

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

Институт природных ресурсов
Направление подготовки (специальность) 18.04.01 «Химическая технология»
Кафедра физической и аналитической химии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Определение нистатина в вине методом капиллярного электрофореза

УДК 615.33-047.44: 663.2: 66.087.9

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ5Г	Гофманова Яна Сергеевна		

Руководитель

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

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

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

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент кафедры ЭБЖ	Немцова О.А			

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

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

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

**Запланированные результаты обучения по программе
 18.04.01 «Химическая технология»**

Планируемые результаты обучения

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)	Требования ФГОС, критериев и/или заинтересованных сторон
<i>Профессиональные компетенции</i>		
P1	Применять <i>глубокие</i> естественно-научные, математические и инженерные <i>знания</i> для создания <i>новых</i> материалов	Требования ФГОС (ПК-2, 10, 12, 22, 23), Критерий 5 АИОР (п.1.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P2	Применять <i>глубокие знания</i> в области современных технологий химического производства для решения <i>междисциплинарных</i> инженерных задач	Требования ФГОС (ПК-2, 4-7, ОК-4), Критерий 5 АИОР (пп. 1.1, 1.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P3	Ставить и решать <i>инновационные задачи инженерного анализа</i> , связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии	Требования ФГОС (ПК-2, 17, 20), Критерий 5 АИОР (пп.1.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, <i>проектировать</i> и использовать <i>новое</i> оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на <i>мировом</i> рынке	Требования ФГОС (ПК-1, 17-21), Критерий 5 АИОР (п.1.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P5	Проводить теоретические и экспериментальные <i>исследования</i> в области создания <i>новых</i> материалов, современных химических технологий, нанотехнологий	Требования ФГОС (ПК-14-16, ОК-2-6), Критерий 5 АИОР (п.1.4), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>

P6	Внедрять, эксплуатировать современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их <i>высокую эффективность</i> , соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды	Требования ФГОС (ПК-1, 10), Критерий 5 АИОР (п.1.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
<i>Универсальные компетенции</i>		
P7	Использовать <i>глубокие знания по проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной инженерной деятельности</i> с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности	Требования ФГОС (ПК-3 8, 13), Критерий 5 АИОР (п. 2.1), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P8	<i>Активно</i> владеть <i>иностранным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности	Требования ФГОС (ПК-7, ОК-3), Критерий 5 АИОР (п. 2.2), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве <i>члена и руководителя группы</i> , состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность <i>следовать корпоративной культуре</i> организации	Требования ФГОС (ПК-9, ОК-4, 5), Критерий 5 АИОР (п. 1.6, 2.3), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P10	Демонстрировать <i>глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>	Требования ФГОС (ПК-5, 6, 10), Критерий 5 АИОР (п. 2.4, 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>
P11	<i>Самостоятельно учиться</i> и непрерывно <i>повышать квалификацию</i> в течение всего периода профессиональной деятельности	Требования ФГОС (ПК-11, ОК-1, 2, 6), Критерий 5 АИОР (п. 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов <i>EUR-ACE</i> и <i>FEANI</i>

Взаимное соответствие целей ООП и результатов обучения и кредитная стоимость результатов обучения представлены в следующих таблицах.

Взаимное соответствие целей ООП и результатов обучения

Результаты обучения	Цели ООП				
	Ц1	Ц2	Ц3	Ц4	Ц5
P1	+	+	+	+	+
P2	+	+		+	
P3	+	+	+	+	+
P4				+	
P5			+		+
P6	+	+		+	
P7		+			
P8			+		+
P9		+			
P10		+	+		
P11			+	+	+

Кредитная стоимость результатов обучения

<i>Профессиональные компетенции выпускника – 100 кредитов ECTS</i>							<i>Универсальные компетенции выпускника – 20 кредитов ECTS</i>				
Кредиты	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
	19	20	9	19	21	12	2	4	6	4	4

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

Институт природных ресурсов
 Направление подготовки _18.04.01 «Химическая технология»
 Кафедра физической и аналитической химии

УТВЕРЖДАЮ:
 Зав. кафедрой

 (подпись) _____ (дата) Пестряков А.Н.
 (Ф.И.О.)

**ЗАДАНИЕ
 на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

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

Студенту:

Группа 2ДМ5Г	ФИО Гофмановой Яне Сергеевне
------------------------	--

Тема работы:

«Определение качественных показателей золы тепловых электростанций»	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	№ 2657/с от 20.0402017

Срок сдачи студентом выполненной работы:	31 мая 2017 г.
--	----------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе (наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и. т. д); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и. т. д</p>	<p>В качестве объектов исследования взять фунгицидный антибиотик нистатин, провести литературный обзор по тематике научно-исследовательской работы, в экспериментальной части описать использованное оборудование, предоставить методики проведения экспериментов, проанализировать полученные результаты, сделать выводы.</p>
<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов (аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование</p>	<p>Аналитический обзор литературы Объекты и методы исследования Экспериментальная часть Разработка методики определения нистатина методом капиллярного электрофореза Валидационная оценка методики определения нистатина в вине методики капиллярного электрофореза Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение Социальная ответственность</p>

дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).	Заключение по работе
Перечень графического материала	Слайды презентации
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Креницына Зоя Владимировна, к.т.н., доцент кафедры менеджмента
Социальная ответственность	Немцова Ольга Александровна, ассистент кафедры ЭБЖ
Раздел на иностранном языке	Рыманова Ирина Евгеньевна, старший преподаватель кафедры ИЯПР
Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:	
На русском: 1.5 Методы определения, 1.5.1 Спектрофотометрические, 1.5.2 Хроматографические методы, 1.5.3 Капиллярный электрофорез.	
На английском: 1.5 Methods for the determination of nystatin, 1.5.1 Spectrophotometric methods, 1.5.2 Chromatographic methods, 1.5.3 Capillary electrophoresis	

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

Задание выдал руководитель:

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

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ5Г	Гофманова Я.С.		

Реферат

Выпускная квалификационная работа изложена на 155 страницах, содержит 30 таблиц, 31 рисунок, 58 источников литературы, приложение А,Б.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, противогрибковые антибиотики, нистатин, забраживание вина, метрологическая оценка.

Объект исследования: фунгицидный антибиотик нистатин.

Предмет исследования: возможность создания методики определения нистатина методом капиллярного электрофореза.

Цель работы – Разработать методику определения фунгицидного антибиотика нистатина методом капиллярного электрофореза для контроля качества и безопасности вина на различных стадиях производства и реализации готовых продуктов.

В процессе работы было исследовано влияние растворителя на сигнал нистатина, проведена оценка стабильности нистатина во времени при использовании различных растворителей. С целью подбора рабочих условий определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза было изучено влияние параметров ведущего электролита, параметров анализа (длина волны, температура капилляра, напряженность электролитического поля) на пики анализируемого вещества. С использованием подобранных рабочих условий была разработана методика количественного определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза. Для подтверждения достоверности результатов количественного определения, в соответствии с требованиями валидационной оценки была проведена оценка разработанной методики по следующим показателям: линейность методики, специфичность.

Руководитель: д.х.н., доцент, Е.И. Короткова.

Выполнил: магистрант группы 2ДМ5Г Я.С. Гофманова.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

1. ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования».
2. ГОСТ 12.1.012-90 «ССБТ. Вибрационная безопасность. Общие требования».
3. ГОСТ 12.11019-79 «ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».
4. ГОСТ 12.2.003-91 «ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности».
5. СанПин №11-19-94 «Перечень регламентированных в воздухе рабочей зоны вредных веществ».
6. СанПин 2.2.4.1191-03 «Электромагнитные поля в производственных условиях, на рабочих местах. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы».
7. ГОСТ 25818-91 «Золы-уноса тепловых электростанций для бетонов».
8. ГОСТ 10538-87 «Топливо твердое. Методы определения химического состава золы».
9. СНиП 23-05-95 «Естественное и искусственное освещение».
10. ГОСТ 12.2.003-91 «Оборудование производственное. Общие требования безопасности».
11. ГОСТ 12.2.032-78 «ССБТ. Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования».

Содержание

	Введение	18
Глава 1	Литературный обзор	21
1.1	История открытия нистатина.....	21
1.2	Физико-химические свойства нистатина.....	23
1.3	Способы выделения и механизм действия нистатина.....	26
1.3.1	Способы выделения нистатина из продуцентов.....	26
1.3.2	Механизм действия нистатина.....	27
1.4	Применение антибиотиков в виноделии.....	29
1.5	Методы определения нистатина.....	30
1.5.1	Спектрофотометрические методы.....	30
1.5.2	Хроматографические методы.....	35
1.5.3	Капиллярный электрофорез.....	45
Глава 2	Экспериментальная часть	48
2.1	Оборудование и материалы.....	48
2.2	Реактивы.....	51
2.3	Объекты исследования.....	51
2.4	Приготовление фоновых и исследуемых растворов.....	52
2.5	Методика эксперимента.....	54
Глава 3	Разработка методики определения нистатина методом капиллярного электрофореза	57
3.1	Выбор растворителя.....	57
3.2	Выбор концентрации ведущего электролита.....	61
3.3	Выбор рН ведущего электролита.....	63
3.4	Выбор длины волны.....	65
3.5	Выбор напряжения.....	66
3.6	Выбор температуры капилляра.....	67
Глава 4	Валидационная оценка методики определения нистатина в вине методики капиллярного электрофореза	68

4.1	Определение специфичности методики.....	68
4.2	Определение линейности методики.....	71
4.3	Подготовка методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза к метрологической аттестации.....	72
4.4	Проверка правильности методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.....	73
Глава 5	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение.....	75
5.1	Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.....	75
5.1.1	Введение.....	75
5.1.2	Потенциальные потребители результатов исследования.....	76
5.1.3	Анализ конкурентных технических решений.....	77
5.1.4	SWOT-анализ.....	78
5.1.5	Оценка готовности проекта к коммерциализации.....	79
5.1.6	Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования.....	81
5.2	Инициация проекта.....	82
5.2.1	Цели и результат проекта.....	83
5.2.2	Организационная структура проекта.....	84
5.2.3	Ограничения и допущения проекта.....	84
5.3	Планирование управления научно-техническим проектом...	85
5.3.1	Иерархическая структура работ проекта.....	85
5.3.2	Контрольные события проекта.....	86
5.3.3	План проекта.....	86
5.3.4	Бюджет научного исследования.....	89

5.3.4.1	Расчет материальных затрат научно-технического исследования.....	89
5.3.4.2	Основная заработная плата.....	91
5.3.4.3	Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала.....	94
5.3.4.4	Отчисления на социальные нужды.....	95
5.3.4.5	Накладные расходы.....	95
5.3.4.6	Матрица ответственности.....	96
5.3.4.7	План управления коммуникациями проекта.....	97
5.3.4.8	Реестр рисков проекта.....	98
5.4	Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.....	98
5.4.1	Оценка сравнительной эффективности исследования.....	99
Глава 6	Социальная ответственность.....	103
6.1	Анализ вредных факторов производственной среды.....	102
6.1.1	Характеристика вредных веществ.....	103
6.1.2	Недостаточная освещённость рабочей зоны.....	105
6.1.3	Повышенный уровень шума.....	106
6.1.4	Отклонение показателей микроклимата в помещении.....	107
6.2	Анализ опасных факторов производственной среды.....	108
6.2.1	Механическая опасность.....	108
6.2.2	Электробезопасность.....	109
6.2.3	Пожаровзрывоопасность.....	111
6.3	Охрана окружающей среды.....	112
6.4	Защита в чрезвычайных ситуациях.....	113
6.5	Особенности законодательного регулирования проектных решений.....	114
6.6	Правовые вопросы обеспечения безопасности.....	116
	Выводы.....	117

Список используемых источников.....	118
Список публикаций студента.....	119
Приложение А.....	125
Приложение Б.....	142

Введение

Актуальность работы. Среди современных проблем охраны здоровья населения России, проблема правильного питания человека, защита его здоровья путем предотвращения попадания в организм некачественных пищевых продуктов, занимает особое место. Вино на протяжении многих веков является неотъемлемой частью питания человека [1].

Контроль качества продуктов пищевой промышленности должен осуществляться согласно нормативной документации, в которой отражены требования к контролю качества и безопасности [2]. В течение последних десятилетий резко возросло использование различных консервантов в пищевой промышленности, в том числе антибиотиков. С одной стороны, применение консервантов является необходимостью для продления сроков годности продукции путем защиты от микробной порчи и/или роста патогенных микроорганизмов, а с другой стороны применение антибиотиков в винодельческой продукции на территории Российской Федерации в настоящее время запрещено [3]. Пристального внимания в данном вопросе заслуживает полиеновый противогрибковый антибиотик – нистатин. Его введение в виноматериал является эффективным способом предотвращения виноградных вин от забраживания [4], также нистатин используется в сельском хозяйстве при обработке почвы, зараженной плесневыми грибами, при этом микроколичества препарата могут попадать в ягоды винограда, а затем и в конечный продукт – вино.

В настоящее время в аналитической химии существует ряд методов для определения нистатина, таких как ВЭЖХ, спектрофотометрия и капиллярный электрофорез. Все эти методы имеют свои преимущества и ряд недостатков. Основными недостатками данных методов являются: длительное время анализа, использование токсичных растворителей, сложная процедура пробоподготовки, недостаточная чувствительность и селективность. Поэтому

разработка новых высокочувствительных, селективных и экологических методов контроля качества пищевых продуктов, в том числе методов качественного и количественного определения антибиотиков, является актуальной и своевременной задачей.

Цель работы. Разработать методику определения фунгицидного антибиотика нистатина методом капиллярного электрофореза для контроля качества и безопасности вина на различных стадиях производства и реализации готовых продуктов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

. Исследовать влияние растворителей на аналитический сигнал нистатина методом капиллярного электрофореза (этанол, ледяная уксусная кислота, смесь этанола и 1 н уксусной кислоты при различных соотношениях). Провести оценку стабильности нистатина во времени при использовании различных растворителей методом капиллярного электрофореза.

Исследовать влияние параметров ведущего электролита (концентрация, рН), параметров анализа (длина волны для УФ – детектирования аналитического сигнала, температура капилляра, напряженность электролитического поля) на аналитический сигнал нистатина, с целью подбора рабочих условий определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.

Разработать методику количественного определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.

Провести валидационную оценку разработанной методики по показателям: линейность методики, специфичность, прецизионность, точность.

Оценить правильность разработанной методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза, с помощью метода «введено – найдено» на реальных объектах.

Научная новизна.

1. Исследовано влияние рН ведущего электролита на электрофоретическую подвижность и стабильность нистатина методом капиллярного электрофореза.

2. Подобраны рабочие условия определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза при использовании в качестве растворителя смеси этанол – 1н уксусная кислота для системы капиллярного электрофореза «Капель 105М» («Люмэкс», Россия).

3. Разработана новая методика определения нистатина методом капиллярного электрофореза в вине, отличающаяся экспрессностью, микрообъемами анализируемого раствора. Проведенная валидационная оценка разработанной методики показала ее соответствие основным критериям приемлемости по всем показателям: линейность, специфичность, правильность, диапазон применения.

Практическая значимость.

Разработана методика определения нистатина методом капиллярного электрофореза в вине. Подобраны рабочие условия определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.

Показано, что разработанная методика более чувствительна и требует менее сложной пробоподготовки, позволяет исключить использование токсичных реагентов и сократить время анализа по сравнению с другими методами анализа.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 История открытия нистатина

До 50 – х годов прошлого века не существовало препаратов для лечения заболеваний вызываемых дрожжеподобными грибами рода *Candida*. Известные в те годы пенициллин и стрептомицин не помогали при лечении грибковых заболеваний.

В 1948 году Рэйчел Браун и Элизабет Ли Хэйзен из Нью – Йоркского Управления здравоохранения начали поиск эффективного противогрибкового препарата. В результате исследований ученые обнаружили в почве никому ранее не известный микроорганизм, названный *Streptomyces noursei*. В последствии из этих бактерий было выделено вещество, обладающее противогрибковым эффектом и не оказывающее токсического действия на организм. В 1950 году доктор Элизабет Хэйзен и Рейчел Браун совместно запатентовали один из самых широко известных лекарственных препаратов, который в 1954 году назвали «Нистатин».

Основные исследования по изучению структуры и функций нистатина проводились в период с 1960 по 1970 гг. Хотя профессор Браун вывела его формулу ранее в совместных работах с профессором Хэйзен, точная химическая структура не была установлена вплоть до 1976 года, когда стало возможно разделить нистатин на два отдельных соединения.

Обе формы нистатина представляют собой огромные органические молекулы, химическая структура которых позволяет использовать его в качестве противогрибкового агента. Во-первых, нистатин обладает очень низкой растворимостью в полярных растворителях, таким образом, попадая в организм, препарат не всасывается в пищеварительном тракте и кровеносной системе. Более того, препарат практически нетоксичен и не обладает побочными эффектами, потому ни одна из его форм не абсорбируется организмом. Этот факт также объясняет, почему нистатин неэффективен

против так называемых «глубоких» грибковых инфекций ЖКТ и кровеносной системы. Во – вторых, огромная структура нистатина на основе углерода помогает ему связываться с внешней мембраной клеток грибов, что вызывает разрывы клеточных стенок и является причиной гибели. Однако, препарат не имеет подобного эффекта на клетки животных или зеленых растений, что делает его безопасным для людей, животных и с/х культур.

Хэйзен видела огромные возможности применения нистатина для различных отраслей производства. В 1960 года Французские, Итальянские и Аргентинские виноделы изучали возможность применения нистатина в качестве консерванта. Импортёры свежих продуктов из дальних стран начали использовать нистатин для сохранения бананов на время их транспортировки из тропиков до места продажи. В 1970 годах нистатин был утвержден в качестве пищевой добавки при выращивании птиц, для предотвращения грибковых инфекций у индейки и кур. К середине 1970 – х годов нистатин начали использовать для лечения Американских язв от, казалось бы, непобедимой Голландской болезни язв. Хотя это было очень дорого и непрактично для широкого применения, нистатин сохранил много исторически – значимых и эстетически важных язв на северо – западе Соединенных Штатов [5].

Наиболее необычное применение нистатина произошло после разрушительного наводнения реки Арно в Италии в 1966 г. После отступления наводнения искусствоведы во Флоренции столкнулись с огромной задачей по спасению и восстановлению огромного множества картин и фресок, пострадавших от паводковых вод. Ситуация усугублялась еще и быстрым ростом плесени и грибка на многовековых работах. Ученые из Университета Флоренции предположили, что нистатин может быть наиболее эффективным средством для остановки роста грибов без повреждения картин. Препарат дал исследователям время, которое им было необходимо для реставрации картин.

Важное медицинское применение нистатина появилось в 1990 году в Университете Техаса где был разработан Ниотран – липосомальная форма

нистатина для инъекций. Для производства Ниотрана нерастворимый нистатин заключали в капсулу в виде микроскопических капелек, полученный таким образом препарат хорошо растворялся в кровеносной системе и появилась возможность для лечения «глубоких» грибковых инфекций внутренних органов. В сентябре 1998 года на научной конференции в Сан – Диего, Калифорния были представлены первые результаты по клиническому применению Ниотрана. Исследования проведенный на 75 пациентах показали положительные результаты, даже на тех пациентах у которых до этого наблюдалась резистенция к другим противогрибковым препаратам. Ни у одного из пациентов не наблюдалось побочных эффектов, присутствующих при лечении заболеваний другими синтетическими противогрибковыми препаратами. На основе проведенных исследований в 2000 году началось массовое производство препарата Ниотран [6].

1.2 Физико – химические свойства нистатина

Нистатин – стереоизомерная 33 – [3 – амино – 3,6 – дидезокси – β – D – манопиранозилокси] – 1,3,4,7,9,11,17,37 – октагидрокси – 15,16,18 – триметил – 13 – оксо – 14,39 – диоксабицикло – (33.3.1) – нонатриаконта – 19,21,25,27,29,31 – гексаен – 36 – карбоновая кислота [7]. Структурная формула нистатина приведена на рисунке 1.

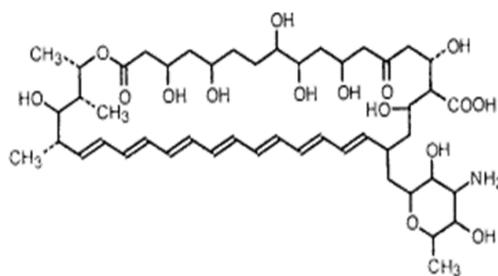


Рисунок 1 – Структурная формула нистатина [7]

В очищенном виде нистатин представляет собой кристаллический бледно – желтый или светло – коричневый порошок, горький на вкус,

разлагающийся без плавления при температуре 160 °С, полностью при 250 °С. Молекулярная масса которого составляет 925,503 г/моль.

Спектр поглощения нистатина характеризуется тремя максимумами при длинах волн около 291, 305 и 319 нм, при отношении поглощения в кювете с толщиной слоя 1 см при 291 нм к таковому при 305 нм 0,61 – 0,73, а отношение поглощения при 291 нм к таковому при 319 нм – 0,83 – 0,96 (рисунок 2) [8].

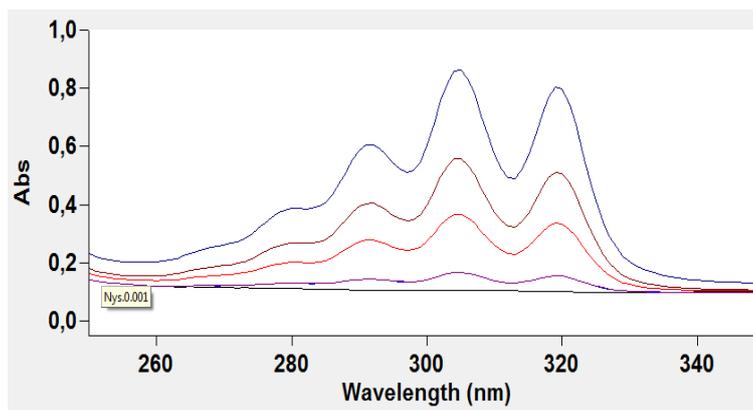


Рисунок 2 – Спектр поглощения раствора нистатина в этаноле

Инфракрасный спектр указывает на присутствие карбоксильных и лактонных групп. ИК – спектр нистатина приведен на рисунке 3.

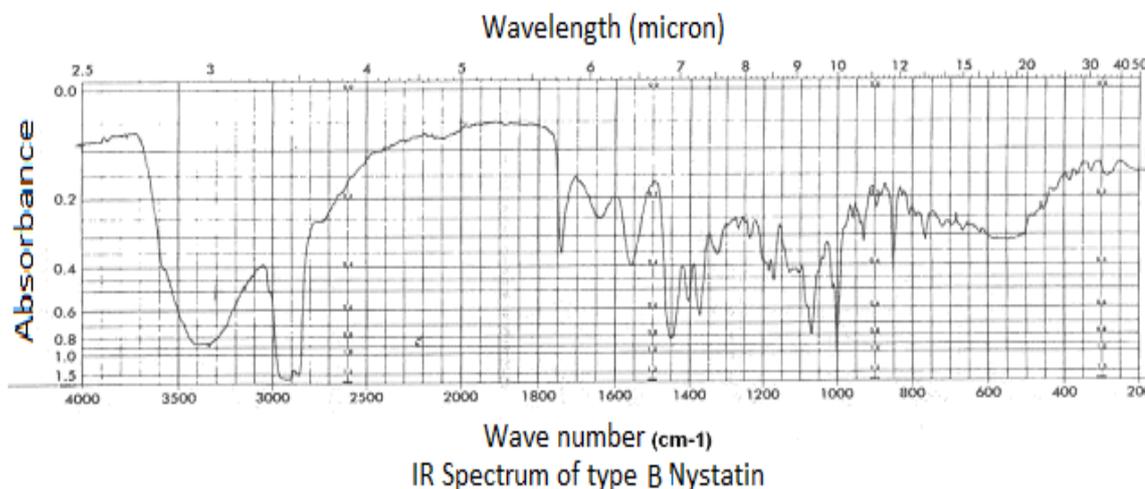


Рисунок 3 – Инфракрасный спектр нистатина [9]

Расшифровка полос ИК спектра приведена в таблице 1 [9].

Таблица 1 – Расшифровка полос ИК спектра нистатина [9].

Частота (см ⁻¹)	Тип колебаний
1065	Симметричные растягивающиеся СН ₃
1376	Симметричные деформационные СН ₃
1577 и 1576	Карбоксильный ион
1702	Лактон
3300-3500	НН, ОН растягивающиеся, валентные

Нистатин обладает слабой растворимостью. За исключением кислотных и щелочных сред, практически не растворим в воде, хлороформе и эфире, но несколько лучше растворим в диоксане, в низших алифатических спиртах, таких как метанол, этанол и бутанол при нагревании до 28 °С, хорошо растворим в пропилен гликоле, пиридине, ледяной уксусной кислоте, N, N – диметилформамиде или диметилсульфоксиде. Нистатин гигроскопичен, светочувствителен, термически не стоек, чувствителен к действию влаги, легко теряет активность в присутствии кислорода воздуха и при облучении светом, разрушается в кислой и щелочной средах. В кристаллическом виде при 0–5 °С, сохраняет активность в течение 6 месяцев [10].

Субстанция нистатина амфотерна, однако, водные и алкалиновые растворы быстро дезактивируются. Водные растворы стабильны в течении 10 минут при нагревании до 100 °С и рН 7, также стабильны в умеренно щелочных средах, но лабильны при рН 9 и рН 2. Нистатин показывает оптимальную стабильность в буферном растворе цитрата – фосфата при рН 5,7. Калиевые и натриевые соли антибиотика растворяются в воде, но они не стойкие [11].

1.3 Способы выделения и механизм действия нистатина

1.3.1 Способы выделения нистатина из продуцентов

Нистатин относится к группе полиеновых антибиотиков, ациклического строения, нарушающий функции мембран, продуцируемый при росте определённых штаммов *Streptomyces Noursei*. Продуцент нистатина хорошо развивается на средах, содержащих кукурузный экстракт, соевую муку, аммонийные соли (нитраты не используются), крахмал или глюкозу (сахарозу, лактозу, гидрол не потребляет), мел.

Для приготовления посевного материала используют молодые споры стрептомицета, и процесс развития продолжается в течение 30 – 40 ч. В ферментеры вносят посевной мицелий в объеме примерно 10 %. Процесс развития стрептомицета и образование нистатина в ферментерах продолжается 80–90 ч при температуре 28 °С. Развитие микроорганизма и процесс биосинтеза нистатина существенно зависят от концентрации неорганического фосфора в среде. В процессе развития стрептомицета нистатин в основной массе накапливается в мицелии.

Существует несколько методов выделения и очистки антибиотика. Авторы работы [12] для выделения нистатина, экстрагируют его либо из мицелия метанолом или пиридином, либо из культуральной жидкости изопропанолом. Нистатин очищают кристаллизацией из 70 % водного ацетона при 50 °С с последующим противоточным распределением в двухфазной системе бутанол: метанол: вода: гексан (50:50:35:15). Позднее авторами [13] был предложен еще один способ выделения нистатина. Антибиотик извлекают из влажного мицелия насыщенным в метаноле, этаноле или изопропаноле раствором CaCl_2 . Нистатин переходит в раствор в виде хлоркальциевого комплекса, состоящего из двух биологически активных веществ: нистатина A_1 (примерно 73–85 %) и нистатин A_2 (около 27–15 % от общего количества антибиотика), который разрушают прибавлением к

раствору двух объемов воды. Выпадающий в осадок нистатин фильтруют, многократно промывают водой и сушат в вакууме.

1.3.2 Механизм действия нистатина

Полиеновый антибиотик нистатин, подавляет жизнедеятельность патогенных дрожжевых и дрожжеподобных грибов, особенно дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Механизм биологического действия антибиотика нистатина заключается в том, что он нарушает проницаемость цитоплазматической мембраны клеток грибов. Мембрана клетки грибка, представляет собой трехслойную структуру (рисунок 4).

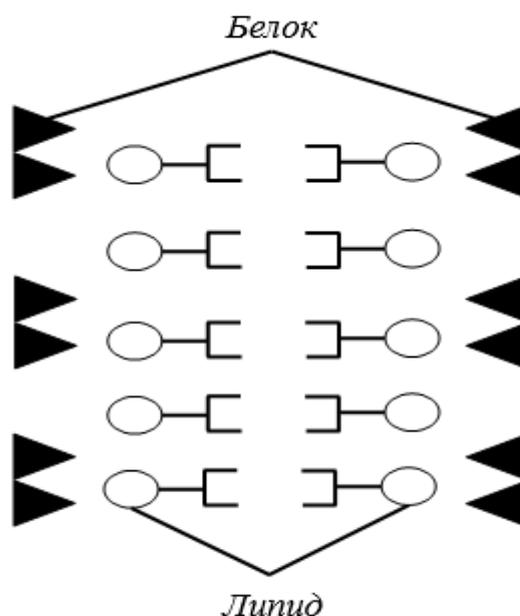


Рисунок 4 – Модель структуры мембраны [14]

Средний слой из двух липидных монослоев, концы их углеводородных цепей соприкасаются и ориентированы параллельно, а гидрофильные концы направлены наружу и примыкают к белковым слоям с каждой стороны. Переход веществ через мембрану включает транспорт через белок – липид – белок. Гидрофобный слой (центральная часть мембраны) является осмотическим барьером. В результате взаимодействия нистатина со

стеринами мембраны образуется пора (ионный канал) – проводящая структура. Образование каналов связано с построением полиен – стеринового комплекса в мембране. Гидроксильные группы в гидроксильной цепи молекулы как бы выстилают образовавшуюся пору. Гидрофильная цепь определяет проводимость и избирательность ионных каналов. Уменьшение числа гидроксильных групп изменяет селективность канала с анионной на катионную.

Такие комплексы образуются на обеих сторонах мембраны. Каждая ОН – группа с гидрофобной стороны молекулы нистатина одной полупоры взаимодействует с аминогруппой соседней молекулы нистатина другой полупоры (рисунок 5).

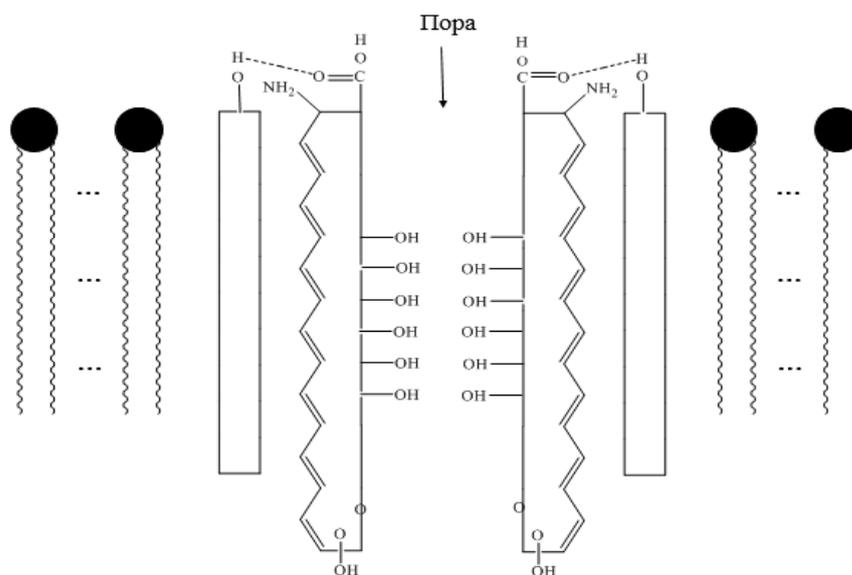


Рисунок 5 – Модель комплекса «антибиотик полиенового ряда – стерин (холестерин)» [14]

В результате полупоры, расположенные с двух сторон мембраны, образуют завершённую пору, пронизывающую мембрану насквозь. Через такую пору радиусом 0,4 нм проникают вода, ионы, неэлектролиты. Нарушение липопротеидных структур приводит к утечке водорастворимых низкомолекулярных соединений, таких как K^+ , фосфаты, NH^+ , аминокислоты через мембрану и к утрате избирательной проницаемости. В настоящее время

считают, что даже незначительные изменения мембранных структур приводят к инактивации энергетических механизмов транспорта. При этом клетка не может получать назад метаболиты, теряемые за счет утечки, и рост становится невозможным [14].

1.4 Применение антибиотиков в виноделии

При изготовлении столовых полусладких вин технологи стремятся чтобы эти вина были стойкими против забраживания, снижения вкусовых качеств, помутнения. В науке энологии найдется не так много вопросов, которые настолько внимательно бы изучались, как вопрос о способах предупреждения забраживания вин, содержащих сахар при наличии небольшого количества спирта, и результаты исследования которых были бы на столько скудны. Издавна на дрожжи воздействуют известным средством сернистым ангидридом, который способен замедлить, временно приостановить и совершенно прекратить брожение, делая вино стойким против забраживания. Однако введение в сусло небольшого количества сернистого ангидрида, благоприятно действующего на вино, приводит к его взаимодействию с альдегидами вина, и окисляясь он теряет свои антисептические свойства. Использование больших доз сернистого ангидрида нежелательно, так как такие дозы придают вину привкус сернистого ангидрида, тем самым ухудшая его вкусовые качества и могут быть опасны для здоровья.

Во многих винодельческих странах проводились и в настоящее время проводятся исследования, целью которых является найти заменители сернистой кислоты. Известны работы авторов, описывающие ряд антибиотиков, которые исследовались как заменители сернистого ангидрида при изготовлении винной продукции. Лучшее результаты среди этих антибиотиков были получены с антимицином, актидионом, нистатином. Данные антибиотики обладают стабилизирующими свойствами, не придают

вину и соку никакого постороннего запаха и привкуса и с органолептической точки зрения вполне пригодны. [15]

Нистатин является фунгицидом, способный стерилизовать среду или останавливать брожение вина при дозе 25 мг/л.

При дозе 5 мг/л нистатин ингибирует 80 % дрожжей и полностью останавливает брожение. Его активность зависит во многом от рН. Нистатин в 2 раза более активен при рН 3,8, чем при рН 4,8 и в 10 раз более активен при рН 3,8, чем при рН 7,0. Данный антибиотик является очень активным фунгицидом, способным убивать дрожжи, но он весьма нестабильный. При дозе 25 мг/л, антибиотик обеспечивает остановку спиртового брожения. Практически стерилизуют среды с 10 % спирта при дозах от 10 до 15 мг [16].

Однако, применение этих антибиотиков запрещено для широкого использования. В настоящее время установлено, что употребление их с пищей вредно для здоровья человека и ведет к тому, что микробы, находящиеся в организме, в том числе и патогенные, приобретают иммунитет к антибиотикам и в дальнейшем введение в организм в случае заболевания даже таких сильнодействующих антибиотиков, как пенициллин и стрептомицин, не оказывает лечебного действия.

1.5 Методы определения нистатина

В настоящее время для определения нистатина применяют три группы методов: спектрофотометрические, методы ВЭЖХ со спектрофотометрическим или флуориметрическим детектированием и методы капиллярного электрофореза.

1.5.1 Спектрофотометрические методы

В настоящее время спектрофотометрические методы используются в основном для количественного определения нистатина в биологических

объектах. Основными преимуществами спектрофотометрических методов является информативность, достоверность, быстрота проведения анализа, наличие разнообразных методов математической обработки результатов, возможность автоматизации измерений. Данные методы нашли широкое применение для быстрого определения нистатина в фармацевтических препаратах.

В работе [17] описан спектрофотометрический метод совместного определения гидрокортизона, нистатина и окситетрациклина в фармацевтических препаратах. Спектрофотометрическое определение проводили на спектрофотометре Beckman Instrument DU – 70 в кювете с толщиной слоя 1 см. Стандартные растворы концентрацией 200 мг/л готовили растворением навесок окситетрациклина в воде, гидрокортизона в водно – спиртовом растворе, нистатина в метаноле. В качестве фонового раствора использовали ацетатный буфер (0.1 М, рН 4,5). Для приготовления градуировочных растворов 28 мг/л исследуемых веществ переносили в мерную колбу объемом 25 см³, добавляли 5 см³ ацетатного буфера и доводили до метки водным раствором этанола (16%).

Спектры поглощения исследуемых веществ снимали в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм со скоростью развертки 600 нм/мин. Для определения гидрокортизона и нистатина в присутствии окситетрациклина использовали метод мерной производной (дельта лямбда 12 нм). Сигнал гидрокортизона и нистатина детектировали при 255,5 нм и 245 нм, соответственно. Диапазон определяемых концентраций по методике составил от 2 до 36 мг/л, предел определения $3,17 \times 10^{-2}$ мг/л.

Авторы работы [18] предложили спектрофотометрический метод количественного определения противогрибкового компонента нистатина в фармацевтических препаратах. В качестве растворителя использовалась смесь диоксан – вода (7:3). Анализируемый раствор нистатина, подлежащий анализу, имел следующий состав:

- Нистатин – 1,5 г
- Глицерин – 100 г
- Бикарбонат натрия – 5 г
- Вода – 10 г
- Анестезин (бензокаин) – 1,5 г
- Разбавленный спирт – 20 мл

На основании состава приготовленного раствора, ожидаемое содержание нистатина составляет 1,07 %. Подготовка стандартных растворов осуществлялась следующим образом: 10,0 мг стандартного вещества нистатина взвешивали на аналитических весах после чего переносили в мерную колбу с номинальным объёмом 50 см³. Добавляли некоторое количество растворителя, смеси диоксан – вода в соотношении (7:3), после полного растворения вещества, доводили объём до метки тем же растворителем. Исходный раствор нистатина готовили концентрацией 200 мг/л. 25 см³ исходного раствора доводили до 100 см³ растворителем диоксан-вода (7:3). Из полученного раствора готовили ряд стандартных растворов, каждый по 10 см³, с концентрациями 5, 10, 15, 20 и 25 мг/л. Спектры поглощения стандартных растворов регистрировали в спектральном диапазоне 240 – 400 нм с использованием кварцевых кювет с толщиной слоя 5 мм.

Пробоподготовку анализируемого лекарственного препарата производили в следующей последовательности: 1 см³ гомогенизированного исходного образца (раствора) пипеткой вносили в мерную колбу с номинальным объёмом 50 см³. После чего в колбу добавляют смесь растворителя диоксин – вода (7: 3) до метки и хорошо встряхивают до гомогенизации. Для растворения нерастворенной фазы, 5 см³ суспензии переносят в другую колбу (25 см³) и добавляют тот же растворитель диоксан – вода. После чего образуется однородный прозрачный раствор. Полученный раствор разбавляют три раза (10 см³ и 20 см³ растворителя) и разделяют на две части. Среднее содержание нистатина в результате пяти определений

отличается от ожидаемого значения не более 3,15 % от среднего. Стандартное отклонение отдельных значений в среднем составляет 0,716 % от среднего. Статистический анализ был ограничен этими двумя статистическими параметрами. Диапазон определяемых концентраций по методике составил от 5 до 25 мг/л. В заключение данный аналитический метод, основанный на использовании фоточувствительности и селективной фототрансформации активного вещества, оказался надежным для аналитического контроля этих типов смесей.

В работе [19] авторы использовали метод дериватизационной спектрофотометрии в условиях ортогонального многочлена в неравных интервалах для совместного определения нистатина и метронидазола в фармацевтических препаратах. Исходные растворы готовили растворением нистатина и метронидазола в метаноле с концентрацией 0,1 мг/мл. Стандартные растворы метронидазола и нистатина дополнительно разбавляли метанолом, для приготовления рабочих стандартных растворов в пределах концентраций (1–25) и (1–15) мкг/мл соответственно.

Приготовление раствора вагинальных суппозиторий заключалось в следующем. Пять вагинальных суппозиториях фирмы Amrizole – N взвешивали и тщательно измельчали в ступке, и растворяли в 60 см³ метанола, количественно эквивалентных 500 мг метронидазола и 100 000 МЕ нистатина, что эквивалентно 20,5 мг. После обрабатывали ультразвуком 10 мин при комнатной температуре, раствор переносили в мерную колбу на 100 см³. Полученную смесь разбавляли метанолом. Наполнитель – основа суппозитория – это полиэтиленгликоль, поэтому фильтрация не требовалась, так как он полностью растворим в метаноле. Дальнейшее разбавление проводили метанолом с получением раствора, содержащего 25 мкг/мл⁻¹ метронидазола и 1,025 мкг/мл⁻¹ нистатина. Спектрофотометрическое детектирование проводили при длинах волн 301,5 и 241,5 нм.

Предлагаемый хемометрический метод может быть легко применен для одновременного определения метронидазола и нистатина в вагинальных

суппозиториях с использованием широко доступных

УФ

– спектрофотометров. Предлагаемый метод селективен, чувствителен. По сравнению с различными хроматографическими методами предлагаемый способ является экономичным и недорогостоящим.

Авторами работы [20] предложен экспресный спектрофотометрический метод для анализа нистатина в кормах. Для анализа нистатина был использован двухлучевой спектрофотометр Shimadzu Model UV – 160A с 1 см кюветами. Для обработки образцов были использованы – лабораторная мельница Retsch KG (Haan, Germany), оборудованная экраном 0,5 мм, вихревой смеситель (Heidolph, Германия) и центрифуга IEC Centra – MP4 (Needham Heights, MA). Нормальные спектры были получены между 260 и 360 нм со скоростью сканирования 1500 нм/мин. Спектры третьей производной были получены цифровой дифференциацией нормальных спектров в соответствии со способом свертки с 17–25 точками данных вокруг каждой длины волны. Разность длин волн ($\Delta\lambda$), зависящая от установки ключевого входа N и диапазона длины волны измерения, составляла 6,3 нм для $N = 9$ и ≤ 100 нм.

Стандартные растворы нистатина готовили, растворением 25 мг вещества в 25 см³ диметилформамиде. Аликвоты полученных растворов дополнительно разбавляли метанолом, для приготовления стандартных рабочих растворов в диапазоне концентраций 0,04 – 4,0 мкг нистатина/мл. Все растворы были защищены от света и готовились ежедневно.

Пробоподготовка анализируемого вещества.

1 г взвешенного образца грунта переносили в центрифужную пробирку с винтовой крышкой объемом 50 см³. Добавляли 20 см³ метанола и встряхивали пробирку в течение 2 мин после чего центрифугировали в течение 30 с при 1000 об. Аликвоту 1 см³ прозрачного супернатанта переносили в пробирку с завинчивающейся крышкой объёмом 15 см³ и добавляли 3 см³ метанола. Пробирку на короткое время подвергали завихрению, после чего полученный раствор анализировали на нормальной спектрофотометрии в

диапазоне длин волн 260 – 360 нм относительно дистиллированной воды, а затем производили анализ по третьей производной с использованием разницы в длине волны 6,3 нм.

Точность метода составляет 5,6 %, диапазон определяемых концентраций по методике составил от 0,04 до 4,0 мкг/мл.

Авторы работы [21] разработали методику количественного определения нистатина в воздухе рабочей зоны спектрофотометрическим методом в диапазоне массовых концентраций 0,5-20,0 мг/дм³. Погрешность данной методики при выполнении не превышает ±16 %. В основе метода определения, лежит способность растворов нистатина в смеси 1 н водного раствора ледяной уксусной кислоты с этиловым спиртом в соотношении (1:1) по объему поглощать УФ – излучение при длине волны 305 нм. В анализируемом объеме пробы, нижний предел измерения нистатина равен 5 мкг, при измерении массовой концентрации нистатина в воздухе рабочей зоны при отборе 10 дм³ воздуха составляет – 0,5 мг/м³.

Основные недостатки спектрофотометрических методов анализа:

- большое влияние сопутствующих веществ на аналитический сигнал;
- узкий спектр исследуемых объектов;
- небольшая чувствительность методик;
- по сравнению с хроматографическими методами спектрофотометрия требует значительных затрат образца и характеризуется низкой чувствительностью и селективностью.

1.5.2 Хроматографические методы

Все большее практическое значение находят хроматографические методы анализа для контроля качества лекарственных средств, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая обеспечивает высокую чувствительность, специфичность и экспрессность.

В работе [22] предложен метод ВЭЖХ для качественного и количественного анализа многокомпонентной лекарственной формы, содержащей нистатин, преднизолон метасульфобензоат натрия, тернидазол. Для анализа исследуемой лекарственной формы была выбрана обращенно – фазовая жидкостная хроматография. Анализ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Миличром А – 02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск) с колонкой (75 x 2 мм), заполненной обращенной фазой ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия) с ультрафиолетовым детектором. Использованный полимерный сорбент ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия) не проявляет ионообменных свойств по отношению к азотсодержащим лекарственным веществам (тернидазол, нистатин), что позволило получить симметричные хроматографические пики определяемых соединений.

Для анализа исследуемой смеси лекарств авторами работы [22] предложены следующие условия хроматографического определения: в качестве подвижной фазы использовали два элюента: элюент А – ацетонитрил; градиентное элюирование с линейным увеличением доли органического компонента от 5 до 100 % за 2500 мкл при расходе элюента 150 мкл/мин и температуре 35 °С. Элюент Б – перхлорат лития и хлорная кислота, вода [0,2 М LiClO₄ – 0,005 М HClO₄] – H₂O (5:95), (pH 2.8). При данных условиях, время удержания тернидазола составило 5,2 мин., преднизолон метасульфобензоата натрия 8,3 мин. и нистатина 10,3 мин (рисунок 6).

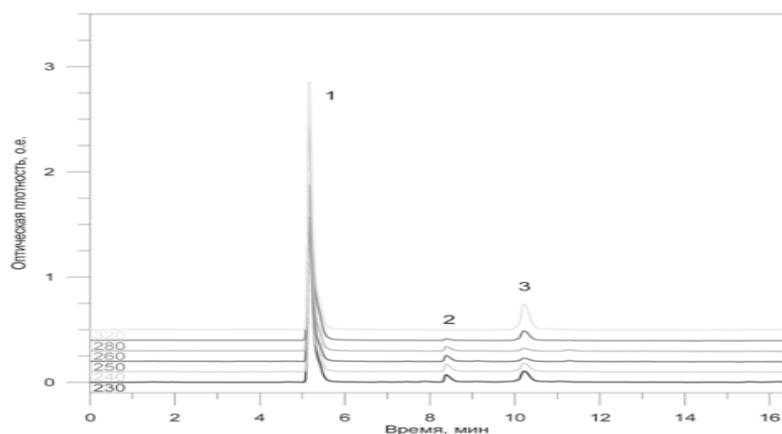


Рисунок 6 – ВЭЖХ хроматограмма раствора готовой лекарственной формы «Тержинан». Пики: 1 – тернидазол; 2 – преднизолон метасульфобензоат натрия; 3 – нистатин [22]

Относительная ошибка по разработанной методики для тернидазола составила 1,1 %, для преднизолон метасульфобензоат натрия – 1,9 %, для нистатина – 1,7 %.

Авторами работы [23] предложен метод ВЭЖХ для определения содержания нистатина в пероральных и вагинальных таблетках. В данном исследовании была оптимизирована и подтверждена новая методика высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа нистатина в таблетках для перорального и вагинального применения с использованием экспериментальной схемы Vox–Behnken.

Анализы проводились на приборе ВЭЖХ, состоящем из системы, управляемой компьютером, с программным обеспечением ChromGate, PDA – детектором К – 2800. Хроматографическое разделение проводили с помощью прибора Текнокрома (250 мм × 4,6 мм), на аналитической колонке С18. Хроматографическое разделение проводили при изократическом элюировании. В качестве подвижной фазы использовали метанол и 0,05 М буфер ацетат аммония в пропорции [70:30]. рН смеси доводили до 5,0 с помощью ледяной уксусной кислоты. Перед использованием подвижную фазу дегазировали путем обработки ультразвуком в условиях низкого вакуума.

Объем впрыскивания составлял 20 мкл при скорости тока жидкости 1,0 мл/мин. Для приготовления анализируемого раствора, взвешивали 10 таблеток. Рассчитывали средний вес и измельчали в мелкий порошок. Соответствующую часть этого мелкого порошка, эквивалентную 5 мг нистатина, взвешивали и переносили в мерную колбу на 25 см³. Затем его растворяли и доводили до 25 см³ с помощью подвижной фазы. Полученный раствор обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут, затем проводили фильтрование через мембранный фильтр 0,45 мкм. При данных условиях, время удержания нистатина составляло приблизительно 16 мин. (рисунок 7)

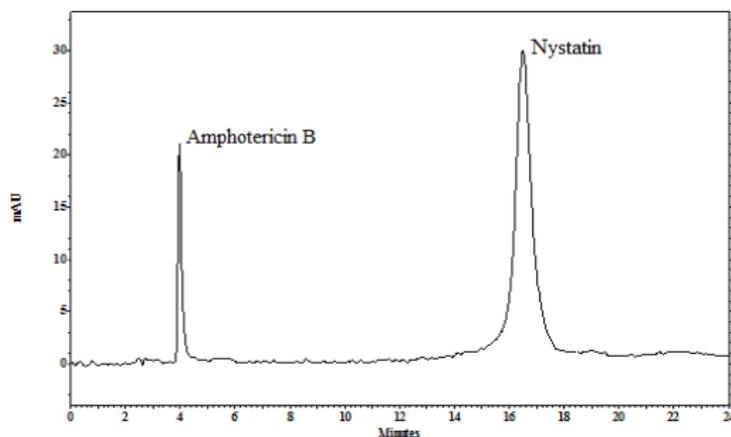


Рисунок 7 – ВЭЖХ хроматограмма раствора лекарственной формы:

Пики: 1 – амфотерицин В; 2 – нистатин [23]

Для построения калибровочного графика готовили стандартный раствор нистатина (600 мкг/см³) растворяя в подвижной фазе. Полученный раствор разбавляли подвижной фазой для получения рабочих стандартных растворов в концентрациях 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 и 500 мкг/см³. Во все рабочие стандартные растворы добавляли 25 мкг/см³ амфотерицина В, в качестве внутреннего стандарта и осторожно полученную смесь встряхивали.

Для исследования линейности метода использовали ведение пробы стандартного раствора с девятью концентрациями в широком диапазоне концентраций (5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/см³).

Коэффициенты корреляции ($R > 0,999$) показали существенную взаимосвязь между площадью пика и концентрацией нистатина. Метод линейный в диапазоне от 5 до 500 мкг/см³ с приемлемым коэффициентом корреляции ($R_2 = 0,9996$). Предел обнаружения метода и количественного определения составили 0,01 и 0,025 мкг/см³.

Авторами [24] была разработана простая, экспрессная, чувствительная изократическая методика определения нистатина в фармацевтических объектах, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ВЭЖХ – УФ детектированием. Сепарацию анализируемого объекта проводили на колонке Symmetry 300 TM C18 (размер частиц 5 мкм, 4,6 × 150 мм) с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетата аммония и метанола в соотношении (20:80). В ходе проведенного исследования были подобраны оптимальные условия определения нистатина в фармацевтических препаратах. В выбранных оптимальных условиях, предел обнаружения метода и количественного определения составили 0,01 и 0,03 мг/л. Метод линеен в диапазоне от 0,001 до 500 мг/л, коэффициент корреляции составил $R_2=0.9992$. Погрешность разработанной методики равна 5,0 %.

В работе [25] предложили метод определения нистатина в разных лекарственных формах (порошок местного применения, суспензия для перорального применения, таблетки, мазь, крем), методом жидкостной хроматографии. Разделение компонентов проводили на колонке с обращенной фазой Symmetry C18 (4,6 x 250 мм), в качестве подвижной фазы использовалась смесь (метанол, вода, диметилформамид в соотношении 55:30:15), с УФ детектированием при длине волны 305 нм. При данных условиях, время удержания нистатина составило 11,7 мин (основного пика) и 17,5 мин (изомера). Количественное определение нистатина в лекарственных формах основана на суммировании площадей пиков двух основных изомеров нистатина. Калибровочный график линеен в области от 0,05 до 0,2 мг/мл, коэффициент корреляции $> 0,999$.

Пробоподготовка лекарственного средства в виде порошка местного применения.

Перед отбором пробы емкость с исследуемым образцом встряхивают или перемешивают шпателем. После чего взвешивают порошок, количество которого приблизительно эквивалентно 13 750 единицам нистатина (137,5 мг, если заявка на этикетке составляет 100 000 единиц/г), после чего переносят в мерную колбу объемом 25,0 см³, добавляют 20 см³ подвижной фазы и помещают в ультразвуковую баню на 3–5 минут. Встряхивают в течении 10 мин и доводят полученный раствор до метки подвижной фазой, затем встряхивают вручную приблизительно 2 мин. Полученный раствор центрифугируют в течении 10 мин, и фильтруют через шприцевой фильтр PTFE или GHP (0,45 мм).

Пробоподготовка лекарственного средства в виде суспензии для перорального применения.

Перед отбором пробы емкость с исследуемым образцом встряхивают в течении 30 с и дают возможность постоять в течении 30 с. В мерную колбу объемом 200 см³ вносят 1 см³ исследуемого образца с помощью пипетки эквивалентного 100 000 единицам нистатина. Пипетку промывают 10 см³ подвижной фазы в мерную колбу. После добавления подвижной фазы доводят объем приблизительно до 190 см³, обрабатывают ультразвуком 5 мин и встряхивают в течение 10 мин, затем доводят до метки подвижной фазой.

Пробоподготовка лекарственного средства в виде таблеток.

На аналитических весах взвешивают 20 таблеток и определяют средний вес одной таблетки. После чего взвешивают одну таблетку (заявка на этикетке, 500 единиц нистатина/таблетку) и переносят в мерную колбу на 250 см³, добавляют 200 см³ подвижной фазы (метанол–вода–ДМФ в соотношении 75:5:20), и обрабатывают ультразвуком со встряхиванием в течение приблизительно 20 мин, пока таблетка не растворится. После чего встряхивают в течении 15 мин, и доводят объем до метки с помощью подвижной фазы, встряхивают 2 мин, затем оставляют стоять приблизительно

5 мин. Из полученного раствора отбирают аликвоту 7,0 см³ и доводят до 25,0 см³ подвижной фазой с помощью шприцевого фильтра.

Пробоподготовка лекарственного средства в виде крема.

В мерной колбе объемом 50 см³ взвешивают 274 мг анализируемого крема эквивалентного 27400 единицам нистатина. И добавляют 10 см³ ДМФ и 30 см³ метанола (предварительно нагретого на паровой бане).

Полученный раствор помещают в ультразвуковую баню на 10 мин, встряхивают в течении 15 мин и доводят до 48 см³, затем встряхивают вручную. Дают полученной смеси остыть до комнатной температуры, доводят водой до метки. Проводят фильтрование, как описано для местного порошка.

Пробоподготовка лекарственного средства в виде мази.

В центрифужной пробирке объемом 50 см³ взвешивают 274 мг мази, эквивалентное 27 400 единицам нистатина. После чего добавляют 10,0 см³ ДМФА и перемешивают на вихревом смесителе в течение 2 – 3 минут, пока мазь не станет прозрачной. После декантирования отбирают аликвоту 2 мл и разбавляют ее до 10 см³ смесью метанола с водой в соотношении (70:35). Полученный раствор фильтруют как описано для местного порошка.

Настоящий метод ЖХ обеспечивает быстрое и простое определение нистатина во множествах фармацевтических препаратах. Точность метода делает его подходящей альтернативой, микробиологическому анализу, как для для массовых и дозированных форм нистатина.

Авторами работы [26] был разработан метод изократической высокоэффективной жидкостной хроматографии, оптимизированный и подтвержденный для определения нистатина в слюне человека с различными видами детектирования: спектрометрическим и флуориметрическим. При проведении анализа использовалась хроматографическая система (система Брези) состоящая из насоса, нагревателя колонки, флуоресцентного детектора (λ_{ex} 290 нм, λ_{em} 410 нм) и фото детектора массива (PDA). Длина волны этого детектора была установлена на 305,6 нм. Сбор данных осуществлялся программой регистрации данных Empower Software. Для анализа

использовалась аналитическая колонка Luna™ C18 с обращенной фазой (размер частиц 250 × 4,6 мм, 10 мкм) которую выдерживали при 25 °С. Подвижная фаза состояла из смеси метанола, воды, ДМФ в соотношении (70:20:10). Элюирование проводили изократически при 25 °С со скоростью потока 0,8 мл/мин. Подвижную фазу фильтровали через 0,45 мкм фильтр Millipore™ Durapore и дегазировали под вакуумом перед использованием.

Приготовление стандартного раствора заключалось в смешивании соответствующего количества нистатина с 10 см³ слюны в полипропиленовой центрифужной пробирке. Приготовленный стандартный раствор хранили при 37 °С и защищали от света в течение 90 мин. Через 10 мин образец перемешивали в течение 1 мин. После этого образец центрифугировали (15 мин при 5000 об/мин), супернатант собирали и переносили в стеклянный контейнер и хранили при 0 °С (до тех пор, пока не были подготовлены стандарты калибровки). Осадок ресуспендировали в метаноле и затем анализировали спектрофотометрически, чтобы определить, сколько нистатина (Р) не растворилось в слюне. Количество растворимого нистатина (S) рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$(BN) - (P) = (S) \quad (1)$$

Калибровочные стандарты готовили разбавлением различных аликвот собранного супернатана лекарственной слюной до получения объема 600 л. Эти образцы перемешивали в течение 15 с и добавляли к раствору депротеинизирующий раствор MeOH–AcN (1:1.). Затем образцы перемешивали каждые 10 мин в течении 30 мин вихревым смесителем а затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об, после чего проводили фильтрацию через фильтр Durapore и переносили полученный раствор в пробирки с автоматическим пробоотборником и вводили (50 см³) в систему ВЭЖХ. Время элюирования нистатина при данных условиях составляло 5,8 ± 0,2 мин. Калибровочные кривые в слюне человека были линейными от 0,78 до 50 мкг/мл. Пределы количественного определения составляли 0,78 мкг/мл и 0,75 мкг/мл для УФ – и флуоресцентного детектирования.

Авторы [27] разработали метод жидкостной хроматографии для анализа жидкости для полоскания рта, содержащей гидрохлорид лидокаина, гидрокортизон и нистатин. Был разработан один метод жидкостной хроматографии с УФ – детектированием. Хроматографическое разделение проводили при использовании колонки Waters Symmetry C18 (150 мм × 4,6 мм; 5 мкм). Подвижная фаза А состояла из метанола и 0,1 М NaH₂PO₄ (60:40), рН которых предварительно довели до 4,5 разбавленной фосфорной кислотой. Подвижная фаза В состояла из метанола и 0,1 М NaH₂PO₄ (70:30) рН, которой также предварительно доводился до 4,5 разбавленной фосфорной кислотой. Обе подвижные фазы дегазировали, барботируя гелием в течение 2 мин. Колонку Waters Symmetry C18 LC выдерживали при комнатной температуре. Скорость потока составляла 1,0 см³/мин, а объем впрыска 10 см³. Спектрофотометрическое детектирование проводили при длине волны 230 нм. После встряхивания и взвешивания 2 г суспензии, соответствующей 1,6 мг гидрохлорида лидокаина, 0,8 мг гидрокортизона и 1,4 мг нистатина, сначала смешивали с 5 см³ метанола, а затем тем же растворителем доводили до 10 см³. При данных условиях, время удержания нистатина составляло приблизительно 10 мин (рисунок 8).

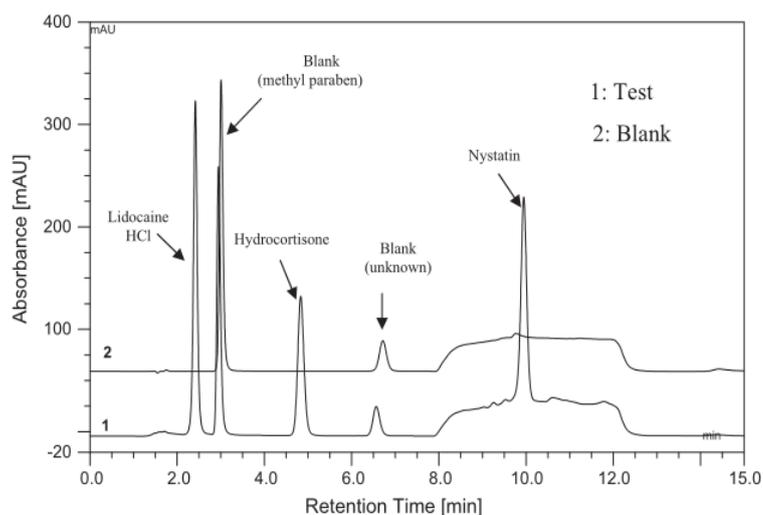


Рисунок 8 – ЖХ хроматограмма раствора лекарственной формы (подвижная фаза А: метанол – 0,1 М NaH₂PO₄ (60:40) рН 4,5, подвижная фаза В: метанол – 0,1 М NaH₂PO₄ (70:30), рН 4,5.

Авторы работы [28] для одновременного определения двух нестероидных противогрибковых препаратов, миконазола и нистатина применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и хемометрические методы. Для анализа использовали, двухлучевой спектрофотометр с ультрафиолетовым излучением Shimadzu (Киото, Япония), модель UV-1601 PC, оборудованный 1-см кварцевыми кюветами, подключенный к IBM-совместимому компьютеру. В комплекте было программное обеспечение для персональной спектроскопии UVPC версии 3.7 (Shimadzu). Метод жидкостной хроматографии выполняли на жидкостной хроматографической системе Knauer (НР) (Берлин, Германия), снабженной высокоточным линейным насосом А54103 100, детектором 2500 с переменным ультрафиолетовым излучением и управляющим клапаном А1357 с контуром проб 20 мл. Для сбора и обработки данных использовался прибор Eurochrom для Windows Basic Edition V3.05. Для разделения использовали колонку Р18 Phenomenex Luna (Германия) С18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм). Детектор устанавливали на 230 нм. Подвижную фазу готовили смешиванием метанола, ацетонитрила и 50 мМ ацетата аммония (рН доводили до 6 с использованием ледяной уксусной кислоты) в соотношении 60:30:10. Скорость потока составляла 1 мл/мин, объем инъекции 20 см³. Количественное определение основано на площади пика, которое было достигнуто с использованием УФ – детектирования при 230 нм. Все анализы проводились при комнатной температуре. Исходные стандартные растворы (1 мг/мл) каждого препарата готовили отдельно в метаноле для спектрофотометрических методов и для ВЭЖХ. Подходящие растворение проводили с использованием указанного растворителя. 15 стандартных синтетических растворов бинарной смеси были приготовлены путем дальнейшего разбавления исходных растворов метанолом в диапазоне 10–90 мг/мл миконазола и 1,8–18 мг/мл нистатина. Спектры УФ-поглощения регистрировались в диапазоне 280–320 нм. Точки данных спектров собирались каждые 0,2 нм.

Стандартные растворы готовили дальнейшим разбавлением исходных стандартных растворов подвижной фазой до достижения концентраций 4–20 мг/мл для миконазола и 10–100 мг/мл для нистатина. Трехжды вводили объем 20 см³ для каждой концентрации и хроматографировали в определенных условиях. Были построены значения площади пика в зависимости от соответствующих концентраций. Получены линейные зависимости. Применяемые хемометрические методы представляют собой многомерные методы, включающие классические наименьшие квадраты, регрессию главных компонентов и метод частичных наименьших квадратов. Спектры ультрафиолетового поглощения стандартных растворов комплексов для обучения и валидации в метаноле регистрировали в диапазоне 280–320 нм с интервалом 0,2 нм. Разработанные методы были подтверждены и успешно применены для одновременного определения миконазола и нистатина в их таблетках. Результаты анализа, полученные с использованием хемометрических методов, были статистически сопоставлены с результатами метода ВЭЖХ и наблюдалось хорошее согласие.

1.5.3 Капиллярный электрофорез

Метод капиллярного электрофореза более чувствителен и требует менее сложной пробоподготовки, позволяет исключить использование токсичных реагентов, не требует применения высокочистых дорогостоящих растворителей и позволяет сократить время анализа по сравнению с другими методами анализа.

В работе [29] авторы предлагают метод капиллярного электрофореза как альтернативу ВЭЖХ для фармацевтического анализа. Авторы разработали три отдельных метода, последующие эксперименты были выполнены на капиллярной электрофоретической системе Beckman Coulter с фотодиодным матричным детектором. Данная система была запущена с программным обеспечением Beckman Coulter 32 Karat v8.0. Сбор данных осуществлялся с

помощью системы Waters Empower. Для всех анализов был использован капилляр из плавленого кварца длиной 40 см до окна детектора и внутренним диаметром 75 мкм. Гидродинамический объем впрыска для 5 – фторцитозина составил 43 нл, что соответствует образцу введения при 0,4 фунтов на квадратный дюйм в течение 9 секунд. Гидродинамический объем впрыска для миконазола составил 115 нл, что соответствует введению образца при 0,8 фунтов на квадратный дюйм в течение 12 секунд. Гидродинамический объем впрыска для нистатина составил 14 нл, что соответствует введению образца при 0,3 фунтов на квадратный дюйм в течение 4,0 секунд. Для обнаружения всех трех соединений использовали фотодиодный матричный детектор при длине волны 214 нм. Напряжение, используемое для анализа, составляло 25 кВ, 20 кВ и 30 кВ для 5–фторцитозина, миконазола и нистатина соответственно. Температуру капилляра устанавливали равной 25° С. Для 5 – фторцитозина и нистатина был использован калий фосфатный буфер 10 мМ (KН₂РO₄), с рН 7,0. Для миконазола использовали 50 мМ KН₂РO₄. Время анализа данных составляло 4 минуты для 5–фторцитозина, 7 минут для миконазола и 3 минут для нистатина.

В целом для миконазола стандартное отклонение при 5 впрыскиваниях для всех концентраций, как оказалось в результате получилось меньше 2 %. Результаты исследования линейности показывают значения R² равным 0,996 (исследование 1) и значения R² равного 0,994 (исследование 2). Аналогичны результаты для 5–фторцитозина, при исследовании линейности, точность измерений составила менее 2,0 % с значением R² равного 0,998. Предел количественной оценки соотношения сигнала к шуму равного 11 с относительным стандартным отклонением 3,4 % был достигнут при концентрации 0,0025 мг/мл. Результат предела обнаружения с отношением сигнала к шуму равного 4 с относительным стандартным отклонением 26 % был найден при концентрации 0,005 мг/мл. Нистатин оказался более сложным и интересным по сравнению с миконазолом и 5–фторцитозином. Что касается

точности, то при каждом уровне концентрации относительное стандартное отклонение составило менее 2,0 %.

В работе [30] был предложен метод капиллярного зонального электрофореза для анализа фармацевтических препаратов, основными компонентами которых являются гидрокортизон–21–гемисукцинат, окситетрациклин и нистатин. Для анализа использована система капиллярного электрофореза Beckman P/ACE 5510 (Фуллerton, Калифорния, США), снабженная диодно–матричным детектором. Система контролировалась Dell DIMENSION™ P133V с программным обеспечением P/ACE. Разделение проводили с помощью кварцевого капилляра $L_{эфф}/L_{общ}=50/57$ см, $ID=75$ мкм. Разделение проводили при следующих условиях: 30 кВ и 25 °С в 10 мМ фосфатном буфере, доведенного до pH11 использовавшийся в качестве электролита. Электрофореграмма, полученная при разделении в выбранных условиях, представлена на рисунке 9.

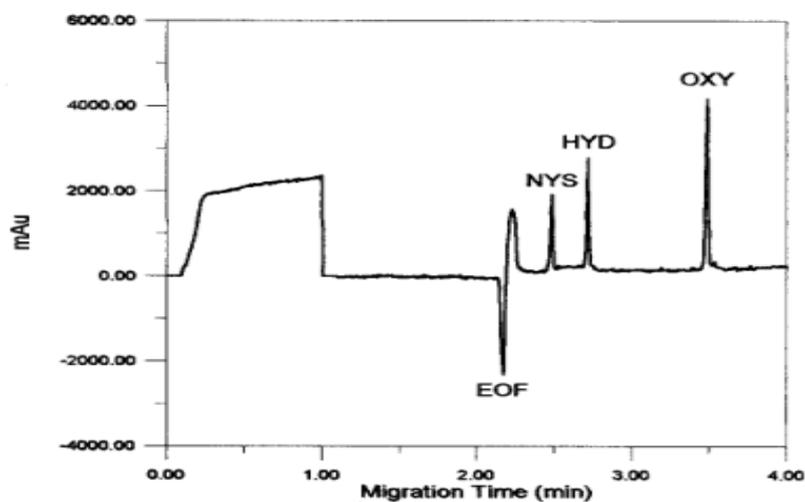


Рисунок 9 – Электрофорограмма образца, содержащего 16, 20 и 16 мг/л гидрокортизона – 21 – гемисукцината, окситетрациклина и нистатина, полученных в оптимизированных условиях при 231 нм (10 мМ фосфатный буфер с pH 11;0, 25 °С; 30 кВ).

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Оборудование и материалы

Оборудование

В данной работе экспериментальные исследования методом капиллярного электрофореза проводились с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель 105М» (группа компаний «Люмэкс», Россия) с автосемплером и жидкостной системой охлаждения капилляра, в комплекте с персональным компьютером. Прибор производит измерения в спектральном диапазоне длин волн от 190 до 400 нм с помощью фотометрического детектора, оснащенного дейтериевой лампой и монохроматором с дифракционной решеткой. Ввод пробы – гидродинамический, 30 мбар×с. В качестве капилляра использовали кварцевый капилляр с внутренним диаметром 75 мкм, полной и эффективной длиной капилляра 60 и 50 см, соответственно.

Капиллярный электрофорез «Капель 105М» предназначен для автоматизированного анализа проб пептидов, аминокислот, ионов, оптических изомеров широкого диапазона и прочих многочисленных (ионных) веществ, лекарственных препаратов, высокочистых материалов, пищевых, биологических объектов. Метод капиллярного электрофореза основан на разделении заряженных компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Устройство системы капиллярного электрофореза представлена на рисунке 10.

В кварцевый капилляр, вводится не большое количество анализируемого раствора (1нл), предварительно заполненного буферным раствором – электролитом. После, к концам капилляра подается напряжение до 30 кВ и по капилляру, компоненты смеси начинают движение, с разной скоростью. Скорость движения компонентов смеси по капилляру, в первую очередь

зависит от заряда и массы (точнее от величины ионного радиуса) и, за счёт чего в разное время достигают зоны детектирования.

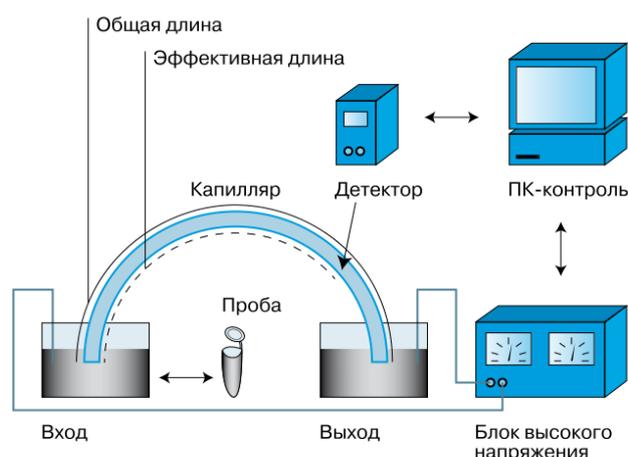


Рисунок 10 – Устройство системы капиллярного электрофореза [31]

Количественной характеристикой вещества является площадь или высота пика, пропорциональная концентрации вещества, а качественной – время миграции. Система капиллярного электрофореза работает в комплекте с персональным компьютером, операционная система, которого MS Windows XP/7.

Метод капиллярного электрофореза характеризуется высокой эффективностью и низкой чувствительностью. Несмотря на более низкую чувствительность, метод капиллярного электрофореза обладает рядом преимуществ по сравнению с ВЭЖХ:

- Микрообъем буферов и анализируемой пробы;
- Высокая эффективность разделения (обусловлена плоским профилем электроосмотического потока);
- Не требуется применение высокочистых дорогостоящих растворителей (ацетонитрил, метанол, гексан);
- Простая и не дорогая аппаратура;
- Отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок и сорбента (проблем с его старением);

- Отсутствие дорогостоящих прецизионных насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ;
- Экспрессность анализа.

Контроль pH растворов проводили с помощью лабораторного pH – метр / иономер ИТАН (Россия), способного оперативно определять активность ионов водорода pH. pH-метр/ иономер ИТАН характеризуется широким диапазоном измерения ЭДС (от – 3000 до + 3000 мВ)

Для взвешивания точной навески образца использовали лабораторные электронные аналитические весы общего назначения A&DHL-400 ООО «Госметр» (г. Санкт–Петербург, Россия), погрешность взвешивания которых составляет не более 0,0002 г.

Для получения дистиллированной воды использовали установку водоподготовки «АквадистиляторДЭ – 4».

Статистическая обработка результатов исследований (построение графиков и таблиц) выполнялась с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

Для центрифугирования проб перед анализом использовали центрифугу лабораторную фирмы MPW-55 (Польша).

В работе для приготовления растворов использовали мерную лабораторную стеклянную посуду: конические колбы наливные вместимостью 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 и 1000.0 см³; цилиндры мерные вместимостью 25.0 см³.

Добавки исследуемых объектов (нистатин) осуществляли с помощью пипеточного дозатора Ленпипет серии Лайтс объемом дозирования 10–100 мкл, 100–1000 мкл (производства компании АО «Термо Фишер Сайентифик», г. Санкт–Петербург, Россия), точностью отбора ± 0,09 мкл, ± 0,14 мкл и ± 0,3 мкл, ± 3 соответственно.

Пробоподготовку и анализ вещества проводили в пробирках микроцентрифужных типа «Эппендорф», с делениями 1,5 мл (производства «МиниМед», г. Брянск).

Перед помещением в прибор для капиллярного электрофореза все буферные и промывочные растворы центрифугировались в течение 10 минут при 12000 мин^{-1} .

Для подготовки и восстановления поверхности капилляров проводили последовательную промывку:

- 5 минут дистиллированной водой;
- 5 минут раствором 1 моль/дм^3 гидроксида натрия;
- 5 минут дистиллированной водой;
- 5 минут 1 моль/дм^3 раствором соляной кислоты
- 5 минут дистиллированной водой;

2.2 Реактивы

- этиловый спирт (Лабтех, Россия);

- уксусная кислота (ООО «Химспециализация», г. Москва);

- стандарт титр для рН – метрии:

фосфатный буферный раствор (эквимольная смесь дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия) с рН 6,86 (Уралхиминвест, г. Уфа);

- соляная кислота (Уралхиминвест, г. Уфа);

- гидроксид натрия (Вектон, г. Санкт–Петербург);

- натрий фосфорнокислый однозамещённый (Химмед, г. Москва);

- натрий фосфорнокислый двузамещённый (Химмед, г. Москва);

2.3 Объекты исследования

В качестве стандартного вещества использовался нистатин (содержание чистого вещества $\geq 98\%$ производства Acrosorganics)

В данной работе, в качестве объектов исследования использовались:

1. Вино столовое полусладкое белое «Мускатное». Изготовитель: ООО «Торговый Дом Виктория», (Россия, г. Майкоп), произведено по ГОСТУ

32030–2013. Вино произведено из белых мускатных сортов винограда. Объёмная доля этилового спирта: 10–12%.

2. Вино столовое «Красное полусладкое». Изготовитель: ЗАО «Славпром», (Россия, г. Славянск–на–Кубани). Состав: виноматериал столовый сухой красный, суло виноградное концентрированное, консервант сорбат калия, антиокислитель диоксид серы. Объёмная доля этилового спирта: 9,0 – 11,0 %, массовая концентрация сахара: 30 – 40 г/дм³.

3. Вино столовое полусладкое красное «АПСНЫ». Изготовитель: ООО «Вина и Вода Абхазии», (Республика Абхазия, г. Сухум). Содержит пищевую добавку: консервант диоксид серы. Объёмная доля этилового спирта 11,0 %.

4. Вино сухое белое «Galandino». Изготовитель: «Шенк Италия», Ора, Италия. Содержит пищевую добавку: консервант диоксид серы. Объёмная доля этилового спирта 11,5 %.

2.4 Приготовление фоновых и исследуемых растворов

Приготовление растворов для подготовки и восстановления поверхности капилляров

Для приготовления раствора соляной кислоты концентрации 1 моль/дм³. Мерную колбу вместимостью 100 см³ заполняли дистиллированной водой примерно на две трети объема, переносили 8,3 см³ соляной кислоты, перемешивали и доводили до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора гидроксида натрия молярной концентрации 1 моль/дм³, брали навеску гидроксида натрия массой 4 г, переносили в коническую колбу вместимостью 150 см³ и доводили до метки дистиллированной водой после чего тщательно перемешивали.

Приготовление буферных растворов

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 6.86, использовали стандарт – титр. Перед применением извлекали ампулу из упаковки, снимали с нее надпись, промывали наружную поверхность ампулы

дистиллированной водой. После чего в мерную колбу обыкновенную вместимостью 1000 см³ вставляли воронку диаметром 9–10 см. В торце ампулы пробивали отверстие с помощью стеклянного бойка. Перевернув ампулу, также пробивали отверстие и через него промывали ампулу изнутри водой до полного удаления вещества с поверхностей, промывные воды сливали в колбу. Колбу заполняли водой примерно на две трети объема, взбалтывали до полного растворения содержимого и доводили дистиллированной водой до метки.

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 9, концентрацией 0,25 мг/мл, брали приготовленный стандартный раствор фосфатного буферного раствора с рН 6.86, объемом 50 см³, переносили в мерную колбу объемом 100 см³ и доводили до метки дистиллированной водой. рН полученного раствора изменяли 0,1 М гидроксидом натрия.

Для приготовления фосфатного буферного раствора с рН 5, концентрацией 0,25 мг/мл, брали приготовленный стандартный раствор фосфатного буферного раствора с рН 6.86, объемом 50 см³, переносили в мерную колбу объемом 100 см³ и доводили до метки дистиллированной водой. рН полученного раствора изменяли 0,1 М раствором соляной кислоты.

Для приготовления раствора фосфорнокислого натрия двузамещенного молярной концентрации 0,188 моль/дм³. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещали (6,73 ± 0,01) г 12 – водного фосфорнокислого двузамещенного натрия, добавляли 50 – 60 см³ дистиллированной воды, перемешивали до полного растворения, затем доводили объём до метки дистиллированной водой.

Для приготовления раствора фосфорнокислого натрия однозамещенного молярной концентрации 0,1 моль/дм³. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещали (1,56 ± 0,01) г 2 – водного фосфорнокислого однозамещенного натрия, добавляли 50 – 60 см³ дистиллированной воды, перемешивали до полного растворения, затем доводили объём до метки дистиллированной водой.

Для приготовления фосфатного буферного раствора молярной концентрации $0,01 \text{ моль/дм}^3$. В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносили 5 см^3 раствора фосфорнокислого натрия двузамещенного молярной концентрации $0,188 \text{ моль/дм}^3$ и $0,5 \text{ см}^3$ раствора фосфорнокислого однозамещенного натрия молярной концентрации $0,1 \text{ моль/дм}^3$.

Приготовление растворов смеси растворителей 1 и ледяной уксусной кислоты и этанола в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4

Для приготовления 1 и водного раствора ледяной уксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 100 см^3 , приливали 70 см^3 дистиллированной воды, добавляли $5,8 \text{ см}^3$ концентрированной ледяной уксусной кислоты, перемешивали. После чего доводили объем до метки дистиллированной водой и перемешивали раствор.

Для приготовления смеси 1 и ледяной уксусной кислоты и этанола в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4. В мерную колбу вместимостью 50 см^3 , приливали смесь 25 см^3 , $16,7 \text{ см}^3$; $12,5 \text{ см}^3$; 10 см^3 1 и водного раствора ледяной уксусной кислоты и доводили до метки спиртом этиловым. После чего смесь тщательно перемешивали и оставляли на 10 – 15 минут. Затем снова доводили спиртом этиловым и перемешивали содержимое колбы.

Приготовление стандартных растворов нистатина

Для приготовления стандартного раствора нистатина молярной концентрацией $0,2 \text{ мг/мл}$, брали навеску нистатина массой $0,01 \text{ г}$, переносили в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводили до метки растворителем, после чего тщательно перемешивали. Более низкие концентрации получали последовательным разбавлением стандартного раствора ведущим электролитом. Растворы нистатина готовились непосредственно перед работой.

Глава 5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

5.1.1 Введение

Целевым результатом проведенной исследовательской работы стала разработка методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.

Среди современных проблем охраны здоровья населения России, проблема правильного питания человека, защита его здоровья путем предотвращения в организм некачественных пищевых продуктов, занимает особое место. Вино на протяжении многих веков является неотъемлемой частью питания человека.

Контроль качества продуктов пищевой промышленности должен осуществляться согласно нормативной документации, в которой отражены требования к контролю качества и безопасности.

В течение последних десятилетий резко возросло использование различных консервантов в пищевой промышленности, в том числе антибиотиков. С одной стороны, применение консервантов является необходимостью для продления сроков годности продукции путем защиты от микробной порчи и/или роста патогенных микроорганизмов, а с другой стороны применение антибиотиков в винодельческой продукции на территории Российской Федерации в настоящее время запрещено, согласно Техническому Регламенту Таможенного Союза 029/2012 «Требования по безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств».

Пристального внимания в данном вопросе заслуживает полиеновый противогрибковый антибиотик – нистатин. Его введение в виноматериал является эффективным способом предотвращения виноградных вин от забраживания, также нистатин используется в сельском хозяйстве при обработке почвы, зараженной плесневыми грибами, при этом микроколичества препарата могут попадать в ягоды винограда, а затем и в конечный продукт – вино.

Известны факты обнаружения внесения антибиотика на винодельческом рынке Канады, Германии.

Необходимость определения данного антибиотика в винодельческой продукции обоснована тем, что его накопление в организме человека может быть опасным из-за привыкания и резистентности. В связи с этим разработка новых методов обнаружения и количественного определения фунгицидного антибиотика нистатина в вине является актуальной задачей для решения проблем контроля качества и безопасности винодельческой продукции

5.1.2 Потенциальные потребители результатов исследования

Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование.

Целевым рынком для внедрения разработанной методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза, является такая область, как контроль качества винных изделий.

Исходя из этого, можно выделить одну основную группу потребителей лаборатории методов контроля качества винной продукции.

5.1.3 Анализ конкурентных технических решений

Детальный анализ конкурирующих разработок, существующих на рынке, необходимо проводить систематически, поскольку рынки пребывают в постоянном движении.

К предприятиям-конкурентам в области строительной отрасли можно отнести «ГКУ «Испытательный центр» (Уфа) и «Лаборатория арбитражных анализов вина и контроля качества винодельческой продукции» (Москва).

В таблице 4 приведена оценочная карта, включающая конкурентные технические разработки в области обогащения полезных ископаемых.

Таблица 4 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических 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. Длительность измерения	0,1	5	4	3	0,5	0,4	0,3
2. Удобство измерения	0,18	5	3	3	0,9	0,54	0,54
3. Точность	0,05	5	4	3	0,3	0,2	0,15
4. Простота измерения	0,1	5	3	3	0,5	0,3	0,3
5. Определение более широкого диапазона концентраций	0,05	5	4	5	0,3	0,2	0,25
6. Отсутствие опасных реагентов	0,1	5	5	5	0,5	0,5	0,5
Итого	0,58	30	23	22	3	2,140	2,04

Б_ф – продукт проведенной исследовательской работы;

Б_{к1} – «ГКУ «Испытательный центр»;

Б_{к2} - «Лаборатория арбитражных анализов вина и контроля качества винодельческой продукции».

5.1.4 SWOT – анализ

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

Он проводится в несколько этапов.

Первый этап заключается в описании сильных и слабых сторон проекта, в выявлении возможностей и угроз для реализации проекта, которые проявились или могут появиться в его внешней среде. Дадим трактовку каждому из этих понятий.

Рекомендуется результаты первого этапа SWOT-анализа представлять в табличной форме (таблица 5).

Таблица 5 – Матрица SWOT

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>С1. Заявленная экономичность и энергоэффективность технологии</p> <p>С2. Экологичность технологии</p> <p>С3. Более низкая стоимость производства по сравнению с другими технологиями</p> <p>С4. Наличие бюджетного финансирования</p> <p>С5. Квалифицированный персонал</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>Сл1. Отсутствие достаточного финансирования проектов</p> <p>Сл2. Недостаток литературных данных по данному проекту</p> <p>Сл3. Большой срок поставок материалов и комплектующих, используемых при проведении научного исследования</p>
<p>Возможности:</p> <p>В1.Использование инновационной инфраструктуры ТПУ</p> <p>В2.Появление дополнительного спроса на новый продукт</p> <p>В3. Снижение таможенных пошлин на материалы, используемые при научных исследованиях</p> <p>В4. Повышение стоимости конкурентных разработок</p>	<p>СиВ:</p> <p>С1. Разработка новой методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза с целью использования ее в лаборатории качества винодельной продукции.</p> <p>С2. Появление экспресс-анализа для проведения данных исследований.</p>	<p>СлиВ:</p> <p>Для проведения экспериментов по данной теме требуется дорогостоящее оборудование. Процесс длительный и трудоемкий.</p> <p>Поиск инвесторов для финансирования научной работы.</p>

Продолжение таблицы 5

<p>Угрозы: У1. Несвоевременное финансовое обеспечение научного исследования со стороны государства У2. Отсутствие спроса на новые технологии производства У3. Введение дополнительных требований к стандартизации методики У4. Рост цен на электроэнергию.</p>	<p>СВиУ: 1. Создание конкурентных преимуществ данной методики 2. Привлечение заинтересованных сторон в финансировании новых разработок</p>	<p>СЛиУ: 1. Приобретения необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца 2. Сокращение поставок или смена поставщика 3. Продвижение программы с целью создания спроса 4. Сертификация и стандартизация продукта</p>
---	---	--

5.1.5 Оценка готовности проекта к коммерциализации

На какой бы стадии календарного цикла не находилась, научная разработка, уместным будет оценить степень ее готовности к коммерциализации и выяснить уровень собственных знаний для проведения (завершения) разработки. Для этого необходимо заполнить специальную форму, содержащую показатели степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта.

Перечень вопросов приведен в таблице 6.

Таблица 6 – Оценка степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1	Определен имеющийся научно-технический задел	4	4
2	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	5	5
3	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	4	5

Продолжение таблицы 6

4	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	3	4
5	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	5	5
6	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	4
7	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	3	3
8	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	5	4
9	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	4
10	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	3	4
11	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	1	3
12	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	2	4
13	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	3	5
14	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	3	5
15	Проработан механизм реализации научного проекта	2	4
	ИТОГО	50	63

При проведении анализа по таблице 6 каждый показатель оценивается по пятибалльной шкале. При этом системы измерения по каждому направлению (степень проработанности научного проекта, уровень имеющихся знаний у разработчика) различаются.

При оценке степени проработанности научного проекта:

- 1 балл означает непроработанность проекта;
- 2 балла – слабую проработанность;

- 3 бала – выполнено, но есть сомнения в качестве;
- 4 балла – выполнено качественно;
- 5 баллов – имеется положительное заключение независимого эксперта.

Для оценки уровня имеющихся знаний у разработчика система баллов принимает следующий вид:

- 1 – не знаком или слабо знаком;
- 2 – в объёме теоретических знаний;
- 3 – владею теорией и практическими примерами применения;
- 4 – владею теорией и самостоятельно выполняю;
- 5 – владею теорией, выполняю и могу консультировать.

Оценка готовности научного проекта к коммерциализации (или имеющихся знаний у разработчика) определяется по формуле (3):

$$B_{\text{сум}} = \sum B_i \quad (3)$$

где $B_{\text{сум}}$ – суммарное количество баллов по каждому направлению;

B_i – балл по i -му показателю.

Значение $B_{\text{сум}}$ позволяет говорить о мере готовности научной разработки и ее разработчика к коммерциализации. Так, значение $B_{\text{сум}}$ получилось от 50 до 63, что значит перспективность выше средней, или же разработка действительно перспективна.

Объемы инвестирования в текущую разработку низки. Улучшение инвестирования позволило бы провести более качественные и глубокие исследования.

5.1.6 Метод коммерциализации результатов научно-технического исследования

Существуют различные методы коммерциализации научных разработок. На данной стадии представленной научной разработки успешном

продвижению способствует торговля патентными лицензиями, с помощью которой будет достигнута передача третьим лицам интеллектуальной собственности на лицензионной основе. Не исключена и организация совместного предприятия типа «университет – производство», когда идеи первого воплощаются ресурсами второго.

При коммерциализации научно-технических разработок продавец (т.е. владелец соответствующих объектов интеллектуальной собственности) преследует вполне определенную цель, которая определяется тем, куда в последующем он намерен направить полученный коммерческий эффект. Возможных путей немало:

- получение средств для продолжения научных исследований и разработок (получение финансирования, оборудования, уникальных материалов, других научно-технических разработок и пр.);
- одноразовое получение финансовых ресурсов для каких-либо целей (в качестве гранта);
- обеспечение постоянного притока финансовых средств.

Допускаются и различные сочетания перечисленных возможностей. При этом время продвижения товара на рынок во многом зависит от правильности выбора метода коммерциализации. Для данной работы был выбран инжиниринг, как средство продвижения результатов исследований. Инжиниринг предполагает предоставление на основе договора одной стороной (консультантом) другой стороне (заказчику) комплекса или отдельных видов инженерно-технических услуг, связанных с проектированием, вводом в эксплуатацию, производством продукции.

5.2 Инициация проекта

Группа процессов инициации состоит из процессов, которые выполняются для определения нового проекта или новой фазы существующего. В рамках процессов инициации определяются изначальные

цели и содержание и фиксируются изначальные финансовые ресурсы. Определяются внутренние и внешние заинтересованные стороны проекта, которые будут взаимодействовать, и влиять на общий результат научного проекта. Данная информация закрепляется в Уставе проекта.

Устав проекта документирует бизнес - потребности, текущее понимание потребностей заказчика проекта, а также новый продукт, услугу или результат, который планируется создать.

Устав научного проекта магистерской работы:

5.2.1 Цели и результат проекта

Информация о заинтересованных сторонах проекта представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Кафедра ФАХ	Разработка методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза. Экспресс-анализ определения нистатина данной методикой. Научные открытия в области определения нистатина. Написание научных статей.

В таблице 8 представлена информация об иерархии целей проекта и критериях достижения целей.

Таблица 8 – Цели и результат проекта

Цели проекта:	Разработка методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.
Ожидаемые результаты проекта:	Обосновать возможность использования данной методики в лабораториях контроля качества
Критерии приемки результата проекта:	Надежность, повторяемость, точность измерений

Продолжение таблицы 8

Требования к результату проекта:	Требование:			
	Воспроизводимость	методики,	экономическое	и
	экологическое значение			
Упрощённая система определения нистатина в вине.				

5.2.2 Организационная структура проекта

Организационная структура проекта представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Рабочая группа проекта

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудо- затраты, час.
1	Короткова Е.И	руководитель проекта	Отвечает за реализацию проекта, координирует деятельность участников проекта.	838
2	Креницына З.В.	эксперт	Консультирует по вопросам финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения	64
3	Немцова О.А.	эксперт	Консультирует по вопросам безопасности жизнедеятельности	64
4	Рыманова И.Е	эксперт	Консультирует по части английского языка	18
5	Гофманова Я.С.	исполнитель	Выполняет отдельные работы по проекту	2634
ИТОГО:				3618

5.2.3 Ограничения и допущения проекта

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а также «границы проекта» – параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованных в рамках данного проекта.

Таблица 10 – Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
4.1. Бюджет проекта	872185,6 рублей
4.1.1. Источник финансирования	«Р-Фарм»
4.2. Сроки проекта:	01.10. 2015 г. – 31.05. 2017 г.
4.2.1 Дата утверждения плана управления проектом	01.06.2017 г.

5.3 Планирование управления научно-техническим проектом

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

5.3.1 Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализации укрупненной структуры работ.

На рисунке 31 представлен шаблон иерархической структуры работ по проекту.

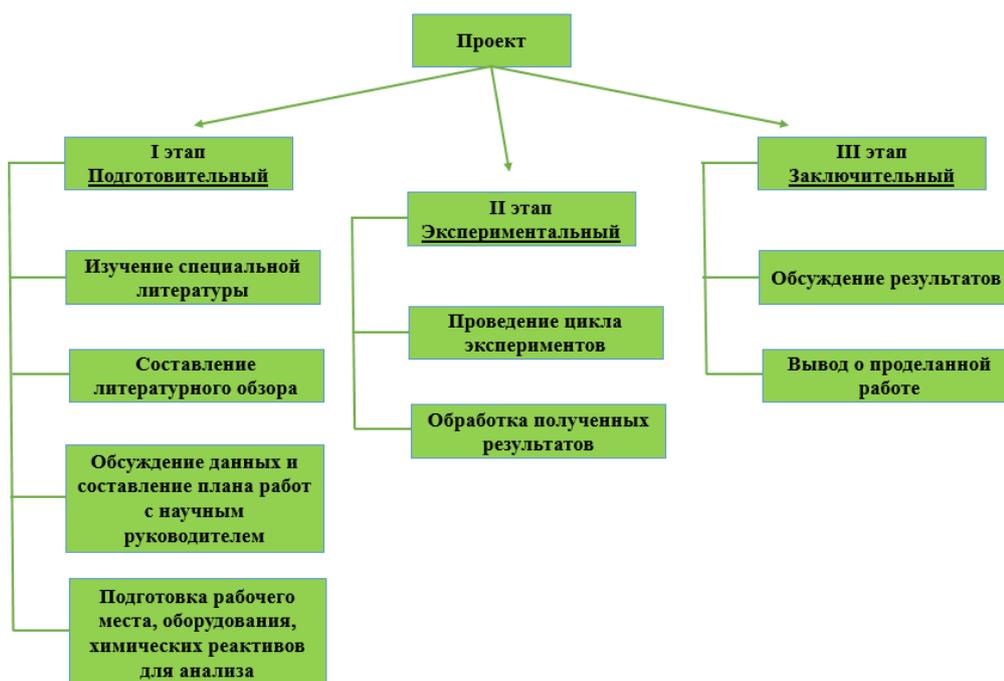


Рисунок 31 – Иерархическая структура работ проекта

5.3.2 Контрольные события проекта

Контрольные события проекта представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Литературный обзор по теме проекта	Сентябрь – октябрь, 2015 г.	Литературный обзор в ВКР
2	Постановка цели и задач	Октябрь, 2015 г.	Раздел цели и задачи в ВКР
3	Разработка плана экспериментальных работ	Ноябрь, 2015 г.	План работ
4	Подбор растворителя для нистатина. Изучение стабильности нистатина в данном растворителе.	Декабрь 2015 – Апрель 2016 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
5	Подбор оптимальных условий определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза.	Май – Октябрь 2016 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР

Продолжение таблицы 11

6	Валидационная оценка методики анализа.	Ноябрь 2016 – Январь 2017 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
7	Применение данной методики на объекте исследования.	Январь – Февраль 2017 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
8	Обсуждение результатов Доработка экспериментальной части ВКР	Март, 2017 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР
9	Оформление ВКР	Апрель – июнь 2017 г.	Результаты экспериментов, представленных в ВКР

5.3.3 План проекта

В рамках планирования научного проекта построен календарный и линейный график проекта.

Линейный график представляется в виде таблицы (таблица 12).

Таблица 12 – Календарный план проекта

Код работы (из ИСР)	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственных исполнителей)
1	Составление технического задания	13	01.09.15	15.09.15	Короткова Е.И., Гофманова Я.С.
2	Изучение литературы	87	16.09.15	27.12.15	Короткова Е.И., Гофманова Я.С.
3	Выбор направления исследования	18	12.01.16	31.01.16	Короткова Е.И., Гофманова Я.С.
4	Теоретические и экспериментальные исследования	229	02.02.16	29.01.17	Короткова Е.И., Гофманова Я.С.
5	Обобщение и оценка результатов	21	01.02.17	26.02.17	Короткова Е.И., Гофманова Я.С.

Продолжение таблицы 12

6	Разработка технической документации и проектирование	51	29.02.17	29.04.17	Короткова Е.И., Гофманова Я.С.
7	Оформление комплекта документации	20	04.05.17	27.05.17	Гофманова Я.С.
Итого:		439			

Диаграмма Ганта – это тип столбчатых диаграмм (гистограмм), который используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. График приведен в таблице 13.

5.3.4 Бюджет научного исследования

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

5.3.4.1 Расчет материальных затрат научно-технического исследования

Данная статья включает стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта:

- приобретаемые со стороны сырье и материалы, необходимые для создания научно-технической продукции;
- покупные материалы, используемые в процессе создания научно-технической продукции для обеспечения нормального технологического процесса.

Все затраты на оборудование, реактивы, лабораторную посуду и средства защиты приведены в таблицах 14 – 18.

Стоимость оборудования, используемого при выполнении конкретного научного проекта и имеющегося в данной научно-технической организации, учитывается в виде амортизационных отчислений. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, имеющегося в организации, но используемого для выполнения конкретной темы.

Таблица 14 – Материальные затраты на оборудование

Наименование	Количество, шт	Стоимость с НДС, руб/шт	Сумма, руб.	Срок эксплуатации, лет	Амортизация, руб (за 15 месяцев)
Капиллярный электрофорез «Капель 105М»	1	1443800	1443800	10	180465
Центрифуга лабораторная MPW-55	1	17650	17650	10	2206
Весы аналитические	1	44600	44600	10	5580
pH-мер	1	38000	38000	10	4750
193001 рублей					

Таблица 15 – Материальные затраты на реактивы

Наименование	Масса, кг	Стоимость с НДС, руб/кг	Сумма, руб
Уксусная кислота	0,3	300	90
Соляная кислота	1	256	256
Нистатин	0,02	2730	54,6
Этиловый спирт	1	200	200
Фосфатный буферный раствор	0,5	3250	1625
Гидроксид натрия	0,1	250	25
Итого:			2250,6

Таблица 16 – Материальные затраты на лабораторную посуду

Наименование	Количество, шт	Стоимость с НДС, руб/шт	Сумма, руб
Эпидорф	2000	1	2000
Колба коническая	1	484	484
Мерный цилиндр, 100 мл	1	250	250
Пипетка	1	70	70
Стакан мерный, 250 мл	2	50	100
Дозатор пипеточный	1	2500	2500

Продолжение таблицы 16

Фильтровальная бумага	1	170	170
Итого:			5574

Таблица 17 – Материальные затраты на средства защиты

Наименование	Количество, шт	Стоимость с НДС, руб/шт	Сумма, руб
Халат	2	1000	2000
Перчатки	2	100	200
Итого:			2200

Таблица 18 – Общие материальные затраты на научно-технические исследования

Вид затрат	Сумма, руб
Материальные затраты на реактивы	2250,6
Материальные затраты на лабораторную посуду	5574
Материальные затраты на средства защиты	2200
Материальные затраты на оборудование	193001
Итого:	203025,6

5.3.4.2 Основная заработная плата

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

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

$$C_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп} \dots \dots \dots (4)$$

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

$Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата.

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

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_{раб} \quad (5)$$

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

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

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d} \quad (6)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

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

Расчет заработной платы научно-производственного и прочего персонала проекта проводили с учетом работы 3-х человек – научного руководителя, консультанта и исполнителя. На выполнение НИР понадобилось 251 рабочих дней. Баланс рабочего времени исполнителей представлен в таблице 19.

Таблица 19 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Ассистент	Инженер (дипломник)
Календарное число дней	365	365	365
Количество нерабочих дней	66	66	66
-выходные дни	52	52	52
-праздничные дни	14	14	14

Продолжение таблицы 19

Потери рабочего времени	48	48	48
- отпуск	48	48	48
- невыходы по болезни	-	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	251	251

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_b \cdot (k_{пр} + k_d) \cdot k_p \quad (7)$$

где Z_b – базовый оклад, руб.;

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

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

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

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

$$Z_m = Z_b \cdot k_p \quad (8)$$

где Z_b – базовый оклад, руб.;

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

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

Согласно информации сайта Томского политехнического университета должностной оклад (ППС) доцента кандидата наук в 2016 году без учета РК составил 26300 руб., консультанта – 20800 руб., исполнителя – 14100 руб. Расчёт основной заработной платы приведён в таблице 20.

Таблица 20 – Расчёт основной заработной платы

Исполнители	З _б , руб.	$k_{пр}$	$k_{д}$	$k_{р}$	З _м , руб.	З _{дн} , руб.	Т _р , раб. дн.	З _{осн} , руб.
Руководитель	26300	-	-	1,3	34190	1140	140	159600
Ассистент (инженер)	20800	-	-	1,3	27040	901	30	27030
Инженер дипломник	14100	-	-	1,3	18330	611	439	268229

5.3.4.3 Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

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

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

$$Z_{доп} = k_{доп} \cdot Z_{осн} \quad (9)$$

где $Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата, руб.;

$k_{доп}$ – коэффициент дополнительной зарплаты;

$Z_{осн}$ – основная заработная плата, руб.

В таблице 21 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 21 – Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Ассистент (инженер)	Инженер (дипломник)
Основная зарплата	159600	27030	268229
Дополнительная зарплата	23940	4055	40234
Итого по статье $C_{зп}$	183540	31085	308463

5.3.4.4 Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) \quad (10)$$

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

Отчисления на социальные нужды составляет 27 % от суммы заработной платы всех сотрудников.

5.3.4.5 Накладные расходы

В эту статью включаются затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему. Кроме того, сюда относятся расходы по содержанию, эксплуатации и ремонту оборудования, производственного инструмента и инвентаря, зданий, сооружений и др. В расчетах эти расходы принимаются в размере 70 – 90 % от суммы основной заработной платы научно-производственного персонала данной научно-технической организации.

Накладные расходы составляют 80 – 100 % от суммы основной и дополнительной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы.

Расчет накладных расходов ведется по следующей формуле:

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) \quad (11)$$

где $k_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов.

Электроэнергия на оборудование:

Капиллярный электрофорез = $6 \cdot 401 \cdot 0,2 \cdot 5,8 = 2791$ руб.

Центрифуга лабораторная = $6 \cdot 20 \cdot 0,09 \cdot 5,8 = 63$ руб.

Муфельная печь = $6 \cdot 20 \cdot 2,8 \cdot 5,8 = 1949$ руб.

Аналитические весы = $6 \cdot 10 \cdot 0,1 \cdot 5,8 = 35$ руб.

На основании полученных данных по отдельным статьям затрат составляется калькуляция плановой себестоимости НИР. В проекте не предусмотрены затраты, связанные с выплатой дополнительной заработной платы научно – производственного и прочего персонала проекта, научными и производственными командировками, оплатой работ, выполняемых другими организациями и предприятиями. Смета затрат приведена в таблице 22.

Таблица 22 – Смета затрат на выполнение НИР

Статьи затрат	Затраты, руб.
Сырье и материалы	10024,6
Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	193001
Фонд заработной платы	523088
Отчисления на социальные нужды	141234
Накладные расходы	4838
Итого	872185,6

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

5.3.4.6 Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта формируется матрица ответственности (таблица 23).

Таблица 23 - Матрица ответственности

Этапы проекта	Короткова Е.И., руководитель проекта	Креницына З.В., эксперт	Немцова О.А., эксперт	Рыманова И. Е., эксперт	Гофманова Я.С., исполнитель
Составление технического задания	О				
Изучение литературы					И, О
Выбор направления исследования	О, И				И, О
Теоретические и экспериментальные исследования	О, И				И, О
Обобщение и оценка результатов	О, И				И, О
Разработка технической документации и проектирование	О				И, О
Оформление комплекта документации	О, С	О, С	О, С	О, С	И, О

Степень участия в проекте может характеризоваться следующим образом:

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

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

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

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

5.3.4.7 План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. План управления коммуникациями приведен в таблице 24.

Таблица 24 – План управления коммуникациями

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Статус проекта	Руководитель проекта	Представителю заказчика	Ежеквартально
2.	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель проекта	Участникам проекта	Еженедельно
3.	Документы и информация по проекту	Ответственное лицо по направлению	Руководителю проекта	Не позже сроков графиков и к. точек
4.	О выполнении контрольной точки	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже дня контрольного события по плану управления

5.3.4.8 Реестр рисков проекта

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

Возможные риски проекта приведены в таблице 25.

Таблица 25 – Реестр рисков

№	Риск	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска	Условия наступления
1	Технический	3	5	высокий	Повышение требований, проработка технологии	Неисправность оборудования
2	Организационный	5	5	высокий	Финансирование проекта, расстановка приоритетов	Нехватка ресурсов
3	Управление проектом	1	4	низкий	Долгосрочное планирование	Некомпетентное управление

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

Эффективность научного ресурсосберегающего проекта включает в себя социальную эффективность, экономическую и бюджетную эффективность. Показатели общественной эффективности учитывают социально-экономические последствия осуществления инвестиционного проекта как для общества в целом, в том числе непосредственные результаты и затраты проекта, так и затраты, и результаты в смежных секторах экономики, экологические, социальные и иные внеэкономические эффекты.

Показатели экономической эффективности проекта учитывают финансовые последствия его осуществления для предприятия, реализующего данный проект. В этом случае показатели эффективности проекта в целом характеризуют с экономической точки зрения технические, технологические и организационные проектные решения.

Бюджетная эффективность характеризуется участием государства в проекте с точки зрения расходов и доходов бюджетов всех уровней.

Кроме выше перечисленных видов эффективности можно выделить ресурсный эффект (характеризуется показателями, отражающими влияние инновации на объем производства и потребления того или иного вида ресурса), научно-технический (оценивается показателями новизны и полезности) и др.

5.4.1 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 (таблица 26). 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:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}} \quad (12)$$

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

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

Φ_{\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:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p \quad (13)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов;

a_i – весовой коэффициент i-го параметра;

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

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности рекомендуется проводить в форме таблицы, пример которой приведен ниже.

Таблица 26 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Разработанный метод	Метод аналог 1
Определение нистатина в вине	0,20	5	3
Способствует росту производительности труда пользователя	0,15	4	5
Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,1	4	4
Энергосбережение	0,15	4	3
Итого	1,00	4,6	3,4

$$I_p = 0,2 \cdot 5 + 0,15 \cdot 4 + 0,1 \cdot 4 + 0,15 \cdot 4 = 2,6$$

$$I_{p-1} = 0,2 \cdot 3 + 0,15 \cdot 5 + 0,1 \cdot 4 + 0,15 \cdot 3 = 2,2.$$

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 определение оксидов кальция и железа более эффективно, так как меньше материалоемкость, больше выход продукта и ускоренный процесс.

Список публикаций

1 Гофманова Я.С. разработка методики определения нистатина в вине методом капиллярного электрофореза // XVIII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулева «Химия и химическая технология в XXI веке», 1 секция, Россия, Томск, 29 мая -1 июня 2017 г.