

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

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

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы
Определение глутатиона на золотоуглеродсодержащих электродах методом вольтамперометрии

УДК 577.12.5:543.55

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДЗВ	Пашковская Эльвира Александровна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф. ФАХ ИПР	Дорожко Е. В.	к.х.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф. менедж- мента	Рыжакина Т.Г.	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Асс. каф. ЭБЖ	Раденков Т. А.			

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

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

Томск – 2017 г.

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

Институт природных ресурсов
Направление подготовки «Химическая технология»
Уровень образования бакалавриат
Кафедра физической и аналитической химии
Период выполнения весенний семестр 2016/2017 учебного года

Форма представления работы:

Бакалаврская работа

КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
--	--

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
	<i>Литературный обзор</i>	
	<i>Методики эксперимента</i>	
	<i>Обсуждение результатов</i>	

Составил преподаватель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф. ФАХ	Дорожко Е.В.	к.х.н.		

СОГЛАСОВАНО:

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

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

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

УТВЕРЖДАЮ:

Зав. кафедрой

_____ Пестряков А.Н.

(Подпись)

(Дата)

(Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Бакалаврской работы

Студенту:

Группа	ФИО
2ДЗВ	Пашковской Эльвире Александровне

Тема работы:

Определение глутатиона на золотоуглеродсодержащих электродах методом вольтамперометрии
--

Утверждена приказом директора (дата, номер)	
---	--

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
--	--

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	Объект исследования – глутатион; Определить глутатион в модельных растворах методом вольтамперометрии;
Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	Подбор рабочих условий определения глутатиона в модельных растворах
Перечень графического материала	Графический материал полученных результатов

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы

Раздел	Консультант
«Социальная ответственность»	Раденков Т. А.
«Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Рыжакина Т. Г.

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

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Дорожко Е. В.	к.х.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДЗВ	Пашковская Э. А.		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО		
2ДЗВ	Пашковской Эльвире Александровне		
Институт	ИПР	Кафедра	ФАХ
Уровень образования	Бакалавриат	Направление/специальность	«Химическая технология синтетических биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и косметических средств»

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения.	<p><i>Объект исследования</i> – глутатион; <i>Рабочая зона</i> – научно-исследовательская лаборатория 2 корпуса ТПУ; <i>Область применения</i> – фармацевтическая промышленность.</p>
---	---

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. Производственная безопасность</p> <p>1.1. Анализ выявленных вредных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – физико-химическая природа вредности, её связь с разрабатываемой темой; – действие фактора на организм человека; – приведение допустимых норм с необходимой размерностью (со ссылкой на соответствующий нормативно-технический документ); – предлагаемые средства защиты (сначала коллективной защиты, затем – индивидуальные защитные средства). <p>1.2. Анализ выявленных опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – механические опасности (источники, средства защиты); – термические опасности (источники, средства защиты); – электробезопасность (в т.ч. статическое электричество, молниезащита – источники, средства защиты); 	<p>1.1 Выявление вредных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> – в ходе работы к вредным факторам воздействия можно отнести: токсичные вещества, используемые при выполнении работы (серная кислота, спирт этиловый); – для устранения влияния вредных факторов необходимо использовать средства защиты: для коллективной защиты - работа под вытяжным шкафом; для индивидуальной защиты - индивидуальные средства защиты (халат, респиратор, одноразовые перчатки); – освещение, уровень шума и вибрации, микроклиматические условия должны соответствовать требованиям СанПиН 2.2.4.548 – 96; <p>1.2 Выявление опасных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> – для обеспечения электробезопасности токоведущие части оборудования необходимо использовать в соответствии с требованиями СанПиН 2971-84; – молниезащита производственных зданий и сооружений обеспечивается заземлением электрооборудования; – для обеспечения пожаро- и взрывобезопасности необходимо соблюдать требования по условиям эксплуатации обо-
--	--

пожаровзрывобезопасность (причины, профилактические мероприятия, первичные средства пожаротушения).	рудования, работающего под давлением, а так же условия хранения и работы с легко воспламеняющимися жидкостями;
2. Экологическая безопасность: <ul style="list-style-type: none"> – защита селитебной зоны – анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); – анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); – анализ воздействия объекта на литосферу (отходы); – разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды. 	<ul style="list-style-type: none"> – влияние вредных веществ, которые используются во время эксперимента, на окружающую среду (серная кислота); – загрязнение сточных вод в результате удаления отходов в канализационную сеть; – разработаны решения по обеспечению экологической безопасности: – СанПиН 2.1.6.1032-01; – ГН 2.1.6.1338 – 03; – ГН 2.2.5.2309 – 07; – ГН 2.1.5.1315-03.
3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях: <ul style="list-style-type: none"> – перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; – выбор наиболее типичной ЧС; – разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; – разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий. 	<ul style="list-style-type: none"> – при разработке и эксплуатации проектируемого решения возможны ЧС: пожар, взрыв и т. д.; – для ликвидации последствий пожара необходимо: <ol style="list-style-type: none"> 1. вызвать пожарную службу; 2. использовать огнетушитель, песок, асбестовое одеяло; 3. отключить электричество; 4. организовать эвакуацию рабочих;
4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<ul style="list-style-type: none"> – виды компенсаций за вредные и (или) опасные условия труда: сокращение продолжительности рабочего времени, ежегодные дополнительные отпуска, оплата труда в повышенном размере, молоко за вредность и др. лечебно-профилактическое питание, досрочное назначение трудовой пенсии; – эргономичное проектирование рабочего места.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Асс. каф. ЭБЖ	Раденков Т. А.			

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДЗВ	Пашковская Э. А.		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОС-
БЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО		
2ДЗВ	Пашковской Эльвире Александровне		
Институт	ИПР	Кафедра	ФАХ
Уровень образования	Бакалавриат	Направление/специальность	«Химическая технология синтетических биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и косметических средств»
Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:			
1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих		Работа с информацией, представленной в российских и иностранных научных публикациях, аналитических материалах, статических бюллетенях и изданиях, нормативно-правовых документах	
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов			
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования			
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:			
1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения		Проведение предпроектного анализа. Определение целевого рынка и проведение его сегментирования. Выполнение SWOT-анализа проекта	
2. Определение возможных альтернатив проведения научных исследований		Определение целей и ожиданий, требований проекта. Определение заинтересованных сторон и их ожиданий	
3. Планирование и формирование бюджета научных исследований		Разработка графика проведения научного исследования. Определение бюджета научно – технического исследования (НТИ)	
4. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования		Проведение оценки экономической эффективности исследования глутатиона в модельных растворах	
Перечень графического материала:			
1. Оценка конкурентоспособности технических решений			
2. Матрица SWOT			
3. График проведения и бюджет НИ			
4. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИ			
5. Сравнительная эффективность разработки			
Дата выдачи задания для раздела по линейному графику			

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент каф. менеджмента	Рыжакина Т.Г.	к.э.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д3В	Пашковская Э. А.		

Реферат

Выпускная квалификационная работа с. 65, рис. 11, табл. 21, источников 33.

Ключевые слова: глутатион, модификация электродов, углеродсодержащие композитные электроды, тозилатные соли арилдиазония, вольтамперометрия.

Объектом исследования являются глутатион в окисленной и восстановленной формах.

Цель работы: определение глутатиона на модифицированных углеродсодержащих композитных электродах (УКЭ) методом вольтамперометрии.

В научно – исследовательской работе был определен глутатион в модельных растворах с использованием вольтамперометрии.

В результате исследования были подобраны рабочие условия определения восстановленного глутатиона в модельных растворах. Проведено определение восстановленного глутатиона в модельных растворах.

Результаты НИР могут быть использованы фармацевтическими компаниями, медицинскими учреждениями и лабораториями разных профилей.

В будущем планируется продолжить модификацию полученного электрода с целью получить ферментативный биосенсор для селективного определения глутатиона в биообъектах.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВКР – выпускная квалификационная работа

НИР – научно исследовательская работа

ЧС – чрезвычайные ситуации

УКЭ - углеродсодержащий композитный электрод

ХСЭ – хлоридсеребряный электрод

ЗУКЭ - золотоуглеродсодержащий композитный электрод

ВАГ – вольтамперограмма

ЦВА – циклическая вольтамперограмма

ТСА – тозилатные соли арилдиазония

СИЗ – средства индивидуальной защиты

Оглавление

Введение	12
Глава 1. Литературный обзор.....	13
1.1. Структура и свойства глутатиона	13
1.2. Методы определения глутатиона.....	14
1.3. Вольтамперометрический метод анализа	17
Глава 2. Экспериментальная часть.....	18
2.1 Аппаратура, ячейки, электроды.....	18
2.2 Реактивы.....	20
2.3. Объекты исследования	20
2.4 Исследование электрохимических свойств глутатиона в модельном растворе на углеродсодержащем композитном электроде (УКЭ), модифицированном золотом.....	21
2.5. Объяснение поведения глутатиона на ЗУКЭ. Предположительный механизм электрохимических реакций, протекающих в модельном растворе.....	25
2.5. Исследование электрохимических свойств глутатиона в модельном растворе на ЗУКЭ, модифицированном тозилатной солью арилдиазония..	28
2.7. Сравнение результатов, полученных на модифицированных УКЭ	31
Глава 3. Обобщение результатов. Рекомендации для определения глутатиона в модельном растворе.....	32
Глава 4. Социальная ответственность	33
4.1 Описание оборудования, используемого для исследования объекта.....	33
4.2 Производственная безопасность	33
4.3 Экологическая безопасность.....	39
4.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	40
4.5 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	41

Глава 5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	42
5.1 Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	42
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	42
5.1.2 Анализ конкурентных технических решений.....	43
5.1.3 SWOT-анализ.....	43
5.2 Планирование научно-исследовательских работ	46
5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования	46
5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ	47
5.2.3 Разработка графика проведения научного исследования.....	50
5.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ).....	54
5.3 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования..	59
Выводы	62
Список литературы	63

Введение

Данная научно – исследовательская работа (НИР) посвящена проблеме определения глутатиона в модельных растворах.

Глутатион играет важную роль в клетках живых организмов, находясь в них в двух формах: окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH). Оптимальное соотношение двух этих форм позволяет клеткам сохранять свою жизнеспособность, а нарушение необходимого баланса приводит к различным сбоям в работе организма. Так, поскольку синтез глутатиона происходит в печени, по изменению уровня этого вещества в крови можно сделать вывод о здоровом или нездоровом функционировании этого органа.

Важнейшая способность восстановленного глутатиона – антиоксидантная – помогает нейтрализовать излишнее количество свободных радикалов кислорода, образующихся в ходе непрерывных биохимических реакций в организме. Таким образом GSH предотвращает т.н. «оксидативный стресс», зачастую сопровождающий такие заболевания, как сахарный диабет, гипертония, атеросклероз, злокачественные новообразования, а так же являющийся одной из причин болезни Альцгеймера.

Целью данной работы было определение глутатиона в модельном растворе методом вольтамперометрии.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. подобрать альтернативу существующей методике определения глутатиона в модельном растворе на ртутно-пленочном электроде в связи с токсичностью данного материала электрода;
2. подобрать условия для модификации углеродсодержащих композитных электродов (УКЭ) золотом для определения глутатиона;
3. оценить значение дальнейшей модификации золотоуглеродсодержащего композитного электрода (ЗУКЭ) тозилатными солями арилдиазония для определения глутатиона;
4. сформулировать рекомендации для количественного определения глутатиона в модельных растворах на модифицированных электродах.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Структура и свойства глутатиона

Глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин) – это трипептид, состоящий из аминокислот L-глутамата, L-цистеина и глицина. Он синтезируется в эукариотических клетках, является одним из основных внутриклеточных тиолсодержащих соединений и присутствует в организме в двух формах: окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH).

Глутатион относится к фармакологической группе пептидов, его молекулярная форма имеет вид $C_{10}H_{17}N_3O_6S$, а название по номенклатуре ИЮПАК - (2S)-2-амино-4-1R-1-карбоксиметил карбамоил-2-сульфанилэтил карбамоил бутановая кислота. Глутатион легко растворим в воде, нерастворим в метаноле и диэтиловом эфире. Его молярная масса составляет 307,32 г/моль, температура плавления равна 195 °C (383 °F или 468 K) [1].

Структурные формулы веществ изображены на рисунке 1:

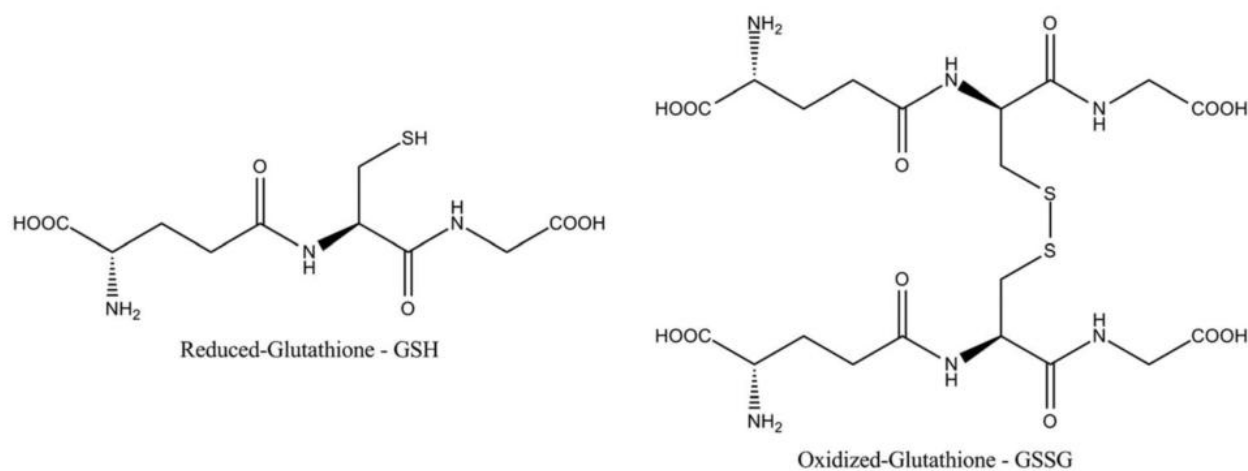


Рисунок 1 – структурные формулы глутатиона в окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH) формах.

Оптимальный баланс восстановленного и окисленного глутатиона в клетке выражается соотношением 100/1 (т.е. количество GSSG не должно превышать 1% от общего внутриклеточного содержания глутатиона) [3]. Примерно 85–90% GSH находится в цитозоле, но некоторая его часть после

синтеза в цитозоле оказывается в митохондриях, ядре, пероксисомах, эндоплазматическом ретикулуме [4].

Недостаток GSH нарушает баланс GSH/GSSG и подвергает клетку риску окислительного стресса: восстановленный глутатион участвует в ферментативной антиоксидантной защите, являясь т.н. скэвенджером или «ловушкой» свободных радикалов кислорода [5], [6]. Т.е. допуская снижение уровня GSH в организме, можно подвергнуть этот организм гибели вследствие разрушения молекул липидов, белков, нуклеиновых кислот, углеводов в его клетках.

Дисбаланс GSH наблюдается при различных патологиях, в т. ч. нейродегенеративных расстройствах, болезни Альцгеймера, кистозном фиброзе, ВИЧ-инфекциях, диабете, онкологических заболеваниях и старении [7].

Как антиоксидант GSH играет последнюю роль в поддержании клеточного редокс – статуса, в частности - редокс – зависимого сигналинга клетки, т.к. его внутриклеточная концентрация довольно высока: около 1–10 мМ (для клеток печени и клеток злокачественных новообразований она составляет 10 мМ) [6]. Он участвует в работе системы детоксикации в качестве ко-субстрата, превращая перекиси в органические спирты (катализатором в данном случае служат глутатионпероксидаза GPx и глутатионтрансфераза GST):

$$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPx/GST}} \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} \quad (1).$$

Кроме того GSH восстанавливает окисленную форму глутаредоксина (Grx), которая, в свою очередь, образуется как продукт восстановления дисульфидов [8], и участвует в регуляции процессов восстановления поврежденных молекул ДНК [9].

1.2. Методы определения глутатиона

В зависимости от природы объекта, содержание глутатиона в котором необходимо установить, различают несколько методов определения этого соединения: спектральные, хроматографические и электрохимические методы.

Для определения глутатиона в окисленной и восстановленной формах в плазме крови, цельной крови и гепатоците крыс разработан метод ВЭЖХ [10]. Суть метода заключается в детектировании соединения, образующегося при реакции GSH и GSSG с ортофталальдегидом (OPA) при pH=8 и pH=12 соответственно, способного флуоресцировать. Для определения наномольных количеств описана процедура основанная на формировании производных S-карбокситиольных свободных тиолов иодуксусной кислоты с последующим превращением свободных аминогрупп в производные 2,4-динитрофенила путем реакции с 1-фтор-2,4-динитробензолом [11].

Спектрофотометрические методы определения глутатиона позволяют определить концентрацию восстановленного (GSH) глутатиона как разность между концентрациями tGSH (общего глутатитона) и GSSG [12].

Как видно, упомянутые выше методы предполагают не прямое определение глутатиона в биообъектах: либо необходимо предварительно получить комплексное соединение, которое реально детектировать, либо определение GSH носит косвенный характер, и предварительно необходимо определить содержание нецелевых веществ в модельном растворе. Длительная пробоподготовка нецелесообразна вследствие неустойчивости глутатиона, способного переходить из окисленной формы в восстановленную, в то время как необходимо селективно детектировать и ту и другую. Так или иначе разработка метода, позволившего бы напрямую определять содержание конкретной формы глутатиона носит заманчивой характер и является целью данного исследования.

Обратимся к опыту исследователей, занимающихся электрохимическим определением интересующего нас вещества.

В статье индийских ученых, опубликованной в 2015 году в 56 номере журнала *Electrochemistry Communications*, описывается методика вольтамперометрического определения глутатиона на золотых электродах с площадью золота равной 0.0232см^2 (электродом сравнения выступал хлоридсеребряный

электрод, вспомогательным электродом – электрод, покрытой платиновой фольгой). Этот метод количественного определения GSH основан на стехиометрической конверсии GSSG на границе раздела и определяет суммарное количество (GSH + GSSG). Авторы статьи предлагают комбинировать этот метод с другими установленными методами для определения соотношения GSH / GSSG в жидкостях организма [13].

Другая статья, написанная Ричардом Комптоном, Патрицией Ли и Луи Гонкалвесом в 2015 году, описывает эксперимент по определению глутатиона методом вольтамперометрии с помощью электрода, состоящего из углеродных нанотрубок (электрод сравнения – квазисеребряный, вспомогательный - углеродный электрод). Метод так же предполагает определять различные проценты свободного и полного GSH в растворах, содержащих как восстановленный, так и окисленный глутатион [14].

Ранее, в 2010 году, была опубликована статья «Исследование электрохимических свойств глутатиона методом вольтамперометрии», в которой был предложен метод косвенного определения глутатиона в окисленной и восстановленной формах на ртутнопленочном электроде методом вольтамперометрии [15]. Однако хотелось бы получить альтернативную методику, т.к. предпочтительнее в исследованиях применять нетоксичные материалы, в т.ч. и для электродов.

Можно считать, что использование как золота, так и углерода в качестве материала рабочего электрода оптимально. Однако, согласно статье китайских ученых «Unusual oxidation of glutathione existing the steric hindrance» (2016) тиоловые группы глутатиона активно садятся на поверхность электрода, содержащего золото, таким образом уменьшая площадь рабочей поверхности электрода с каждой новой добавкой глутатиона в анализируемый раствор [16]. Кроме того, методики, представленные в описанных выше статьях, не позволяют определять отдельно каждую из форм глутатиона. Необходима дальнейшая модификация электрода с целью сделать его более селективным,

способным определять и GSH, и GSSG. Таким золотосодержащий электрод способен сделать фермент, который катализирует реакцию только восстановленного или только окисленного глутатиона.

В данной работе описывается начальный этап разработки ферментативного биосенсора. Необходимо исследовать поведение глутатиона на углеродсодержащем электроде с золотом и агентом - сшивателем для прикрепления фермента к этому электроду.

1.3. Вольтамперометрический метод анализа

Основа электрохимических методов исследования - процессы, протекающих на поверхности электрода или в межэлектродном пространстве. При анализе изучается аналитический сигнал, возникающий в результате электрохимической реакции, при которой через границу раздела электропроводящих фаз происходит перенос электронов или ионов [17].

Метод вольтамперометрии основан на изучении зависимости силы тока (I), протекающего через электрохимическую ячейку, от приложенного к ячейке напряжения (E) – т.н. полярограммы или вольтамперограммы. Под действием прилагаемого напряжения происходит поляризация - смещение потенциала электрода от равновесного значения [18].

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1 Аппаратура, ячейки, электроды

Исследование электрохимических свойств глутатиона проводилось на компьютеризованном вольтамперометрическом анализаторе TA-Lab («Томь-аналит» г. Томск).

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

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

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

Перемешивание растворов осуществляли при помощи стабилизированной вибрации индикаторного электрода.

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

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

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

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

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

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

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

2.2 Реактивы

В данной работе использовались следующие реактивы:

- L - глутатион восстановленный (Fluka, Германия);
- L - глутатион окисленный (Fluka, Германия);
- Стандарт-титры для приготовления стандартных буферных растворов:
 - гидрофталат калия $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (pH=4,01);
 - эквимольная смесь дигидрофосфата калия KH_2PO_4 и гидрофосфата натрия Na_2PO_4 (pH=6,86);
 - тетраборат натрия 1-водный $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (pH=9,18);
- раствор золотозлористоводородной кислоты HAuCl_4 (C = 1000 мг/дм³);
- раствор сульфата натрия Na_2SO_3 (C = 0,04 М);
- раствор серной кислоты H_2SO_4 (C = 0.5М);
- раствор тозилатной соли арилдиазония (C = 60 мг/л). Синтез тозилатной соли арилдиазония был осуществлен на каф. БИОХМ ТПУ научно-исследовательской группой под руководством к.х.н. Трусовой М.Е.

2.3. Объекты исследования

В ходе работы был проведен анализ растворов L - глутатиона окисленного и L – глутатиона восстановленного с целью поиска аналитического сигнала.

2.4 Исследование электрохимических свойств глутатиона в модельном растворе на углеродсодержащем композитном электроде (УКЭ), модифицированном золотом

Первым этапом было проведено сравнение электрохимической активности УКЭ и УКЭ, модифицированного золотом (ЗУКЭ) при разных условиях. Для модификации УКЭ был использован раствор HAuCl_4 ($C = 1000 \text{ мг/дм}^3$), нанесение производилось путем электролиза, время электролиза варьировалось для получения оптимального времени.

Для сравнения электрохимической активности электродов было проведено запись катодных вольтамперограмм (ВАГ) с использованием каждого из них в

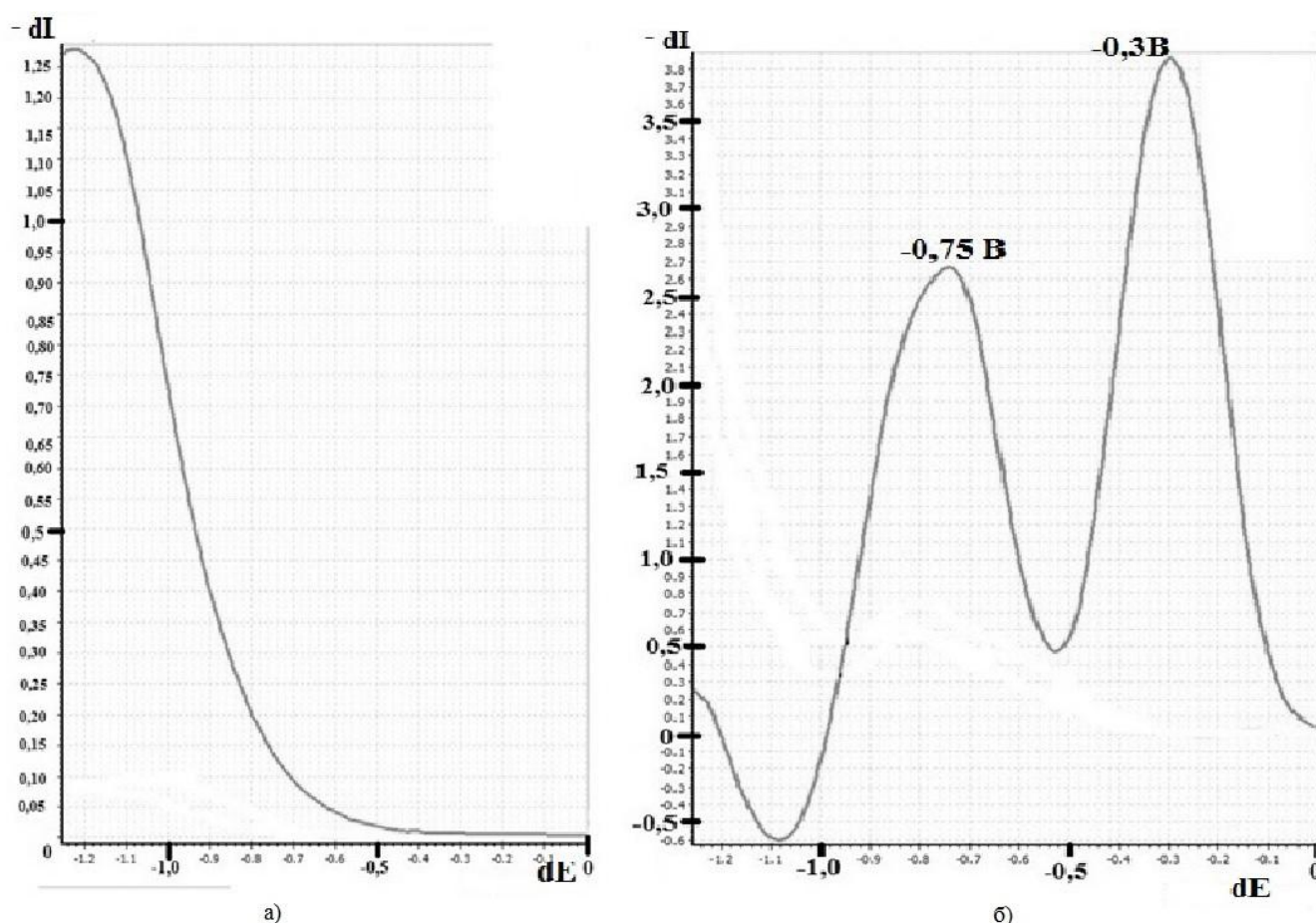


Рисунок 2 - Катодная ВАГ боратного буферного раствора $\text{pH}=9,18$ на УКЭ без модификации (а) и ЗУКЭ (б).

боратном буферном растворе с $\text{pH} = 9,18$ ($E = -1,25 \div 0\text{В}$, скорость изменения

потенциала $V = 80$ мВ/с, режим записи вольтамперной развертки дифференциальный).

Для УКЭ ВАГ отображает пик кислорода при потенциале $-1,2$ В (рисунок 2а). Для ЗУКЭ, модификация которого производилась в течение 60с ($E = -0.1 \div +0.2$ В), ВАГ отображает два пика кислорода: при $-0,75$ В и $-0,3$ В, - что говорит о его большей электрохимической активности в сравнении с УКЭ без модификации (рисунок 2б). Кроме того, полученные на ЗУКЭ пики превышают пик кислорода на УКЭ по высоте в два раза, что также говорит более высокой чувствительности модифицированного электрода.

После выбора наиболее оптимальных условий модификации УКЭ золотом (время электролиза равно 60с), была проведена последующая циклизация в

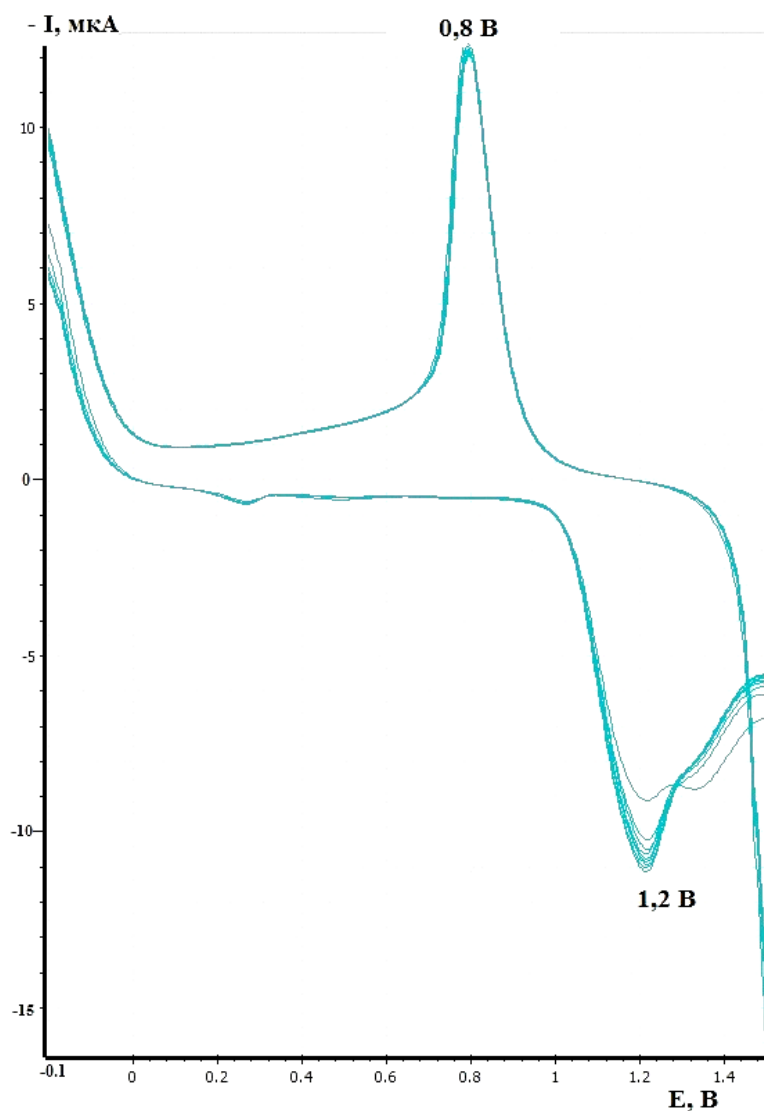


Рисунок 3 – ЦВА H_2SO_4 0,05 М на ЗУКЭ.

растворе 0.5M H₂SO₄ при E = - 1.5 ÷ +1.5 В методом вольтамперометрии до получения воспроизводимых циклических ВАГ (рисунок 3).

Далее для определения оптимальных условий детектирования глутатиона было проведена запись циклических вольтамперограмм (ЦВА) в боратном буферном растворе с подавлением кислорода путем барботирования раствора азотом. При осуществлении добавок глутатиона восстановленного к модельному раствору новых пиков на ВАГ не наблюдалось, происходило лишь незначительное изменение высоты пика золота в катодной и анодной областях ЦВА. Т. о. даже в случае появления новых пиков на ВАГ при добавлении восстановленного глутатиона в модельный раствор разделить их от пиков золота не представляется возможным (рисунок 4).

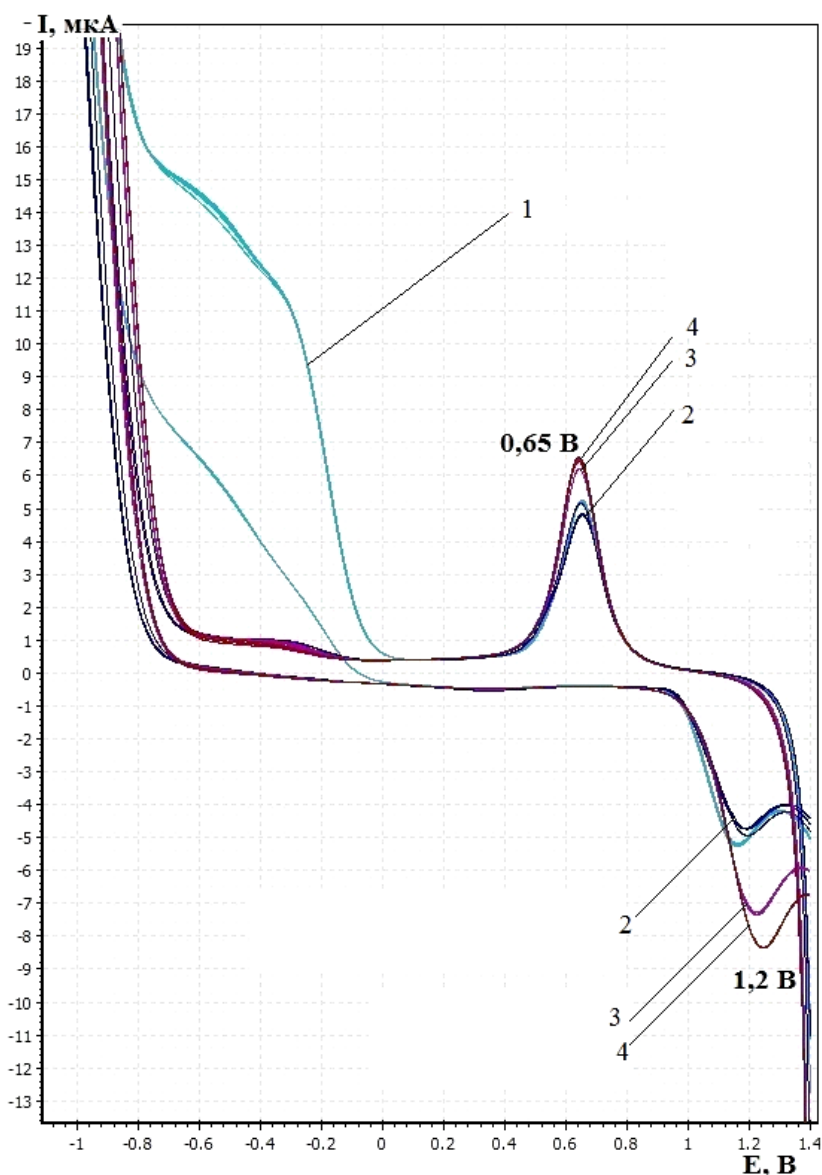


Рисунок 4 - ЦВА боратного буферного раствора pH=9,18 на ЗУКЭ:

1-фоновый электролит без добавок ; 2 – фоновый электролит без добавок, барботированный азотом ; 3 – C(GSH)= 3,03*10⁻⁵ M ; 4 - C(GSH)= 6,05*10⁻⁵ M .

Было принято решение изучать отдельно катодную и анодную области ВАГ, чтобы исключить отвод продуктов, происходящий в результате снятия цикличе-

ских ВАГ. Кроме того удаление кислорода проводилось раствором сульфита натрия Na_2SO_3 ($C = 0,04 \text{ M}$) [20].

При повторении опыта с добавками глутатиона восстановленного к модельному раствору с $\text{pH} = 9,18$ в анодной области появление пиков не наблюдалось, однако при повторении опыта в тех же условиях для катодной области были получены результаты: пик, появившийся на ВАГ при $E = -0,65 \text{ В}$, увеличивался с увеличением концентрации восстановленного глутатиона в ячейке (рисунок 5). Зависимость высоты пика от концентрации является линейной в диапазоне концентраций от $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ до $3,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Уравнение зависимости имеет вид: $y = 0,0554x + 0,1454$, коэффициент корреляции: $R^2 = 0,942$ (рисунок 6).

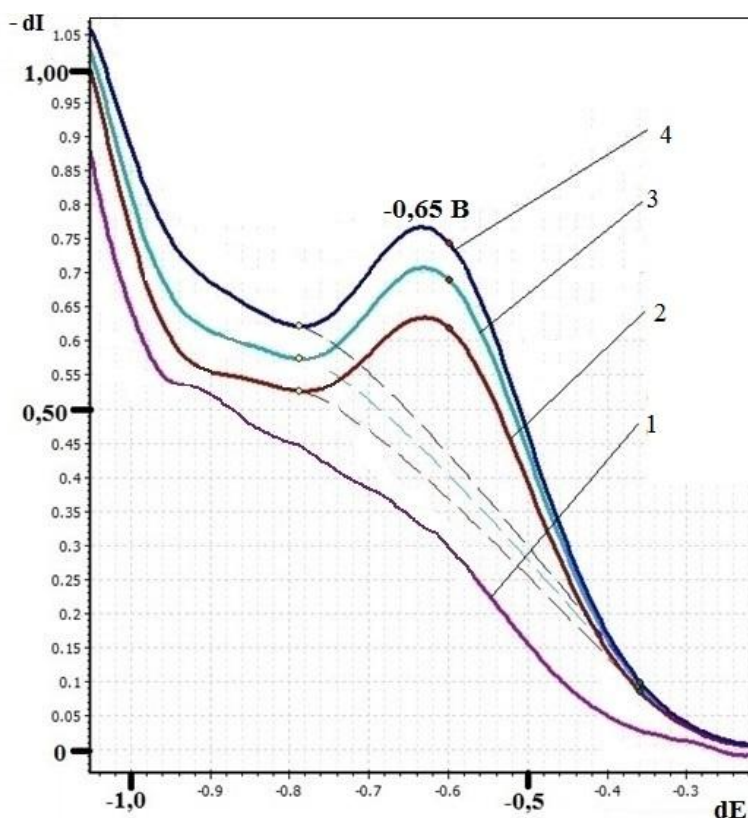


Рисунок 5 - Катодная ВАГ боратного буферного раствора $\text{pH}=9,18$ на ЗУКЭ с добавками GSH: 1- боратный буферный раствор с добавкой сульфита натрия ($C=0,04\text{M}$); 2 - $C(\text{GSH})= 2,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 3 - $C(\text{GSH})= 2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 4 - $C(\text{GSH})= 2,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

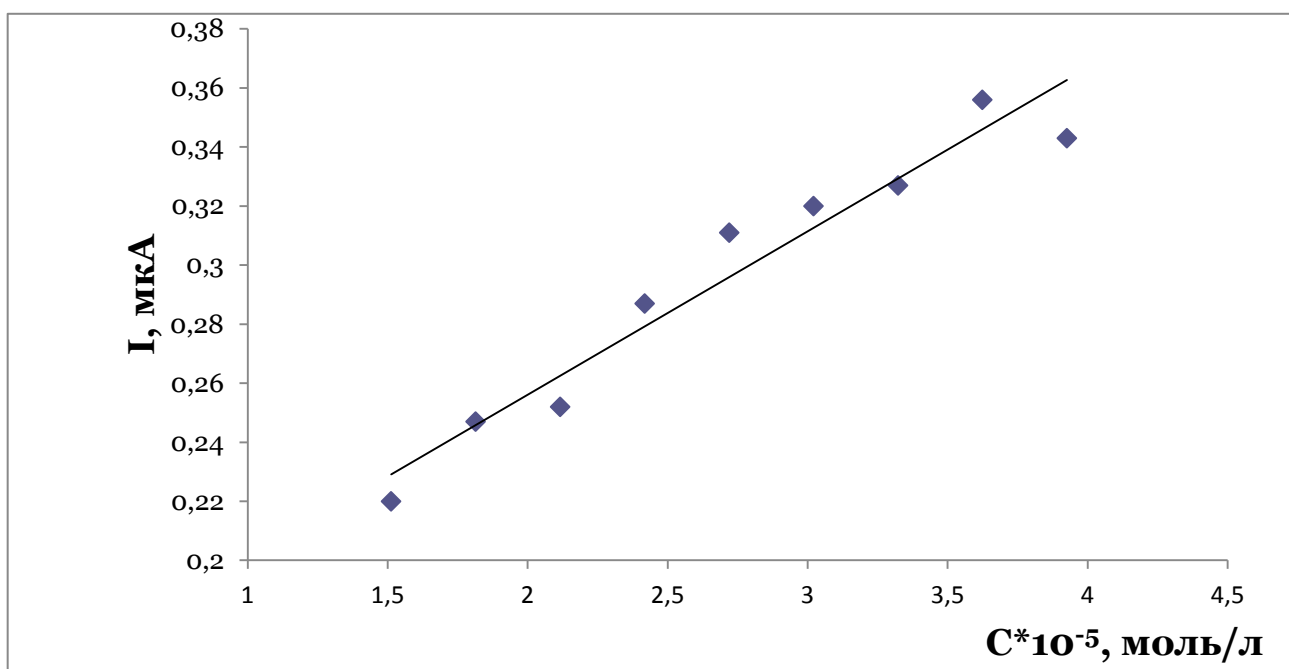


Рисунок 6 – Зависимость катодного тока GSH от его концентрации в боратном буферном растворе (pH = 9,18) для ЗУКЭ.

Исследование электрохимического поведения окисленного глутатиона было произведено в тех же условиях. На полученной ВАГ наблюдался пик при $E = -0,5$ В, однако зависимость роста высоты этого пика с увеличением концентрации GSSG в ячейке не являлась линейной.

2.5. Объяснение поведения глутатиона на ЗУКЭ. Предположительный механизм электрохимических реакций, протекающих в модельном растворе.

Как известно, при снятии катодной ВАГ в электрохимической ячейке происходят процессы восстановления. Исследование двух форм глутатиона показали, что пик на ВАГ наблюдается при введении обеих форм глутатиона в электрохимическую ячейку. Если для GSSG появление пика и его рост с увеличением концентрации вещества в ячейке логичен и понятен – окисленный глутатион электрохимически восстанавливается до GSH, то процесс, происходящий в этих же условиях при добавлении GSH в ячейку и детектируемый прибором, нуждается в объяснении.

Для того чтобы понять природу этого процесса, было проведено исследование поведения глутатиона восстановленного в тех же условиях, однако без подавления кислорода в ячейке. Эксперимент показал, что пики кислорода, детектируемые при $-0,75\text{В}$ и $-0,3\text{В}$ на ЗУКЭ в боратном буфере (рисунок 2б) при добавлении GSH уменьшаются. Это подтверждает заявленные в литературном обзоре антиоксидантные свойства глутатиона: он связывается с кислородом в растворе, количество кислорода снижается с каждой новой дозой восстановленного глутатиона, и кислородные пики становятся меньше.

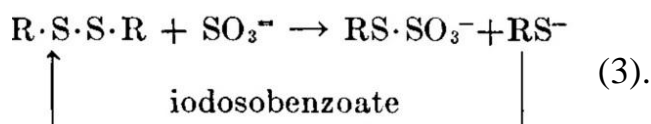
При записи катодной ВАГ для GSH пик наблюдался при $-0,65\text{ В}$, т.е. ровно между пиками, полученными на ЗУКЭ без добавки глутатиона. Значит можно предположить, что прибор регистрирует образование кислорода в ячейке. Разберем последовательно механизм происходящих в ячейке реакций.

При записи первой ВАГ в боратном буферном растворе, где основной молекулярный кислород подавлен сульфитом натрия пик не наблюдается. Предположим, что в этот момент происходит переход малого количества адсорбированного на золоте электрода кислорода из молекулярной формы в радикальную, т.е. после снятия первой ВАГ фонового электролита в ячейке появляется некоторое количество свободных радикалов кислорода. При записи второй ВАГ после первой добавки GSH в ячейку пик появляется. Учитывая антиоксидантную способность восстановленного глутатиона, можем считать, что в этот момент произошло взаимодействие GSH и $\text{O}_2^{\bullet-}$, образовался окисленный глутатион и новый молекулярный кислород. Молекулы кислорода вновь переходят в радикальную форму при снятии следующей ВАГ и сразу взаимодействуют с новой порцией GSH. С каждой новой ВАГ образуется всё большее количество молекулярного кислорода, и пик растёт:

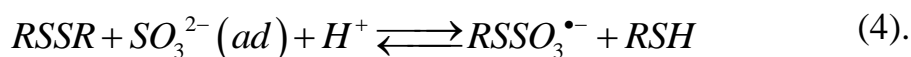




Чтобы разобраться с процессом, происходящем в ячейке при добавлении в нее GSSG, обратимся к статье Нью – Йоркских исследователей 1959 года. В ней приводится механизм неэлектрохимического взаимодействия окисленного глутатиона с сульфит – ионом, в результате которого образуется ион RS^- [21]:



В исследуемом нами модельном растворе так же присутствуют сульфит – ионы. Взаимодействие GSSG с ними, на основе реакции 3, можно описать следующим уравнением:



Образующийся в ходе данной реакции восстановленный глутатион вступает в реакцию с радикалами кислорода, образуя молекулярный кислород, который и детектируется прибором. Т.о. реакции 1,2 и 4 представляют собой своеобразный цикл перехода глутатиона из одной формы в другую и кислорода из радикальной формы в молекулярную (рисунок 7):

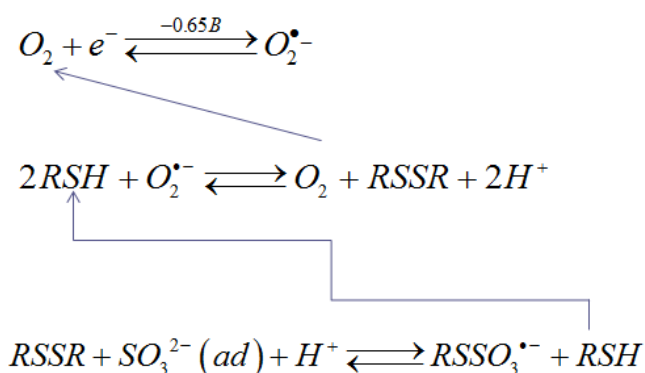


Рисунок 7 – Цикл электрохимических реакций с участием глутатиона, протекающих в модельном растворе и на ЗУКЭ.

2.5. Исследование электрохимических свойств глутатиона в модельном растворе на ЗУКЭ, модифицированном тозилатной солью арилдиазония

Перспектива данной НИР заключается в разработке ферментативного биосенсора, способного селективно детектировать окисленный или восстановленный глутатион в биообъектах.

Описанная в предыдущем разделе модификация электрода – это лишь начальный этап разработки биосенсора: кроме наночастиц золота на поверхность УКЭ следует «посадить» сам селективный к определенной форме глутатиона фермент. Возникает вопрос, каким же образом можно осуществить дальнейшую модификацию полученного ЗУКЭ.

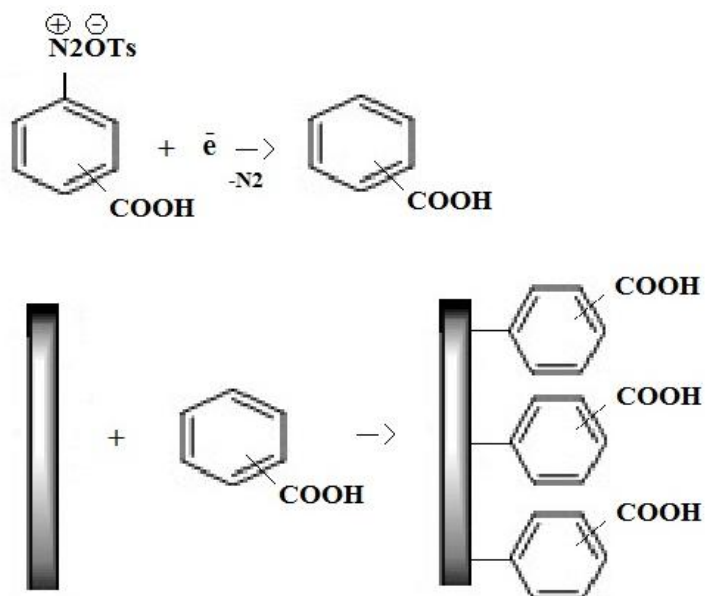


Рисунок 8 - модификация УКЭ с помощью TSA

При разработке ферментативных «сендвич»-систем принято использование т.н. агентов-сшивателей, через которые и можно осуществить «посадку» фермента на электрод.

Одним из вариантов «посадки» фермента для ЗУКЭ является его ковалентная пришивка с помощью тозилатных солей арилдиазония. Преимуществом этих солей является то, что они образуют на поверхности электрода компактную, стабильную пленку, удобную для пришивки полипептидов, в том числе ферментов.

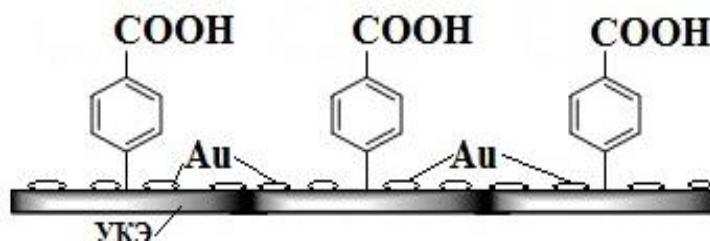


Рисунок 9 - поверхность УКЭ, модифицированная золотом и TSA.

Кроме того, т.к. TSA не содержат серу, они присоединяются к немодифицированным областям УКЭ, и таким образом площадь поверхности, занятая наночастицами золота, не уменьшается [22]. Сам про-

цесс прикрепления данного агента-сшивателя на электрод не является трудоемким: достаточно просто вымочить электрод в растворе нужной соли, чтобы ее пленка закрепилась на поверхности электрода по механизму, изображенному на рисунке 8 [23]. Готовая поверхность модифицированного электрода представлена на рисунке 9.

В ходе данной работы было исследовано, как время вымачивания электрода в растворе ТСА влияет на его чувствительность. Для выбора оптимального времени вымачивания время выдерживания в растворе ТСА варьировалось от 30 до 120с. Модификация производилась следующим образом: после модификации УКЭ золотом полученный ЗУКЭ очищали путем цикликации в 0,05М растворе H_2SO_4 , затем выдерживали в растворе ТСА с концентрацией 60 мг/л.

Для ЗУКЭ, выдержанных в растворе ТСА 30, 60 и 120с была проведена запись катодных ВАГ в боратном буферном растворе с $pH=9,18$ для трех концентраций глутатиона .

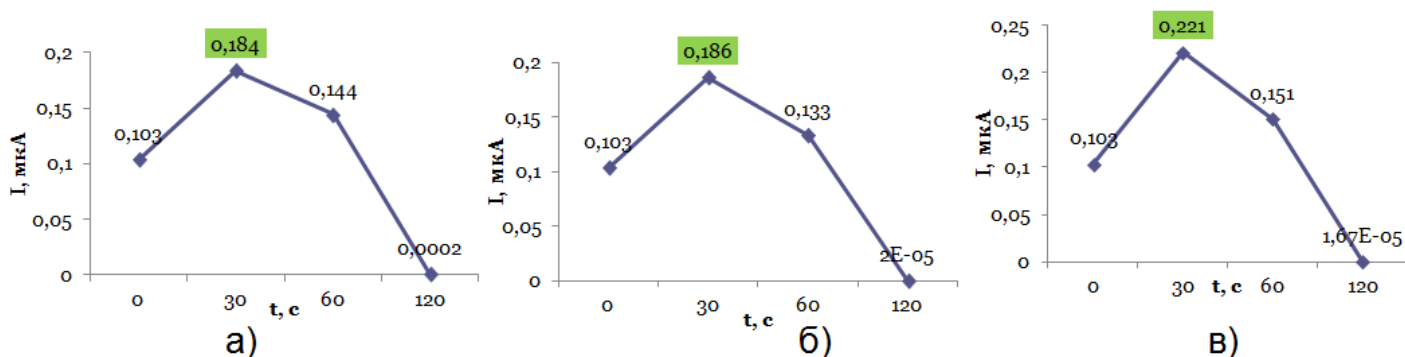


Рисунок 10 - зависимость высоты пика GSH от времени выдерживания ЗУКЭ в растворе ТСА. Концентрации GSH в ячейках:
 а) $C = 3,03 \cdot 10^{-6} M$; б) $C = 6,05 \cdot 10^{-6} M$; в) $C = 9,08 \cdot 10^{-6} M$.

Как видно из рисунка 10, наибольшей чувствительностью обладает электрод, выдержанный в растворе ТСА в течение 30с, т.к. пик на ВАГ для трех концентраций восстановленного глутатиона наибольший.

Для данного электрода была проведена запись ВАГ с добавлением GSH в электрохимическую ячейку и построен график зависимости катодного тока GSH от его концентрации в растворе на ЗУКЭ, модифицированном ТСА. Зависимость носит линейный характер, уравнение прямой имеет вид $y = 0,1047x + 0,1692$, коэффициент корреляции - $R^2 = 0,9947$ (рисунок 11):

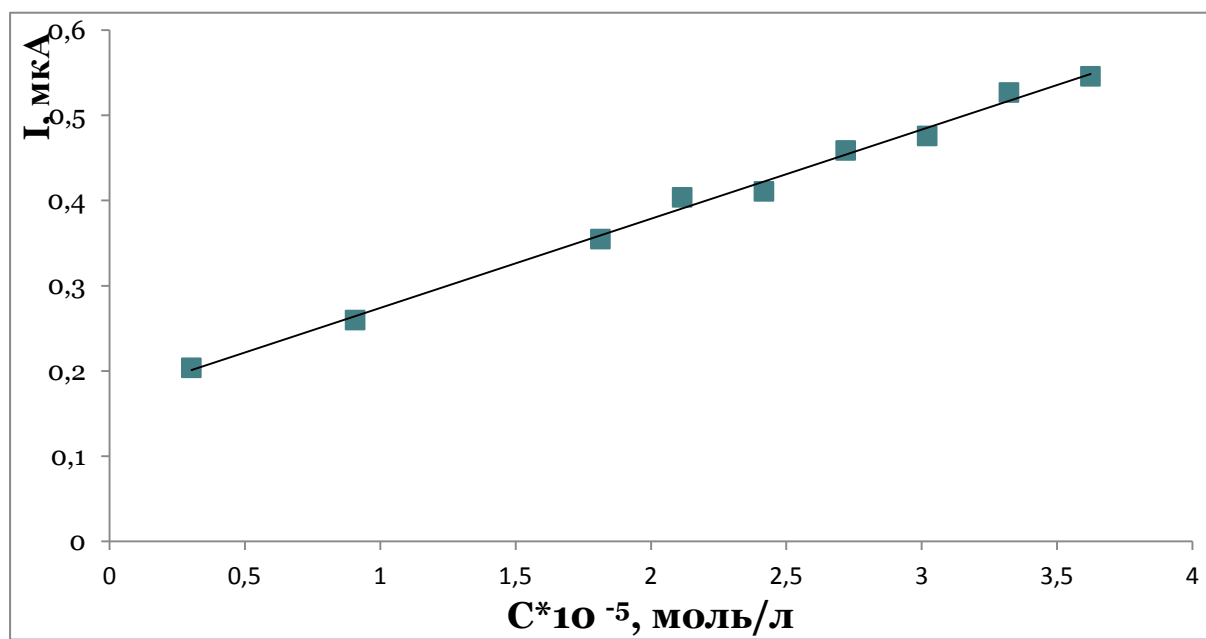


Рисунок 11 - зависимость катодного тока GSH от его концентрации в растворе на ЗУКЭ, модифицированном ТСА ($t = 30$ с).

2.7. Сравнение результатов, полученных на модифицированных ЗУКЭ

Для определения наиболее эффективного метода модификации ЗУКЭ была составлена таблица по результатам проведенных экспериментов:

Таблица 1. Сравнение характеристик модифицированных электродов

ЗУКЭ		ЗУКЭ, модифицированный ТСА	
I, мкА	C*10 ⁻⁵ , М	I, мкА	C*10 ⁻⁵ , М
0,247	1,814	0,355	1,814
0,252	2,116	0,404	2,116
0,287	2,418	0,411	2,418
0,311	2,72	0,459	2,72
0,32	3,021	0,476	3,021
0,327	3,323	0,527	3,323
0,356	3,624	0,546	3,624
$R^2 = 0,942$		$R^2 = 0,9947$	
$y = 0,0554x + 0,1454$		$y = 0,1047x + 0,1692$	

Как видно из таблицы, наибольшую чувствительность к восстановленному глутатиону проявляет ЗУКЭ, модифицированный ТСА: высота пиков на ВАГ, записанных на нем, больше, чем для тех же концентраций GSH на ЗУКЭ без модификаций. Кроме того, коэффициент корреляции для зависимости высота пиков - концентрация глутатиона в растворе ближе к единице ($R^2 = 0,9947$).

Глава 3. Обобщение результатов. Рекомендации для определения глутатиона в модельном растворе

По результатам проведенной работы можно сформулировать рекомендации по определению восстановленного глутатиона в модельном растворе на золотоуглеродсодержащих композитных электродах, модифицированных тозилатными солями арилдиазония:

1. среда модельного раствора должна быть с $\text{pH}=9,18$;
2. диапазон потенциалов для снятия катодной вольтамперограммы должен быть от 0 до $-1,25$ В;
3. удаление кислорода из модельного раствора следует производить $0,04$ М раствором сульфита натрия Na_2SO_3 ;
4. нанесение наночастиц золота необходимо производить путем электролиза из раствора HAuCl_4 (1000 мг/дм³) в течение 60 с (скорость изменения потенциала $W = 5$ [мВ/с], $E = -0.1 \div +0.2$ В). Далее необходима циклизация электродов в растворе $0.5\text{M H}_2\text{SO}_4$ при диапазоне потенциалов от -1.5 В до $+1.5$ В методом вольтамперометрии до получения воспроизводимых ЦВА.
5. в качестве ковалентного модификатора необходимо использовать тозилатную соль арилдиазония. Модификацию ЗУКЭ производить путем выдерживания электрода в растворе ТСА с концентрацией 60 мг/л в течение 30 с.

Глава 4. Социальная ответственность

4.1 Описание оборудования, используемого для исследования объекта

Исследование электрохимических свойств глутатиона проводилось на компьютеризованном вольтамперометрическом анализаторе TA-Lab («Томь-аналит» г. Томск), способным проводить высокочувствительные измерения для оценки содержания примесей в различных водах, а так же других проб, представленных в виде растворов, методами вольтамперометрии.

4.2 Производственная безопасность

Для работы в химической лаборатории требуется соблюдение техники безопасности и охраны труда, использование средств индивидуальной защиты, для обеспечения максимально безвредных условий труда.

Неблагоприятные факторы производственной среды могут воздействовать на работников в случае нарушения санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории. К таким факторам можно отнести, например, контакт с химическими веществами, проявляющими токсические свойства, а так же напряжение зрительного аппарата при выполнении анализов. В таблице №# представлен анализ вредных и опасных факторов при определении глутатиона в модельных растворах.

Таблица 2. Опасные и вредные факторы при определении глутатиона в модельных растворах методом вольтамперометрии

Наименование	Нормативные документы	Величина ПДК, мг/м ³	Класс опасности	Примечание
Конц. серная кислота	ГОСТ 14262-78	1	2	Серная кислота воздействует на верхние дыхательные пути и легкие, на кожные покровы, вызы-

				вает раздражение, ожоги слизистых оболочек и тяжелые ожоги кожи.
Этиловый спирт	ГОСТ Р 51723-2001	100	4	Проявляет токсическое воздействие на организм, выражающееся в затуманенности сознания работника, нарушении координации движений и т.п., что приводит к невозможности проведения экспериментов в лаборатории.

Работа с кислотами и щелочами

Работа с кислотами и щелочами, являющимися концентрированными, осуществляется только в вытяжном шкафу и с использованием средств индивидуальной защиты (СИЗ): перчаток, очков, халатов. При работе с дымящей азотной кислотой с удельной плотностью 1,51 - 1,52 г/см³, а также с маслами помимо СИЗ следует надевать резиновый фартук.

Концентрированные кислоты необходимо хранить в вытяжном шкафу в стеклянной посуде емкостью не более 2 л. Одновременно с кислотами недопустимо хранение легковоспламеняющихся веществ.

Для хранения растворов кислот (кроме плавиковой) предусмотрена стеклянная посуда, а для растворов щелочей - полиэтиленовая тара.

Перемещение двухлитровой бутылки с кислотой разрешается необходимо осуществлять, перенося ее вдвоем в корзине так, чтобы промежутки были забиты стружкой или соломой для амортизации. Концентрированные кислоты и щелочи в специальных емкостях, объем которых меньше двух

литров, следует переносить в предохраняющих от ожогов специальных ящиках с ручкой.

Переливание концентрированных кислот, щелочей, и других едких жидкостей осуществляется при помощи сифонов с грушей.

При приготовлении растворов кислот более концентрированные кислоты приливаются в воду тонкой струей (а не наоборот!) при непрерывном помешивании, используя при этом термостойкую посуду, способную выдержать сильное выделение тепла, сопровождающее растворение.

При поражении кожных покровов кислотой необходимо немедленно промыть нужный участок в течение 10 - 15 минут струей воды, затем нейтрализовать остатки кислоты на поверхности кожи 2 - 5 % раствором карбоната натрия.

Пролитую кислоту засыпают песком. Затем песок убирают, посыпают место, пораженное кислотой, известью или содой и промывают водой.

Пролитые растворы концентрированных щелочей (NaOH, KOH, NH₄OH) засыпают песком или деревянными опилками, а затем нейтрализуют остатки щелочи слабым раствором уксусной кислоты.

Мероприятия по снижению риска воздействия вредных факторов на работников:

1. использование СИЗ (очки, маски, респираторы, резиновые перчатки, халаты);
2. использование герметичных тары для хранения реактивов и оборудования для проведения реакции;
3. применение вытяжки (вытяжной шкаф).

Производственное освещение

В лаборатории 2 корпуса НИ ТПУ используется, как общее естественное и искусственное, так и местное, то есть комбинированное освещение, необходимое для нормальной зрительной работы без перенапряжения глаз [41]. Освещение, являющееся искусственным, но близким к солнечному свету по

спектральному составу является безопасным для работы, если оно равномерно и устойчиво и не содержит резких теней или блеклостей в поле зрения.

Микроклимат в аналитической лаборатории

Основными показателями микроклимата воздуха в лаборатории, удовлетворяющими требованиям, являются: температура воздуха(t) – 19-21⁰С, его относительная влажность – 60 - 65% и скорость движения (v) – 0,2 м/с [26].

Для поддержания нормальных параметров микроклимата в лаборатории установлены: система вентиляции, подающая чистый воздух и удаляющая загрязненный воздух из рабочей зоны; локальная система - местная вентиляция – вытяжной шкаф (загрязненный воздух удаляется вентиляторами от места его возникновения).

Уровень шума и вибрации

Для предотвращения негативного влияния шума и вибрации приборы, используемые в работе, были установлены на амортизирующие прокладки в соответствии с требованиями [25]. По уровню шума, локальной и общей вибрации лабораторию 2 корпуса НИ ТПУ можно отнести к допустимому классу, ПДУ < 25 дБ, позволяющему безопасно выполнять работу.

Электробезопасность

В работе использовались весы аналитические лабораторные, анализатор вольтамперометрический TA-Lab.

Все помещения лаборатории 2 корпуса НИ ТПУ соответствуют требованиям [28] электробезопасности: электрооборудование, напряжение которых превышает 36 В, а также все оборудование и механизмы, которое может оказаться под напряжением, заземлено.

По условиям опасности поражения электрическим током помещение лаборатории согласно [31] принадлежит к первой категории. Для предотвра-

щения воздействия тока на человека в лаборатории 2 корпуса НИ ТПУ приняты следующие меры:

1. до токоведущих частей соблюдаются соответствующие расстояния либо произведено заземление электрооборудования [28];
2. токоведущие части ограждены;
3. применены блокировки аппаратов и ограждающих устройств, предотвращающие ошибочные операции и не допускающие доступ к токоведущим частям;
4. применены предупреждающие сигнализация и надписи;
5. используется цельное электрооборудование.

Кроме того, условия, описанные в разделе «Микроклимат», поддерживались неизменными. Окружающая среда в лаборатории 2 корпуса НИ ТПУ невзрывоопасна, не содержит значительного количества токопроводящей пыли и агрессивных газов.

Конструкции электрооборудования так же обеспечивает безопасность работы. От прикосновений к токоведущим частям (ТЧ) защищает металлический корпус приборов, кроме того - зануление первого класса защиты.

Молниезащита производственных зданий и сооружений

В зависимости от типа опасного воздействия, которое возникает при электрическом разряде молнии, разрабатывается соответствующая защита промышленных зданий. Различают следующие типы воздействия:

- Прямой удар, опасный термическим и механическим разрушением здания.
- Вторичное воздействие, характеризующееся образованием электрических токов в замкнутых токопроводящих системах здания (электропроводке, трубопроводе и пр.). При возникновении искры и нагрева металлоконструкций от вторичного воздействия может возникнуть пожар или взрыв.

- Занос высоких потенциалов приводит к пожару, взрыву, выходу из строя электрооборудования из-за переноса электрических потенциалов, который возникает при ударе молнии, по внешним металлоконструкциям (трубопроводам) в защищаемое сооружение.

В первую очередь необходимо защитить мачты, трубы, опоры ЛЭП, т.к. объекты большой высоты подвергаются большей опасности.

В зависимости от того, к какой категории относится производственный объект, выбирается необходимый уровень защиты.

К первой категории относятся объекты, на которых могут находиться взрывоопасные вещества классов В1 и В2, а также электростанции и подстанции. Такие здания защищают от заряда статического электричества заземлением всех металлических корпусов сооружения, от прямого удара – с помощью стержневых и тросовых молниеотводов, от вторичного действия и заноса высоких потенциалов установками специальных перемычек, объединяющих контуры в единую систему.

Ко второй категории относятся сооружения, в которых находятся взрывоопасные химические вещества, помимо веществ класса В1 и В2. Эти здания защищают от прямого удара молнии тросовыми или стержневыми молниеотводами, расположенными на здании или стоящими отдельно; сетчатыми молниеотводами с ячейкой не менее 6х6 м (по требованиям МЭК 5х5 м); заземлениями металлической кровли.

К третьей категории – все другие объекты. Защита зданий аналогична защите объектов второй категории.

Правила пожарной безопасности в лаборатории

В Национальном Исследовательском Томском политехническом университете, где проводились исследования, предприняты меры для предотвращения возникновения пожаров. В случае же возникновения пожара необходимо его локализовать и потушить[28]. Это обеспечивается проходами

между лабораторными столами и незагроможденными выходами. При возникновении загорания все сотрудники должны обладать знаниями об инструкции и плане эвакуации по заранее разработанной программе.

Для тушения возможного загорания и пожаров в лаборатории имеется следующее оборудование:

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

Для обнаружения пожара и оповещения людей установлена система пожарной сигнализации, для эвакуации - разработан план эвакуации.

4.3 Экологическая безопасность

Вредные вещества, являющиеся сырьем, продуктами или отходами химического производства, могут попадать в окружающую среду по сточным водам и, таким образом, загрязнять ее.

При выполнении работы в качестве исследуемого объекта был использован пептид глутатион, который не оказывает негативного влияния на окружающую среду.

Основными отходами при выполнении работы были: сточные воды с низкой концентрацией серной кислоты и слив воды, которой мылась посуда после работы с реактивами. В г.Томске утилизацией отходов, в т.ч. медицин-

ских и химических, занимается АО «Полигон», а обезвреживанием отходов кислот, щелочей, концентратов, оксидов, гидроксидов, солей и т.п. – компания "ЭкоАрхитектура", работающая по всей России.

В современной индустрии так же существует понятие «безотходная технология», объединяющее в себя комплекс мероприятий в технологических, в результате которых сокращается до минимума количество вредных выбросов и уменьшается воздействие отходов на окружающую среду до приемлемого уровня: предпочтение процессов получения максимального количества продукции с минимальным количеством отходов; применение бессточных технологических систем или очистка сточных вод; переработка отходов производства во вторичное сырье; применение технологическую систему производства с замкнутой структурой материальных потоков сырья и отходов внутри комплекса.

4.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Признаки чрезвычайной ситуации (ЧС) – разрушение зданий, сооружений, материальных ценностей, гибель людей.

Наиболее типичная ЧС для работы в химической лаборатории носит техногенный характер - это пожар.

В случае выявления пожара (признаков горения) необходимо:

1. вызвать пожарную бригаду по телефону 01 и покинуть здание;
2. при сильном задымлении и ограниченной видимости необходимо лечь на пол во избежание отравления угарным газом, сориентироваться в помещении, обозначить направление движения к выходу и покинуть помещение;
3. по возможности осуществить самостоятельную эвакуацию людей и материальных ценностей, ориентируясь по плану эвакуации с опорой на обстоятельства реально создавшейся ситуации;
4. по возможности отключить подачу электроэнергии в здании.

4.5 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

В соответствии с российским законодательством для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, предусмотрены следующие виды компенсаций:

1. сокращение продолжительности рабочего времени;
2. дополнительные отпуска – 1 раз в год;
3. повышение размера оплаты труда;
4. молоко или другое лечебно-профилактическое питание;
6. назначение трудовой пенсии досрочно[30].

Эргономическое проектирование рабочих мест осуществляется с учетом рабочих движений и перемещений для конкретного технологического процесса; основных и вспомогательных операций, осуществляемых в удобном рабочем положении; расположения средств управления в зоне перемещений рабочего; сохранения оптимального обзора источников визуальной информации при смене рабочей позы и рабочего положения; возможности осуществления профилактических осмотров, ремонта и наладки, удобства их выполнения; рационального размещения оборудования и безопасности рабочих. Соблюдение этих условий обеспечивает высокую производительность труда.

Неправильное положение тела при выполнении работы приводит к быстрому возникновению статической усталости, снижению производительности и качества работы, а также снижению способности своевременно оценивать данные, получаемые в ходе работы или реагировать на возникновение опасности.

Глава 5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

Проблемы эффективного ресурсопотребления и ресурсосбережения всегда являются актуальными. На сегодняшний день все технологические процессы сопровождаются потреблением первичных ресурсов (вода, воздух, энергия), материальных и трудовых. Формирование и реализация стратегии ресурсосбережения на всех уровнях управления – один из важнейших вопросов стратегического менеджмента, так как ресурсоемкость является второй стороной товара, когда первой является его качество.

Оценка коммерческой ценности разработки является необходимым условием при поиске источников финансирования для проведения научного исследования и коммерциализации его результатов.

Целью раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» является определение перспективности и успешности научно-исследовательского проекта, разработка механизма управления и сопровождения конкретных проектных решений на этапе реализации.

Достижение цели обеспечивается решением задач:

- планирование научно-исследовательских работ;
- оценки коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения;
- определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования.

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

5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Целевым рынком разработанной методики вольтамперометрического определения глутатиона являются различные медицинские учреждения,

проводящие анализы крови и других биообъектов. Потенциальными потребителями результатов могут быть фармацевтические компании, медицинские учреждения и лаборатории разных профилей, диагностические центры.

5.1.2 Анализ конкурентных технических решений

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum B_i \cdot B_j \quad (5)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента;

B_i – вес показателя (в долях единицы); B_j – балл i -го показателя.

Целесообразно проводить данный анализ с помощью оценочной карты, которая приведена в таблице 3.

Таблица 3. Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		B_{ϕ}	B_{K1}	B_{K2}	K_{ϕ}	K_{K1}	K_{K2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Точность определения	0,2	5	5	3	1,5	1,5	0,9
2. Экспрессность	0,2	5	3	5	1,5	0,9	1,5
3. Простота эксплуатации	0,2	4	3	3	0,8	0,6	0,6
Экономические критерии оценки эффективности							
4. Цена	0,2	5	3	4	1	0,6	0,8
5. Предполагаемый срок эксплуатации	0,1	4	3	4	0,4	0,3	0,4
6. Стоимость оборудования	0,1	4	3	4	0,4	0,3	0,4
7. Стоимость реактивов							
Итого	1				5,6	4,2	4,6

В таблице 5: $K1$ – спектрофотометрический метод анализа; $K2$ – хроматографический метод анализа; K_{ϕ} – вольтамперометрический метод анализа.

По итогам анализа оценочной карты можно сделать вывод, что научная разработка, описываемая в данной НИР, является конкурентноспособной.

5.1.3 SWOT-анализ

SWOT – Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы) – представляет собой ком-

плексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты SWOT-анализа

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта: С1. Экспрессность С2. Простота эксплуатации С3. Широта объектов для анализа С4. Селективность</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта: Сл1. Невысокая точность определения Сл2. Необходимость прибора Сл3. Необходимость дорогостоящих реактивов, дополнительных материалов к прибору</p>
<p>Возможности: В1. Появление дополнительного спроса на продукт В2. Разработка методики определения в разных биологических объектах В3. Перспективы внедрения вольтамперометрии в качестве метода анализа в медицине.</p>		
<p>Угрозы: У1. Развития конкурентных методов анализа У2. Ограниченный круг потребителей У3. Повышение стоимости оборудования У4. Отсутствие необходимых реактивов</p>		

Второй этап SWOT-анализа состоит в выявлении соответствия сильных и слабых сторон научно-исследовательского проекта внешним условиям окружающей среды. Это соответствие или несоответствие должны помочь выявить степень необходимости проведения стратегических изменений.

В рамках данного этапа необходимо построить интерактивные матрицы проекта. Их использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Примеры интерактивных матриц представлены в таблицах 5, 6, 7, 8.

Таблица 5. Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и возможности»

Сильные стороны проекта					
Возможности проекта		С1	С2	С3	С4
	В1	+	+	+	+
	В2	+	+	+	+
	В3	+	-	-	-

Таблица 6. Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и возможности»

Слабые стороны проекта				
Возможности проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	В1	+	-	-
	В2	+	-	-
	В3	-	-	-

Таблица 7. Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и угрозы»

Сильные стороны проекта					
Угрозы проекта		С1	С2	С3	С4
	У1	-	-	-	-
	У2	-	-	+	-
	У3	-	+	+	+
	У4	-	+	+	-

Таблица 8. Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и угрозы»

Слабые стороны проекта				
Угрозы проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	У1	-	-	+
	У2	-	-	+
	У3	+	+	-
	У4	-	-	-

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа (таблица 9).

Таблица 9. Итоговая матрица SWOT-анализа

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

5.2 Планирование научно-исследовательских работ

5.2.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научных исследований формируется рабочая группа, в состав которой входят: бакалавр, научный руководитель, консультант по части социальной ответственности (СО) и консультант по экономической части (ЭЧ) выпускной квалификационной работы. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (таблица 10).

Таблица 10. Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№раб	Содержание работ	Должность исполни-
----------------	------	------------------	--------------------

			теля
1	2	3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, бакалавр
Выбор направления исследований	2	Ознакомление с экспериментальными данными и выбор направления исследований	Научный руководитель, бакалавр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Научный руководитель, бакалавр,
	4	Патентный обзор литературы	Бакалавр
	5	Календарное планирование работ по теме	Научный руководитель, бакалавр
Теоретические и экспериментальные исследования	6	Проведение лабораторных анализов	Бакалавр
	7	Проведение расчетов и их обоснование на основании экспериментальных данных	Бакалавр
	8	Сопоставление результатов с теоретическими исследованиями	Научный руководитель, бакалавр
Обобщение и оценка результатов	9	Оценка эффективности полученных результатов	Научный руководитель, бакалавр
	10	Определение целесообразности проведения ВКР	Научный руководитель, бакалавр
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	11	Оценка эффективности применения анализа	Бакалавр, консультант по ЭЧ
	12	Разработка социальной ответственности по теме	Бакалавр, консультант СО
Оформление комплекта документации по ВКР	13	Составление пояснительной записки	Бакалавр

5.2.2 Определение трудоемкости выполнения работ

Трудоемкость выполнения научного исследования оценивается экспертным путем в человеко-днях и носит вероятностный характер, т.к. зависит от множества трудно учитываемых факторов. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости $t_{ожі}$ используется формула:

$$t_{ожі} = \frac{3t_{mini} + 2t_{maxi}}{5}, \quad (6)$$

где $t_{ожі}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения i -ой работы чел.-дн.;

$t_{\min i}$ – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (оптимистическая оценка: в предположении наиболее благоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.;

$t_{\max i}$ – максимально возможная трудоемкость выполнения заданной i -ой работы (пессимистическая оценка: в предположении наиболее неблагоприятного стечения обстоятельств), чел.-дн.

Исходя из ожидаемой трудоемкости работ, определяется продолжительность каждой работы в рабочих днях T_p , учитывающая параллельность выполнения работ несколькими исполнителями по формуле:

$$T_{p_i} = \frac{t_{\text{ож}i}}{Ч_i}, \quad (7)$$

где T_{p_i} – продолжительность одной работы, раб.дн.; $t_{\text{ож}i}$ – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел.-дн.; $Ч_i$ – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

Результаты расчетов занесены в таблицу 11.

Таблица 11. Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ						Исполнители	Т _p , раб. дн.		Т _{кi} , кал. дн.	
		t _{min} , чел.-дн.		t _{max} , чел.-дн.		t _{ож} , чел.-дн.			Исп. 1	Исп. 2	Исп. 1	Исп. 2
		Исп. 1	Исп. 2	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 1	Исп. 2					
1	Составление и утверждение технического задания	1	1	2	2	1,4	1,4	Р	0,4	0,4	0,5	0,5
		1	1	2	2	1,4	1,4	Б	0,4	0,4	0,5	0,5
		1	1	2	2	1,4	1,4	К ¹	0,4	0,4	0,5	0,5
		1	1	2	2	1,4	1,4	К ²	0,4	0,4	0,5	0,5
2	Ознакомление с экспериментальными данными и выбор направления исследований	0,4	0,4	2	2	1	1	Р	0,5	0,5	0,6	0,6
		0,4	0,4	2	2	1	1	Б	0,5	0,5	0,6	0,6
3	Подбор и изу-	4	4	10	10	6,4	6,4	Р	3,2	3,2	3,8	3,8

	чение материа- лов по теме	4	4	10	10	6,4	6,4	Б	3,2	3,2	3,8	3,8
4	Патентный обзор литературы	6	6	10	10	7,6	7,6	Б	7,6	7,6	9	9
5	Календарное планирование работ по теме	0,5	0,5	1,5	1,5	0,9	0,9	Р	0,5	0,5	0,6	0,6
		0,5	0,5	1,5	1,5	0,9	0,9	Б	0,5	0,5	0,6	0,6
6	Проведение лабораторных анализов	10	10	15	15	12	12	Б	12	12	14,2	14,2
7	Проведение расчетов и их обоснование на основании экспериментальных данных	6	6	8	8	6,8	6,8	Б	6,8	6,8	8	8
8	Сопоставление результатов с теоретическими исследованиями	2	2	3	3	2,4	2,4	Р	1,2	1,2	1,4	1,4
		2	2	4	4	2,8	2,8	Б	1,4	1,4	1,6	1,6
9	Оценка эффективности полученных результатов	2	2	4	4	2,8	2,8	Р	1,4	1,4	1,6	1,6
		3	3	5	5	3,8	3,8	Б	1,9	1,9	2,3	2,3
10	Определение целесообразности проведения ВКР	5	5	6	6	5,4	5,4	Р	2,7	2,7	3,2	3,2
		5	5	6	6	5,4	5,4	Б	2,7	2,7	3,2	3,2
11	Оценка эффективности применения анализа	4	4	9	9	6	6	К ¹	3	3	3,6	3,6
		4	4	9	9	6	6	Б	3	3	3,6	3,6
12	Разработка социальной ответственности по теме	5	5	9	9	6,6	6,6	К ²	3,3	3,3	3,9	3,9
		5	5	9	9	6,6	6,6	Б	3,3	3,3	3,9	3,9
13	Составление пояснительной записки	15	15	30	30	21	21	Б	21	21	25	25

В таблице: Р – научный руководитель; Б – бакалавр; К¹ – консультант по экономической части; К² – консультант по социальной ответственности.

5.2.3 Разработка графика проведения научного исследования

При выполнении дипломных работ студенты становятся участниками сравнительно небольших по объему научных тем, поэтому наиболее удобным и наглядным является построение ленточного графика проведения научных работ в форме диаграммы Ганта.

Диаграмма Ганта – это горизонтальный ленточный график, на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ. Диаграмма Ганта строится на основании данных таблицы 10.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней следует перевести в календарные дни. Для этого необходимо воспользоваться следующей формулой:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (8)$$

где T_{ki} – продолжительность выполнения i -й работы в календарных днях;

T_{pi} – продолжительность выполнения i -й работы в рабочих днях;

$k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности.

В свою очередь коэффициент календарности определяется по формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (9)$$

где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году;

$T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году;

$T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году.

На проведение научного исследования отведен период из четырех основных месяцев (с февраля по май) и половина мая на исправление недочетов, тогда количество календарных дней составит 140. Количество выходных и праздничных дней примем 16 и 6 соответственно.

Тогда Коэффициент календарности составит:

$$k_{\text{кал}} = \frac{140}{140-6-16} = 1,186.$$

Календарный план-график проведения научного исследования по определению нейтральных и кислых сахаров в образцах ксантана представлен в таблице 12.

Таблица 12. Календарный план-график проведения НИОКР по теме «Определению глутатиона в модельных растворах методом вольтамперометрии»

Вид работы	Исполнители	T _{кi} , дней	Продолжительность выполнения работ														
			февраль		март			апрель			май						
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, бакалавр	0,5 0,5 0,5 0,5															
Ознакомление с экспериментальными данными и выбор направления исследования	Научный руководитель, бакалавр	0,6 0,6															
Подбор и изучение материалов по теме	Научный руководитель, бакалавр	3,8 3,8															
Патентный обзор литературы	Бакалавр	9															
Календарное планирование работ по теме	Научный руководитель, бакалавр	0,6 0,6															
Проведение лабораторных анализов	Бакалавр	14,2															
Проведение расчетов и их обоснование на основании экспериментальных данных	Бакалавр	8															

Вид работы	Исполнители	T _{ki} , дней	Продолжительность выполнения работ																	
			февраль		март			апрель			май									
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3							
Сопоставление результатов с теоретическими исследованиями	Научный руководитель, бакалавр	1,4 1,6																		
Оценка эффективности полученных результатов	Научный руководитель, бакалавр	1,6 2,3																		
Определение целесообразности проведения ВКР	Научный руководитель, бакалавр	3,2 3,2																		
Оценка эффективности применения анализа	Консультант по ЭЧ, бакалавр	3,6 3,6																		
Разработка социальной ответственности по теме	Консультант СО, бакалавр	3,9 3,9																		
Составление пояснительной записки	Бакалавр	25																		

Условные обозначения в таблице

Научный руководитель	Бакалавр	Консультант по ЭЧ	Консультант СО

5.2.4 Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

В процессе формирования бюджета НТИ используется следующая группировка затрат по статьям: материальные затраты НТИ; затраты на оборудование; основная заработная плата исполнителей темы; дополнительная заработная плата исполнителей темы; отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления); накладные расходы.

Материальные затраты НТИ включают стоимость всех материалов, используемых при разработке проекта, в частности, сырье и материалы, покупные комплектующие изделия и полуфабрикаты, используемые в качестве объектов исследований (испытаний) и для эксплуатации, технического обслуживания и ремонта изделий – объектов испытаний (исследований). Материальные затраты и затраты на оборудование для данного НТИ представлены в таблице 13, 14.

Таблица 13. Материальные затраты

Наименование	Марка, размер	Ед. измер.	Количество			Цена за ед., руб. для всех исп.	Сумма, руб.			
			Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3		Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3	
Фосфатный буферный раствор pH=1,65	Производство Россия	мл	20	40	60	24	480	960	1440	
Фосфатный буферный раствор pH=4,01	Производство Россия	мл	40	40	40	24	960	960	960	
Фосфатный буферный раствор pH=6,85	Производство Россия	мл	40	40	40	24	960	960	960	
Фосфатный буферный раствор pH=9,18	Производство Россия	мл	120	120	120	24	2880	2880	2880	
Калий хлорид насыщенный	ГОСТ 4234-77	мл	20	20	20	3,4	68	68	68	
L – Глутатион (GSH)	Fluka, Германия	мл	5	4	4	1634	8170	6536	6536	
L – Глутатион (GSSG)	Fluka, Германия	мл	5	4	4	1634	8170	6536	6536	
Лабораторная химическая посуда	ГОСТ 1770-74									
- колбы мерные на 50 и 100 см ³		шт	5	5	5	1200				
- цилиндры мерные с носиком на 25, 50, 100 см ³		шт	2	2	2	100				
- Пипетки, градуированные на 5, 10 см ³		шт	2	2	2	50				
- Стаканы на 25, 50, 100 см ³		шт	4	4	4	152	6935	6935	6935	
- стеклянные палочки		шт	1	1	1	7				
- стеклянные воронки		шт	1	1	1	20				
			Транспортные расходы (5%)					1 431,15	1 291,75	1 315,75
			Итого					30 054,15	27 126,75	27 630,75

Таблица 14. Затраты на оборудование

Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт.			Цена единицы оборудования, руб.			Общая стоимость оборудования, руб.		
	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3
Дистиллятор для приготовления воды очищенной (Россия, ЧЗБТ)	1	1	1	35000	35000	35000	35000	35000	35000
Весы аналитические (класс точности 0,0001 г., Россия)	1	1	1	38000	38000	38000	38000	38000	38000
pH-метр (Mettler Toledo, Швейцария)	1	1	1	26500	26500	26500	26500	26500	26500
Дозатор 1-канальный, переменного объема 1-5 мл (Россия);	1	1	1	5780	5780	5780	5780	5780	5780
Дозатор 1-канальный, переменного объема 10-100 мкл (Россия);	1	1	1	7906	7906	7906	7906	7906	7906
ХСЭ	2	2	2	760	760	760	1520	1520	1520
УКЭ	1	1	1	790	790	790	790	790	790
							115496	115496	115496

Для оборудования нужно рассчитать величину годовой амортизации по следующей формуле:

$$A_{\text{год}} = \frac{C_{\text{перв}}}{T_{\text{пи}}}, \quad (10)$$

где $C_{\text{перв}}$ – первоначальная стоимость, руб;

$T_{\text{пи}}$ – время полезного использования, год.

Результаты расчетов приведены в таблице 13.

Статья заработной платы исполнителей темы включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (включая премии и доплаты) и дополнительную заработную плату. Также включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы в размере 20 – 30 % от тарифа или оклада:

$$З_{\text{зп}} = З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}}, \quad (11)$$

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

$Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата (12-20 % от $Z_{\text{осн}}$).

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

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_p, \quad (12)$$

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

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. (таблица 12).

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (13)$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

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

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

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

В таблице 15 приведен баланс рабочего времени каждого работника НТИ.

Таблица 15. Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Инженер	Лаборант
Календарное число дней	365	365	365
Количество нерабочих дней	83	83	83
- выходные дни	66	66	66
- праздничные дни	17	17	17
Потери рабочего времени	24	24	
- отпуск	24	24	-
- невыходы по болезни	-	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	258	258	282

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (14)$$

где $Z_{тс}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от $Z_{тс}$);

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2 – 0,5

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

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 16.

Таблица 16. Расчет основной заработной платы

Исполнители	$Z_{тс}$, руб	k_d	k_p	Z_m , руб	$Z_{дн}$, руб	T_p , раб.дн.	$Z_{осн}$, руб
Научный руководитель	28000	0,35	1,3	60060	6108	11,7	71464
Бакалавр	7061	0,35	1,3	15146	1540	7,6	11704
Консультант по ЭЧ	22450	0,35	1,3	48155	4897	4,1	20078
Консультант СО	33240	0,35	1,3	71300	7251	4,4	31904

Общая заработная плата исполнителей работы представлена в таблице 17.

Таблица 17. Общая заработная плата исполнителей

Исполнители	$Z_{осн}$, руб.	$Z_{доп}$, руб.	$Z_{зп}$, руб.
Научный руководитель	28000	3360	31360
Бакалавр	7061	847	7908
Консультант по ЭЧ	22450	2694	25144
Консультант СО	33240	3989	37229

В статье расходов – отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления) отражаются обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников.

Величина этих отчислений определяется по следующей формуле:

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (15)$$

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

Тарифы страховых взносов в 2016 году остались на прежнем уровне в соответствии с постановлением Правительства РФ от 26.11.2015 № 1265, т. е. есть общий совокупный тариф все также составляет 30%, в том числе: 22 процента в ПФ РФ; 2,9 процента в ФСС России; 5,1 процента - в ФФОМС.

Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 18.

Таблица 18. Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнители	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.
Научный руководитель	28000	3360
Бакалавр	7061	847
Консультант по ЭЧ	22450	2694
Консультант СО	33240	3989
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	0,3	
ИТОГО:	30492,3	

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование графических материалов, оплата услуг связи, электроэнергии, транспортные расходы и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 5) \cdot k_{\text{нр}}, \quad (16)$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов $k_{\text{нр}}$ допускается взять в размере 16%.

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в таблице 19.

Таблица 19 . Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.			Примечание
	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3	
1. Материальные затраты НТИ	30 054,15	27 126,75	27 630,75	Табл 15
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	<u>115 496</u>	<u>115 496</u>	<u>115 496</u>	Табл. 16
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	90 751	90 751	90 751	Табл. 18
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	10 890	10 890	10 890	Табл. 19
5. Отчисления во внебюджетные фонды	30 492,3	30 492,3	30 492,3	Табл. 20
6. Затраты на научные и производственные командировки	-	-	-	-
7. Контрагентские расходы	-	-	-	-
8. Накладные расходы	44 429,352	43 960,968	44 041,608	16 % от суммы ст.1-7
9. Бюджет затрат НТИ	322 112,8	318 717,01	319 301,65	Сумма ст. 1-8

Как видно из таблицы 19, основные затраты НТИ для всех вариантов исполнения работы приходится на покупку специального оборудования для проведения НТИ.

5.3 Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической 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 финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп. } i} = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\text{max}}}, \quad (17)$$

где $I_{\text{финр}}^{\text{исп. } i}$ – 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 разгах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в разгах (значение меньше единицы, но больше нуля). Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (18)$$

где I_{pi} – интегральный показатель ресурсоэффективности для i -го варианта исполнения разработки;

a_i – весовой коэффициент i -го варианта исполнения разработки;

b_i^a, b_i^p – балльная оценка i -го варианта исполнения разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Результаты по расчету интегрального показателя ресурсоэффективности представлены в таблице 20.

Таблица 20. Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3
1. Повышение производительности	0,15	5	4	4
2. Энергоэкономичность	0,15	4	4	4

3. Достоверность	0,25	5	4	4
4. Простота использования	0,20	4	4	4
5. Надежность	0,25	5	3	3
ИТОГО:	1	4,65	3,75	3,75

$$I_{p \text{ исп.1}} = 5 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,15 + 5 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,20 + 5 \cdot 0,25 = 4,6;$$

$$I_{p \text{ исп.2}} = 4 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,20 + 3 \cdot 0,25 = 3,75;$$

$$I_{p \text{ исп.3}} = 4 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,15 + 4 \cdot 0,25 + 4 \cdot 0,20 + 3 \cdot 0,25 = 3,75.$$

Результаты эффективности разработки занесены в таблицу 21.

Таблица 21. Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3
1	Интегральный финансовый показатель	0,998	1	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности	4,65	3,75	3,75
3	Интегральный показатель эффективности	<u>4,66</u>	3,75	3,75
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	1	0,80	0,80
5	Конкурентоспособность (табл. 5)	<u>5,6</u>	4,2	4,6

Как видно из таблицы 21, наиболее эффективным исполнением можно считать первое, т.к. его интегральный показатель эффективности, а так же балл, оценивающий конкурентоспособность, выше чем для других исполнений.

Вывод: в результате проведенной работы была спроектирована и создана конкурентоспособная разработка, отвечающая современным требованиям в области ресурсоэффективности и ресурсосбережения.

Выводы

В ходе проведения НИР были получены следующие результаты:

1. предложена альтернатива ртутно-пленочному электроду для определения глутатиона в модельных растворах методом вольтамперометрии;
2. подобраны условия модификации УКЭ золотом и тозилатными солями арилдиазония для определения GSH в модельных растворах методом вольтамперометрии;
3. предложен механизм реакций реакции восстановления кислорода в растворе GSH на фоне сульфита натрия;
4. подобраны условия определения GSH на модифицированных УКЭ и сформулированы соответствующие рекомендации для его определения.

Список литературы

1. Глутатион [Электронный ресурс]. – Режим доступа [www.URL: http://lifebio.wiki](http://lifebio.wiki).
2. Strużńska L, Chalimoniuk M, Sulkowski G. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. *Toxicology* 212 (2-3): – 2005. – P.185-194.
3. F.D. Carvalho, F. Remiao, P. Vale, Glutathione and cysteine measurement in biological samples by HPLC with a glassy carbon working detector // *Biomed. Chromatogr.* – 1994. – Vol.8 – P. 134-136.
4. Green, R. M., Graham, M., O'Donovan, M. R., Chipman, J. K., and Hodges, N. J. (2006) Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity, *Mutagenesis*, 21, 383–390.
5. Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3217–3266.
6. Townsend, D.M., Tew, K.D., and Tapiero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 145–155.
7. Danyelle M. Townsend, Kenneth D. Tew, Haim Tapiero Department of Pharmacology, Fox Chase Cancer Center, 7701 Burholme Ave., Philadelphia, PA 19111, USA Faculté de pharmacie, Université de Paris, CNRS UMR 8612, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 94200 Chatenay Malabry, France. The importance of glutathione in human disease.
8. Deponte, M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830. – 2013. – P 3217–3266.
9. Pujari, G., Berni, A., Palitti, F., and Chatterjee, A. (2009) Influence of glutathione levels on radiation-induced chromosomal DNA damage and repair in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, 675, 23–28.

10. Roman Kand'ár, Pavla Žáková, Halka Lotková, Otto Kučerab, Zuzana Červinková. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. – 2007. – P. 1382–1387.
11. D.J. Reed, J.R. Babson, P.W. Beatty, A.E. Brodie, W.W. Ellis, D.W. Potter. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. – 1980. – P. 55-62.
12. André R.T.S. Araujo, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, José L.F.C. Lima. Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. – 2008. – P. 1511-1519.
13. Gopi Kalaiyarasan, Alam Venugopal Narendra Kumar, Chinnaiyah Sivakumar, James Joseph. Electro-generated reactive oxygen species at Au surface as an indicator to explore glutathione redox chemistry and quantification. *Electrochemistry Communications* 56. – 2015. – P. 29 – 33.
14. Patricia T. Leea, Luís M. Goncalvesb, Richard G. Compton. Electrochemical determination of free and total glutathione in human saliva samples. *Sensors and Actuators B* 221. - 2015. – P. 962 – 968.
15. Короткова Е.И. Дорожко Е. В. Исследование электрохимических свойств глутатиона методом вольтамперометрии. *Известия ВУЗов. Химия и химическая технология*. - 2010. -т. 53 -№ 2 -с. 35-38.
16. Wansong Zong*, Xiaoning Wang, Chuanxi Yang, Yonggang Du, Weijun Sun and Zhenzhen Xu. Unusual oxidation of glutathione existing the steric hindrance. *Biomedical Research* 27 (3). – 2016. – P. 934-937.
17. Г.В. Прохорова. Введение в электрохимические методы анализа. – 1991.
18. Метод. указ. к лаб. работам /; Сост. Б.М. Стифатов, В.В. Слепушкин, Ю.В. Рублинецкая. Самара, Самар. гос. техн. ун-т, – 2013. – P. 20 с.
19. Каталог продукции ООО «НПП «Томьаналит» [Электронный ресурс]. – Режим доступа [www.URL: http://www.tomanalyt.ru/ru/catalog/](http://www.tomanalyt.ru/ru/catalog/)

20. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЫШЬЯКА. Хустенко Л. А., Толмачева Т. П. Патент: RU(11) 2 354 961(13) С1. – 2007.
21. Studies on the Reaction of Sulfite with Proteins, Bailey&Cole, New York, 1959;
22. Флоринель-Габриель Баника. Химические и биологические сенсоры. Основы и применения. 2014. 880 стр. ISBN 978-5-94836-380-6
23. Вольтамперометрическое определение ряда лекарственных веществ на твердом и органо-модифицированном электродах. Кандидатская диссертация Мартынюк О. А. Томск, 2010.
24. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий.
25. ГОСТ 12.1.003–83. Шум. Общие требования безопасности. 01.07.1984.- М.: Стандартиформ, 2008. – 13 с; СН 2.2.4/2.1.8.566-96
26. ГОСТ Р12.1.019-2009 Система стандартов безопасности труда.
27. Технический регламент «О требованиях пожарной безопасности» № 123-ФЗ от 22 июля 2008 год
28. ГОСТ 12.1.038 – 82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
29. Технический регламент «О безопасности средств индивидуальной защиты» №1213-ФЗ от 24.12.2009;
30. Трудовой кодекс Российской Федерации (Собрание законодательства Российской Федерации, 2002, N 1 (ч. I), ст. 3; 2004, N 35, ст. 3607; 2006, N 27, ст. 2878; 2008, N 30 (ч. II), ст. 3616), ПРИКАЗ от 12 апреля 2011 г. N 302н
31. Постановление от 30 мая 2003 г. N 114 «О введении в действие ГН 2.1.6.1338-03»
32. ГОСТ 14262-78. Кислота серная особой чистоты. Технические условия
33. ГОСТ Р 51723-2001. Спирт этиловый питьевой 95%-ный. Технические условия