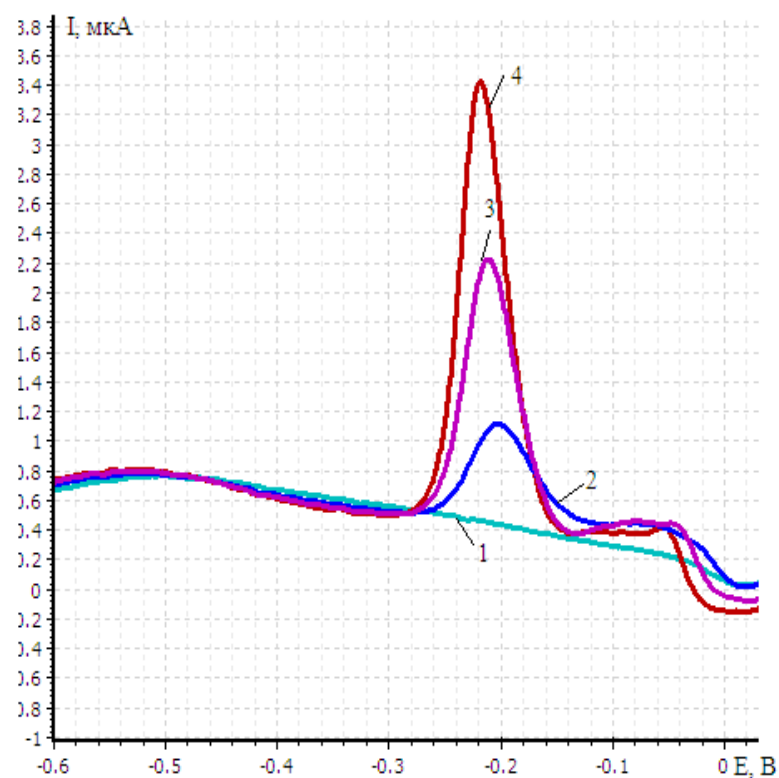


Рисунок 11 – Анодная вольтамперограмма GSH на РПЭ

1- фон $pH=4,01$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

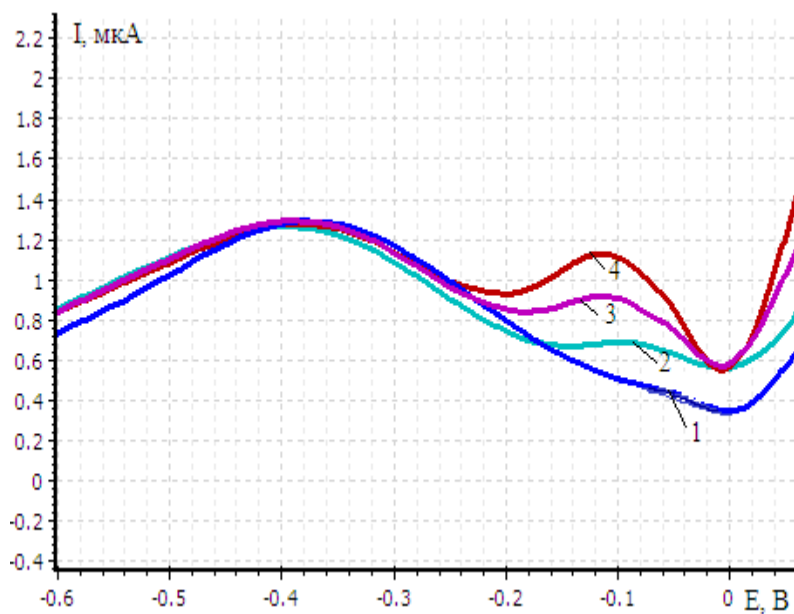


Рисунок 12 – Анодная вольтамперограмма GSH на РПЭ

1- фон $pH=6,86$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

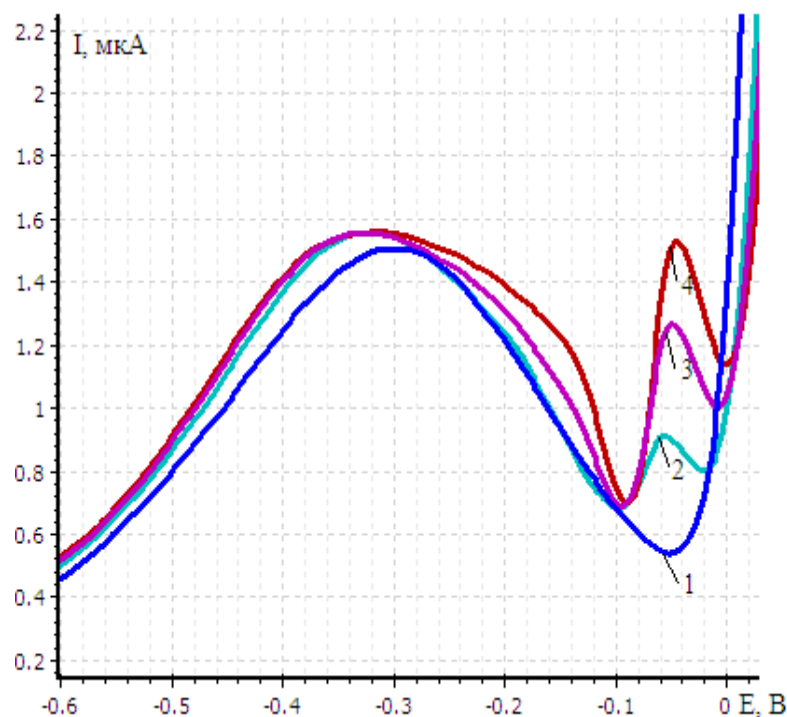


Рисунок 13 – Анодная вольтамперограмма GSH на РПЭ

1- фон $pH=6,86$; 2-GSH $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3-GSH $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
4-GSH $5,1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

Используя данные эксперимента, были построены графики зависимости токов восстановления и окисления GSH от природы буферных растворов отличающиеся составом солей и pH среды. Данные зависимости представлены на рисунках 14,15.

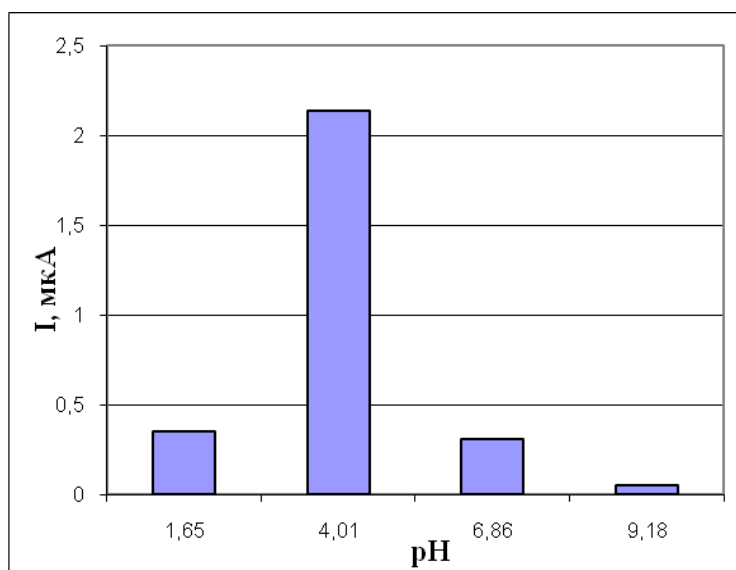


Рисунок 14 – Зависимость токов восстановления GSH ($3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³) от pH

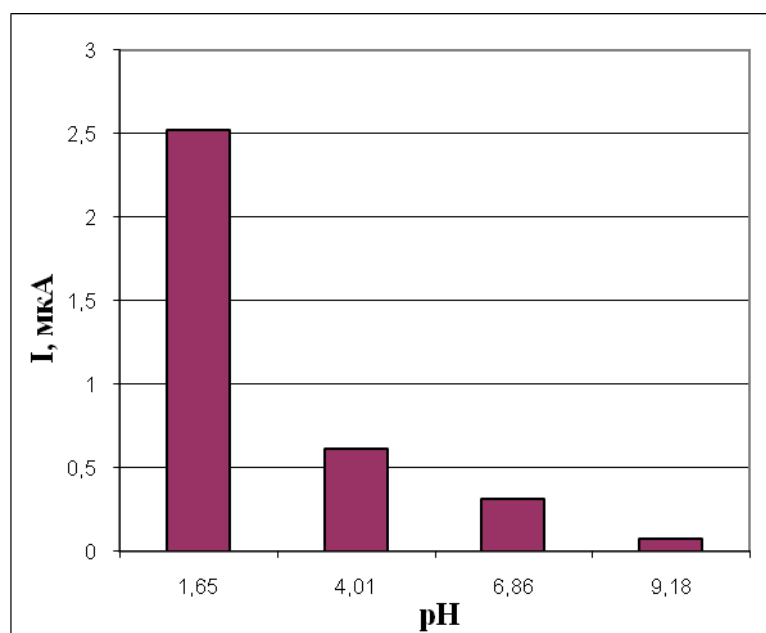


Рисунок 15 – Зависимость токов окисления GSH ($3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³) от pH

Согласно данным максимальные токи наблюдались в кислых областях pH. Для токов восстановления GSH максимальная величина тока соответствовала природе фонового электролита pH=4,01. А для токов окисления GSH максимальная величина соответствовала природе фонового электролита pH=1,65.

Несмотря на то, что максимальные токи окисления были получены в pH=1,65, прямолинейная зависимость тока от концентрации GSH в ячейке не соблюдалась. Данная зависимость представлена на рисунке 16.

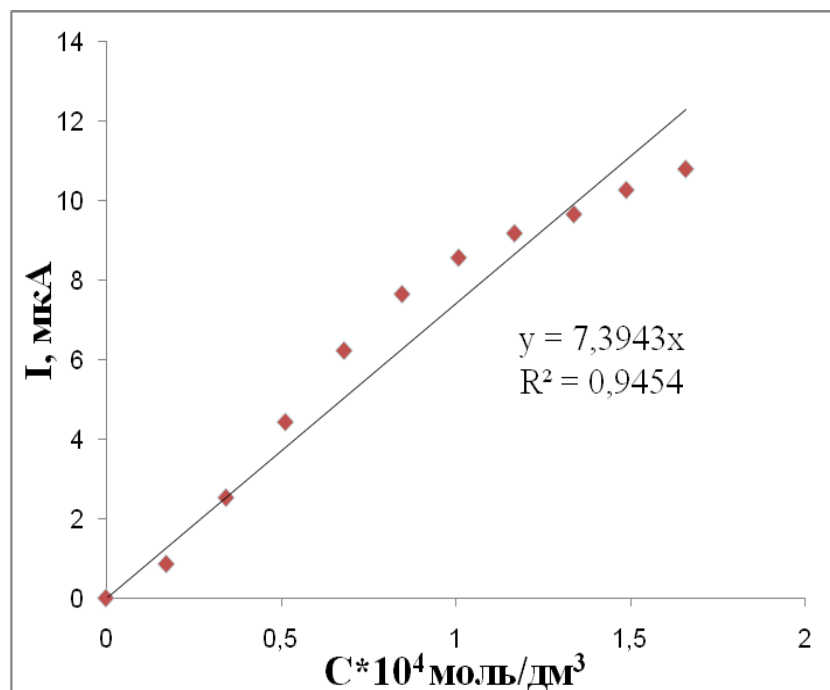


Рисунок 16 – Градуировочная зависимость тока окисления GSH от концентрации GSH в растворе в области от $3,40 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$ до $1,66 \cdot 10^{-4} \text{ моль/дм}^3$. $W=40 \text{ мВ/с}$; $\text{pH}=1,65$

Таким образом, согласно экспериментальным данным были выбраны следующие условия для определения GSH в модельных растворах:

- наилучшие условия, с точки зрения pH, был выбран буфер гидрофталат калия $\text{pH}=4,01$.
- для дальнейшего исследования были выбраны анодные вольтамперограммы, в связи с отсутствием мешающего влияния кислорода на ток окисления GSH. Градуировочная зависимость тока окисления GSH от концентрации его в растворе представлена на рисунке 17.

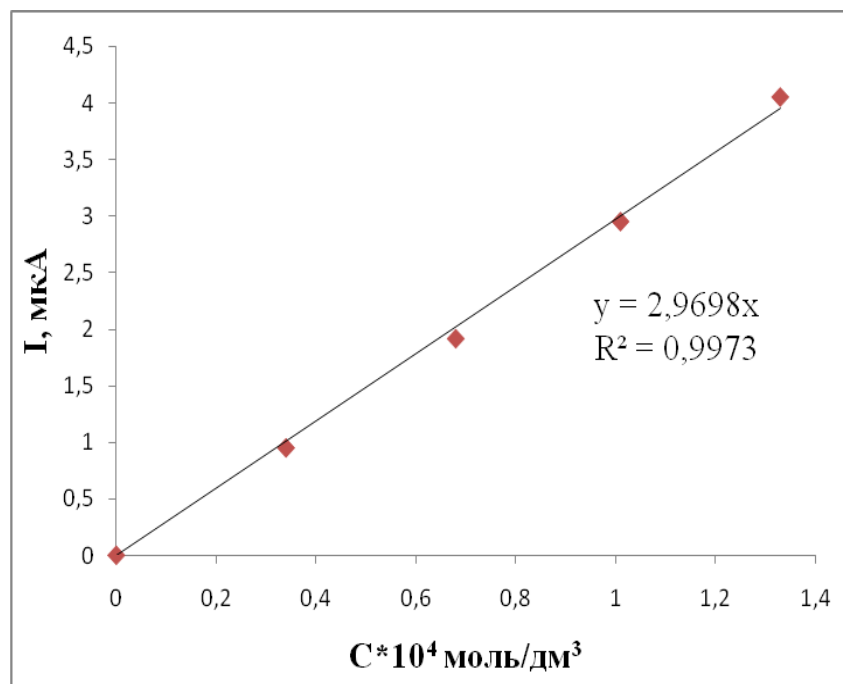


Рисунок 17 – Градуировочная зависимость тока окисления GSH от концентрации GSH в растворе в области от $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ до $1,66 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. $W=40$ мВ/с; $pH=4,01$

2.4.1.2 Исследование влияния pH фонового электролита среды Бриттона-Робинсона на токи окисления глутатиона на ртутно-пленочном электроде

Для учета влияния pH фонового электролита среды Бриттона-Робинсона на токи окисления GSH на ртутно-пленочном электроде была построена зависимость токов окисления от pH среды с учетом раствора Бриттона-Робинсона.

Раствор Бриттона-Робинсона был приготовлен из смеси фосфорной, уксусной и борной кислот с концентрациями 0,04 М (1:1:1). Для получения буферного раствора с требуемым значением pH к 100 мл этой смеси приливали указанный объем 0,2 н раствора NaOH. Таким образом были приготовлены растворы с pH=3,6, pH=6,9 и pH=9,16. На рисунке 18 представлена циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления GSH на РПЭ с pH=3,6.

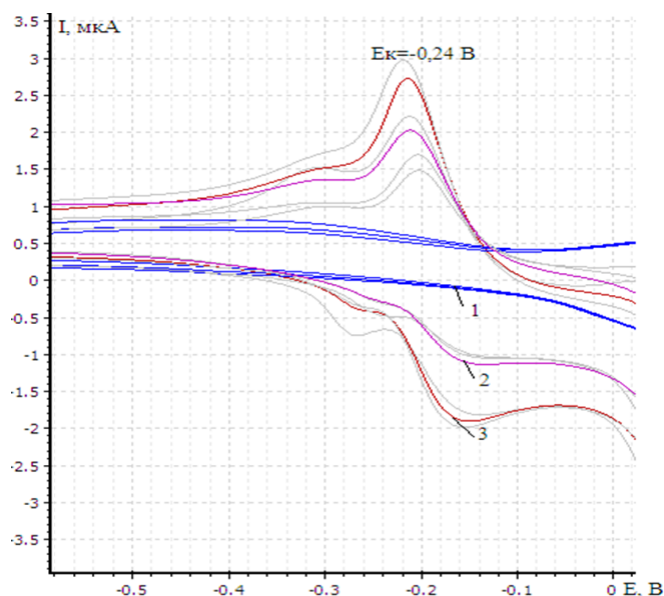


Рисунок 18 – Циклическая вольтамперограмма восстановления-окисления GSH на РПЭ

1- фон ($pH=3,6$); 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

На рисунке 19 представлена зависимость тока окисления глутатиона от рН среды Бриттона-Робинсона.

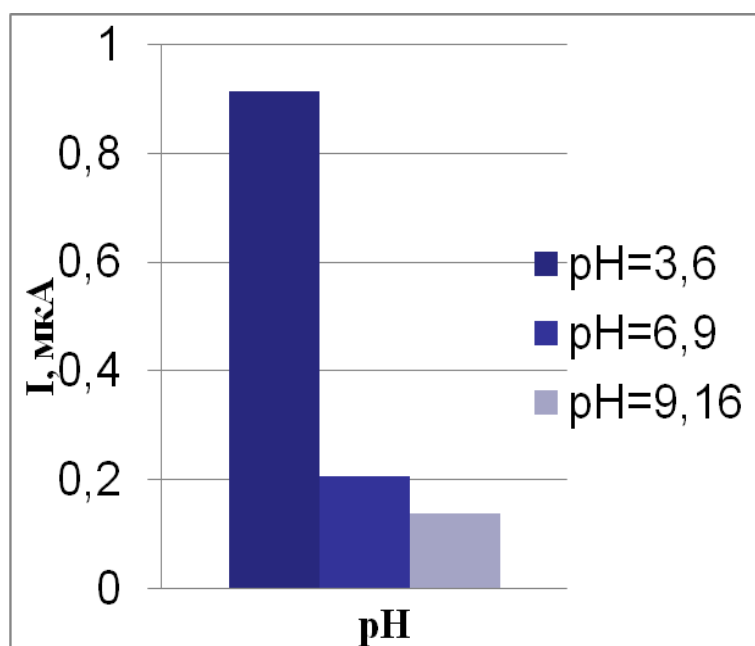


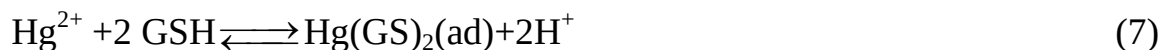
Рисунок 19 – Зависимость токов окисления GSH ($3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³) от рН среды Бриттона-Робинсона

Максимальные токи окисления GSH наблюдаются в кислых средах.

Зависимость токов окисления GSH от рН среды Бриттона-Робинсона была аналогична поведению GSH в буферных растворах разной природы.

2.4.1.3 Предположительный механизм окисления-восстановления глутатиона на ртутно-пленочном электроде

Было предположено, что с переносом электрона одновременно переносится протон водорода, предполагаемый механизм представлен в уравнениях 7,8.



В подтверждении данного механизма была записана анодная вольтамперограмма в зависимости от скорости развертки потенциалов. Прямолинейная зависимость тока окисления GSH от скорости развертки потенциалов представлена на рисунке 20.

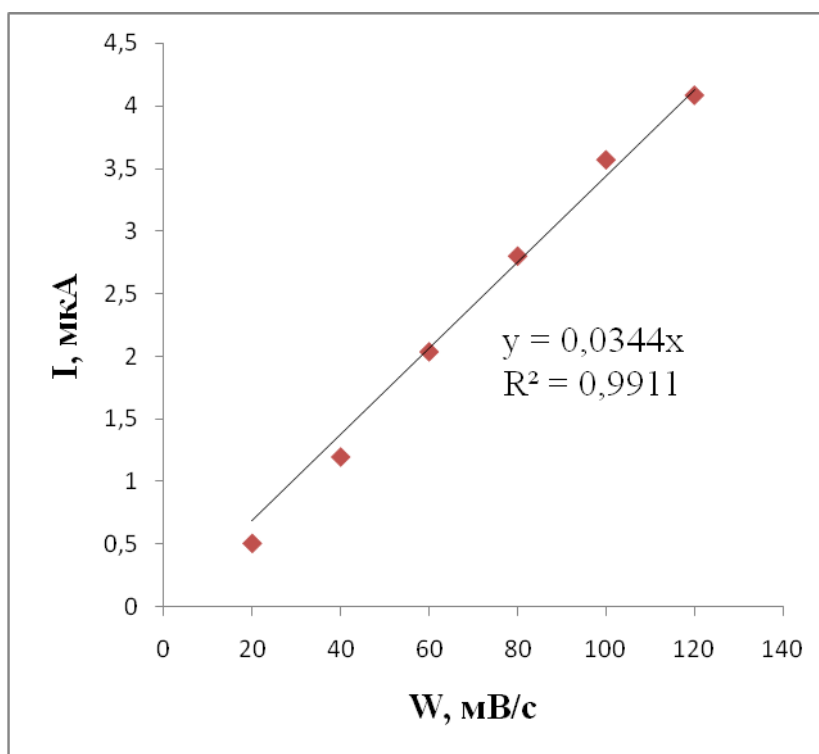


Рисунок 20 – Зависимость тока окисления GSH ($3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³) на РПЭ от скорости развертки потенциалов

Прямолинейная зависимость указывает на адсорбционный характер окисления GSH на РПЭ, что отражено в представленном механизме уравнение (7).

2.4.1.4 Подбор оптимальных параметров времени накопления и потенциала накопления для определения глутатиона в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде

Для нахождения оптимальных условий определения GSH в модельных растворах были подобраны потенциал и время накопления в условиях окисления GSH на РПЭ при выбранных условиях (pH=4,01; анодная вольтамперограмма)

Влияние потенциала накопления на величину тока окисления GSH на РПЭ было исследовано в области потенциалов от 0 до -0.4 В. Данная зависимость представлена на рисунке 21.

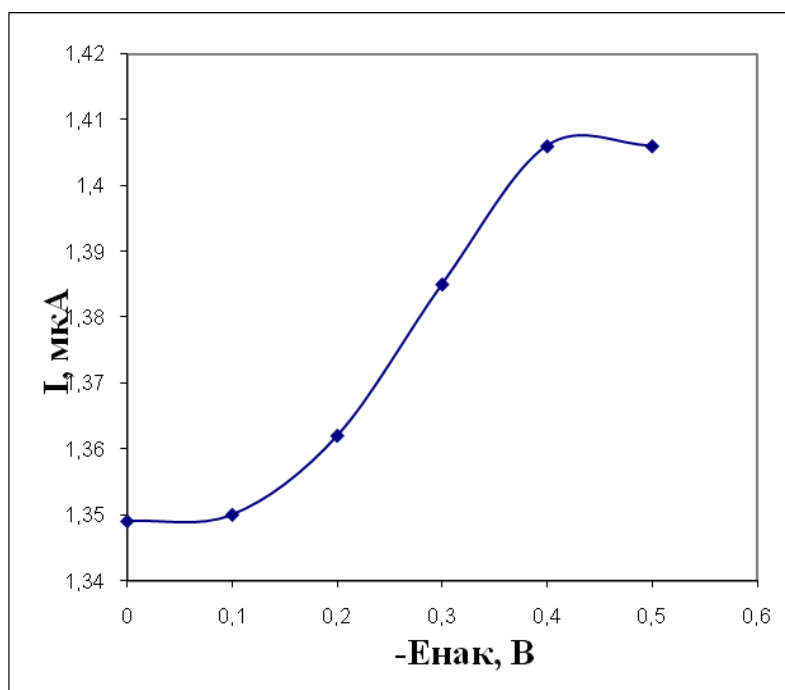


Рисунок 21 – Зависимость тока окисления GSH ($C=3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³) на РПЭ от потенциала накопления на РПЭ. $W=40$ мВ/с.

Максимальный ток окисления GSH на РПЭ достигается при потенциале накопления -0.4 В.

При исследовании зависимости тока окисления GSH от времени накопления при потенциале накопления в -0,4В, замечено, что на РПЭ ток пика окисления GSH возрастает до 110 с и сохраняется постоянным. Данная зависимость представлена на рисунке 22.

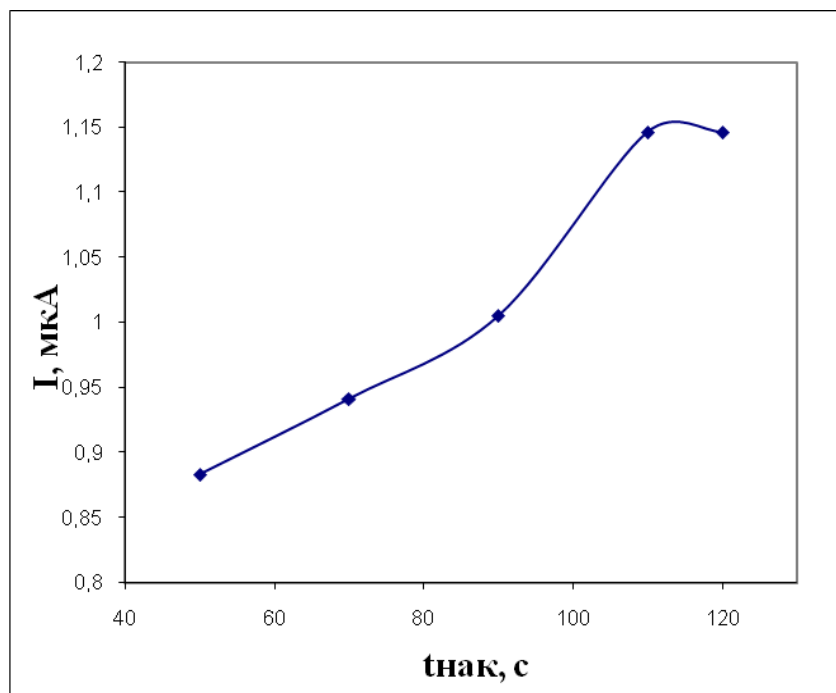


Рисунок 22 – Зависимость тока окисления GSH ($C=3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³) на РПЭ при постоянном потенциале накопления $E_{\text{нак}}=-0,4\text{В}$ от времени накопления. $W=40$ мВ/с

Максимальный ток окисления GSH на РПЭ достигается при времени накопления равное 110 с.

2.4.2 Электрохимические свойства цистина, цистеина, глицина

Согласно данным представленного механизма окисления-восстановления GSH (уравнения 7-8) на РПЭ предполагается предварительная адсорбция GSH через атом серы.

Для подтверждения данного механизма были записаны вольтамперограммы окисления других модельных серосодержащих соединений, таких как, цистин и цистеин. В качестве модельного соединения не содержащего серу был выбран глицин.

На рисунке 24 представлена анодная вольтамперограмма цистина на РПЭ.

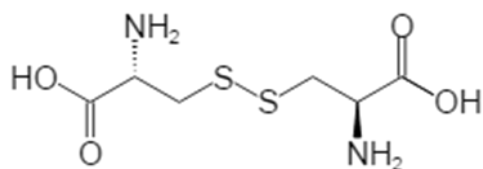


Рисунок 23 – Структурная формула цистина

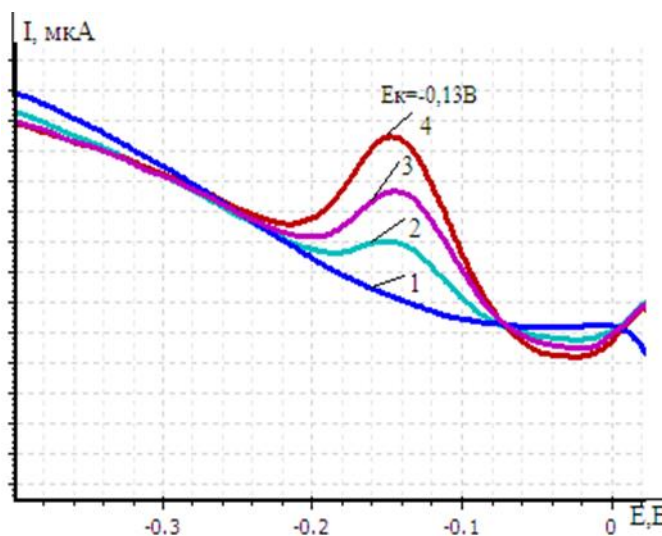


Рисунок 24 – Анодная вольтамперограмма цистина на РПЭ
 1- фон $pH=4,01$; 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
 4- $5,14 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

На рисунке 26 представлена анодная вольтамперограмма цистеина на РПЭ.

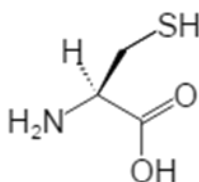


Рисунок 25 – Структурная формула цистеина

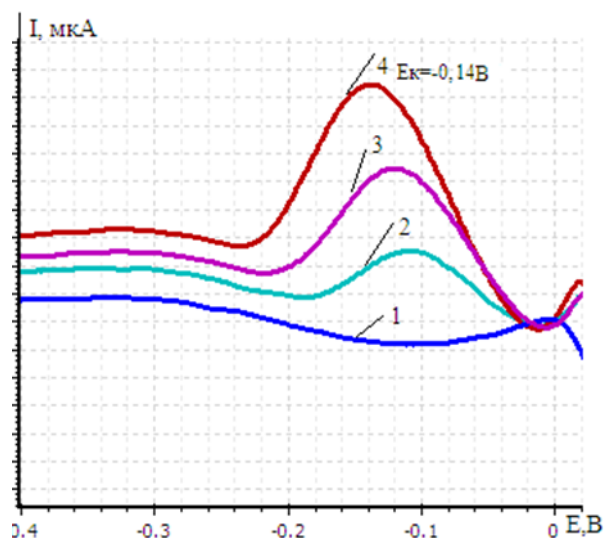


Рисунок 26 – Анодная вольтамперограмма цистеина на РПЭ
 1- фон $pH=4,01$; 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
 4- $5,14 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

Потенциалы окисления цистина, цистеина близки к потенциалу окисления GSH $E=-0,14$ В на РПЭ.

На рисунке 28 представлена анодная вольтамперограмма глицина

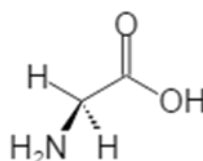


Рисунок 27 – Структурная формула глицина

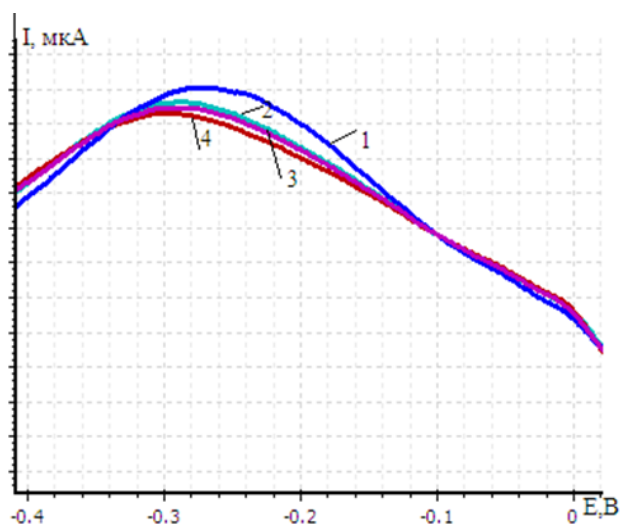


Рисунок 28 – Анодная вольтамперограмма глицина на РПЭ
 1- фон $pH=4,01$; 2- $1,73 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³; 3- $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³;
 4- $5,14 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³

Глицин оказался в данной области потенциалов на данном электроде электрохимически не активен.

Таким образом, GSH окисляется на РПЭ через –SH группу. При дальнейшей разработки методики определения GSH в сложных объектах (сыворотка и плазма крови) возможно суммарное определения серосодержащих соединений при $E = -0.14\text{ В}$ на РПЭ.

Таким образом, подобраны оптимальные условия определения GSH в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде:

- Буферный раствор: гидрофталат калия $\text{pH} = 4,01$;
- Скорость развертки: $W = 40\text{ мВ/с}$;
- Потенциал накопления: $E_{\text{нак}} = -0,4\text{ В}$;
- Время накопления: $t_{\text{нак}} = 110\text{ с}$
- Линейный диапазон концентраций GSH от $3,40 \cdot 10^{-5}\text{ моль/дм}^3$ до $1,66 \cdot 10^{-4}\text{ моль/дм}^3$
- предполагаемый механизм представлен в уравнениях 1,2.

Данные условия эксперимента могут быть использованы для разработки методики определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека.

2.4.3 Вольтамперометрический метод определения глутатиона в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде

Полученные пики окисления GSH, в модельных растворах на РПЭ можно использовать в качестве аналитических сигналов для разработки методики суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии.

Для разработки этой методики был использован аналитический сигнал GSH при анодной развертке потенциала при $E = -0.2\text{ В}$, где зависимость прироста предельного тока окисления GSH от увеличения его концентрации

в растворе линейна. Эта область находилась между концентрациями от $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ до $1,66 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³.

Градуировочная зависимость тока окисления GSH от его концентрации в ячейке в условиях постоянно токовой вольтамперометрии на РПЭ приведена на рисунке 29.

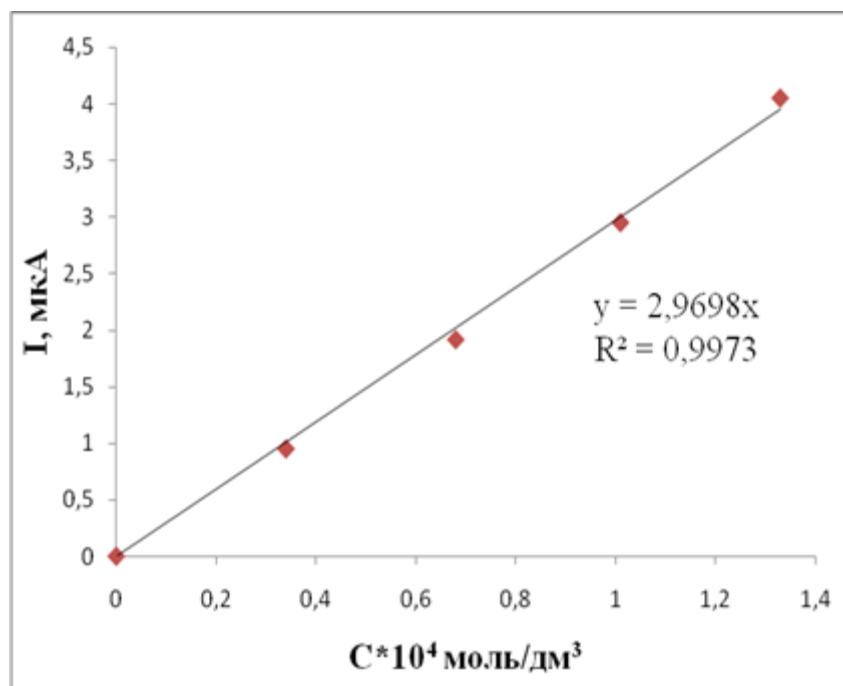


Рисунок 29 – Градуировочная зависимость тока окисления GSH от концентрации GSH в растворе в области от $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ до $1,66 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³. $W=40$ мВ/с; $pH=4,01$

На основании полученных данных выведено уравнение регрессии зависимости изменения тока окисления GSH от его концентрации в растворе в диапазоне концентраций $3,40 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ до $1,66 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³:

$$I = 2,9698 \times C \quad (9)$$

Предел обнаружения GSH $3,4 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³ достаточен для применения ее в оценки количественного содержания GSH в сыворотке крови.

Таблица 2 – Значения тока окисления GSH от его концентрации в растворе

№	концентрация в ячейке моль/дм ³	величина тока мкА	Добавка, мл
1	0,000034	0,616	0,1
2	0.000068	1,761	0.2
3	0.000101	2,952	0.3
4	0.000133	4,054	0.4
5	0.000166	5,173	0,5

Правильность методики определения GSH в модельных растворах проверялась методом «введено-найдено» по критерию Стьюдента (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты количественного определения GSH в модельных растворах (n=5, P=0,95)

Введено, С·10 ⁵ , моль/дм ³	Найдено, С·10 ⁵ , моль/дм ³	ε, %
0,34	2,0±0,2	5,9
0,68	5,9±0,5	8,7
1,01	9,9±0,9	9,8
1,33	13,7±0,3	10,3
1,66	17,5±0,6	10,5

Для рассматриваемого диапазона концентрации GSH принято решение приписать наибольшую погрешность (10,5) для всей области концентраций линейного участка градуировочной характеристики.

Таким образом, оптимальные условия эксперимента, позволили нам использовать аналитический сигнал GSH в модельных растворах для разработки методики суммарного количественного содержания глутатиона в сыворотке крови человека.

2.5 Вольтамперометрический метод определения глутатиона в модельных растворах на углеродсодержащем электроде

В качестве метода сравнения определения GSH был выбран метод титрования в присутствии ионов серебра с вольтамперометрическим способом регистрации сигнала.

Исходя из литературных данных известно [50], что тиоловые соединения вступают во взаимодействие с металлами. Наиболее перспективным является серебро, которое взаимодействуя с GSH образует тиоляты серебра.



Методика определения содержания GSH заключалась в съемке вольтамперограмм окисления серебра в модельных растворах на углеродсодержащем электроде в присутствии GSH.

Анодная вольтамперограмма окисления серебра на углеродсодержащем электроде с последующем введением GSH представлена на рисунке 30.

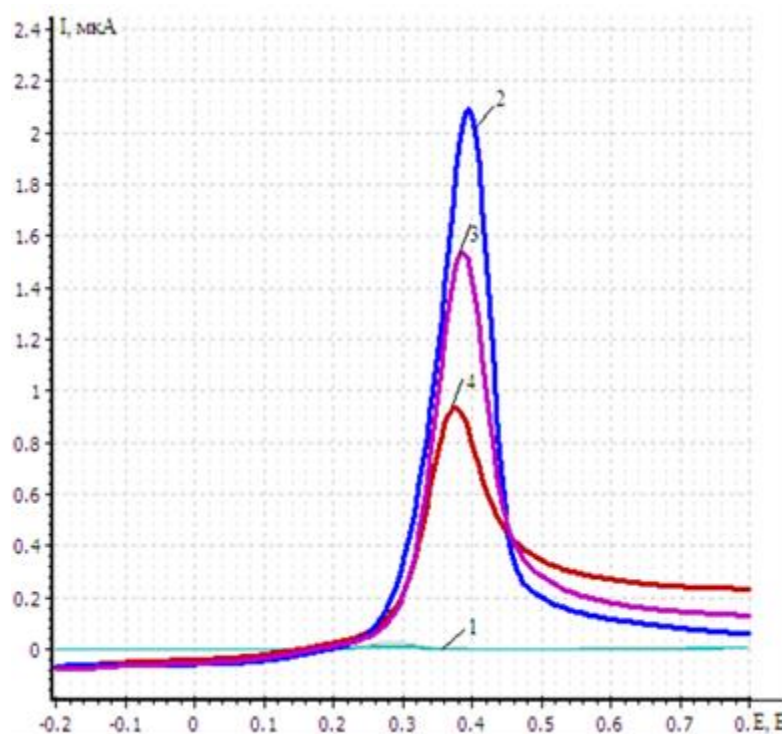


Рисунок 30 – Анодная вольтамперограмма окисления Ag на углеродсодержащем электроде

1- фон $pH=4,01$; 2- $Ag(NO_3)$ ($C=1,81 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³); 3- GSH

Все расчеты проводились с оценкой ΔI , где

$$\Delta I = I_{Ag} - I_{GSH}, \text{ где}$$

I_{Ag} – ток окисления серебра;

I_{GSH} – ток окисления серебра в присутствии GSH

В качестве аппаратного оформления использовался вольтамперометрический анализатор TA-Lab. Использовалась постоянноточковая вольтамперометрия с линейной скоростью развертки потенциала $W=100$ мВ/с.

2.5.1 Исследование влияния природы фонового электролита на токи окисления серебра в присутствии глутатиона на углеродсодержащем электроде

Было исследовано влияние фонового электролита на ток окисления серебра в присутствии GSH. Были исследованы фоновые электролиты $pH=4,01$; $pH=6,86$ и $pH=9,18$.

Для определения содержания GSH в ячейку приливали 5 мл буферного раствора и 5 мл воды. Регистрацию фоновой линии проводили в постоянноточковом режиме съемки при линейной скорости развертки потенциала $W=100$ мВ/с, в интервале потенциалов от $-0,2$ до $+0,8$ В. Отсутствие пиков на вольтамперограмме и воспроизводимые кривые свидетельствовали о чистоте фона. После получения удовлетворительных кривых фона, вносили добавку нитрата серебра объемом $V_{\text{NaNO}_3}=0,05$ мл ($C=1,81 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³), перемешивали и проводили съемку вольтамперограмм. Далее вносили добавку GSH ($C=2,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³).

В таблице 4 представлены данные величины ΔI от pH среды.

Таблица 4 – Зависимость тока окисления серебра в присутствии GSH ($C=2,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) от pH среды

pH	ΔI , мкА
4,01	4,844
6,86	1,742
9,18	3,061

Максимальные токи наблюдались при pH=4,01.

Для дальнейшего исследования GSH в сыворотке крови человека на углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра была выбрана градуировочная зависимость, представленная на рисунке 31.

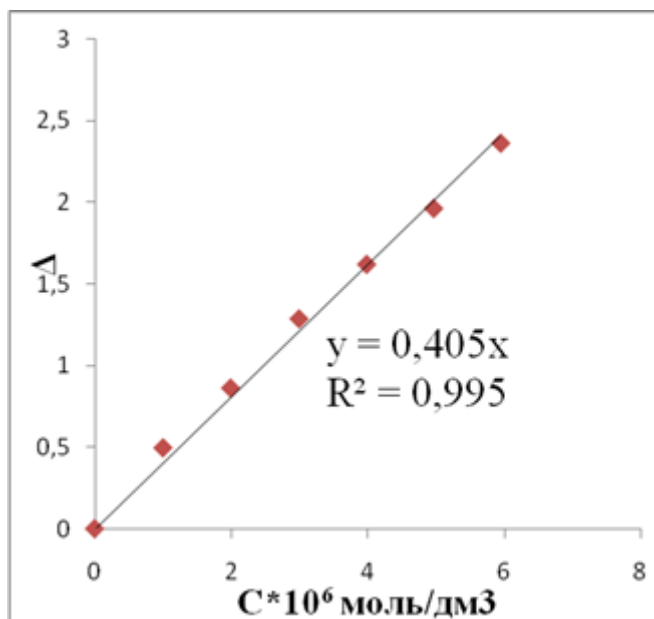


Рисунок 31 – Градуировочная зависимость ΔI от концентрации GSH (от $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³ до $5,94 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) на углеродсодержащем электроде

Анодный пик серебра регистрировали в диапазоне потенциалов от +0,2 до +0,5 В. Анодный пик GSH регистрировали в диапазоне потенциалов от +0,2 до +0,5 В

2.5.2 Исследование оптимальных параметров потенциала накопления и времени накопления на ток окисления серебра в присутствии глутатиона на углеродсодержащем электроде

Для нахождения оптимальных условий определения глутатиона в модельных растворах были подобраны потенциал и время накопления в условиях окисления серебра на углеродсодержащем электроде в присутствии глутатиона.

Влияние потенциала накопления на величину тока окисления серебра в присутствии GSH на углеродсодержащем электроде было исследовано в области потенциалов от -0,2 до +0,3 В. На рисунке 32 представлена зависимость тока окисления серебра в присутствии глутатиона от потенциала накопления на углеродсодержащем электроде.

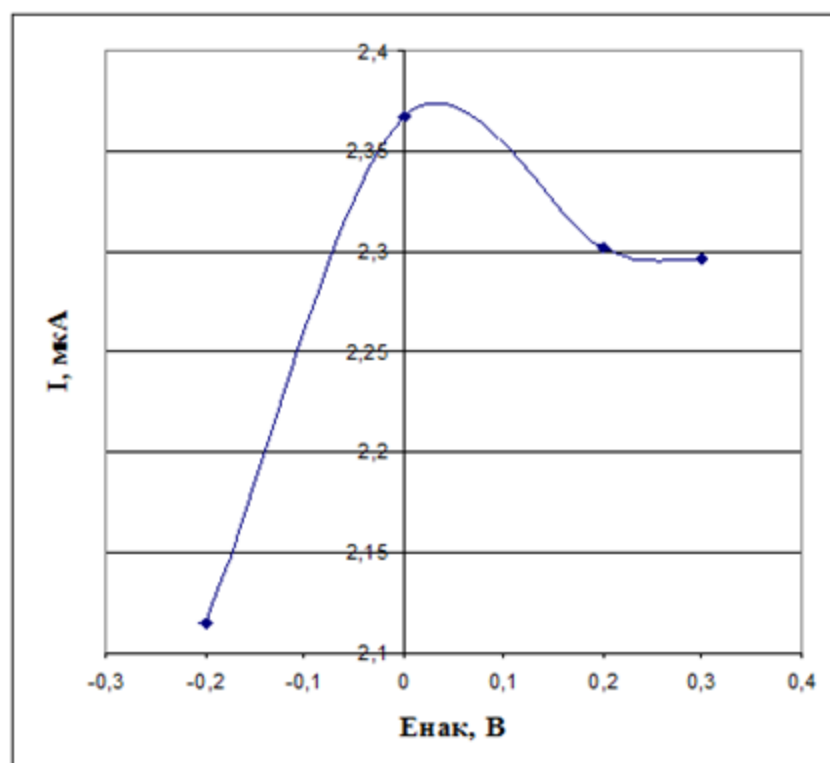


Рисунок 32 – Зависимость тока окисления серебра в присутствии GSH ($C=2,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) на углеродсодержащем электроде от потенциала накопления. $W=100$ мВ/с.

Максимальный ток окисления GSH на углеродсодержащем электроде достигается при потенциале накопления 0 В.

При исследовании зависимости тока окисления серебра в присутствии GSH на углеродсодержащем электроде от времени накопления при постоянном потенциале накопления 0В. На рисунке 33 представлена зависимость тока окисления серебра в присутствии глутатиона от времени накопления на углеродсодержащем электроде.

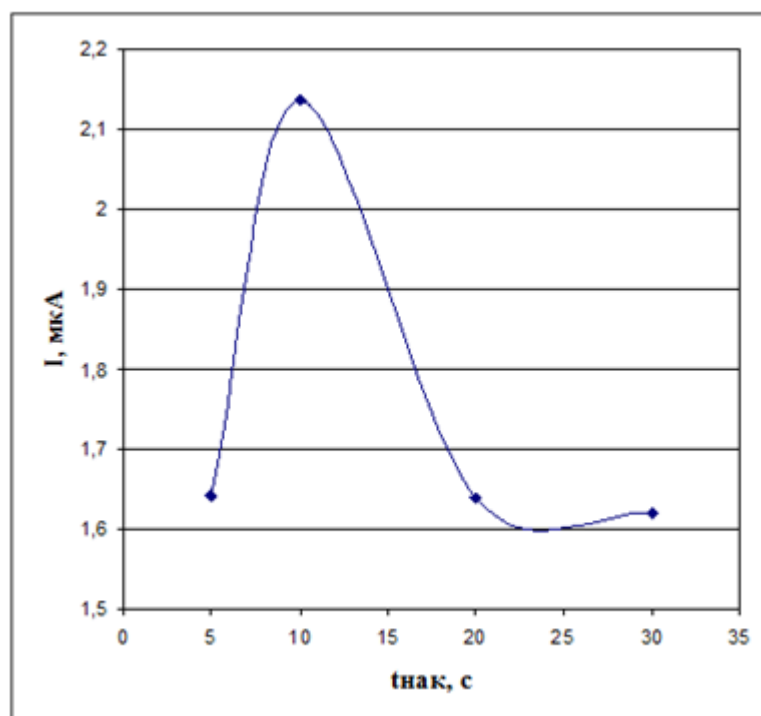


Рисунок 33 – Зависимость тока окисления серебра в присутствии GSH ($C=2,4 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) на углеродсодержащем электроде при постоянном потенциале накопления $E_{\text{нак}}=0$ В от времени накопления. $W=100$ мВ/с.

Максимальный ток окисления серебра в присутствии GSH на углеродсодержащем электроде достигается при времени накопления равное 10 с.

2.5.3 Исследование зависимостей ΔI от концентрации глутатиона в растворе на углеродсодержащем электроде в присутствие ионов серебра

Для доказательства того, что метод титрования в присутствии ионов серебра с вольтамперометрическим способом регистрации сигнала является наиболее чувствительным, были исследованы токи окисления серебра на углеродсодержащем электроде в присутствии GSH в концентрациях равных от $1 \cdot 10^{-7}$ до $5,94 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³; от $1 \cdot 10^{-8}$ до $5,94 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³ и от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5,94 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³. Градуировочные зависимости представлены на рисунках 34-36.

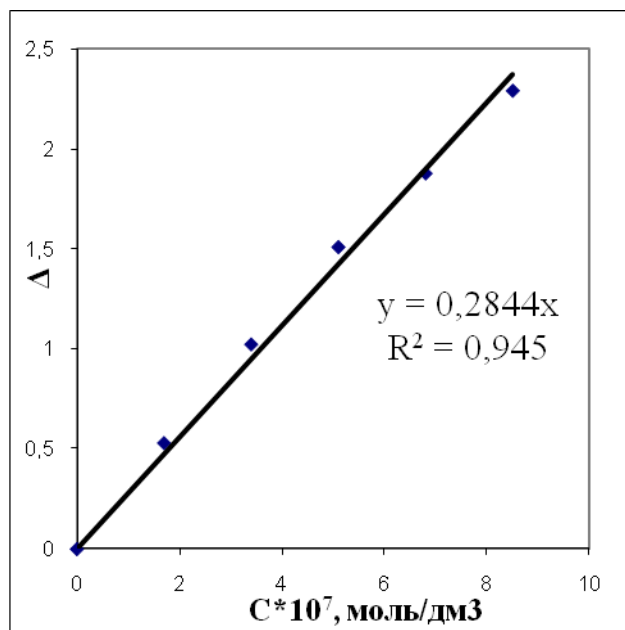


Рисунок 34 – Градуировочная зависимость ΔI от концентрации GSH (от $1 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³ до $5,94 \cdot 10^{-7}$ моль/дм³) на углеродсодержащем электроде.

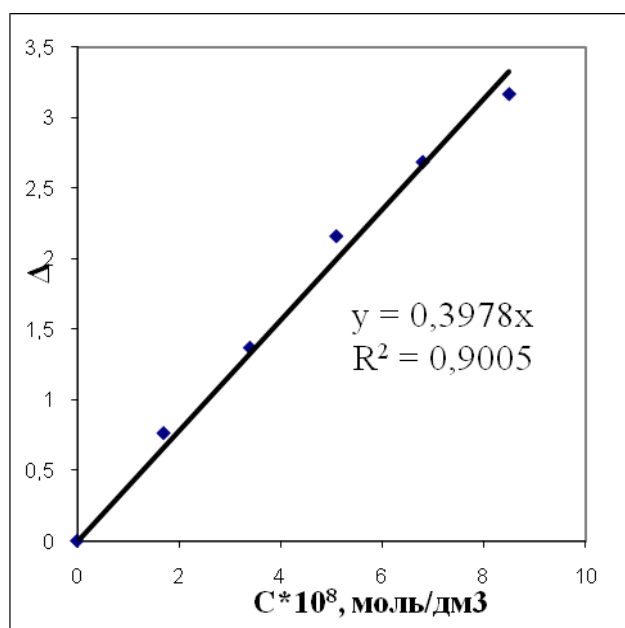


Рисунок 35 – Градуировочная зависимость ΔI от концентрации GSH (от $1 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³ до $5,94 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³) на углеродсодержащем электроде.

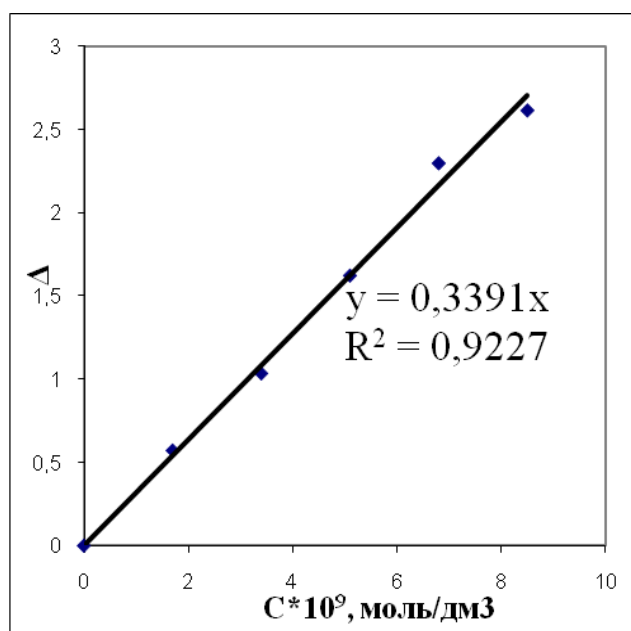


Рисунок 36 – Градуировочная зависимость ΔI от концентрации GSH (от $1 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³ до $5,94 \cdot 10^{-9}$ моль/дм³) на углеродсодержащем электроде.

Таким образом, были подобраны оптимальные условия определения GSH в модельных растворах на углеродсодержащем электроде:

- Буферный раствор: гидрофталат калия pH=4,01;
- Скорость развертки: $W=100$ мВ/с;
- Потенциал накопления: $E_{\text{нак}}=0$ В;
- Время накопления: $t_{\text{нак}}=10$ с
- Линейный диапазон концентраций GSH от $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³ до $5,94 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³

Данные условия эксперимента могут быть использованы для разработки методики определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека.

2.6 Сравнительное определение суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на глутатион методом вольтамперометрии на ртутно-пленочном электроде и углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра

Методика определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на GSH методом вольтамперометрии заключалась в съемке вольтамперограмм окисления GSH на РПЭ и углеродсодержащем электроде при выбранных ранее оптимальных условиях.

Для определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на GSH в ячейку приливали 5 мл раствора буфера pH=4,01 и 5 мл воды. Проводили регистрацию фоновой линии.

Отсутствие пиков на вольтамперограмме и воспроизводимые кривые свидетельствовали о чистоте фона. После получения удовлетворительных кривых фона, вносили добавку сыворотки крови человека объемом $V_{\text{сыб}}=0,05$ мл для РПЭ, перемешивали и проводили съемку вольтамперограмм. Для углеродсодержащего электрода перед добавкой сыворотки крови человека вносили добавку нитрата серебра объемом 0,05 мл. Анодный пик регистрировали в диапазоне потенциалов от -0.25 до -0.45В на РПЭ и от +0,2 до +0,5 В на углеродсодержащем электроде.

Суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на GSH рассчитывали по градуировочным зависимостям, которые являются оптимальными для определения GSH в модельных растворах (рисунок 29 для РПЭ, рисунок 31 для углеродсодержащего электрода).

Уравнение расчета суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на GSH для РПЭ:

$$y = 2,9698x \quad (13)$$

где, $y = I$, мкА

Уравнение расчета суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на GSH для углеродсодержащего электрода:

$$y = 0,405x \quad (14)$$

где, $y = I$, мкА

Таблица 4. Сравнительное определение суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в пересчете на GSH методом вольтамперометрии на ртутно-пленочном электроде и углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра (n=5)

№ образца сыворотки крови	C(GSH)=C*10 ³ моль/дм ³	
	Ртутно-пленочный электрод	Углеродсодержащий электрод в присутствии ионов серебра
1	0,13±0,06	0,09±0,02
2	0,15±0,06	0,11±0,03
3	0,19±0,05	0,12±0,03
4	0,16±0,05	0,10±0,05
5	0,21±0,03	0,16±0,04
6	0,11±0,04	0,10±0,03
7	0,20±0,06	0,17±0,05
8	0,18±0,03	0,15±0,03
9	0,22±0,02	0,18±0,01
10	0,25±0,06	0,21±0,05

По результатам, представленным в таблице 4 видно, что полученные данные хорошо коррелируют между собой, несмотря на то, что методика титрования глутатиона в присутствии ионов серебра на углеродсодержащем электроде с вольтамперометрический образом регистрации сигнала, показала заниженные результаты.

3 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

3.1 Предпроектный анализ

3.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Целевым рынком разработанной методики вольтамперометрического определения глутатиона являются различные медицинские учреждения проводящие анализы крови. Потенциальными потребителями результатов могут быть фармацевтические компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей, диагностические центры.

3.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum B_i \cdot B_i \quad (15)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента; B_i – вес показателя (в долях единицы); B_i – балл i -го показателя.

Целесообразно проводить данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 5.

Таблица 5 – 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. Стоимость оборудования	0,1	4	3	4	0,4	0,3	0,4
7. Стоимость реактивов							
Итого	1				5,6	4,2	4,6

К1 – спектрофотометрический метод анализа

К2 – хроматографический метод анализа

3.1.3 SWOT-анализ

SWOT – Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы) – комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлять в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты SWOT-анализа

	Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Экспрессность С2. Простота эксплуатации С3. Широта объектов для анализа С4. Селективность	Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Невысокая точность определения Сл2. Необходимость прибора Сл3. Необходимость дорогостоящих реактивов, дополнительных материалов к прибору
Возможности: В1. Появление дополнительного спроса на продукт В2. Разработка методики определения в разных биологических объектах В3. Перспективы внедрении вольтамперометрии в качестве метода анализа в медицине.	Благодаря спроса на новый продукт, появляется возможность использования его в качестве альтернативного метода анализа в медицине.	Долгий срок поставок материалов и оборудования могут негативно сказаться на успешном внедрении данного продукта, а соответственно, на его спросе.
Угрозы: У1. Развития конкурентных методов анализа У2. Ограниченный круг потребителей У3. Повышение стоимости оборудования У4. Отсутствие необходимых реактивов	Заявленная точность и экспрессность могут сделать предлагаемую методику конкурентоспособной.	Отсутствие спроса на новые методы и развитая конкуренция методов, плохо сказывается на внедрение разработки на рынок. Не хватка дополнительных материалов к оборудованию и реактивов, может привести к большим затратам времени на проведение научных исследований.

3.1.4 Оценка готовности проекта к коммерциализации

Бланк оценки данного научного проекта предоставлен в таблице 7.

Таблица 7 – 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	4	4
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	4	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	4
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	3	3
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	1	1
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	2
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	2	2
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	2	3
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	3
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	4	3
	ИТОГО БАЛЛОВ	49	45

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или уровень имеющихся знаний у разработчика) равна

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i \quad (16)$$

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

3.1.5 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.

3.2 Инициация проекта

3.2.1 Устав проекта

Инициация проекта определяют изначальные цели проекта или содержание работы.

Таблица 8 – Цели и результат проекта

Цели проекта:	Определение глутатиона в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии
Ожидаемые результаты проекта	Разработка вольтамперометрической методики определения глутатиона в сыворотке крови на ртутно-пленочном электроде и углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра
Критерии приемки результата проекта:	Не использование вредных реактивов, получение новой методики определения содержания холестерина в пищевых продуктах
Требования к результату проекта:	Разработать вольтамперометрическую методику определения глутатиона в сыворотке крови человека. Точность определения данной методики; Экспрессность получения результатов.

3.2.2 Организационная структура проекта

Таблица 9 – 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 выполнение проекта	60
2	Инженер-исследователь ФАХ, Дорожко Е.В.	Консультант	Контроль над ходом выполнения проекта, консультации по поводу проведения эксперимента, получения и анализа результатов НИР	275
3	Райфегерст К.В.	Исполнитель	Выполнение проекта (проведение эксперимента, получение и анализ результатов НИР)	420
ИТОГО:				755

3.2.3 Ограничения и допущения проекта

Ограничения и допущения проекта представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/допущения
Бюджет проекта	
Источник финансирования	НИ ТПУ
Сроки проекта	С 01.02.2016 по 1.06.2016
Дата утверждения плана управления проектом	01.02.2016
Дата завершения проекта	15.06.2016

3.3 Планирование управления научно-техническим проектом

Планирование научного проекта состоит из процессов определения цели работы, разработка последовательности действий и общего содержания работы, требуемых для достижения определенных целей.

3.3.1 Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ. В процессе создания ИСР структурируется и определяется содержание всего проекта. В таблице 11 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.

Таблица 11 – Иерархическая структура работ по проекту

Проект		
1 этап Подготовительный	2 этап Экспериментальный	3 этап Заключительный
Изучение литературных данных	Проведение цикла экспериментов	Обсуждение результатов
Составление литературного обзора	Обработка полученных результатов	Вывод о проделанной работе
Обсуждение проработанных данных и составление плана работ с научным руководителем и ассистентом		
Подготовка рабочего места, оборудования, хим. реактивов		

3.3.2 План проекта

Таблица 12 – Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)
1	Введение	7	08.02.16	15.02.16	Дорожко Е.В. Райфегерст К.В.
2	Литературный обзор	10	15.02.16	25.02.16	Райфегерст К.В.
3	Теоретический анализ	10	25.02.16	03.03.16	Райфегерст К.В.
4	Постановка задачи исследования	5	03.03.16	10.03.16	Короткова Е.И. Дорожко Е.В. Райфегерст К.В.
5	Экспериментальная часть	40	15.02.16	15.04.16	Дорожко Е.В. Райфегерст К.В.
6	Результаты и обсуждения	10	15.04.16	25.04.16	Дорожко Е.В. Короткова Е.И. Райфегерст К.В.
7	Разработка презентации и раздаточного материала	10	25.04.16	5.05.16	Райфегерст К.В.
8	Оформление	20	15.04.16	5.05.16	Райфегерст К.В.
Итого:		112			

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

Таблица 13 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Код работы (из ИСР)	Вид работ	Исполнители	Т _к , кал, дн.												
				февраль			март			апрель			май		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	
1	Введение	Ассистент, магистрант	7												
2	Литературный обзор	Магистрант	10												
3	Теоретический анализ	Магистрант	10												
4	Постановка задачи исследования	Руководитель ассистент, магистрант	5												
5	Эксперименталь ная часть	Ассистент, магистрант	40												
6	Результаты и обсуждения	Руководитель, магистрант, ассистент	10												
7	Разработка презентации и раздаточного материала	Магистрант	10												
8	Оформление	Магистрант	20												



- магистрант



- руководитель



- ассистент

3.3.3 Бюджет научного исследования

Расчет стоимости материальных затрат производится по действующим прейскурантам или договорным ценам.

Таблица 14 – Расчет затрат по статье «Сырье и материалы»

Наименование	Марка, размер	Количество	Цена за единицу, руб. (ссылка на поставщика)	Сумма, руб.
Фосфатный буферный раствор pH=1,65	Производство Россия		240	240
Фосфатный буферный раствор pH=4,01	Производство Россия		240	240
Фосфатный буферный раствор pH=6,85	Производство Россия		240	240
Фосфатный буферный раствор pH=9,18	Производство Россия		240	240
Калий хлорид насыщенный	ГОСТ 4234-77		34	34
Глутатион	Fluka, Германия	1	1634	1634
Цистин	Fluka, Германия	1	1758	1758
Цистеин	Fluka, Германия	1		1567
Глицин	Fluka, Германия	1	2600	2600
Нитрат серебра	Лабтех, Россия	1	2500	2500
Лабораторная химическая посуда (http://www.lavlab.ru/category/cilindry)	ГОСТ 1770-74			
- колбы мерные на 50 и 100 см ³		5 шт	1200	6935
- цилиндры мерные с носиком на 25, 50, 100 см ³		2 шт	100	
- Пипетки, градуированные на 5, 10 см ³		2 шт	50	
- Стаканы на 25, 50, 100 см ³		4 шт	152	
- стеклянные палочки		1 шт	7	
- стеклянные воронки		1 шт	20	
Транспортные расходы (5%)				899,4
Итого				18887,4

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 15.

Таблица 15 – 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	Хлоридсеребряный электрод	2	760	1520
7	Углеродсодержащий электрод	1	790	790
Итого				115496

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 16.

Таблица 16 – Расчет затрат по статье «Амортизация оборудования»

Наименование оборудования	Цена оборудования, руб.	Эксплуатации оборудования, количество лет	А, руб.
Вольтамперометрический анализатор TA-Lab	157000	5	31400
Итого			31400

Основная заработная плата исполнителей темы

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

$$C_{\text{зп}} = Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}, \quad (17)$$

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:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_{\text{раб}}, \quad (18)$$

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

$T_{\text{р}}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.;

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (19)$$

где, $Z_{\text{м}}$ – 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;

$F_{\text{д}}$ – 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 17.

Таблица 17 – Баланс рабочего времени за 2016 год

Показатели рабочего времени	Руководитель	Ассистент	Магистр
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	
- отпуск	24	24	-
- невыходы по болезни	-	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	258	258	282

Месячный должностной оклад работника:

$$З_{\text{м}} = З_{\text{б}} \cdot (k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}}, \quad (20)$$

Где, $З_{\text{б}}$ – базовый оклад, руб.;

$k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, (определяется Положением об оплате труда); $k_{\text{д}}$ – 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); $k_{\text{р}}$ – 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:

$$З_{\text{м}} = З_{\text{б}} \cdot K_{\text{р}} \quad (21)$$

Где, $З_{\text{б}}$ – базовый оклад, руб.;

$K_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Расчет основной заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта проводился без учета премиального

коэффициента $K_{\text{пр}}$ (определяется Положением об оплате труда) и коэффициент доплат и надбавок $K_{\text{д}}$.

Согласно информации сайта Томского политехнического университета должностной оклад (ППС) профессора доктора наук без учета РК составил 33162,87 руб., консультанта – 14584,32 руб., исполнителя – 7914,43 руб. Расчет основной заработной платы приведен в табл. 18.

Найдем основную заработную плату за период с февраля по май 2016 года для руководителя, консультанта и магистранта:

$$Z_{\text{мес}} = 33162,87 * 4 = 132651,48$$

$$Z_{\text{осн}} = 132651,48 * 1,3 = 172446,92$$

$$Z_{\text{мес}} = 14584,32 * 4 = 58337,28$$

$$Z_{\text{осн}} = 58337,28 * 1,3 = 75838,46$$

$$Z_{\text{мес}} = 7914,43 * 4 = 31657,72$$

$$Z_{\text{осн}} = 31657,72 * 1,3 = 41155,24$$

Таблиц 18 – Расчёт основной заработной платы

Исполнители	$Z_{\text{б}}$, руб.	$k_{\text{р}}$	$Z_{\text{мес}}$, руб	$Z_{\text{осн}}$, руб.
Руководитель	33162,87	1,3	132651,48	172446,92
Консультант	14584,32	1,3	58337,28	75838,46
Магистрант	7914,43 (стипендия)	1,3	31657,72	41155,24
Итого				289440,62

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = K_{\text{внеб}} * (Z_{\text{осн}}) \quad (22)$$

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 %. У магистранта нет отчислений на социальные нужды, так как он получает стипендию.

Таблица 19 – Отчисления на социальные нужды

	Руководитель	Консультант
Зарплата, руб.	172462,5	75838,5
Отчисления на соц. нужды, руб.	52601	23130,5
Итого	98969	

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:

$$C_{\text{накл}} = K_{\text{накл}} * (Z_{\text{осн}}) \quad (23)$$

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

Затраты на проведение НИР

Смета затрат приведена в таблице

Таблица 20 – Смета затрат на выполнение НИР

Статьи затрат	Затраты, руб.
Сырье и материалы	18887,4
Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	115496
Фонд заработной платы	289456
Отчисления на социальные нужды	98969
Накладные расходы	260510,4
Амортизация оборудования	31400
Итого	814718,8

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

3.4.1 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. 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:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}, \quad (24)$$

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:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (25)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;

a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

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

n – число параметров сравнения.

Таблица 21 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Вольтамперометрический метод анализа Текущий проект	Спектрофотометрический метод анализа Аналог 1
Точность определения	0,5	5	4
Скорость определения	0,3	5	4,5
Простота эксплуатации	0,2	5	4
Итого	1,00	5	4,15

Текущий проект = $5 \cdot 0,5 + 5 \cdot 0,3 + 5 \cdot 0,2 = 5$

Аналог 1 = $4 \cdot 0,5 + 4,5 \cdot 0,3 + 4 \cdot 0,2 = 4,15$

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 более эффективна, так как она более точна и проста в эксплуатации.

4 Социальная ответственность

4.1 Производственная безопасность

4.1.1. Анализ вредных и опасных факторов, которые может создать объект исследования

Таблица 22 – Опасные и вредные факторы при выполнении работ по определению содержания глутатиона в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии

Источник фактора, наименование видов работ	Факторы (по ГОСТ 12.0.003-74)		Нормативные документы
	Вредные	Опасные	
1. Работа с химическими реактивами 2. Работа на аналитической установке Та- Lab («Томьаналит» г. Томск) 3. Работа на компьютере	1. Отклонение показателей микроклимата в лаборатории; 2. Превышение уровней шума и вибрации; 3. Недостаточная освещенность рабочей зоны	1. Контакт с токсичными химическими веществами 2. Электрический ток.	Параметры микроклимата устанавливаются СанПиН 2.2.2.542–96 *** Гигиенические нормативы шума определены ГОСТ 12.1.003 - 83* ГОСТ 12.1.003 – 83 и ГОСТ 17187 – 81 *** Параметры нормируемого освещения устанавливаются СНиП 23–05–95 *** Установление предельно допустимых уровней (ПДУ) напряжения и тока согласно ГОСТ 12.1.038 – 82. Защитные мероприятия от поражений электрическим током – защитное заземление ГОСТ 12.1.030-81.

Микроклимат производственных помещений

Микроклимат производственных помещений – это климат внутренней среды этих помещений, который определяется действующими на организм человека сочетаниями температуры, влажности и скорости движения воздуха, а также температуры окружающих поверхностей.

Таблица 23 – Допустимые нормы микроклимата в рабочей зоне производственных помещений

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

Метеорологические условия рабочей среды (микроклимат) оказывают влияние на процесс теплообмена и характер работы. Микроклимат характеризуется температурой воздуха, его влажностью и скоростью движения, а также интенсивностью теплового излучения. Длительное воздействие на человека неблагоприятных метеорологических условий резко ухудшает его самочувствие, снижает производительность труда и приводит к заболеваниям. Высокая температура воздуха способствует быстрой утомляемости работающего, может привести к перегреву организма, тепловому удару или профзаболеванию. Низкая температура воздуха может вызвать местное или общее охлаждение организма, стать причиной простудного заболевания либо обморожения [51].

Влажность воздуха оказывает значительное влияние на терморегуляцию организма человека. Высокая влажность при высокой температуре воздуха способствует перегреванию организма, при низкой же температуре она усиливает теплоотдачу с поверхности кожи, что ведет к

переохлаждению организма. Низкая влажность вызывает пересыхание слизистых оболочек дыхательных работающих.

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.

В помещении, где находится компьютер средняя температура воздуха 22 °С, относительная влажность воздуха 55%, скорость движения воздуха – 0,1 м/с. Ориентируясь на оптимальные и допустимые показатели микроклимата на рабочих местах (СанПиН 2.2.2.542-96), можно сделать вывод о том, что метеоусловия являются оптимальными, то есть обеспечивают сохранение нормального функционального и теплового состояния организма без напряжения реакции терморегуляции и создают предпосылки для высокого уровня работоспособности.

Недостаточная освещенность рабочей зоны

Недостаточное освещение рабочего места затрудняет длительную работу, вызывает повышенное утомление и способствует развитию близорукости. Слишком низкие уровни освещенности вызывают апатию и сонливость, а в некоторых случаях способствуют развитию чувства тревоги. Длительное пребывание в условиях недостаточного освещения сопровождаются снижением интенсивности обмена веществ в организме и ослаблением его реактивности.

Работа, связанная с документами требует хорошего освещения. Излишне яркий свет снижает зрительные функции, приводит к перевозбуждению нервной системы, уменьшает работоспособность, нарушает механизм сумеречного зрения. Воздействие чрезмерной яркости

может вызывать фотоожоги глаз и кожи, кератиты, катаракты и другие нарушения.

Гигиеническое нормирование искусственного и естественного освещения. Нормируемыми параметрами для систем искусственного освещения являются: величина минимальной освещенности $L_{доп}$, допустимая яркость в поле зрения $L_{доп}$, а также показатель ослепленности P и коэффициент пульсации K_p (СНиП 23–05–95), [52].

Превышение уровней шума и вибрации

Шум лабораторной установки – это беспорядочное сочетание звуков различной частоты и интенсивности, возникающих при механических колебаниях в упругой среде (твердой, жидкой или газообразной). Длительное воздействие шума снижает остроту слуха и зрения, повышает кровяное давление, утомляет центральную нервную систему, в результате чего ослабляется внимание, увеличивается количество ошибок в действиях рабочего, снижается производительность труда. Воздействие шума приводит к появлению профессиональных заболеваний и может явиться причиной несчастного случая.

Уровни шума не должны превышать значений установленных в ГОСТ 12.1.003 – 83 и ГОСТ 17187 – 81, и проводится не реже двух раз в год.

По СН 3223 – 85 нормируются параметры шума и составляют:

- для лаборатории ПДУ составляет 75 Дб;
- для вентиляции ПДУ составляет 70 Дб.

По уровню шума, локальной и общей вибрации инфа и ультра звука данная лаборатория с вышеперечисленным оборудованием относится к допустимому классу, ПДУ <25 дБА, что соответствует требованиям безопасного нахождения в лаборатории установленного в этом стандарте.

Для снижения шума в помещениях проводятся следующие основные мероприятия:

- уменьшение уровня шума в источнике его возникновения;
- звукопоглощение и звукоизоляция;

- установка глушителей шума;
- рациональное размещение оборудования.

Вибрация лабораторной установки – процесс распространения механических колебаний в твердом теле.

Для снижения вибрации используют следующие методы:

- виброизоляция;
- вибродемпфирование, под которым понимают превращение энергии механических колебаний в тепловую.

Важным для снижения опасного воздействия вибрации на организм человека является правильная организация труда и отдыха, постоянное медицинское наблюдение, лечебно-профилактические мероприятия [53, 54].

Контакт с токсичными химическими веществами

Работа 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. Характеристика химических веществ, используемых при выполнении НИР представлена в таблице 3.

Таблица 24 – Характеристика веществ, применяемых для работы [55]

Вещества	Физические свойства	ПДК, мг/м ³	Класс Опасности	Общая характеристика токсического действия
Хлорид калия	Белое кристаллическое вещество	5	3	Практически нетоксичен
Гидроксид натрия	Белое твёрдое вещество	0,5	2	Вызывает ожоги кожи, необратимые изменения зрительного нерва (атрофию) и, как следствие, потерю зрения
Фосфорная кислота	Бесцветное, гигроскопичное твердое вещество	1	2	Обладает повреждающим действием на кожные покровы и слизистые оболочки глаз.
Уксусная кислота	Бесцветная жидкость с резким характерным запахом, кислым вкусом	5	3	Ожог верхних органов дыхания возможен ядовитыми парами уксусной кислоты
Борная кислота	Бесцветное кристаллическое вещество в виде чешуек без запаха, жирные на ощупь, или кристаллический порошок	10	3	Ухудшает работу печени, желудка, репродуктивных органов.
Нитрат серебра	Бесцветные ромбические кристаллы	0,5-1	3	При избыточном поступлении в организм возникает такое специфическое заболевание, как аргироз

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. К средствам защиты от попадания на кожу вредных химических веществ служат резиновые перчатки, лабораторные халаты, шапочки, обувь. Для защиты дыхательных путей от действия вредных химических веществ служат специальные ватно-марлевые повязки, респираторы, противогазы. Для защиты слизистой оболочки глаз можно использовать специальные очки. Средством защиты от поражения вредными химическими веществами служит также точное соблюдение техники безопасности и инструкций к используемым веществам [56].

Электрический ток

По действующим правилам устройства электроустановок (ПУЭ) лабораторное помещение относится к первому классу, т.е. помещениям без повышенной опасности.

Причинами несчастных случаев при воздействии электрического тока могут быть:

- случайное прикосновение к токоведущим частям, находящимся под напряжением;
- появление напряжения на металлических частях электрооборудования, которые нормально не находятся под напряжением (вследствие нарушения изоляции, падения на них провода, находящегося под напряжением);
- возникновение шагового напряжения на участке земли, где находится человек.

Основными мерами защиты от поражения электрическим током являются:

1. обеспечение недоступности для случайного прикосновения токоведущих частей, находящихся под напряжением;
2. обеспечение надежной изоляции электроустановок;
3. применение защитного заземления, зануления, отключения и др.;
4. применение специальных защитных средств [57]

2. Экологическая безопасность

2.1 Анализ влияния объекта и процесса исследования на окружающую среду

Вредные вещества могут попадать в окружающую среду (атмосферу, гидросферу, литосферу) по сточным водам в виде пыли, дыма, газа, твердых отходов производства.

2.2 Мероприятия по защите окружающей среды

Утилизация химических отходов, как и предварительный сбор и погрузка должны проводиться лишь персоналом организации, которая занимается этим видом деятельности и имеет лицензию. Так как даже работа по уборке таких отходов, может причинить вред здоровью человека и даже нанести урон экологии региона, в случае ошибки при её погрузке или транспортировке, поэтому без подготовки и специального оборудования, любые манипуляции с опасными видами, запрещены.

Необходимо совершенствовать технологические процессы с целью сохранения окружающей среды от вредных выбросов.

3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Одним из важнейших факторов в безопасности жизнедеятельности людей является подготовленность к чрезвычайным ситуациям.

Химический взрыв

Химический взрыв — взрыв, возникающий за счет протекания химической реакции веществ или разложения вещества. Обычно характеризуется значительной разрушительной мощностью и поражающей способностью. Может приводить к пожару в лаборатории.

Ситуации, которые могут привести к химическому взрыву:

- работа со взрывчатыми веществами.
- длительное хранение аммиачных растворов солей серебра может привести к выпадению очень взрывчатого (даже под слоем воды) черного осадка нитрида серебра.

– хранение кислот в металлических емкостях или пролив их на металлические поверхности приводит к выделению водорода. В замкнутом объеме может накопиться взрывоопасная концентрация. Аналогично опасно хранить щелочи рядом с металлами амфотерного характера (алюминий, цинк).

При химическом ожоге кислотой пораженное место сразу же промывают большим количеством проточной холодной воды 15-20 мин. Если кислота попала на кожу через одежду, то сначала надо смыть ее водой с одежды, после чего промыть кожу. При попадании на тело человека серной кислоты в виде твердого вещества необходимо удалить ее сухой ватой или кусочком ткани, а затем пораженное место тщательно промыть водой. При химическом ожоге полностью смыть химические вещества водой не удастся. Поэтому после промывания пораженное место обрабатывают раствором пищевой соды (одна чайная ложка на стакан воды). При попадании брызг щелочи или паров в глаза и полость рта необходимо промыть пораженные места большим количеством воды, а затем раствором борной кислоты (0,5 чайной ложки кислоты на стакан воды) [56].

Термические ожоги

Термический ожог – воздействие на кожу сильнонагретых материалов.

Ситуации, которые могут привести к термическому ожогу: работа с нагревательными приборами. Следует помнить старое правило: "горячая пробирка выглядит также как и холодная".

Отравление

Отравление – попадание в организм токсичного вещества.

Ситуации, которые могут привести к отравлению:

1. Потребление пищи в лаборатории. Уже много пострадавших.
2. Со всеми новыми веществами следует обращаться очень осторожно, так как они могут оказаться неожиданно сильнотоксичными.
3. Работа с высокотоксичными веществами требует внимательности и осторожности.

Пожар

При выполнении дипломной работы может возникнуть чрезвычайная ситуация замыкание проводки и возгорание. По возможности, пламя необходимо потушить песком, но перед этим необходимо сообщить руководителю. Соблюдая все правила с электрическим оборудованием можно избежать ЧС.

Ситуации, которые могут привести к пожару:

1. Термическое лопание колбы с легковоспламеняющимися жидкостями. Для локализации очага пожара рекомендуется под установку с колбой заранее помещать металлический поддон с загнутыми краями.
2. Смешивание веществ дающих экзотермическую реакцию с воспламеняющимися материалами.
3. Работа с очень легковоспламеняющимися жидкостями и горючими газами если в помещении находятся источники с открытым пламенем или сильнонагретые предметы.

Противопожарная защита

Все лабораторные помещения должны соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004-91 и иметь необходимые средства противопожарной безопасности согласно ГОСТ 12.4.009-83. Помещения лабораторий по степени пожароопасности относятся к классу П-2, так как в нем присутствует выделение пыли и волокон во взвешенном состоянии (в ред. Федерального закона от 10.07.2012 N 117-ФЗ). Лаборатории должны быть оснащены пожарными кранами (в количестве не менее одного на этаж) с пожарными рукавами необходимой длины. Каждое рабочее помещение должно быть оснащено песком и огнетушителями, а помещения с легковоспламеняющимися и огнеопасными веществами - дополнительными средствами пожаротушения. На видном в помещении лаборатории должен висеть план эвакуации. Каждый сотрудник лаборатории должен быть ознакомлен с правилами обращения с взрыво- и огнеопасными веществами, газовыми приборами, а также использовать противогаз,

огнетушитель и другие средства пожаротушения, имеющимися в наличии лаборатории. В лаборатории, а также в непосредственной близости от них (под лестницами, в коридорах) строго запрещается хранение горючих материалов, и установление предметов, загромождающих пути эвакуации и доступа к средствам пожаротушения. Аварийная вытяжная вентиляция должна снизить взрывопожароопасность помещений. Воздухообмен аварийной вентиляции должен соответствовать требованиям СНиП и ПБВХП-74. При возникновении загорания или пожара в помещении с наличием аварийной вентиляции во избежание распространения пожара необходимо выключить работающие вентиляторы аварийной вентиляции.

Курение в лаборатории воспрещается. Отсутствие разрешения начальника или сотрудника, отвечающего за противопожарную безопасность, запрещается установление нагревательных и лабораторных приборов, запуск в эксплуатацию. Нагревательные приборы необходимо установить на термостойкую подставку. Сотрудники лаборатории, заметивший задымление, пожар или другие признаки пожара обязаны:

- незамедлительно сообщить в пожарную часть по телефону;
- принять всевозможные меры по недопущению распространения огня;
- известить начальника лаборатории, в свою очередь который обязан известить сотрудников, принять меры по ликвидации пожара к их эвакуации.
- знать и уметь пользоваться первичными средствами пожаротушения.

Средства пожаротушения

Вода – наиболее доступное средство для тушения пожаров в лаборатории. Для тушения небольших очагов пламени можно взять воду из ближайшего водопроводного крана. При необходимости подачи большого количества воды в зону очага горения пользуются внутренним пожарным водопроводом (пожарный кран). Вода применяется для тушения твердых горючих материалов – дерева, бумаги, резины, тканей, одежды, а также хорошо растворяющихся в воде горючих жидкостей – ацетона, низших спиртов, органических кислот. Эффективность тушения пожара водой

повышается при подаче ее в зону горения в виде распыленных струй. Водой нельзя тушить электрооборудование и электропроводку, находящиеся под напряжением, вещества способные вступить с водой в химическую реакцию.

1. Асбестовое полотно – применяют для тушения веществ и материалов, горение которых не может происходить без доступа воздуха, но только в тех случаях, когда площадь горения не велика.

2. Сухой песок – рекомендуется применять при загорании небольших количеств ГЖ, ЛВЖ и твердых веществ, в том числе тех, которые нельзя тушить водой. В соответствии с нормами противопожарной безопасности, наличие песка обязательно в каждом лабораторном помещении. Песок хранят в ящиках, снабженных совком.

3. Для тушения пожаров, в случае их возникновения, в лаборатории имеются следующие средства:

- огнетушитель ОХП-10, предназначенный для тушения пожаров твердых горючих материалов, легковоспламеняющихся и горючих жидкостей;
- огнетушитель ОВП-10, предназначенный для тушения различных веществ и материалов, за исключением щелочных металлов и веществ, горение которых происходит без доступа воздуха, а также электроустановок, находящихся под напряжением.

План эвакуации персонала с лаборатории кафедры «Физической и аналитической химии» при возникновении пожара представлен на рисунке 37.

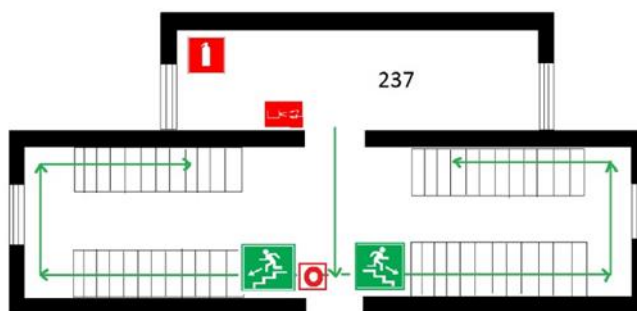


Рисунок 37 – План эвакуации при пожаре

В лаборатории имеются огнетушителей марки ОХП-10 и ОВП-10 предназначены для тушения загорания различных веществ и материалов, за исключением щелочноземельных элементов, а также электроустановок под напряжением до 1000 В. При загорании снять огнетушитель, поднести к очагу загорания, не менее 1 метра, прочистить спрыск иглой или гвоздем, повернуть рычаг до отказа до 180°, перевернуть огнетушитель вверх дном и направить струю на огонь. Действие огнетушителя 60 секунд, длина струи пены 6-8 метров. Выход пены из огнетушителя 50 литров [58].

4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

4.1 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

- лаборатория должна быть обеспечена водопроводом, канализацией, электричеством, боксами с приточно-вытяжной вентиляцией с механическим побуждением, центральным отоплением и горячим водоснабжением.
- помещения должны быть оборудованы легко открываемыми фрамугами или форточками, обеспеченными в летнее время мелкими сетками, и вытяжными шкафами с побудительной вентиляцией (скорость движения воздуха при открытых створках не менее 1 м/сек.).
- газовые краны вытяжных шкафов должны быть расположены у передних бортов (краев) с учетом устранения возможности случайного их открывания. Штепсельные розетки должны размещаться на торцевой стороне рабочего стола вне вытяжного шкафа.
- в лаборатории должны быть оборудованы водопроводные раковины для мытья рук персонала и раковины, предназначенные для мытья инвентаря.
- все помещения лаборатории должны иметь естественное и искусственное освещение, отвечающее требованиям, предусмотренным строительными нормами и правилами.
- температура воздуха в лабораторных помещениях должна поддерживаться в пределах 18 - 21°C.

- стены в лабораторных помещениях должны быть облицованы на высоту 1,5 м белой глазурованной плиткой или выкрашены масляной краской светлых тонов. В боксах, операционных и виварии - белой глазурованной плиткой или плиткой из гладких синтетических материалов. Ширина основных проходов к рабочим местам или между двумя рядами оборудования должна быть не менее 1,5 м с учетом выступающих конструкций стен.
- полы в лабораторных помещениях покрываются линолеумом или релином. В боксах, операционных и виварии - гладкой плиткой.
- лабораторная мебель должна быть окрашена масляной или эмалевой краской светлых тонов, рабочие поверхности столов покрываются пластиком или другим кислото- и щелочеустойчивым материалом и не портящимся также от применения кипячения. Внутренние и наружные поверхности мебели не должны иметь щелей и пазов, затрудняющих обработку дезинфицирующими веществами.
- при эксплуатации приборов и аппаратов необходимо строго руководствоваться правилами, изложенными в техническом паспорте. Стационарные электроприборы должны быть заземлены. Ежемесячно проверяется исправность электроприборов. Особое внимание уделяется круглосуточно работающим электроприборам. При нарушении работы электроприбора (запах, выделение дыма, изменение характера шума и т.д.) прибор отключают от сети и не используют до проверки и проведения необходимого ремонта.
- электроприборы (плитки, сушильные шкафы, пылесосы, воздуходувки с мотором и др.) включают в сеть с соответствующим прибору напряжением. Все работы с воздуходувкой и пылесосом (смазывание, монтаж, ремонт и пр.) проводят при отключении их от электросети.
- при работе в лаборатории персонал должен пользоваться санитарной одеждой, спецодеждой, обувью, резиновыми перчатками и предохранительными приспособлениями, предусмотренными действующими нормами.

Заключение

В процессе исследования были сделаны следующие выводы:

1. Подобраны оптимальные условия определения глутатиона в модельных растворах на ртутно-пленочном электроде:

- Буфер: гидрофталат калия $\text{pH}=4,01$;
- Скорость развертки: $W=40$ мВ/с;
- Потенциал накопления: $E_{\text{нак}}=-0,4$ В;
- Время накопления: $t_{\text{нак}}=110$ с;
- Линейный диапазон концентраций GSH: от $0,34 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³ до $1,66 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³.

2. Подобрали оптимальные условия определения глутатиона в модельных растворах на углеродсодержащем электроде в присутствии ионов серебра:

- Буфер: гидрофталат калия $\text{pH}=4,01$;
- Скорость развертки: $W=100$ мВ/с;
- Потенциал накопления: $E_{\text{нак}}=0$ В;
- Время накопления: $t_{\text{нак}}=10$ с
- Линейный диапазон концентраций GSH: от $1 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³ до $5,94 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³.

3. Проведено сравнительное определение глутатиона в сыворотке крови человека на ртутно-пленочном и углеродсодержащем электродах в присутствии ионов серебра.

Результаты определения содержания глутатиона в сыворотке крови человека, полученные методом вольтамперометрии на ртутно-пленочном электроде близки к данным, полученными методом титрования в присутствии ионов серебра на углеродсодержащем электроде. Кроме того, методика титрования в присутствии ионов серебра на углеродсодержащем электроде оказалась более чувствительной и позволяет не использовать токсичную ртуть, что несомненно указывает на ее конкурентные преимущества.

Проведена оценка экономической эффективности данного процесса и рассмотрено воздействие разработанных аспектов деятельности с точки зрения социальной ответственности на человека и окружающую среду.

На сегодняшний день данные методики определения содержания глутатиона в сыворотке крови человека можно рекомендовать для проведения анализов в клинических биохимических лабораториях.

Список использованных источников

1. Глутатион [Электронный ресурс]. – Режим доступа [www.URL: http://lifebio.wiki](http://lifebio.wiki).
2. Strużńska L, Chalimoniuk M, Sulkowski G. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology* 212 (2-3): – 2005. – P.185-194.
3. F.D. Carvalho, F. Remiao, P. Vale, Glutathione and cysteine measurement in biological samples by HPLC with a glassy carbon working detector // *Biomed. Chromatogr.* – 1994. – Vol.8 – P. 134-136.
4. О.Я Бабак. Глутатион в норме и при патологии: биологическая роль и возможности клинического применения. – 2015.
5. Nagy, P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways, *Antioxidants & Redox Signaling*, 18. – 2013. – P. 1623–1641.
6. Janssen-Heininger, Y.M., Nolin, J.D., Hoffman, S.M., van der Velden, J.L., Tully, J.E., Lahue, K.G., Abdalla, S.T., Chapman, D.G., Reynaert, N.L., van der Vliet, A., and Anathy, V. Emerging mechanisms of glutathione- dependent chemistry in biology and disease, *Journal of Cellular Biochemistry*, 114. – 2013. – P. 1962–8.
7. Danyelle M. Townsend, Kenneth D. Tew, Haim Tapiero Department of Pharmacology, Fox Chase Cancer Center, 7701 Burholme Ave., Philadelphia, PA 19111, USA Faculté de pharmacie, Université de Paris, CNRS UMR 8612, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 94200 Chatenay Malabry, France. The importance of glutathione in human disease.
8. Franco, R., and Cidlowski, J.A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death and Differentiation*, 16, – 2009. – P. 1303–1314.
9. Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830. – 2013. – P 3217–3266.

10. Galano, A., and Alvarez-Idaboy, J.R. Glutathione: mechanism and kinetics of its nonenzymatic defense action against free radicals, RSC Advances, 1. – 2011. – P. 1763–1771.
11. Winterbourn, C.C. Superoxide as an intracellular radical sink, Free Radical Biology and Medicine, 14. – 1993. – P. 85–90.
12. Hagen TM1. Fate of dietary glutathione: disposition in the gastrointestinal tract. Am J Physiol. – 1990.
13. Fukagawa NK1, Ajami AM, Young VR. Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. Am J Physiol. – 1996.
14. Iantomasi T1. Glutathione transport system in human small intestine epithelial cells. Biochim Biophys Acta. – 1997.
15. Witschi A1. The systemic availability of oral glutathione. Eur J Clin Pharmacol. – 1992.
16. Aeby S1, Assereto R, Lauterburg BH. High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. Eur J Clin Invest. – 1991.
17. Thompson GA, Meister A. Hydrolysis and transfer reactions catalyzed by gamma-glutamyl transpeptidase; evidence for separate substrate sites and for high affinity of L-cystine. Biochem Biophys Res Commun. – 1976.
18. Orłowski M, Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. Proc Natl Acad Sci U S A. – 1970.
19. Sze G1, et al. Bidirectional membrane transport of intact glutathione in Hep G2 cells. Am J Physiol. – 1993.
20. Benard O1, Balasubramanian KA. Effect of oxidant exposure on thiol status in the intestinal mucosa. Biochem Pharmacol. – 1993.
21. Pastore A1. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clin Chim Acta. – 2003.
22. Bogaards JJ1, Venekamp JC, van Bladeren PJ. Stereoselective conjugation of prostaglandin A2 and prostaglandin J2 with glutathione, catalyzed

by the human glutathione S-transferases A1-1, A2-2, M1a-1a, and P1-1. *Chem Res Toxicol.* – 1997.

23. Roman Kand'ár, Pavla Žáková, Halka Lotková, Otto Kučerab, Zuzana Červinková. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. – 2007. – P. 1382–1387.

24. D.J. Reed, J.R. Babson, P.W. Beatty, A.E. Brodie, W.W. Ellis, D.W. Potter. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. – 1980. – P. 55-62.

25. John P. Richie Jr., Calvin A. Lang. The determination of glutathione, cyst(e)ine, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. – 1987. – P. 9-15.

26. Catherine Ceresera, Jérôme Guichard, Jocelyne Draï, Edith Bannier, Isabelle Garcia, Sophie Boget, Parviz Parvaz, André Revol. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. – 2001. – P. 123–132.

27. Jeffrey Lakritz, Charles G. Plopper, Alan R. Buckpitt. Validated High-Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Method for Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Small Tissue Samples. – 1997. – P. 63-68.

28. Amy F Loughlin, Gary L Skiles, David W Alberts, William H Schaefer. An ion exchange liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of reduced and oxidized glutathione and glutathione conjugates in hepatocytes. – 2001. – P. 131-142.

29. DU Xiao-li, ZHU Zhu , FU Qiang, LI Da-kui. HPLC method for determination of glutathione in human plasma. – 2006.

30. E. Bald, R. Głowacki. Analysis of saliva for glutathione and metabolically related thiols by liquid chromatography with ultraviolet detection. – 2005. – P. 431-433.

31. André R.T.S. Araujo, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, José L.F.C. Lima. Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. – 2008. – P. 1511-1519.

32. Irfan Rahman, Aruna Kode¹ & Saibal K Biswas. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. – 2007.

33. Frank Tietze. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. – 1969. – P. 502-522.

34. M.A. Raggi, L. Nobile, A.G. Giovannini. Spectrophotometric determination of glutathione and of its oxidation product in pharmaceutical dosage forms. – 1991. – P. 1037-1040.

35. Joseph Eliot Woodbridge. US 3864085 A, Glutathione reagent and test method

36. Victor H. Cohn, Jerry Lyle. A fluorometric assay for glutathione, – P. 434-440.

37. G. K. Budnikov, G. K. Ziyatdinova, Ya. R. Valitova. Electrochemical Determination of Glutathione. – 2004. – P. 573-576.

38. Madalena C. C. Areias, Kenichi Shimizu and Richard G. Compton. Voltammetric detection of glutathione: an adsorptive stripping voltammetry approach. – 2016.

39. Jahan Bakhsh Raoof, Reza Ojani, Hassan Karimi-Maleh, Mohammad R. Hajmohamadi and Pouria Biparva. Multi-wall carbon nanotubes as a sensor and ferrocene dicarboxylic acid as a mediator for voltammetric determination of glutathione in hemolysed erythrocyte. – 2011.

40. R. Moradi, S. A. Sebt, H. Karimi-Maleh, Roya Sadeghi, F. Karimi, A. Bahari and H. Arabi. Synthesis and application of FePt/CNTs nanocomposite as a

sensor and novel amide ligand as a mediator for simultaneous determination of glutathione, nicotinamide adenine dinucleotide and tryptophan, – 2013.

41. Hassan Karimi-Maleh, Fahimeh Tahernejad-Javazmi, Ali A. Ensafi, Reza Moradi, Shadpour Mallakpour, Hadi Beitollahi. A high sensitive biosensor based on FePt/CNTs nanocomposite/N-(4-hydroxyphenyl)-3,5-dinitrobenzamide modified carbon paste electrode for simultaneous determination of glutathione and piroxicam. – 2014. – P. 1-7.

42. Ali A. Ensafi, Samira Dadkhah-Tehrani and Hassan Karimi-Maleh. Voltammetric determination of glutathione in haemolysed erythrocyte and tablet samples using modified-multiwall carbon nanotubes paste electrode. – 2011.

43. Jahan Bakhsh Raoof, Reza Ojani, Mansureh Kolbadinezhad. Voltammetric sensor for glutathione determination based on ferrocene-modified carbon paste electrode. – 2008.

44. J. B. Raoof, R. Ojani, H. Karimi-Maleh. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. – 2009. – P. 1169-1175.

45. A.A. Ensafi, Hassan Karimi-Maleh, S. Mallakpour. A new strategy for the selective determination of glutathione in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) using a novel modified carbon nanotube paste electrode. – 2013. – P. 186-193.

46. Afsaneh Safavi, Norouz Maleki, Elaheh Farjami and Farzaneh Aghakhani Mahyari. Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide at a Nanoscale Copper Hydroxide Composite Carbon Ionic Liquid Electrode. – 2009. – P. 7538-7543.

47. Г.В. Прохорова. Введение в электрохимические методы анализа. – 1991.

48. Метод. указ.к лаб. работам /; Сост. Б.М. Стифатов, В.В. Слепушкин, Ю.В. Рублинецкая. Самара, Самар. гос. техн. ун-т, – 2013. – P. 20 с.

49. Т.М.Гиндуллина, Н.М. Дубова. Аналитическая химия и ФХМА. Лабораторный практикум. – Ч.2. – 2013.

50. Т.В. Скиба. Разработка метода инверсионно-вольтамперометрического титрования для определения тиоловых, дисульфидных групп и сульфидной серы в природных водах и биожидкостях. – 2013.

51. СанПиН 2.2.4.1191-03. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.

52 СП 52.13330.2011 Естественное и искусственное освещение.

53. СН 2.2.4/2.1.8.562-96. Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории застройки.

54. СН 2.2.4/2.1.8.566. Производственная вибрация, вибрация в помещениях жилых и общественных зданий. – М.: Минздрав России, 1997.

55 ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

56. Технический регламент от 24 декабря 2009 г. О безопасности средств индивидуальной защиты [Электронный ресурс]. Режим доступа [www.URL: http://www.rg.ru/2010/03/30/tehreg-site-dok.html](http://www.rg.ru/2010/03/30/tehreg-site-dok.html).

57. ГОСТ Р 12.1.019-2009 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

58. ГОСТ Р 22.0.07-95. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Источники техногенных чрезвычайных ситуаций. Классификация и номенклатура поражающих факторов и их параметров.

1.3 Methods for determination of glutathione

Chomatography methods for determination of glutathione

Spectrophotometric method determination of glutathione

Electrochemical methods determination of glutathione

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Райфегерст Ксения Владимировна		

Консультант – лингвист кафедры иностранных языков:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ИЯПР, ИПР	Рыманова И. Е.	к.ф.н.		

1.3 Methods for determination of glutathione

There are a number of procedures, for example, chemical, enzymatic, and chromatographic for the determination of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) in biological samples.

Chomatography methods for determination of glutathione

A HPLC method for determination of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in plasma, whole blood and rat hepatocytes has been developed and evaluated. Reduced glutathione reacts with orthophthaldehyde (OPA) to form a stable, highly fluorescent tricyclic derivate at pH 8, while GSSG reacts with OPA at pH 12. At measurement of GSSG, GSH was complexed to N-ethylmaleimide. For the separation, reverse phase column Discovery C18, 150 mm*4 mm, 5 μ m, was used. The mixture of methanol and 25 mM sodium hydrogenphosphate (15:85, v/v), pH 6.0, was used as mobile phase. The analytical performance of this method is satisfactory for both GSH and GSSG. The intra-assay coefficients of variation were 1.8 and 2.1% for whole blood, 2.0 and 1.9% for rat hepatocytes, 4.3 and 5.2% for plasma. The inter-assay coefficients of variation were 5.8 and 6.2% for whole blood, 6.6 and 7.1% for rat hepatocytes, 6.9 and 7.8% for plasma. The recoveries were as follows: 98.2% (CV 3.5%) and 101.5% (CV 4.2%) for whole blood, 99.1% (2.5%) and 102.3 (4.4%) for rat hepatocytes, 94.1% (CV 7.5%) and 103.5 (CV 8.5%) for plasma. The calibration curve was linear in the whole range tested. The limit of detection was 14.0 and 5.6 fmol, respectively. The preliminary reference ranges of reduced and oxidized glutathione in a group of blood donors are (4.69 $\pm$ 0.93) and (0.28 $\pm$ 0.12) μ mol/g Hb for whole blood, (1.82 $\pm$ 0.55) and (0.154 $\pm$ 0.044) μ M for plasma [23].

A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method for determination of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, cysteine glutathione-mixed disulfide and 20 related sulfur-containing amino acids or their derivatives has been described. The procedure is based upon the initial formation of S-carboxymethyl derivatives of free thiols with iodoacetic acid followed by conversion of free amino groups to 2,4-dinitrophenyl derivatives by reaction with

1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. Chromatography of the reaction mixture without sample isolation is on a 3-aminopropylsilane derivatized silica column and elution with a sodium or ammonium acetate gradient in a water-methanol-acetic acid solvent at pH 4.5. Determination of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and cysteine glutathione-mixed disulfide in biological samples is described [24].

Objectives were to develop this method to quantify simultaneously reduced and oxidized glutathione, cysteine, cystine, and other SH/SS in various tissues, including human blood and plasma, rat liver and hippocampus, mosquito, and spinach leaf. Optimal conditions were determined for sample processing and analysis using metaphosphoric acid and HPLC-DEC. Authentic standards of 10 common SH/SS compounds were resolved and eluted within 15 min, and all standard curves were linear from 5 to 1600 pmol. Validation was based on the following: First, tissue sample sizes were proportional to peak areas over an eightfold range. Second, recovery of SH/SS added to samples before processing was 96–101%. Finally, the results were equivalent and correlated highly with values for total SH by 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) assay ($r^2=0.996$) and for total glutathione by DTNB-GSSG reductase assay ($r^2=0.998$). The life span of the Au/Hg electrode was limited to 200–500 samples based on the lineal range of standard curves. On the basis of these results, we believe that this method will fill a long-time need for the simultaneous determination of SH/SS in biological tissues [25].

A new rapid and highly sensitive HPLC method with ortho-phthalaldehyde (OPA) pre-column derivatization has been developed for determination of reduced glutathione (GSH) and total glutathione (GSHt) in human red blood cells and cultured fibroblasts. OPA derivatives are separated on a reversed-phase HPLC column with an acetonitrile–sodium acetate gradient system and detected fluorimetrically. An internal standard (glutathione ethyl ester) is added to facilitate quantitation. Total glutathione is determined after reduction of disulfide groups with dithiothreitol; the oxidized glutathione (GSSG) concentration is calculated by

subtraction of the GSH level from the GSht level. The assay shows high sensitivity (50 fmol per injection, the lowest reported), good precision (C.V. <5.0%), an analytical recovery of GSH and GSSG close to 100%, and linearity ($r > 0.999$). This HPLC technique is very simple and rapid. Its wide applicability and high sensitivity make it a convenient and reliable method for glutathione determination in various biological samples [26].

Studies present a rapid, validated HPLC-electrochemical method for determining GSH and GSSG in small samples such as those from microdissected airways of the mouse containing 50–200 μg protein which is suitable for routine use. GSH and GSSG can be measured at levels of 1 and 2 pmol on column, respectively, with acceptable accuracy and precision and without the need to generate derivatives. In microdissected airways from the mouse, the intraday assay coefficient of variation for GSH varied from 4.7 to 5.9% and for GSSG was 4.4 to 5.7%. The interday assay coefficient of variation ranged from 6.0 to 7.6% for GSH and 5.5 to 23% for GSSG. Addition of GSH or GSSG to samples increased the peak areas appropriately, without altering the peak shape, retention time, or peak area of the corresponding reduced (oxidized) thiol. The ratio of GSH/GSSG in freeze-clamped liver ranged from 46 to 248, while liver tissue which was homogenized fresh had GSH/GSSG ratios of 62-150. The technique appears to be capable of reproducibly measuring GSH and GSSG in small quantities of nonhepatic tissue [27].

A rugged LC-MS/MS method was developed to quantify reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively) in rat hepatocytes. In addition, GSH conjugates can be detected, characterized and measured in the same analysis. Samples were treated with acetonitrile and iodoacetic acid to precipitate proteins and trap free GSH. These highly polar analytes were separated by ion exchange chromatography using conditions that were developed to be amenable to electrospray ionization and provide baseline chromatographic resolution. A solvent gradient with a total run time of 13 min was used to elute the analytes, as well as any highly retained components in the samples that would otherwise accumulate

on the HPLC column and degrade the chromatography. The analytes were detected using either selected ion monitoring (SIM) using an ion trap mass spectrometer or selected reaction monitoring (SRM) using a triple quadrupole mass spectrometer. The ranges for quantification of GSH and GSSG using an ion trap were 0.651–488 μM and 0.817–327 μM , respectively. Using SRM with the triple quadrupole instrument, the ranges of quantification for GSH and GSSG were 0.163–163 μM and 0.0816–81.6 μM , respectively. This analytical method has general utility for simultaneously investigating the potential of test compounds to induce both oxidative stress from redox cycling in vitro and the formation of GSH conjugates [28].

To establish a HPLC method for the determination of glutathione in human plasma. Blood samples were immediately injected into heparinized tubes pretreated with derivation reagent DTNB and centrifuged within 25 minutes after sampling. Penicillamme was used as an internal standard. 10% perchloric acid was added to precipitate the proteins. 20 μL of the supernatant liquid was injected into the HPLC system. The samples were separated on a SUPELCOSILLC-18 column (150 mm*4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase consisting of 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium acetate buffer (pH 5.6) and methanol (100:8). The flow rate was 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with detection wavelength at 320 nm. Results: The standard curve was linear over the range of 2 to 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.999\ 7$, $n=6$). The limit of detection was 1 $\mu\text{mol}\ \text{L}^{-1}$. The intraday and interday RSDs were below 10%. The recoveries of the control samples of low, medium and high concentrations were within the range of 95% to 105%. Conclusion: The method is accurate, rapid precise, and suitable for the pharmacokinetic studies of glutathione [29].

A method for simultaneous determination of glutathione and its precursors cysteine, cysteinylglycine and homocysteine in saliva is presented. The procedure involves reductive conversion of disulfides to thiols, derivatization to their 2-S-quinolinium derivatives with 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate and separation and quantitation by reversed-phase ion-pairing high performance liquid chromatography with ultraviolet detection at 355 nm. The calibration performed

with saliva samples spiked with thiol disulfides, within the practical concentration ranges, showed linear response of the detector. The method applied to the saliva samples donated by volunteers showed mean concentration (SD, n=8) of cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine: 26.5 (31.6), 6.05 (5.12), 16.97 (7.68), 3.64 (1.34) nmol/ml respectively [30].

Spectrophotometric method determination of glutathione

This work reports the development of a simple, robust, automated sequential injection analysis (SIA) system for the enzymatic determination of total (tGSH) and oxidized (GSSG) glutathione in human whole blood. The reduced (GSH) glutathione concentration is then obtained as the difference between the tGSH and GSSG concentrations. The determination was based on the DTNB–GSSG reductase recycling assay, which couples the specificity of the GSSG reductase (GR) with an amplification of the response to glutathione, followed by spectrophotometric detection of the 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) formed ($\lambda=412$ nm). The implementation of this reaction in a SIA flow system with an in-line dilution strategy permitted the necessary distinct application ranges for tGSH and for GSSG. It also guaranteed the exact timing of fluidic manipulations and precise control of the reaction conditions.

The influence of parameters such as reagents concentration, temperature, pH, flow rate of the carrier buffer solution, as well as reaction coil length, etc., on the sensitivity and performance of the SIA system were studied and the optimum reaction conditions subsequently selected. Linear calibration plots were obtained for GSH and GSSG concentrations up to 3.00 and 1.50 μM , with detection limits of 0.031 and 0.014 μM , respectively. The developed methodology showed good precision, with a relative standard deviation (R.S.D.)<5.0% (n=10) for determination of both glutathione forms. Statistical evaluation showed good compliance, for a 95% confidence level, between the results obtained with the SIA system and those furnished by the comparison batch procedure [31].

The spectrophotometric/microplate reader assay method for glutathione (GSH) involves oxidation of GSH by the sulfhydryl reagent 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form the yellow derivative 5'-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB), measurable at 412 nm. The glutathione disulfide (GSSG) formed can be recycled to GSH by glutathione reductase in the presence of NADPH. The assay is composed of two parts: the preparation of cell cytosolic/tissue extracts and the detection of total glutathione (GSH and GSSG). The method is simple, convenient, sensitive and accurate. The lowest detection for GSH and GSSG is 0.103 nM in a 96-well plate. This method is rapid and the whole procedure takes no longer than 15 min including reagent preparation. The method can assay GSH in whole blood, plasma, serum, lung lavage fluid, cerebrospinal fluid, urine, tissues and cell extracts and can be extended for drug discovery/pharmacology and toxicology protocols to study the effects of drugs and toxic compounds on glutathione metabolism [32].

A method for the analysis of nanogram quantities of glutathione has been developed which is based on the catalytic action of GSH or GSSG in the reduction of Ellman reagent (DTNB) by a mixture of TPNH and yeast glutathione reductase. Unlike previous methods of analysis the procedure described here effectively measures the total glutathione (GSH + GSSG) content of unknown mixtures and is not subject to appreciable interference by the presence of other thiol components. It is suggested that the catalytic action of glutathione in this system resides in the continual enzymic regeneration of GSH, present initially or formed enzymically from GSSG, following its interaction with the sulfhydryl reagent.

The sensitivity of the method is such as to permit the determination of total glutathione in extracellular tissue fluids such as plasma, saliva, and urine normally containing very low levels of this material, essentially without pretreatment of the sample. The same is true for glutathione determinations of whole blood, in which the preliminary procedure is confined to the preparation of a 1:100 hemolyzate from as little as 10 μ l of sample.

Following published procedures, the pretreatment of tissue extracts with NEM to form an enzymically inactive complex with free GSH allowed the determination of the low levels of oxidized glutathione normally present therein. The use of the foregoing analytical method in the determination of total and oxidized glutathione contents of rat blood, kidney, and liver gave values in good agreement with those obtained by previous investigators [33].

A simple and sensitive spectrophotometric method suitable for the stability control of pharmaceutical dosage forms containing glutathione (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine), GSH, is described. Besides GSH, the method quantitatively determines its oxidation product, GSSG. The colour reactions of GSH and GSSG with ammonium tetrachloropalladate have been investigated and the optimum reaction conditions, spectral characteristics and composition of the yellow water-soluble complexes have been established. The assay results of pharmaceutical formulations showed good accuracy and precision over the concentration range of 5×10^{-5} – 6×10^{-4} M GSH [34].

A method for the quantitative colorimetric determination of reduced glutathione in blood. The method includes mixing a sample of the blood with a reagent containing stabilized tungstic acid, ethanol, and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). The mixture is centrifuged and the optical density of the supernatant is measured. The supernatant is mixed with a buffer to get a final pH of from about 7 to about 10, and the optical density is again measured. The glutathione concentration is determined from the optical density measurements [35].

A highly specific, sensitive, and simple method for the determination of submicrogram amounts of glutathione has been developed. GSH is reacted at pH 8 with o-phthalaldehyde yielding a product whose fluorescence at 420 m μ is linear from 0.065 to 32.5 m μ moles/ml. Under the specified reaction conditions, little or no fluorescence is obtained from oxidized glutathione, sulfhydryl-containing amino acids, peptides, purines, or other related compounds [36].

Electrochemical methods determination of glutathione

Procedures were developed for determining glutathione by voltammetry and coulometric titration with electrogenerated oxidants using the biamperometric indication of the titration end-point. Possible mechanisms of the glutathione reaction with electrogenerated halogens are discussed. Microgram amounts of glutathione can be determined in model solutions with an RSD of 1-2%. The oxidation wave of glutathione in the voltammogram is observed at 0.95 V. At higher glutathione concentrations, the wave takes the shape of a peak. Glutathione concentration in the range between 9.15×10^{-5} and 2.14×10^{-3} M is a linear function of its oxidation wave height at a stationary platinum electrode in a 0.05 M H_2SO_4 solution. The determination limit for glutathione is 1.9×10^{-5} M. The procedures for determining glutathione in human blood were proposed [37].

A simple, sensitive, and rapid detection of glutathione by cyclic voltammetry using a bare glassy carbon electrode is reported in which glutathione forms a 1:1 complex compound with copper(II) ions. This complex compound is adsorbed onto the electrode surface and undergoes electrochemical oxidation at a characteristic oxidation potential of -0.20 V vs. the standard mercury/mercurous sulphate reference electrode, which is used to detect the glutathione concentration. The linear dynamic range is obtained for a glutathione concentration from 1 μM to 12.5 μM , and the sensitivity is found to be $0.1 \pm 0.002 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$. A low limit of detection ($n=3$) of 0.14 μM and a precision of 1.8% are achieved using a simple, unmodified electrode. The robustness of the present methodology is demonstrated by the successful quantitative analysis of glutathione in the presence of cysteine [38].

A sensitive and selective electrochemical method was developed for determination of glutathione (GSH) in hemolysed erythrocyte using a ferrocene dicarboxylic acid modified carbon nanotubes paste electrode (FDCCNTPE). Cyclic voltammetry (CV), double potential-step chronoamperometry and differential pulse voltammetric (DPV) were used to investigate the suitability of ferrocene dicarboxylic acid at the surface of a multi-wall carbon nanotubes paste electrode as a mediator for the electrocatalytic oxidation of glutathione in aqueous solutions with various pH. The results showed that FDCCNTPE had high electrocatalytic

activity for the electrooxidation of glutathione. Under optimum conditions (pH 7.00), oxidation of GSH occurs at a potential about 230 mV less positive than that at the unmodified carbon nanotubes paste electrode. The catalytic reaction rate constant, k_h was calculated ($1.98 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) using chronoamperometry. The electrocatalytic oxidation peak current of GSH showed two linear dynamic ranges with a detection limit of $0.2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ GSH. The linear calibration ranges were obtained between $0.5\text{--}24 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and $24\text{--}122 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ GSH using the DPV method. Finally, the proposed method was also examined as a selective, simple and precise electrochemical sensor for the determination of GSH in real samples such as hemolysed erythrocyte [39].

In this study, we report the synthesis and application of a FePt/CNTs nanocomposite as a highly sensitive sensor and novel amide ligand (9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracene-11,12-dicarboximido)-4-ethylbenzene-1,2-diol as a mediator for the determination of glutathione (GSH), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and tryptophan (Trp). The synthesized materials were characterized with different methods such as NMR, IR spectroscopy, TEM, XRD, FESEM, cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and square wave voltammetry (SWV). The modified electrode exhibited a potent and persistent electron mediating behavior followed by well-separated oxidation peaks of GSH, NADH and Trp. The peak currents were linearly dependent on GSH, NADH and Trp concentrations in the range of $0.08\text{--}220$, $1.0\text{--}400$ and $5.0\text{--}500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, with detection limits of 0.05 , 0.8 and $1.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The modified electrode was used for the determination of these compounds in real samples [40].

This study describes the development, electrochemical characterization and utilization of novel modified N-(4-hydroxyphenyl)-3, 5-dinitrobenzamide-FePt/CNTs carbon paste electrode for the electrocatalytic determination of glutathione (GSH) in the presence of piroxicam (PXM) for the first time. The peak currents were linearly dependent on GSH and PXM concentrations in the range of $0.004\text{--}340$ and $0.5\text{--}550 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, with detection limits of 1.0 nmol L^{-1} and 0.1

$\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The modified electrode was successfully used for the determination of the analytes in real samples with satisfactory results [41].

A chemically modified electrode was prepared by incorporating p-aminophenol into multiwall carbon nanotubes paste matrix. Cyclic voltammetry, square wave voltammetry, double potential step chronoamperometry, and electrochemical impedance spectroscopy were used to investigate the electrochemical behaviour of glutathione at the chemically modified electrode prepared. According to the results, p-aminophenol multiwall carbon nanotubes paste electrode (p-APMWCNTPE) showed high electrocatalytic activity for glutathione oxidation, producing a sharp oxidation peak current at about +0.285 vs Ag/AgCl reference electrode at pH 5.0. Chronoamperometry was also used to determine glutathione's catalytic rate constant and diffusion coefficient at p-APMWCNTPE. The square wave voltammetric peak current of glutathione increased linearly with glutathione concentration in the range of 2.0×10^{-7} – 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ with a detection limit of 9.0×10^{-8} mol L⁻¹. The method was also successfully employed as a selective, simple, and precise method for the determination of glutathione in haemolysed erythrocyte, tablet, and urine samples [42].

The electrocatalytic oxidation of glutathione (GSH) has been studied at the surface of ferrocene-modified carbon paste electrode (FMCPE). Cyclic voltammetry (CV), double potential step chronoamperometry, and differential pulse voltammetry (DPV) techniques were used to investigate the suitability of incorporation of ferrocene into FMCPE as a mediator for the electrocatalytic oxidation of GSH in buffered aqueous solution. Results showed that pH=7.00 is the most suitable for this purpose. In the optimum condition (pH=7.00), the electrocatalytic ability of about 480 mV can be found and the heterogeneous rate constant of catalytic reaction was calculated as $k'h=1.83 \times 10^{-1}$ cm s⁻¹ $k'h=1.83 \times 10^{-1}$ cm s⁻¹. Also, the diffusion coefficient of glutathione, D, was found to be 3.61×10^{-5} cm² s⁻¹. The electrocatalytic oxidation peak current of glutathione at the surface of this modified electrode was linearly dependent on the GSH concentration and the

linear analytical curves were obtained in the ranges of 3.2×10^{-5} M– 1.6×10^{-3} M and 2.2×10^{-6} M– 3.5×10^{-3} M with cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry methods, respectively. The detection limits (3σ) were determined as 1.8×10^{-5} M and 2.1×10^{-6} M using CV and DPV, respectively. Finally, the electrocatalytic oxidation of GSH at the surface of this modified electrode can be employed as a new method for the voltammetric determination of glutathione in real samples such as human plasma [43].

Electrooxidation of glutathione (GSH) was studied at the surface of 2,7-bis(ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one modified carbon paste electrode (2,7-BFEFMCPE). Cyclic voltammetry (CV), double potential-step chronoamperometry, and differential pulse voltammetry (DPV) were used to investigate the suitability of this ferrocene derivative as a mediator for the electrocatalytic oxidation of GSH in aqueous solutions with various pH. Results showed that pH 7.00 is the most suitable pH for this purpose. At the optimum pH, the oxidation of GSH at the surface of this modified electrode occurs at a potential of about 0.410 V versus Ag|AgCl|KCl_{sat}. The kinetic parameters such as electron transfer coefficient, $\alpha=0.61$, and rate constant for the chemical reaction between GSH and redox site in 2,7-BFEFMCPE, $k_h=1.73 \times 10^3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, were also determined using electrochemical approaches. Also, the apparent diffusion coefficient, D_{app} , for GSH was found to be $5.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ in aqueous buffered solution. The electrocatalytic oxidation peak current of GSH showed a linear dependence on the glutathione concentration, and linear calibration curves were obtained in the ranges of 5.2×10^{-5} M to 4.1×10^{-3} M and 9.2×10^{-7} M to 1.1×10^{-5} M with cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry methods, respectively. The detection limits (3σ) were determined as 1.4×10^{-5} M and 5.1×10^{-7} M for the CV and DPV methods, respectively. This method was also examined as a selective, simple, and precise new method for voltammetric determination of GSH in real sample such as hemolysed erythrocyte [44].

A novel electrochemical sensor for the simultaneous determination of glutathione (GSH) and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) is described.

The sensor is based on a carbon paste electrode (CPE) modified with benzamide derivative and multiwall carbon nanotubes. This mixture makes a modified electrode that is sensitive for the electrochemical detection of these compounds. Under optimum conditions and at pH 7.0, oxidation of GSH occurs at a potential of about 330 mV less positive than that at an unmodified CPE. The voltammetric peak currents are linearly dependent on GSH and NADH concentrations in the ranges 0.09-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ GSH and 5.0-600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NADH. The detection limits found for GSH and NADH were 0.05 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 1.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The electrochemical sensor was also used for the determination of GSH in urine, pharmaceutical and hemolysed erythrocyte samples [45].

Direct simultaneous electrochemical determination of glutathione (GSH) and glutathione disulfide (GSSG) has been presented using a nanoscale copper hydroxide carbon ionic liquid composite electrode. To the best of our knowledge, this is the first report on the simultaneous determination of these two biologically important compounds based on their direct electrochemical oxidation. Incorporation of copper(II) hydroxide nanostructures in the composite electrode results in complexation of Cu(II) with the thiol group of GSH and leads to a significant decrease in GSH oxidation overpotential, while an anodic peak corresponding to the direct oxidation of GSSG as the product of GSH oxidation is observed at higher overvoltages. Low detection limits of 30 nM for GSH and 15 nM for GSSG were achieved based on a signal-to-noise ratio of 3. The proposed method is free from interference of cysteine, homocystein, ascorbic acid (AA), and uric acid (UA). No electrode surface fouling was observed during successive scans. Stability, high sensitivity, and low detection limits made the proposed electrode applicable for the analysis of biological fluids [46].

