

Инженерная школа природных ресурсов  
 Направление подготовки: 18.03.01 Химическая технология  
 Отделение химической инженерии

### БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Тема работы
<b>Вольтамперометрическое определение холекальциферола в биологически-активных добавках</b>

УДК 577.161.2-047.44:664.022.3

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д5Б	Лукина Анастасия Алексеевна		

Руководитель ВКР

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

Консультант

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент	Дёрина К.В.	к.х.н.		

### КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

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

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Винокурова Г.Ф.	к.т.н., доцент		

### ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Михеева Е.В.	к.х.н., доцент		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
 федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего образования  
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов  
 Направление подготовки (специальность): 18.03.01 Химическая технология  
 Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:  
 Руководитель ООП  
 \_\_\_\_\_ Михеева Е.В.  
 (Подпись)    (Дата)    (Ф.И.О.)

**ЗАДАНИЕ**  
**на выполнение выпускной квалификационной работы**

В форме:

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

Студенту:

Группа	ФИО
2Д5Б	Лукиной Анастасии Алексеевны

Тема работы:

Вольтамперометрическое определение холекальциферола в биологически-активных добавках	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	3624/с от 08.05.2019

Срок сдачи студентом выполненной работы:

--	--

**ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:**

<b>Исходные данные к работе</b>	В качестве объекта исследования взять холекальциферол, разработать вольтамперометрическую методику определения; получение аналитического сигнала холекальциферола, подбор материалов слоя модификатора, оценка получаемых электродных поверхностей
<b>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</b>	Провести литературный обзор по тематике научно-исследовательской работы, в аналитической части описать использованное оборудование, представить методики проведения экспериментов; проанализировать полученные результаты, сделать заключение по работе.
<b>Перечень графического материала</b>	Графическое представление полученных результатов.

<b>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</b>	
<b>Раздел</b>	<b>Консультант</b>
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Рыжакина Татьяна Гавриловна
Социальная ответственность	Винокурова Галина Фёдоровна

<b>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</b>	
---	--

**Задание выдал руководитель / консультант:**

<b>Должность</b>	<b>ФИО</b>	<b>Ученая степень, звание</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
Профессор	Короткова Е.И.	д.х.н., доцент		
Ассистент	Дёрина К.В.	к.х.н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
2Д5Б	Лукина Анастасия Алексеевна		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
 федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего образования  
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Инженерная школа природных ресурсов  
 Направление подготовки (специальность): 18.03.01 Химическая технология  
 Уровень образования бакалавриат  
 Отделение химической инженерии  
 Период выполнения \_\_\_\_\_ (осенний / весенний семестр 2018 /2019 учебного года)

Форма представления работы:  
 бакалаврская работа

(бакалаврская работа, дипломный проект/работа, магистерская диссертация)

### КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН выполнения выпускной квалификационной работы

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
--	--

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
27.02.19	<i>Литературный обзор</i>	20
22.04.19	<i>Материалы, оборудование и используемые методики</i>	20
13.05.19	<i>Обсуждение результатов</i>	40
20.05.19	<i>Выводы</i>	20

**СОСТАВИЛ:**  
**Руководитель ВКР**

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

**Консультант**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Ассистент	Дёрина К.В.	к.х.н.		

**СОГЛАСОВАНО:**

**Руководитель ООП**

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

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА  
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСООБЪЕКТИВНОСТЬ И  
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>
2Д5Б	Лукиной Анастасии Алексеевне

<b>Школа</b>	<b>ИШПР</b>	<b>Отделение</b>	<b>Отделение химической инженерии</b>
<b>Уровень образования</b>	<b>Бакалавриат</b>	<b>Направление/специальность</b>	<b>Химическая технология</b>

**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 научного исследования с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.	Проведение предпроектного анализа. Определение целевого рынка и проведение его сегментирования. Выполнение SWOT-анализа проекта
2. Инициация научного проекта.	Определение целей и ожиданий, требований проекта. Определение заинтересованных сторон и их ожиданий.
3. Планирование процесса управления НИИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок.	Составление структуры работ и календарного плана проекта. Определение бюджета НИИ.
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности.	Проведение сравнительной оценки экономической эффективности научного исследования.

**Перечень графического материала:**

1. Оценка конкурентоспособности технических решений
2. Матрица SWOT
3. График проведения и бюджет НИИ
4. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИИ
5. Сравнительная эффективность разработки

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

**Задание выдал консультант:**

<b>Должность</b>	<b>ФИО</b>	<b>Ученая степень, звание</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
Доцент	Рыжакина Т. Г.	к.э.н.		

**Задание принял к исполнению студент:**

<b>Группа</b>	<b>ФИО</b>	<b>Подпись</b>	<b>Дата</b>
2Д5Б	Лукина Анастасия Алексеевна		

## ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2Д5Б	Лукиной Анастасии Алексеевне

Школа	ИШПР	Отделение (НОЦ)	Отделение химической инженерии
Уровень образования	Бакалавриат	Направление/специальность	Химическая технология

Тема ВКР:

Вольтамперометрическое определение холекальциферола в биологически-активных добавках	
<b>Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:</b>	
1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	<i>Объект исследования</i> – холекальциферол; <i>Прибор</i> – анализатор вольтамперометрический TA-Lab; <i>Методика</i> – определение холекальциферола методами вольтамперометрии и спектрофотометрии; <i>Рабочая зона</i> – научно-исследовательская лаборатория 2 корпуса НИ ТПУ; <i>Область применения</i> – фармацевтическая промышленность.
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<b>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</b> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.	– <i>Трудовой кодекс Российской Федерации" от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 01.04.2019);</i> – <i>ПНД Ф 12.13.1-03 Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения).</i>
<b>2. Производственная безопасность:</b> 2.1. Анализ выявленных вредных и опасных факторов 2.2. Обоснование мероприятий по снижению воздействия	2.1 <i>Выявление вредных факторов: токсичные вещества, используемые в работе; отклонение показателей микроклимата; превышение допустимого уровня вибрации; опасность от электрооборудования.</i> 2.2 <i>Мероприятия по снижению воздействия:</i> – <i>использование установок конденсирования;</i> – <i>использование звукоотражающих перегородок;</i> – <i>использование общего и местного освещения, белое покрытие стен;</i> – <i>индивидуальные средства защиты;</i> – <i>ознакомление и соблюдение инструкции по электробезопасности;</i> – <i>профилактические мероприятия.</i>
<b>3. Экологическая безопасность:</b> – анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); – анализ воздействия объекта на гидросферу	– <i>Вредное воздействие преимущественно распространяется:</i> – <i>на гидросферу (загрязнение сточных вод в результате утилизации отходов);</i>

<p>(сбросы);          – анализ воздействия объекта на литосферу (отходы);          – разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды.</p>	<p>– на атмосферу (использование в работе легкокипящих растворителей).</p>
<p><b>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</b>          – 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.</p>	<p>– Перечень возможных ЧС: пожар, взрыв, поражение электрическим током, землетрясения, ураган, разряды атмосферного электричества.          – Наиболее типичная ЧС – пожар, возникающий вследствие неисправности электрооборудования.</p>
<p><b>Дата выдачи задания для раздела по линейному графику</b></p>	

**Задание выдал консультант:**

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Винокурова Г.Ф.	К.Т.Н., доцент		

**Задание принял к исполнению студент:**

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2Д5Б	Лукина Анастасия Алексеевна		

## ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ ПО ООП

Код результата	Результат обучения
<i><b>Профессиональные компетенции</b></i>	
P1	Применять знания в области современных химических технологий для решения производственных задач
P2	Ставить и решать задачи производственного анализа, связанные с созданием и переработкой материалов с использованием моделирования объектов и процессов химической технологии
P3	Разрабатывать новые технологические процессы, проектировать и использовать новое оборудование химической технологии, проектировать объекты химической технологии в контексте предприятия, общества и окружающей среды
P4	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в области современных химических технологий
P5	Внедрять, эксплуатировать и обслуживать современное высокотехнологичное оборудование, обеспечивать его высокую эффективность, выводить на рынок новые материалы, соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химико-технологическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды
P6	Применять базовые и специальные, математические, естественнонаучные, социально-экономические и профессиональные знания в профессиональной деятельности
<i><b>Универсальные компетенции</b></i>	
P7	Демонстрировать знания социальных, этических и культурных аспектов профессиональной деятельности
P8	Самостоятельно учиться и непрерывно повышать квалификацию в течение всего периода профессиональной деятельности
P9	Активно владеть иностранным языком на уровне, позволяющем разрабатывать документацию, презентовать результаты профессиональной деятельности
P10	Эффективно работать индивидуально и в коллективе, демонстрировать лидерство в инженерной деятельности и инженерном предпринимательстве, ответственность за результаты работы и готовность следовать корпоративной культуре организации



## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа объемом 112 с., 20 рисунков, 35 таблиц, 55 источников, 1 приложение.

**Ключевые слова:** холекальциферол, вольтамперометрическое определение, модифицированные электроды, витамин Д, биологически-активные добавки, спектрофотометрия, БАД.

**Объектом исследования** является холекальциферол в составе биологически-активных добавок.

**Цель работы:** разработать вольтамперометрическую методику количественного определения холекальциферола в составе биологически-активных добавок.

**В результате исследования** разработана методика определения холекальциферола в БАД и подобраны рабочие условия анализа: материал рабочего электрода, состав модифицирующего слоя, условия нанесения модификатора на рабочий электрод, условия подготовки образцов, состав фонового электролита, рН фонового электролита, скорость развертки потенциала.

**Область применения:** контроль качества биологически-активных добавок, фармацевтическое производство.

### **Степень внедрения:**

- Дёрина К. В. , Лукина А. А. Модифицированные производными гликолурила углеродсодержащие электроды для количественного определения холекальциферола // Актуальные вопросы химической технологии и окружающей среды: сборник материалов VII Всероссийской конференции с международным участием, Чебоксары, 19-20 Апреля 2018. - Чебоксары: ЧГУ, 2018 - С. 101
- Lukina A. A. , Ismailov D. V. , Pjin A. P. , Dyorina K. V. , Korotkova E. I. Voltammetric Sensing System for the Detection of Cholecalciferol Based on the

Ni-Bisurea-Pyrographite Composite // Key Engineering Materials . - 2018 - Vol. 769. - p. 250-255

- Лукина А.А., Дёрина К.В. Вольтамперометрическое определение холекальциферола // Ломоносов - 2019: материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Москва, 8-12 Апреля 2019. - Москва: МАКС Пресс, 2019 - С. 33
- А.А. Лукина Определение содержания витамина D3 в различных лекарственных формах // Химия и химическая технология в XXI веке : материалы XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва студентов и молодых ученых (Томск, 20–23 мая 2019 г.) / Томский политехнический университет. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2019. – с. 255

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВКР – выпускная квалификационная работа

УКЭ - углеродсодержащий композитный электрод

ХСЭ – хлоридсеребряный электрод

МЭ – модифицированный электрод

НЧ – наночастицы

ДАГУДФК – 2,6-диацетил- 2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион-дифосфоновая кислота

ГЦФ – гексацианоферрат железа (II/III)

БАД – биологически-активная добавка

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

ВА – вольтамперограмма

ЦВА – циклическая вольтамперограмма

НИР – научно-исследовательская работа

НТИ – научно-техническое исследование

ЧС – чрезвычайные ситуации

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	15
Глава 1. Литературный обзор .....	18
1.1 Физические и химические свойства холекальциферола .....	18
1.2 Метаболизм витамина D <sub>3</sub> и пути реализации его основных функций .....	19
1.3 Биологические функции витамина D в организме .....	22
1.4 Методы определения витамина D <sub>3</sub> .....	24
1.4.1 Биологические методы определение витаминов группы D .....	24
1.4.2 Оптические методы определения холекальциферола .....	25
1.4.3 Хроматографические методы анализа витаминов D .....	27
1.4.4 Электрохимическое определение холекальциферола .....	32
1.4.5 Прочие методики определения холекальциферола .....	34
Глава 2. Аппаратура и методика эксперимента.....	36
2.3 Методика определения холекальциферола методом вольтамперометрии	40
2.4 Методика исследования модифицированных электродных поверхностей .....	42
2.4.1 ИК-спектроскопия образцов электродных поверхностей .....	43
2.4.2 Методика микроскопического исследования электродных поверхностей .....	44
2.4.3 Оценка величины электроактивной поверхности методом вольтамперометрии .....	45
2.4.4 Методика получения и характеристика применяемых наночастиц .....	45
2.5 Спектрофотометрическая методика определения холекальциферола .....	47
Глава 3. Обсуждение результатов .....	49
3.1 Влияние различных факторов на процесс электроокисления холекальциферола на МЭ .....	49

3.1.1 Влияние природы модифицирующего слоя.....	49
3.1.2 Влияние компонентов пробы.....	52
3.1.3 Влияние рН фонового электролита .....	53
3.1.4 Влияние скорости развертки потенциала.....	54
3.1.5 Влияние матрицы объекта анализа.....	56
3.2 Определение содержания холекальциферола в различных объектах вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами .....	58
3.3 Метрологические характеристики вольтамперометрической методики ..	65
Глава 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение .....	72
4.1.2. Анализ конкурентных технических решений.....	73
4.1.3. SWOT-анализ.....	74
4.2 Определение возможных альтернатив проведения НИР .....	78
4.3.1 Структура работ в рамках научного исследования .....	79
4.3.2 Определение трудоемкости выполнения работ .....	80
4.3.3. Разработка графика проведения научного исследования.....	83
4.4. Бюджет научно-технического исследования (НТИ) .....	6285
4.4.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ .....	6487
4.4.3 Расчет основной заработной платы .....	6588
4.4.4 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления).....	90
4.4.5 Накладные расходы .....	90
4.4.6 Формирование бюджета затрат НТИ .....	90
4.5. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования .....	91
Глава 5. Социальная ответственность.....	94

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности .....	94
5.2 Профессиональная социальная ответственность.....	96
5.3 Экологическая безопасность .....	100
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях .....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	111

## ВВЕДЕНИЕ

Витамины группы D относятся к классу биологически активных соединений стероидной природы и являются одним из основных регуляторов гомеостаза кальция в организме. Основными представителями группы D являются витамины D<sub>2</sub> (эргокальциферол) и D<sub>3</sub> (холекальциферол), обладающие сходным механизмом воздействия в организме человека, однако отличающимся по его интенсивности [1].

Они используются для лечения заболеваний, связанных с недостатком кальция, в частности, рахита, остеопороза, остеомалации. Современные исследования подтверждают факты о связи гиповитаминоза D<sub>3</sub> и такими явлениями и заболеваниями, как мышечная усталость, остеоартрит, рак (молочной железы, почек, предстательной железы, колоректальный и др.), сердечно-сосудистые заболевания (инсульт, сердечная недостаточность, гипертензия) и др [2].

Однако, по результатам многочисленных эпидемиологических исследований, на сегодняшний день существует острая проблема дефицита витамина D, поскольку почти у половины населения всего мира наблюдается гиповитаминоз D [3]. Для оценки оптимального содержания данного витамина в организме человека в 2011 году Эндокринологическим обществом США были сформированы Клинические рекомендации [4], согласно которым нижний порог нормального содержания витамина D в сыворотке крови определяется как 75 нмоль/л или 30 нг/мл.

Малое содержание витаминов группы D в природных источниках является основной причиной гиповитаминоза, в связи с чем, возникает необходимость дополнительного введения их в организм в виде синтетических препаратов. Последствия гиповитаминоза D проявляются в виде различных заболеваний, о которых упоминалось ранее.

Остеопороз относят к хроническим прогрессирующим обменным заболеваниям. Данное заболевание характеризуется высокой ломкостью

костей, их низкой массой и ухудшением структуры костной ткани. Одним из симптоматических проявлений заболевания являются переломы, например, переломы шейки бедра. Согласно прогнозам Всемирной организации здравоохранения к 2050 году произойдет трехкратное увеличение числа переломов бедра относительно уровня 1990 г (1,7 миллионов человек) [5].

Рахит также является показателем недостатка кальция и фосфора в организме. Этому заболеванию подвержены дети грудного и раннего возраста, так как именно в этот период происходит активное развитие организма. Оно сопровождается расстройством костеобразования и недостаточной минерализацией костей. Если же зрелая кость недостаточно минерализована, то это заболевание называется остеомалацией.

Наряду с проблемой недостатка витамина D<sub>3</sub> в организме существует проблема его переизбытка. Холекальциферол является жирорастворимым соединением и, как следствие, имеет свойство накапливаться в организме, а, значит, происходит накопление и кальция, что может провоцировать опасные последствия. Например, серьезные повреждения почек (образование камней, нефрит, почечную недостаточность), отложение солей кальция во внутренних органах. При хроническом переизбытке витамина D<sub>3</sub> наблюдается деминерализация костной ткани, что также приводит к остеопорозу. Кроме того, переизбыток холекальциферола в организме сопровождается процессами закупоривания элементов сердечно-сосудистой системы (сосудов и клапанов), вследствие чего развивается атеросклероз.

В связи с чем, актуальной представляется задача контроля содержания витамина D<sub>3</sub>, как в лекарственных препаратах, так и в биологических жидкостях человека.

На сегодняшний день существуют различные методики определения данного соединения в биологических и фармацевтических объектах.

Определение витамина D<sub>3</sub> хроматографическими методами достаточно трудоемкий процесс, требующий длительной пробоподготовки и отличающийся высокой стоимостью оборудования.



Применение электрохимических методов анализа для определения витамина D<sub>3</sub> отличается высокой экспрессностью и позволяет упростить процесс пробоподготовки.

Данная работа направлена на определение данного витамина вольтамперометрическим методом.

**Цель работы:** определение содержания холекальциферола в модельных средах методом вольтамперометрии.

Для достижения данной цели будут решаться следующие **задачи:**

1. Подбор материала рабочего электрода
2. Подбор модификатора
3. Подбор условий нанесения слоя модификатора на поверхность рабочего электрода
4. Подбор электрохимических условий определения вещества
5. Исследование кинетических и термодинамических параметров процесса.

#### **Научная новизна**

Разработана методика количественного определения холекальциферола в составе БАД разной лекарственной формы. Подобраны условия проведения электроокисления холекальциферола на модифицированном углеродсодержащем композитном электроде в водной фазе. Разработана методика пробоподготовки анализируемых объектов исходя из особенностей лекарственной формы.

#### **Практическая значимость**

Разработанная методика вольтамперометрического определения холекальциферола может быть использована для количественного определения данного вещества в различных БАД и применяться в лабораторной практике фармацевтической отрасли.

## Глава 1. Литературный обзор

### 1.1 Физические и химические свойства холекальциферола

Холекальциферол представляет собой бесцветный порошок с молекулярным весом 385 г/моль, нерастворимый в водных средах. Относится к классу жирорастворимых витаминов. Стероидный гормон состава  $C_{27}H_{44}O$ , существует в кристаллическом виде, температура плавления которого  $83\text{ }^{\circ}C$  [1]. На рисунке 1 представлена структурная формула вещества. Холекальциферол является прекурсором кальцитриола.

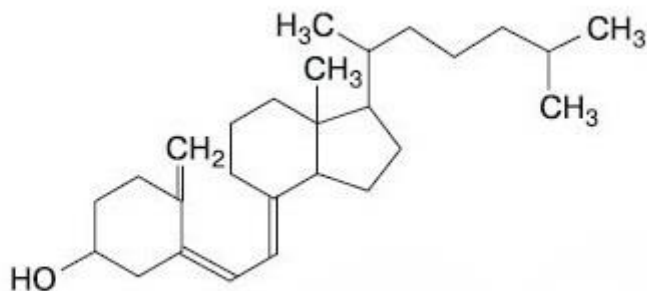


Рисунок 1 – Структурная формула холекальциферола

Кальциферолы (витамины группы D) неустойчивы к действию ультрафиолетового облучения. Происходящий при этом фотохимический процесс необратим. Реакция фотоизомеризации кальциферолов приводит к образованию супрастерина-I, супрастерина-II и токсистерина. Холекальциферол чувствителен к повышенным температурам и неустойчив при комнатной температуре. Нагревание при  $200\text{ }^{\circ}C$  без доступа воздуха приводит к разложению кальциферолов с образованием пирокальциферола-3 и изопирокальциферола-3 [1].

Благодаря наличию в своей структуре гидроксильной группы кальциферолы активно вступают в реакции этерификации с образованием сложных эфиров. Также кальциферолы окисляются кислородом воздуха, в

результате образуются различные продукты. Кальциферолы устойчивы к щелочам, но чувствительны к действию кислот.

Холекальциферол окисляется трет-бутилатом аммония в смеси с бензолом и ацетоном и образует «изокетовитамин D<sub>3</sub>». При действии хлоранила холекальциферол подвергается дегидрогенизации (процесс дегидрирования).

Витамин D<sub>3</sub> (имеющий 5,6-цис-конфигурацию) при каталитическом участии йода или эозина (BF<sub>3</sub>) в нейтральной или щелочной среде превращается в 5,6-транс-холекальциферол. Который, в свою очередь, может быть подвергнут *транс*-, *цис*-фотоизомеризации при действии ультрафиолетового света с иверсией в холекальциферол(I) [1].

Существует ряд цветных качественных реакций на кальциферолы. Одна из них: взаимодействие холекальциферола с раствором брома в хлороформе (соотношение 1:60). Цвет раствора постепенно приобретает зеленовато-голубое окрашивание.

## **1.2 Метаболизм витамина D<sub>3</sub> и пути реализации его основных функций**

Витамины группы D относятся к группе жирорастворимых витаминов. Холекальциферол (витамин D<sub>3</sub>) представляет собой общепринятую форму витамина D, синтезирующуюся у животных. Эргокальциферол (витамин D<sub>2</sub>) представляет собой форму, которая синтезируется главным образом в растительных источниках, например, в грибах. В немногочисленных небогатых продуктах питания витамин D присутствует в очень ограниченном количестве, а самостоятельная выработка витамина в организме человека возможна только при определенных условиях. Во время пребывания на солнце под воздействием ультрафиолетовых лучей, падающих под определенным углом, находящийся в коже человека 7-дегидрохолестерол (7-DHC) трансформируется в

провитамин D<sub>3</sub> (PRED3) [6]. Окончательный этап биотрансформации провитамина осуществляется под воздействием тепла.

Витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> имеют сходное химическое строение и этапы метаболизма в организме. Холекальциферол представляет собой неактивную биологически инертную форму витамина. Его активация и превращение в форму D-гормона (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) осуществляется посредством специфического метаболизма в организме, который заключается в двух этапах ферментативного гидроксирования [7].

Первый этап биотрансформации в 25-гидроксихолекальциферол происходит в печени под действием фермента 25-гидроксилазы. Данный метаболит также имеет второе название кальцидиол по наличию двух гидроксигрупп в структуре.

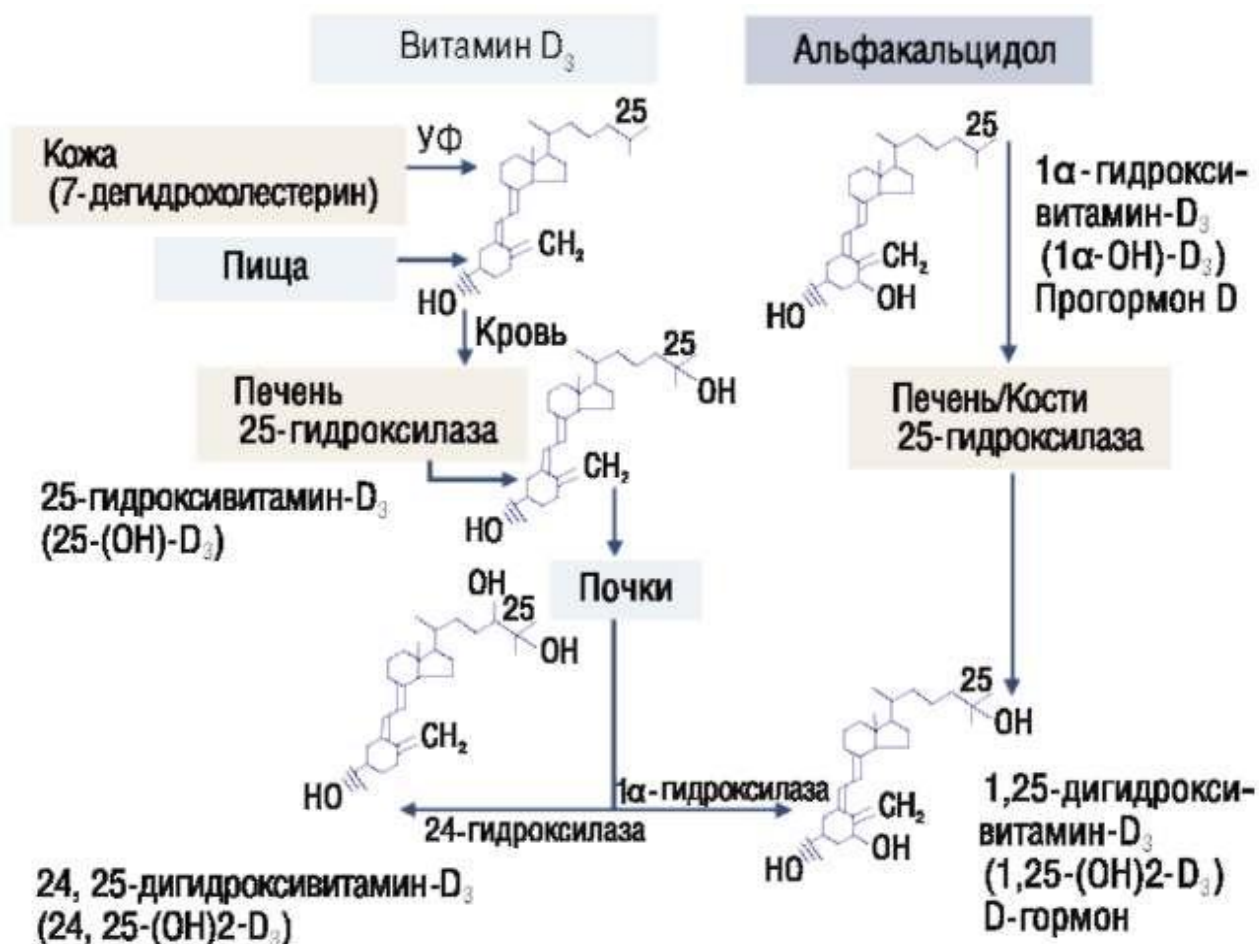


Рисунок 2 – Схема метаболизма витамина D и альфакальцидиола [8]

Вторая реакция гидроксирования происходит преимущественно в почках под действием другого фермента – 1α-гидроксилазы. Результатом

второго этапа является синтез физиологически активного 1,25-дигидроксивитамина D, или так называемого D-гормона [8]. Другое название метаболита по аналогии с предыдущим – кальцитриол. Свое биологическое воздействие кальцитриол начинает уже в процессе всасывания в тонком кишечнике, путем взаимодействия со специфическими рецепторами витамина D (так называемые, VDR), в результате чего усиливается кишечная абсорбция кальция, и с рецепторами остеобластов – регулируется фосфорно-кальциевый метаболизм. Для предотвращения появления избыточного содержания кальция и фосфора в организме существует обратная связь в виде фермента 24-гидроксилазы, активность которой возрастает при достижении повышенной или нормальной концентрации данных ионов в сыворотке крови [8]. Действие 24-гидроксилазы заключается в подавлении синтеза активной формы кальцитриола путем превращения 25(OH)D в альтернативный метаболит — 24,25(OH)<sub>2</sub>D, обеспечивающий фиксацию кальция и фосфора в костной ткани.

Процесс регуляции синтеза в почках 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> осуществляется при непосредственном участии циркулирующего в крови паратиреоидного гормона (ПТГ), посредством изменения активности 1α-гидроксилазы. На концентрацию ПТГ в свою очередь по механизму жесткой обратной связи оказывает влияние, как уровень данного метаболита, так и концентрация ионизированного кальция в плазме крови. Эта отрицательная обратная связь замыкается ингибированием 1α-гидроксилазы высокими концентрациями самого кальцитриола и фактора роста фибробластов 23 (FGF23).

Некоторые ткани организма способны к самостоятельной выработке для локальных целей активного метаболита 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. На интенсивность внутриклеточного синтеза кальцитриола преимущественно оказывает влияние уровень 25(OH)D<sub>3</sub> в окружающих тканях, а не концентрация 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в системном кровотоке [9].

### 1.3 Биологические функции витамина D в организме

Основной и наиболее важной функцией, выполняемой витамином D в организме, является регулирование обмена кальция и фосфора. Эти процессы протекают в два этапа, а именно: поступление иона в слизистую оболочку и его переход в серозную оболочку. Оба этапа находятся под контролем активной формы витамина D<sub>3</sub> – кальцитриола, который специфически действует как на структуру, так и свойства липопротеидной мембраны микроворсинок слизистой ткани кишечника, повышая её проницаемость для пассивно диффундирующего кальция и одновременно увеличивая проникающую и транспортную функции кальциевого катиона [6,7].

Процесс минерализации костных тканей в организме осуществляется через активацию кальцитриолом процессов абсорбции ионов кальция и фосфора в кишечнике, что способствует поддержанию необходимых уровней этих ионов в крови. Этот процесс оказывает непосредственное влияние в случае необходимости на рост и регенерацию костных тканей, поддерживая работу остеобластов и остеокластов, и предотвращает появление различных костных заболеваний, в частности, гипокальциемической тетании.

Многие исследователи сходятся во мнении о том, что функции витамина D в организме чрезвычайно широки и не ограничиваются только поддержанием кальций-фосфорного обмена [10].

Доказано, что рецепторы VDR расположены во многих клетках и тканях различных систем организма, например, это сердечно-сосудистая система, репродуктивные органы, головной мозг и многие другие. Более того в функциональный ряд некоторых из этих тканей входит возможность локального синтеза 1 $\alpha$ -гидроксилазы для выработки и накопления D-гормона. В результате происходит локальное повышение концентрации кальцитриола, который расходуется непосредственно для покрытия собственных нужд без увеличения его концентрации в общем кровотоке [11].

До некоторого времени действие витамина D на иммунную систему не было изучено, однако сегодня современные исследования подтверждают этот факт, поскольку VDR-рецепторы присутствуют практически во всех клетках данной системы. Более того, они имеют собственную 1 $\alpha$ -гидроксилазу. В частности, это активированные лимфоциты, мононуклеары, антиген представляющие клетки и дендритные клетки, на которые по современным данным активная форма витамина оказывает прямое действие, включая недифференцированные и инактивированные T-хелперы и T-регуляторы. Кроме того, одной из функций витамина D в организме является предотвращение чрезмерного выброса провоспалительных цитокинов, модулируя ответ макрофагов и влияя тем самым на скрытые воспалительные процессы [12].

Вот еще несколько примеров внескелетных эффектов витамина D [13]:

- влияние на процесс обновления волосяных фолликулов в коже через рецептор VDR;
- влияние на сердечно-сосудистую систему посредством повсеместного распространения рецепторов и ферментов, необходимых для процессов метаболизма витамина D, в артериальных сосудах, сердце и практически всех клетках и тканях, которые, так или иначе, влияют или связаны с проявлениями патогенеза заболеваний сердца и кровеносной системы;
- влияние на когнитивные функции через локализованные в головном мозге рецепторы и аналогично иммунной системе локализации собственных ферментов. Снижение риска развития когнитивных расстройств, например, такого распространенного заболевания, как деменция, посредством интенсификации фагоцитоза амилоидных бляшек и регуляции нейротрофинов;
- влияние на течение беременности и репродуктивное здоровье посредством сосредоточения VDR и локализованных источников 1 $\alpha$ -гидроксилазы в тканях репродуктивных органов – яичниках, матке, плаценте, яичках и гипофизе [14].

## **1.4 Методы определения витамина D<sub>3</sub>**

Актуальность определения витаминов группы D, и в частности, холекальциферола, обусловлена как целями клинического анализа (мониторинг содержания аналита в биологических жидкостях пациента), так и в целях контроля препаратов на фармацевтическом производстве. Несмотря на то, что витамины группы D являются очень сложными аналитами, на сегодняшний день имеется множество методов их определения, которые можно объединить в несколько больших групп: биологические методы, оптические методы, хроматографические методы, электрохимические.

### **1.4.1 Биологические методы определение витаминов группы D**

В основе данных методов лежит сравнение исследуемого образца с международным стандартом, который представляет собой раствор холекальциферола в каком-либо растительном масле (чаще всего, оливковое) с содержанием активной субстанции 0,025 мкг/мл или 1 МЕ. Также в данной группе методов используются различные биосенсоры. В частности, в работе [15] использовались два метода: плазмонный резонанс и электрохимический биосенсор для обнаружения связи 25-ОН-витамина D. Авторами был изготовлен иммуносенсор, в основе которого лежало применение плазмонного резонанса. За счет применения антитела к витамину D осуществлялось прямое определение его содержания по связи 25-ОН и косвенное определение с помощью связующего белка. Также был изготовлен электрохимический биосенсор на основе модифицированного 4-ферроценилметил-1,2,4-триазаолин-3,5-дионом золотого электрода, изготовленного методом трафаретной печати.



## 1.4.2 Оптические методы определения холекальциферола

**УФ-спектрофотометрия.** Данный метод анализа позволяет определять холекальциферол в различных растворителях путем регистрации интенсивности поглощения от длины волны падающего излучения. Максимум поглощения наблюдается при 265 нм, удельный показатель поглощения в среде этанола равен  $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 485$  [16]. Спектрофотометрический анализ может быть эффективно применен для решения простых аналитических задач. Вследствие того, что позволяет работать исключительно в простых, чаще всего, однокомпонентных, матрицах, не содержащих других аналитов [17]. Данный метод хорошо комбинируется с хроматографическими методами анализа, которые позволяют устранить мешающие и искажающие результат факторы посредством разделения исходной матрицы. Тем не менее, в ряде случаев не менее эффективны иные методики, позволяющие отделить холекальциферол от мешающих компонентов, в частности, посредством омыления. Но применение подобных операций сопровождается использованием реактивов и повышением температуры, что может привести к деструкции или изомеризации части витамина.

**ИК-спектроскопия.** Методы количественного определения с помощью инфракрасной спектроскопии отличаются высокими погрешностями и на практике малоприменимы. В большинстве случаев ИК-спектроскопию используют для подтверждения подлинности биологически активных соединений. В частности, разработанные на данный момент методики определения холекальциферола относятся к качественному анализу и позволяют лишь обнаружить его наличие, но не выявить содержание. Авторы [18] сообщали о количественном анализе эргокальциферола в смеси, содержащей 3 родственных соединения, который включал предварительное бромирование и нитрование образцов с последующей регистрацией ИК-спектров в интервале  $750\text{-}900\text{ см}^{-1}$ . Также авторами [19] предложена

идентификация витамина D<sub>3</sub> в водных растворах. Данная методика позволяет провести экспресс оценку наличия холекальциферола в обогащенных сахаристых кондитерских изделиях.

**Колориметрические методы.** В основу данной группы методов положены цветные реакции холекальциферола с последующим определением интенсивности поглощения полученных растворов. Чаще всего в данной группе методов используется способность кальциферолов реагировать с хлоридом сурьмы(III) в среде хлороформа с образованием окрашенного комплекса с дальнейшим измерением его поглощения при 500 нм. Чувствительность указанного метода превышает чувствительность УФ-спектрофотометрического определения примерно в 4 раза. Впоследствии оригинальная методика была усовершенствована добавлением ацетилхлорида в реакционную смесь, что повысило скорость появления окраски и устойчивость образовавшегося комплекса, и применением дихлорэтилена в качестве растворителя для повышения устойчивости реагента [20]. Наряду с реакцией с хлоридом сурьмы(III), известны другие цветные взаимодействия [18] – серная кислота-фурфурол, хлорная кислота-анисовый альдегид, соляная кислота-тетрахлорметан, трифторуксусная кислота-пероксид водорода и другие. Применение колориметрических методик сопряжено со сложной пробоподготовкой, поэтому традиционно предпочтение отдается другим методам.

**Масс-спектрометрия** – метод исследования вещества путем определения отношения массы к заряду и количества заряженных частиц, образующихся при том или ином процессе воздействия на вещество. На сегодняшний день имеется большое количество методик определения холекальциферола при помощи масс-спектрометрии. Можно сказать, что самыми первыми разработчиками в указанной области были Окано и др. и Халкета и др. [18]. Первая группа занималась масс-спектрометрическим детектированием в сочетании с газожидкостной хроматографией продуктов облучения 7-дегидрохолестерина, полученного из кожи крыс, вторая –

детектированием гидроксированных метаболитов. Масс-спектрометрическим методом анализа в присутствии мешающих компонентов – жирорастворимых витаминов – занимались Цукида и Сакаи [18].

**Поляриметрия.** Оптическая активность холекальциферола и его гомологов является основанием использования указанных методов анализа. Поляриметрические методики часто используются для оценки подлинности фармацевтических субстанций, а также для определения степени их чистоты, что активно применяется и для холекальциферола. В частности, данный метод рекомендует Европейская Фармакопея [21]. Оценка чистоты и подлинности осуществляется по показателю удельного вращения, который для 0,8%-ного спиртового раствора холекальциферола при длине кюветы 1 дм находится в интервале  $[\alpha]_D^{20} = \text{от } + 105^\circ \text{ до } + 112^\circ$ . Главным недостатком поляриметрии является ее низкая селективность, поскольку показатели удельного вращения для некоторых веществ могут находиться в схожих интервалах или даже совпадать. Таким образом, совместное определение в одной смеси изомеров без их предварительного разделения крайне затруднено.

### 1.4.3 Хроматографические методы анализа витаминов D

**Колоночная хроматография** являлась первым методом, используемым для предварительного разделения смеси различных компонентов, включающих холекальциферол, для дальнейшего детектирования. Тем не менее, сегодня наиболее предпочтительны иные хроматографические методики, такие как тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография. Наиболее применим метод Мулдера, который включает в себя несколько последовательных стадий [18]:

- хроматографирование экстагированного и подверженного гидролизу витамина D в виде раствора в петролейном эфире на колонке с оксидом алюминия, обработанным фосфатом, в основном с целью отделения витамина D от больших количеств витамина E;

- последовательное элюирование 8 %-ным раствором диэтилового эфира и 30 %-ным раствором диэтилового эфира в петролейном эфире для окончательного удаления витамина Е;
- распределительное хроматографирование с целью отделения полимеров витамина А;
- элюирование изооктаном или полиэтиленгликолем 600 на колонке, заполненной смесью целита 545;
- элюирование бензолом витамина D на колонке с деактивированным гранулированным флорексом с целью удаления последних следов продуктов разложения витамина А и полиэтиленгликоля 600.

**Тонкослойная хроматография.** Одним из наиболее часто используемых экспресс методов разделения смесей и отделения витаминов D от других жирорастворимых биологически активных соединений, в том числе от витаминов А и Е, является тонкослойная хроматография (ТСХ). Обзор на наиболее популярные методики представлен на рисунке 3.

Разделяемые соединения	Адсорбционный слой	Растворитель (элюент)	Обнаружение (реагент)
Витамины D <sub>2</sub> , А и Е	Оксид алюминия	Хлороформ, тетрахлорид углерода и т.п.	Хлорная кислота, серная кислота, хлорид сурьмы(III)
Витамин D <sub>2</sub> в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — диэтиловый эфир (4:1)	Серная кислота
Витамины D, А и Е	Оксид алюминия	Хлороформ	Хлорид сурьмы(III)
Витамин D <sub>2</sub> и D <sub>3</sub> (эфиры жирных кислот)	Силикагель + AgNO <sub>3</sub>	Гексан — бензол (1:1) или (2:1)	Родамин G в слое
Витамин D в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — этилацетат (3:1), циклогексан-диэтиловый эфир (1:1)	Серная кислота, хлорид сурьмы (III), хлорид сурьмы(V)
Витамин D <sub>3</sub> в лекарственных препаратах	Оксид алюминия	Хлороформ	УФ
Витамины D, А и Е	Силикагель, оксид алюминия	Бензол — петролейный эфир (4:1), толуол — метилэтилкетон (99:1) и др.	Хлорная кислота, серная кислота, хлорид сурьмы(V)
Витамины D, А и Е	Силикагель + полиэтиленгликоль	Петролейный эфир — бензол (1:1)	УФ
Витамин D <sub>3</sub> , примеси, продукты разложения	Силикагель	Хлороформ или дихлорметан	Серная кислота, хлорид сурьмы (III)
Витамины D, А и Е и стерины	Силикагель + AgNO <sub>3</sub>	Хлороформ — ацетон (9:1)	Флуоресцин
Витамин D <sub>2</sub> и др. витамины	Силикагель	Бензол — петролейный эфир — уксусная кислота (35:65:1)	Фосфорномолибденовая кислота, KMnO <sub>4</sub> — Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Витамины D <sub>2</sub> , А и Е в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — диэтиловый эфир (4:1)	Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> — NH <sub>3</sub>
Витамин D в препаратах поливитаминов	Силикагель	Гексан — этилацетат (4:1)	УФ
Витамин D <sub>2</sub> и стерины	Кизельгур	Циклогексан — этилацетат (199:1)	Фосфорномолибденовая кислота
Витамин D в лекарственных препаратах	Силикагель	Циклогексан — этилацетат (1:1)	УФ

Рисунок 3 – Существующие методики разделения витаминов группы D и родственных соединений методом ТСХ [18]

Как видно из рисунка, наиболее предпочтительным адсорбентом в отделении витаминов группы D является силикагель. Удобно применять готовые пластинки силуфол в системах хлороформ – метанол (96:4 или 90:10), хлороформ, циклогексан – эфир (1:1), бензол – ацетон (9:1), гексан – бензол (1:1 или 2:1), ацетон – вода (4:1). Для последующего выявления пятен, принадлежащих кальциферолам, используют чаще всего раствор хлорида сурьмы(III) в уксусной кислоте. Поскольку процесс разделения может быть сопряжен с разложением идентифицируемого соединения в виду его малой устойчивости и последующих искажений в количественных результатах, существуют определенные правила работы при анализе витаминов D методом ТСХ [18]:

- 1) работа при температурах ниже комнатной;
- 2) отсутствие воздействия прямых солнечных лучей, в случае если это необходимо, минимальная продолжительность облучения;
- 3) введение в растворитель веществ-антиоксидантов – трилон Б 0,05%, бутилокситолуол 0,002% и др.;
- 4) высокий класс чистоты растворителей;
- 5) незамедлительное внесение пластинки с помещенными каплями образцов в хроматографическую камеру без предварительного высушивания;
- 6) детектирование и элюирование разделенных пятен без предварительного испарения растворителя.

**Газовая хроматография.** Для определения витаминов группы D газовая хроматография (ГХ) не так популярна вследствие высокой термической неустойчивости и низкой летучести аналита. Однако методики ГХ все равно существуют, и их принято разделять на две большие группы: без применения предобработки и с предварительной химической обработкой (чаще всего это предварительная изомеризация). Наиболее часто применимыми являются методики первой группы. Их суть сводится к термической циклизации витамина в пирокальциферол или изопирокальциферол в зоне испарителя хроматографа и их последующего

детектирования. В результате получаются двойные пики, отношение которых не зависит от экспериментальных условий (температуры и т.д.) в широком интервале. В конечном итоге сумма площадей пиков или площадь главного пика хорошо коррелирует с исходной концентрацией витаминов D.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** На сегодняшний день ВЭЖХ является самым быстрым и селективным методом хроматографии и благодаря этому широко применяется в решении различных аналитических задач, касающихся, в том числе, определения витаминов группы D. Объясняется это рядом преимуществ, которыми обладает ВЭЖХ, а именно:

а) высокая разрешающая способность ВЭЖХ – селективное разделение изомеров и метаболитов;

б) отсутствие длительной пробоподготовки в виде предварительного разделения от подобных соединений или значительное сокращение ее продолжительности;

в) отсутствие предварительной дериватизации;

г) отсутствие химического видоизменения и разрушения структуры аналита по сравнению с ГХ и ТСХ;

д) высокая чувствительность последующего детектирования на УФ-детекторе вследствие высокого значения молярного коэффициента поглощения аналита ( $\epsilon = 18461 \text{ м}^2/\text{моль}$ ) при длине волны  $\lambda = 265 \text{ нм}$ , предел обнаружения 1 нг/мл [18].

Предложен [22] ВЭЖХ метод определения витаминов группы D в пищевых продуктах с использованием внутреннего стандарта и различных регламентированных вариантов подвижных фаз как для нормально-фазовой, так и для обращенно-фазовой ВЭЖХ. Указанная методика включает в себя последовательные этапы гомогенизации пробы, омыление водно-этанольным раствором с добавлением антиоксиданта (аскорбиновая кислота) в колбе с обратным холодильником, экстракции смесью растворителей (от двух до пяти раз), концентрировании экстракта при пониженном давлении и

температуре не выше 40 °С, подготовка раствора для определения, градуировка хроматографических систем, анализ пробы и обработка результатов.

Авторами работы [23] представлен способ совместного определения жирорастворимых витаминов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в пищевых продуктах, витаминно-минеральных комплексах и сыворотке крови. В работе применялся детектор с фотодиодной матрицей, в качестве подвижной фазы раствор ацетонитрил-вода 98:2 (по объему), температура процесса разделения 25 °С. В данной работе использовалась программа регистрирования, позволяющая одновременно проводить параллельное интегрирование хроматографических пиков при разных заданных длинах волн (при максимуме интенсивности для каждого витамина). Это дает возможность одновременного детектирования витаминов и позволяет снизить предел их обнаружения. Подготовка проб со сложными матрицами к вводу в хроматограф осуществлялась методом твердофазной экстракции. Пределы детектирования составили соответственно: витамин А 0,002 мкг/мл, витамин D<sub>3</sub> 0,0025 мкг/мл, витамин Е 0,04 мкг/мл.

Таблица 1 – Характеристические параметры хроматограмм различных анализов

Компонент	Время удержания ( $t_R$ ), мин	Степень разделения ( $R_S$ )
Витамин Е	23,5	4,9
Витамин А	4,4	-
Витамин А <sub>1</sub>	5,6	2,7
Витамин D <sub>3</sub>	17,6	15,7

В работе [24] сообщается также о возможности совместного детектирования витаминов А, D и Е методом УльтраВЭЖХ на колонке Waters Acquity UPLC BEH C18 с размерами частиц 1,7 мкм. В качестве подвижной фазы 100%-ный метанол, температура разделения 25 °С. Из жидкой матрицы премиксов витамины экстрагировали изопропанолом – для простых матриц, содержащих только витамины; или гексаном с последующим гидролизом для более сложных матриц. Сведения о других наиболее характерных методах ВЖЭХ представлены в таблице 2 [18].

Таблица 2 – Определение витаминов D и их метаболитов ВЭЖХ

Авторы	Разделяемые соединения	Происхождение образца для анализа	Тип хроматографической колонки	Элюент	Примечания
Вильямс и др.	Витамины D <sub>3</sub> , А, Е, К	Лекарственные препараты	Пермафаз ODS	Градиентное элюирование: сначала водой, в конце метанолом (5%) или смесью метанол-вода (78:22)	T=50°С
Кроль и др.	Витамин D <sub>3</sub> и превитамины D <sub>3</sub> , витамины D, Е и эфиры витамина А	Синтетические смеси и смеси после изомеризации	Видак	Пентан-тетрагидрофуран (39:1)	
Штейерле	Витамин D <sub>3</sub> и его изомеры	Смолообразные продукты и лекарственные препараты	Алокс Т (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Хлороформ	
Джонс и Де-Люка	Витамины D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> и их метаболиты	Плазма	Зорбакс SIL	1-2%-ный раствор 2-пропанола в скеллизольве	Предварительное разделение на сефадексе LH-20
Мулдер, Де-Фрис, Борсье	Витамины D <sub>2</sub> и D <sub>3</sub>	Лекарственные препараты	Лихросорб SI-60, партисил 5	Гексан-амиловый спирт	Колонка для очистки с RP-8; внутренний стандарт – 4,6-холестадиенол
Коэн, Лапойнт	Витамин D <sub>3</sub>	Продукты питания, премиксы	Лихросорб NH <sub>2</sub>	Гексан-хлороформ (7:3)	
Уолкер и др.	Витамины D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub>	Лекарственные препараты	Силмкагель SI-5A	Гексан (частично насыщенный водой)-хлороформ-тетрагидрофуран-уксусная кислота (40:60:1,5:0,4)	Внутренний стандарт – прогестерон
Окано и др.	25-(OH)-D <sub>2</sub> 25-(OH)-D <sub>3</sub>	Плазма крови	Зорбакс SIL	Гексан- 2-пропанол (94,5:4,5)	Предварительное ВЭЖХ разделение на нуклеосиле C <sub>18</sub>

#### 1.4.4 Электрохимическое определение холекальциферола

Электрохимические методы анализа, благодаря простоте исполнения, высокой чувствительности, экспресности, широко применяются для анализа



различных объектов. В том числе, данная группа методов нашла свое применение в анализе биологически активных веществ.

Для анализа холекальциферола может применяться полярографическое определение витамина D<sub>3</sub> на ртутном капающем электроде (РКЭ), в основу которого положено восстановление сопряженной триеновой системы до диеновой [25]. Показано также, что полярографический метод позволяет одновременно определять витамины А и D<sub>2</sub>, в том числе в масляных препаратах [26]. Также разработана осциллополярографическая методика определения витамина D<sub>3</sub> в масляных препаратах с предварительной экстракцией смесью триэтиламмония в изопропаноле и диметилформамиде (1:1). Получен сигнал в виде полуволны с потенциалом пика +2,52 В. Измерения проводились с использованием РКЭ в качестве рабочего электрода и насыщенного каломельного электрода – в качестве электрода сравнения.

Однако применение ртутных электродов нежелательно из соображений безопасности (ртуть отличается высокой токсичностью), кроме того, потенциалы пиков и волн, выступающих в качестве аналитических сигналов, имеют высокое значение, что может приводить к окислению-восстановлению в сходном диапазоне прочих биологически активных веществ. Таким образом, может наблюдаться существенное искажение получаемых результатов.

Таким образом, применение ртутных электродов, а также электродов, изготовленных из углеродных материалов и благородных металлов (золота, серебра, а также металлов платиновой группы) весьма затруднено из-за ряда недостатков:

- 1) необратимость протекания ряда электрохимических на поверхности таких электродов;
- 2) недостаточная селективность протекающих электрохимических реакций (невозможность определения веществ, имеющих близкие потенциалы восстановления (окисления));

- 3) недостаточная коррозионная стойкость материалов электрода;
- 4) необходимость приложения значительного перенапряжения для протекания электрохимической реакции.

Применение модификаторов (промоторов) поверхностей электродов позволяет снять указанные недостатки [27]. Под термином «модифицированный электрод» понимается электрод, поверхность которого обработана специальным образом с целью изменения электрохимического отклика. Модификация предполагает нанесение на поверхность электрода (химическими, либо физическими методами) химических соединений, либо полимерных пленок, обеспечивающих высокую скорость протекания и снижение величин перенапряжения в процессе переноса электронов.

Для определения холекальциферола применяются следующие модификаторы:

- 1) ферментативные системы;
- 2) наночастицы;
- 3) полимерные пленки;
- 4) углеродные нанотрубки.

#### **1.4.5 Прочие методики определения холекальциферола**

Помимо вышеперечисленных методов существуют также и другие. Грин [18] описал титрование витамина D<sub>3</sub> трихлоридом иода. В процессе титрования образуется гексахлорпроизводное и конечную точку можно обнаружить фотометрически по окраске освобождающегося иода.

В анализе витаминов D флуориметрия не играет столь заметной роли, как в анализе некоторых других стероидов. Чен и др. [18] определяли витамины D в трихлорэтиленовом растворе, используя в качестве реагента смесь уксусного ангидрида и серной кислоты. Максимумы спектров возбуждения и испускания лежат соответственно при 390 и 470 нм.

Гергели с соавторами [18] описали количественный спектрополяриметрический метод определения витаминов D в масляных препаратах.

Также для определения содержания витамина D<sub>3</sub> применяются иммуноферментные методы анализа [28]. Основным недостатком данной группы методов является применение ферментов и антител, как метки, поэтому несмотря на высокую селективность, чувствительность и отсутствие пробоподготовки, подобные системы, как правило, характеризуются сложностями в отношении получения удовлетворительных метрологических характеристик. Данный факт обусловлен склонностью ферментов (как и антител) к денатурации.

## Глава 2. Аппаратура и методика эксперимента

### 2.1 Оборудование, ячейка, электроды и растворы

#### *Оборудование*

Экспериментальная разработка методики в данном исследовании осуществлялась на анализаторе вольтамперометрическом TA-Lab («Томьаналит», г. Томск).

Данный анализатор имеет множество областей применения в лабораторных целях, в частности в рутинном анализе, а также позволяет проводить исследовательские работы. Имеет небольшой размер и требует малых количеств реактивов при использовании. Рабочие параметры: типы форм разверток поляризующего напряжения: постоянно-токовая, квадратно-волновая, ступенчатая и дифференциально-импульсная; режимы вывода данных: прямой и дифференциальный; режим работы: двух- и трехэлектродный.

Основные особенности: возможность работы с тремя образцами одновременно, встроенный канал для подачи инертного газа для дегазации анализируемого раствора, возможность устранения мешающего влияния кислорода встроенным источником УФ-излучения, возможность перемешивания раствора в ячейке без применения магнитной мешалки, посредством вибрации индикаторного электрода, наличие программы электрохимической очистки электродов. Технические характеристики: чувствительность –  $5 \cdot 10^{-11}$  А, воспроизводимость аналитических сигналов – 10-15 %.

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Agilent Technology Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США), подключенном к персональному компьютеру. Технические характеристики: диапазон измерений от 190 до 1100 нм; максимальная скорость сканирования 24000 нм/мин; воспроизводимость длины волны  $\pm 0,1$

нм; точность установки длины волны  $\pm 0,5$  нм; фотометрический диапазон 3,3 А.

Все оборудование перед работой проходило проверку и подготовку, согласно инструкции по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Оценку рН среды проводили при помощи рН-метра/иономера ИТАН («Томьаналит», г. Томск) с электродом ЭС-10308 («Томьаналит», г. Томск), имеющим сферическую мембрану и эффективным при работе с пробами малого объема.

При записи циклических вольтамперограмм удаление кислорода осуществлялось посредством барботажа рабочего объема газообразным азотом с содержанием кислорода не более 0,003%. Подача компрессированного азота проводилась через силиконовый шланг со съемным наконечником из баллона.

Взвешивание точных навесок веществ осуществлялось на лабораторных аналитических весах общего назначения ВЛ-210 (класс точности 0,0001г, «Госметр», Россия).

Получение дистиллированной воды производилось с использованием аквадистиллятора «ДЭ-4» («ТюменьМедико», г. Тюмень) и системы водоочистки Milli-Q Advantage A10 I типа с фильтром Миллипак (Merck Millipore, Германия).

Электрохимические ячейки представляют собой кварцевые стаканчики объемом 20 см<sup>3</sup>.

В работе использовалась следующая мерная лабораторная стеклянная посуда: цилиндры вместимостью 10.0 и 20.0 см<sup>3</sup>, также колбы наливные, объемом 50 и 25 см<sup>3</sup>, пробирки пластиковые центрифужные объемом 15 см<sup>3</sup> и пробирки типа Эппендорф объемом 1,5-2 см<sup>3</sup>.

При приготовлении используемых для анализа растворов и для добавки исследуемых аналитов использовали одноканальные механические дозаторы переменного объема вместимостью 100-1000, 20-200, 1000-5000

мкл типа «Колор» ВК44759 и ThermoScientific BP59599 соответственно. Точность отбора проб для всех дозаторов соответственно составляет  $\pm 0,4$  мкл,  $\pm 0,14$  мкл и  $\pm 0,25$  мкл. Для каждой пробы использовали сменный наконечник дозатора.

Чистоту посуды и используемого фонового электролита проверяли вольтамперометрически, посредством проведения «холостого» опыта перед каждой серией опытов.

#### *Электроды и электрохимические ячейки*

В процессе работы использовали схему с тремя электродами: рабочий (индикаторный), сравнения и вспомогательный электрод. Схема установки, использованной для проведения анализа, представлена на рисунке 4.

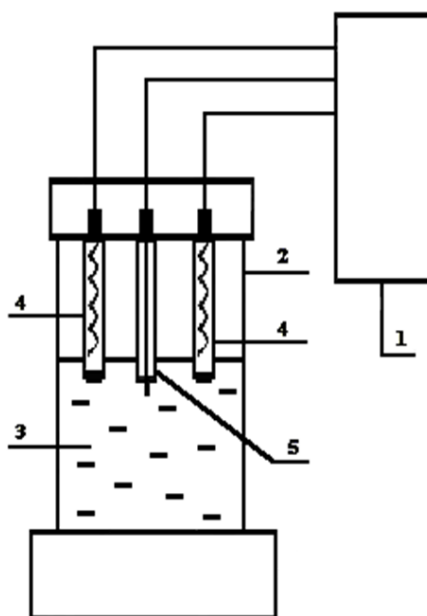


Рисунок 4 – Схема экспериментальной установки:

1 – анализатор вольтамперометрический (АТ, ТА-Lab); 2 – электрохимическая ячейка; 3 – фоновый электролит; 4 – хлорсеребряные электроды; 5 – рабочий (индикаторный) электрод.

В работе в качестве индикаторных электродов использовались модифицированные углеродсодержащие композитные электроды с обновляемой поверхностью (площадь поверхности составляет  $0,060 \text{ см}^2$ ).

Данный вид электродов представляет собой полиэтиленовый корпус, заполненный электропроводящей смесью термостабилизированного

полиэтилена высокого давления и технического углерода марки N220 в соотношении 30% масс. углерода и 70% масс. полиэтилена.

В качестве электрода сравнения, а также вспомогательного электрода в данной работе применялись хлоридсеребряные электроды (ХСЭ), представляющие собой полые цилиндры, заполненные насыщенным раствором хлорида калия (KCl), с опущенной в него серебряной проволокой, покрытой труднорастворимой солью хлорида серебра.

#### *Используемые реактивы*

Перечень веществ, используемых в данной работе:

- ГСО СОП 102-010 холекальциферола, кристаллический порошок белого цвета, о.с.ч., Sigma Aldrich (Германия);
- стандарт-титры для приготовления стандартных буферных растворов («УралХимИнвест», Уфа, Россия):
  - гидрофталат калия  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$  (pH=4,01);
  - эквимольная смесь дигидрофосфата калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и гидрофосфата натрия  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (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);
- изопропиловый спирт, о.с.ч., Sigma Aldrich (Германия);
- октоксинол-9, о.с.ч., Sigma Aldrich (Германия);
- лиофилизированный порошок ДАГУДФК, синтезированный на кафедре органической химии и полимеров КарГУ им. Е.А. Букетова под руководством д.х.н. Салькеевой Л.К.

## **2.2. Объекты исследования и методика пробоподготовки**

В качестве объектов исследования использовались следующие биологически-активные добавки различных производителей в разных лекарственных формах:

- «АкваДетрим» – водный раствор (MEDANA PHARMA, S.A. Польша);
- «Natural Factors Vitamin D<sub>3</sub>» – таблетки (Natural Factors, Канада);

– капли масляные и капсулы желатиновые (Now Foods, США).

Для подготовки образцов в форме таблеток проводили их измельчение в фарфоровой ступке, далее проводили двойное квартование и отбор пробы необходимой массы, затем проведение жидкостной экстракции растворением навески в 10 см<sup>3</sup> изопропилового спирта в центрифужной пробирке объемом 15 см<sup>3</sup>, последующее центрифугирование при 20 °С со скоростью 4000 об/мин в течение 5 минут и смешение с поверхностно-активным веществом Triton X-100 для дальнейшего перевода в водную фазу.

Подготовка образцов в виде масляного раствора осуществлялась последовательным проведением нескольких этапов: 1) отбор дозатором необходимого количества объекта; 2) жидкостная экстракция в 10 см<sup>3</sup> изопропилового спирта путем смешения с ним объекта; 3) центрифугирование при 20 °С со скоростью 4000 об/мин 15 минут; 4) отделение надосадочной части и его смешение с Triton X-100.

### **2.3 Методика определения холекальциферола методом вольтамперометрии**

Подготовка фонового электролита осуществлялась посредством разведения содержимого фиксаля в мерной колбе на 1000 см<sup>3</sup>.

Подготовка стандартного раствора холекальциферола: взвешивание навески массой 0,0050 г, с точностью до 0,0001 г; внесение в мерную колбу объемом 50 см<sup>3</sup>; доведение до метки изопропанолом – получение раствора с концентрацией 100 мкг/см<sup>3</sup>; разбавление раствора до концентрации 50 мкг/см<sup>3</sup> смешением исходного раствора с Triton X-100 в соотношении 1:1.

Вольтамперометрические измерения проводили при помощи трехэлектродной ячейки, в которой в качестве рабочего применялся МЭ ДАГУДФК и НЧ Ni. В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода использовались ХСЭ. Выбор материала вспомогательного электрода обусловлен тем, что ХСЭ отвечает требованиям, предъявляемым к



вспомогательному электроду, изложенным в [29]: обладает большой площадью поверхности за счет применения витой серебряной проволоки, эффективно стабилизирует получаемые сигналы и не участвует в электрохимической реакции (продукты его окисления остаются в объеме электродного корпуса).

Вольтамперометрические измерения проводили следующим образом: кварцевый стаканчик, заполненный фоновым электролитом, помещали в гнездо анализатора и вводили в электролит закрепленные в специальных разъемах электроды. После чего, проводили съемку в диапазоне от 0 до +1В со скоростью развертки потенциала, равной 70 мВ/с в режиме постоянно-токовой вольтамперометрии. Таким образом, получали фоновую вольтамперную кривую. Отсутствие пиков на данной кривой свидетельствует об отсутствии в системе загрязняющих веществ, в том числе поверхностно активных. Затем в электрохимическую ячейку вводили добавку пробы и проводили регистрацию вольтамперной кривой.

Затем проводили измерения тока электроокисления для дальнейшего построения градуировочного графика. В связи с чем, осуществляли последовательное введение приготовленного раствора холекальциферола в ячейки и проводили регистрацию аналитического сигнала в диапазоне потенциалов от 0 до +1В. Полученные кривые подвергались обработке программным обеспечением анализатора вольтамперометрического ТА-Lab с целью вычисления предельного тока электроокисления холекальциферола.

По результатам измерения предельного тока окисления растворов стандартной (градуировочной) серии строили график зависимости предельного тока окисления растворов (I) от концентрации холекальциферола (C, мкг/см<sup>3</sup>). Уравнение прямой линии рассчитывается методом наименьших квадратов [30]. Общий вид уравнения:

$$I = k \cdot C + b, \quad (2.1)$$

где I – предельный ток окисления, А; C – концентрация определяемого вещества в анализируемом растворе, мкг/см<sup>3</sup>; k и b –

коэффициенты. Коэффициент  $k$  – тангенс угла, образуемого калибровочным графиком и осью абсцисс, коэффициент  $b$  – расстояние между началом координат и гипотетической точкой пересечения калибровочного графика с осью ординат, выраженное в единицах оптической плотности.

Аппроксимация полученных данных с целью построения градуировочного графика осуществлялась средствами программного пакета Microsoft Office Excel.

Анализ содержания холекальциферола в объектах исследования проводили аналогично с применением соответствующих подготовленных растворов. Результаты обработки – вычисленные значения предельного тока окисления – использовали для определения концентрации в исходном объекте с помощью ранее построенного градуировочного графика.

Качественная оценка содержания витамина  $D_3$  в объектах анализа проводилась по стандартной методике [31], которая приведена далее. К раствору 0,5 мг препарата в 5 см<sup>3</sup> хлороформа добавляют 0,3 см<sup>3</sup> уксусного ангидрида и 0,1 см<sup>3</sup> серной кислоты, смесь энергично встряхивают: появляется ярко-красное окрашивание, которое быстро переходит в фиолетовое, синее, а затем в зеленое.

#### **2.4 Методика исследования модифицированных электродных поверхностей**

Разработана методика по приготовлению МЭ. На этапе подготовки модификатора и последующего его нанесения на поверхность электрода проводились следующие операции: взвешивание сухих компонентов модификатора, а именно ДАГУДФК и НЧ никеля; смешение сухих компонентов. Подготовка в качестве основы модификатора агарозного геля растворением сухого компонента в воде при нагревании; внесение в основу смеси сухих компонентов, Подготовка поверхности электрода последовательной обработкой водой и этанолом, зачисткой фильтровальной бумагой и последовательным высушиванием на воздухе в течение 30 минут.

Нанесение модификатора на поверхность электрода проводилась окунанием; сушка электрода на воздухе в течение 5 часов до образования тонкой пленки.

Подбор состава модификатора осуществлялся на основании литературных данных [32] и практического исследования влияния различных компонентов на изменение площади электроактивной поверхности МЭ и на электрохимический отклик холекальциферола согласно разработанной методике.

Далее нами был проведен подбор связующего компонента для модифицирующего слоя. Из наиболее распространенных желирующих агентов были отобраны для дальнейшего исследования агар-агар, декстран и хитозан. Приготовление мембран с вышеуказанными связующими компонентами проводилось аналогично разработанной методике по изготовлению МЭ. Оценка применимости в слое модификатора конкретного связующего компонента проводилась по следующим параметрам: 1) простота приготовления; 2) параметры связывания; 3) электрохимическая проводимость – электрохимический отклик ГЦФ пары на МЭ.

#### **2.4.1 ИК-спектроскопия образцов электродных поверхностей**

Изучение морфологии получаемой электродной поверхности проводилось методом ИК-спектроскопии с обратным Фурье-преобразованием. Для исследования применялся ИК-спектрометр «FTIR Cary 660» (Agilent Technologies, США).

Работу с образцами поверхности проводили при помощи приставки НПВО ATR Accessory (Pike Technologies, США) содержащей кристалл селенида цинка (ZnSe).

Для подготовки образца немодифицированной поверхности использовался композитный углеродсодержащий электрод, с которого резакон срезалась поверхность. Толщина образца равнялась 1 мм. Полученный образец размещали в приставке НПВО и фиксировали держателем. Затем проводили съемку в диапазоне длин волн от 1000 до 4000

см<sup>-1</sup>. Подбор ширины щели производился автоматически, она составляла 8 мм. Хранение образцов осуществлялось в эксикаторе.

После чего проводилась подготовка модифицированного образца путем нанесения ДАГУДФК на поверхность рабочего электрода. Затем электрод размещался в сушильном шкафу в течение 5 часов при температуре 50°C или сушился при температуре 22°C в течение 7 часов на воздухе. Образцы поверхности также отделялись от рабочего электрода резаком. ИК-спектроскопия проводилась по ранее описанной методике.

Проведение съемки на электродной поверхности, содержащей наночастицы Ni, было затруднено, в силу их высокой отражающей способности. В связи с чем, в данной работе ИК-спектры электродных поверхностей с окончательно доработанным слоем модификатора не приводятся.

#### **2.4.2 Методика микроскопического исследования электродных поверхностей**

Микроскопическое изучение морфологии электродных поверхностей проводилось при помощи сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония). Исследование образцов проводили в режим обратно-рассеянных электронов в низком вакууме (6 Па) с ускоряющим напряжением 20 кВ. Данные исследования проводились на базе НИ ТПУ

Проводилась предварительная съемка образца поверхности в отсутствии модифицирующего слоя. Образец электродной поверхности размещался на металлическом столике при помощи проводящего углеродного скотча. Затем столик помещается в рабочую камеру. Затем подготавливался образец модифицированной поверхности. После чего вновь проводилась съемка.

### 2.4.3 Оценка величины электроактивной поверхности методом вольтамперометрии

Оценка величины площади электроактивной поверхности проводилась методом вольтамперометрии с помощью ГЦФ пары и последующего аналитического расчета.

В фоновый электролит помещалась добавка стандартного раствора ГЦФ и последующее снятие ЦВА с регистрацией тока электроокисления и электровосстановления. После чего следует расчет площади электроактивной поверхности электрода по уравнению Рэндлса-Шевчика:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2}_{ox} W^{1/2} C^0_{ox} \quad (2.2),$$

где  $i_p$  - ток пика (А),  $n$  - число электронов,  $A$  - площадь электроактивной поверхности,  $W$  - скорость развертки (В/с),  $D$  - коэффициент диффузии ( $\text{см}^2/\text{с}$ ),  $C$  - концентрация деполяризатора (моль/л).

Аналогичным образом проводили подбор материала мембраны. Для чего, сначала записывали ЦВА ГЦФ пары на не модифицированных электродах. Затем на поверхность наносили связующее (агар-агар, декстран и хитозан), высушивали и повторно записывали ЦВА ГЦФ пары. Полученные значения токов применяли для оценки величины электроактивной поверхности по уравнению (2.2).

### 2.4.4 Методика получения и характеристика применяемых наночастиц

В данной работе применялись наночастицы Ni, полученные путем электровзрывом проводника (ЭВП). Процесс осуществляется при следующих параметрах:

- время взрыва составляло 10–6 с;
- температура в момент взрыва – 370 °С,
- давление – 110 Па;
- развиваемая мощность равнялась 1013 Вт/кг;
- скорость разлета продуктов изменялась в интервале от 1 до 5 км/с.

Схема установки для получения НЧ Ni представлена на рисунке 5

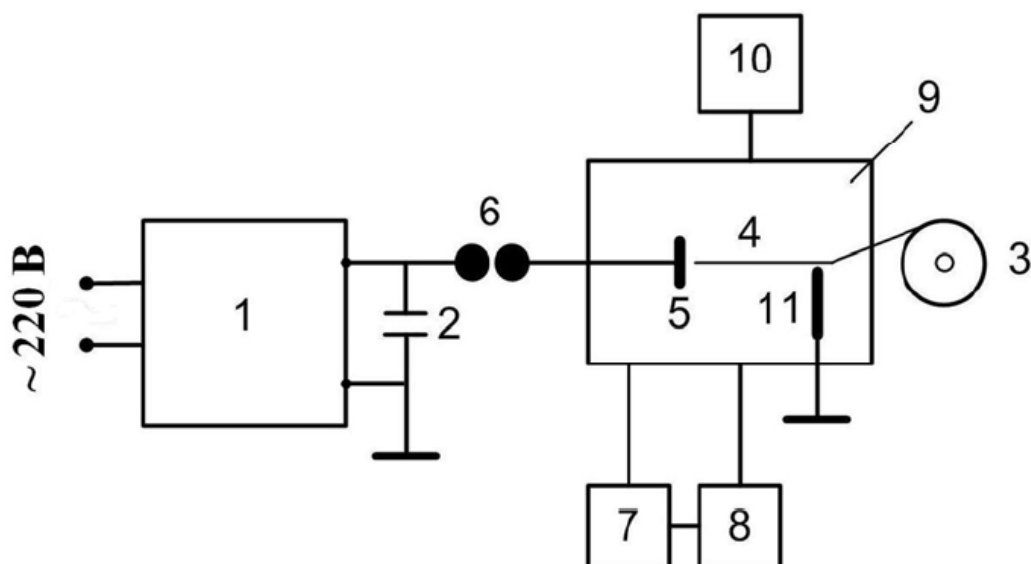


Рисунок 5 – Схема установки производства нанопорошков методом ЭВП:

- 1 – высоковольтный источник питания; 2 – емкостный накопитель энергии;  
 3 – механизм подачи проволоки; 4 – взрываемый проводник;  
 5 – высоковольтный электрод; 6 – коммутатор;  
 7 – накопитель нанопорошка; 8 – вентилятор; 9 – взрывная камера;  
 10 – система газового снабжения; 11 – заземленный электрод

Емкостный накопитель заряжается от высоковольтного источника. Далее осуществляется автоматическая подача взрываемого отрезка проволоки в промежуток между электродами. По достижении проволокой высоковольтного электрода накопитель разряжается на отрезок проволоки между электродами. Образовавшийся при взрыве порошок собирается в накопителе. Объем камеры перед работой вакуумируется, а затем заполняется аргоном.

Выбор данного метода получения НЧ металлов обусловлено возможностью эффективного контроля параметров получаемого порошка НЧ при помощи параметров процесса. Кроме того, порошки НЧ, получаемые описанным методом, как правило, имеют сферическую форму частиц, что важно для дальнейшего применения их, в качестве разветвляющего электродную поверхность материала. Также получение нанопорошков электровзрывом характеризуется низкими затратами энергии и отсутствием теплоносителя. Помимо этого, в данном методе процесс осуществляется в

изолированной камере и отсутствуют технологические выбросы. Таким образом, получение НЧ электровзрывом характеризуется высокой экологичностью и технологической безопасностью. Синтез НЧ методом электровзрыва проводился на базе Научно-исследовательской лаборатории СВЧ-технологии НИ ТПУ.

Характеризацию НЧ проводили при помощи просвечивающей электронной микроскопии и лазерной дифракции. Для просвечивающей электронной микроскопии применялся высокоразрешающий ПЭМ JEM-2100F (JEOL, Япония). Получение микроскопических снимков проводили при энергии пучка 200 кэВ значении расстояния пробега электронов 8 см под высоким вакуумом. Проводили предварительное смешение изопропанола с НЧ металла. Полученную суспензию наносили на металлическую пластинку, после чего высушивали при 30 °С в течение 1 часа. Применение указанных условий позволило снизить возможное влияние дефектов линз на получаемое изображение и свести к минимуму астигматизм и сферические аберрации.

Распределение получаемых НЧ по размерам оценивалось при помощи лазерного анализатора размеров частиц SALD-7101 (Shimadzu, Япония). Пробу образца предварительно диспергировали в изопропиловом спирте. Полученную систему помещали в кварцевую кювету.

## **2.5 Спектрофотометрическая методика определения холекальциферола**

Предварительно нами было проведено исследование по подбору оптимального растворителя, которое заключалось в измерении оптической плотности приготовленных растворов стандарта холекальциферола в соответствующих растворителях с концентрацией 5 мкг/см<sup>3</sup>. Для исследования были выбраны следующие растворители: изопропанол, ацетонитрил, гексан и N,N – диметилформамид. После спектрофотометрических измерений проведен сравнительный анализ полученных результатов, в ходе которого для дальнейшего анализа отобран

растворитель с наибольшим значением оптической плотности при одном значении концентрации, что соответствует наибольшему значению удельного и молярного показателей светопоглощения для холекальциферола. Данный факт позволяет предположить, что, чем большее значение коэффициента поглощения имеет аналит в определенном растворителе, тем выше чувствительность методики и тем ниже предел определения аналита.

Методика заключается в приготовлении серии стандартных растворов; последующем определении их оптических плотностей в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм с помощью УФ, Вид-спектрофотометра Agilent Cary60 с толщиной поглощающего слоя 10 мм; построении градуировочного графика; приготовлении растворов объектов анализа; определении их оптических плотностей; определении концентраций растворов объектов анализа по градуировочному графику. Максимум поглощения холекальциферола наблюдается при 265 нм, допустимое отклонение максимума составляет 3% [22].

Подготовка серии стандартных растворов холекальциферола: взвешивание навески массой 0,0050 г, с точностью до 0,0001 г; внесение в мерную колбу объемом 50 см<sup>3</sup>; доведение до метки изопропанолом – получение исходного раствора с концентрацией 100 мкг/см<sup>3</sup>; последовательное разбавление изопропанолом в колбах вместимостью 25 см<sup>3</sup>. Концентрации полученных растворов составляют соответственно 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 9 мкг/см<sup>3</sup>.

Выбор серии концентраций для стандартных растворов обусловлен необходимостью выполнения закона Бугера-Ламберта-Бера (уравнение 2.3), согласно которому величина оптической плотности не должна быть выше единицы:

$$A = l \cdot C \cdot E_{1\text{ см}}^{1\%}, \quad (2.3)$$

где  $E_{1\text{ см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения холекальциферола в этаноле, см<sup>-1</sup>;  $C$  – массовая концентрация аналита, %;  $l$  – толщина поглощающего слоя, см.



## **Глава 4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение**

Научно-исследовательская работа связана с разработкой новой методики определения содержания холекальциферола в различных лекарственных формах представленных на рынке биологически-активных добавках. На сегодняшний день во всем мире существует острая проблема недостатка витамина D, что подтверждено многочисленными эпидемиологическими исследованиями. Это связано, прежде всего, с малым содержанием витаминов данной группы в природных источниках и с , так называемым, солнечным голоданием – недостаточностью солнечного облучения, что снижает количество вырабатываемого организмом витамина D. Для решения данной проблемы сегодня пользуются, в основном, введением в организм дополнительных количеств витамина в форме биологически-активных добавок различной формы. В связи с чем, разработка новой методики определения холекальциферола является актуальной для возможности осуществления контроля содержания витамина D в БАД, иными словами для проведения контроля качества готовой продукции фармацевтических производств.

Объектом исследования является холекальциферол, содержащийся в биологически-активных добавках, таких как «АкваДетрим» (Россия), «Now Foods Vitamin D<sub>3</sub>» (США), «Natural Factors Vitamin D<sub>3</sub>» (Канада).

Выбор объекта исследования обусловлен несколькими причинами: сложившейся мировой проблемой его гиповитаминоза; широким спектром его биологических функций в организме человека; необходимостью контроля качества выпускаемых БАД.

Согласно литературным данным существуют множество методов для количественного определения холекальциферола в различных объектах. В большинстве своем это хроматографические методики (ВЭЖХ), которые имеют ряд недостатков. В качестве главного недостатка имеющихся методик

следует отметить дороговизну анализа. Также в перечень недостатков можно включить высокую длительность анализа. В своей научно-исследовательской работе использовали электрохимический метод анализа, в частности вольтамперометрию, исходя из преимуществ данного метода: высокая чувствительность, простота исполнения, экспрессность и низкая стоимость анализа.

#### **4.1. Оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения научных исследований с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения**

##### **4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования**

Потенциальными потребителями являются изготовители биологически-активных добавок и лаборатории контроля качества готовой продукции фармацевтической отрасли.

##### **4.1.2. Анализ конкурентных технических решений**

В настоящее время для контроля качества холекальциферола существуют различные методы и методики, однако большинство из них обладают рядом недостатков.

Рассмотрим следующие методы, которые на сегодняшний день более применимы и широко используются в лабораторной практике: УФ-спектрофотометрический метод анализа [22] и ВЭЖХ [23].

Анализ конкурентных технических решений определяется по формуле:

$$K = \sum B_i \cdot B_i \quad (4.1)$$

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

Целесообразно анализ конкурентных технических решений проводить с помощью оценочной карты, которая представлена в виде таблицы 14.

Таблица 14 – Оценочная карта сравнения для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б <sub>ф</sub>	Б <sub>к1</sub>	Б <sub>к2</sub>	К <sub>ф</sub>	К <sub>к1</sub>	К <sub>к2</sub>
1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Технические критерии оценки ресурсоэффективности</b>							
1.Точность определения	0.2	4	3	5	0.8	0.6	1
2.Экспрессность	0.2	5	5	3	1	1	0.6
3.Простота эксплуатации	0.1	5	5	4	1	1	0.8
4.Простота пробоподготовки	0.1	5	5	3	0.5	0.5	0.3
5. Возможность совместного определения витаминов различной природы – селективность	0.1	2	2	5	0.2	0.2	0.5
<b>Экономические критерии оценки эффективности</b>							
1. Цена анализа	0.2	5	5	2	1	1	0.4
2. Стоимость оборудования	0.1	5	4	3	0.5	0.4	0.3
<b>Итого</b>	<b>1</b>	<b>31</b>	<b>29</b>	<b>25</b>	<b>5.0</b>	<b>4.7</b>	<b>3.9</b>

В таблице 14: К<sub>1</sub> – конкурент 1 УФ-спектрофотометрический метод анализа, К<sub>2</sub> – конкурент 2 методика обращенно-фазовой ВЭЖХ, К<sub>ф</sub> – вольтамперометрический метод анализа.

По итогам анализа оценочной карты можно сделать вывод, что научная разработка, описываемая в данной НИР, является конкурентноспособной. Также из представленной оценочной карты можно увидеть, что основным конкурентом разрабатываемого решения является УФ-спектрофотометрический метод анализа.

#### 4.1.3. SWOT-анализ

SWOT – (Strengths – сильные стороны, Weaknesses – слабые стороны, Opportunities – возможности и Threats – угрозы) – это комплексный анализ научно-исследовательского проекта. SWOT-анализ применяют для исследования внешней и внутренней среды проекта [36]. Он состоит из нескольких этапов.

На первом этапе рассматриваются сильные и слабые стороны проекта, т.е. внутренняя среда проекта, а также осуществляется выявление возможностей и угроз – внешняя среда проекта.

Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Первый этап SWOT-анализа

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b> С1. Экспрессность С2. Простота эксплуатации С3. Низкие затраты на пробоподготовку С4. Низкая стоимость анализа С5. Анализ в различных лекарственных формах	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b> Сл1. Сниженная селективность и чувствительность по сравнению с другими методами Сл2. Необходимость прибора Сл3. Необходимость дорогостоящих реактивов, дополнительных материалов к прибору
<b>Возможности:</b> В1. Разработка более дешевой и экспрессной методики анализа В2. Растущий спрос на объект анализа В3. Перспективы внедрения вольтамперометрии в качестве метода анализа в фармацевтическую отрасль В4. Появление вольтамперометрических методик определения сходных аналитов		
<b>Угрозы:</b> У1. Развитие конкурентных методов анализа У2. Ограниченный круг потребителей У3. Повышение стоимости оборудования У4. Отсутствие необходимых реактивов		

Второй этап SWOT-анализа предполагает рассмотрение 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 интерактивную матрицу проекта. Ее использование помогает разобраться с различными комбинациями взаимосвязей областей матрицы SWOT. Каждый фактор помечается либо знаком «+» (означает сильное соответствие сильных сторон возможностям), либо знаком «-» (что означает слабое соответствие); «0» – если есть сомнения в том, что поставить «+» или «-».

Интерактивные матрицы проекта представлены в таблицах 16-19.

Таблица 16 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и возможности»

Сильные стороны проекта						
Возможности проекта		C1	C2	C3	C4	C5
	B1	+	+	+	+	+
	B2	+	0	+	0	+
	B3	+	+	+	0	+
	B4	+	+	+	+	+

Таблица 17 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и возможности»

Слабые стороны проекта				
Возможности проекта		Сл1	Сл2	Сл3
	B1	-	-	-
	B2	0	-	-
	B3	-	-	-
	B4	+	0	0

Таблица 18 – Интерактивная матрица проекта «Сильные стороны и угрозы»

Сильные стороны проекта						
Угрозы		C1	C2	C3	C4	C5
	У1	+	+	+	+	+
	У2	+	+	+	+	+
	У3	0	0	+	-	0
	У4	-	0	-	-	0

Таблица 19 – Интерактивная матрица проекта «Слабые стороны и угрозы»

Слабые стороны проекта				
Угрозы		Сл1	Сл2	Сл3
	У1	-	0	-
	У2	0	-	-
	У3	0	-	-
	У4	0	0	-

Таким образом, в рамках третьего этапа может быть составлена итоговая матрица SWOT-анализа [36], представленная в таблице 20.

Таблица 20 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	<b>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</b> С1. Экспрессность С2. Простота эксплуатации С3. Низкие затраты на пробоподготовку С4. Низкая стоимость анализа С5. Анализ в различных лекарственных формах	<b>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</b> Сл1. Сниженная селективность и чувствительность по сравнению с другими методами Сл2. Необходимость прибора Сл3. Необходимость дорогостоящих реактивов, дополнительных материалов к прибору
<b>Возможности:</b> В1. Разработка более дешевой и экспрессной методики анализа В2. Растущий спрос на объект анализа В3. Перспективы внедрения вольтамперометрии в качестве метода анализа в фармацевтическую отрасль В4. Появление вольтамперометрических методик определения сходных аналитов	Разработка более дешевой и экспрессной методики и растущий спрос на объект анализа раскрывают перспективу развития данной группы методов и внедрения их в лаборатории контроля качества фармацевтических производств.	На скорость внедрения и перспективу использования данной методики могут негативно повлиять: скорость изготовления и доставки необходимого оборудования и реактивов, а также меньшая селективность представленной методики.
<b>Угрозы:</b> У1. Развитие конкурентных методов анализа У2. Ограниченный круг потребителей У3. Повышение стоимости оборудования У4. Отсутствие необходимых реактивов	Сильные стороны проекта: дешевизна, экспрессность и простота анализа способны обеспечить необходимую конкурентоспособность представленной методики.	Отсутствие спроса на новые методы анализа и развитая конкуренция оказывают негативное влияние на внедрение данной разработки в лабораторную практику. Коммерческая недоступность некоторых материалов и реактивов также плохо сказывается на спросе данного решения и может стать причиной как удорожания проекта, так и увеличения длительности анализа.

**Вывод:** в результате SWOT-анализа выявлено, что слабые стороны компенсируются сильными сторонами проекта, а возможности внешней среды помогают еще больше раскрыть его достоинства и нейтрализовать возможные угрозы. Следовательно, при правильном подходе к продвижению проекта и учету всех угроз и возможностей, становится реальным внедрение представленного решения в лабораторную практику фармацевтической отрасли.

#### **4.2 Определение возможных альтернатив проведения научных исследований**

Морфологический подход основан на систематическом исследовании всех теоретически возможных вариантов, вытекающих из закономерностей строения (морфологии) объекта исследования [37]. Синтез охватывает как известные, так и новые, необычные варианты, которые при простом переборе могли быть упущены. Путем комбинирования вариантов получают большое количество различных решений, ряд которых представляет практический интерес. В рамках этого этапа составляется морфологическая матрица. Морфологическая матрица для разработанной вольтамперометрической методики представлена в таблице 8.

Таблица 21 – Морфологическая матрица для методик определения холекальциферола

	1	2	3
А. Приборная база	Анализатор ТА-Lab	Анализатор ТА-Lab	Анализатор ТА-2
Б. Тип электрода	УКЭ	УКЭ	Стеклоуглеродный
В. Использование модификатора	ДАГУДФК+НЧ Ni	ДАГУДФК-	ДАГУДФК+ НЧ Ni
Г. Связующий агент	Агар-агар	Хитозан	Декстран

### 4.3. Планирование научно-исследовательских работ

#### 4.3.1 Структура работ в рамках научного исследования

Для выполнения научно-исследовательской работы формируется рабочая группа, в состав которой входят: бакалавр – Лукина А.А., научный руководитель ВКР – Короткова Е.И., консультант – Дерина К.В., консультант по экономической части (ЭЧ) - Рыжакина Т.Г. и консультант по части социальной ответственности (СО) – Винокурова Г.Ф. Составим перечень этапов и работ в рамках проведения научного исследования и проведем распределение исполнителей по видам работ (таблица 22).

Таблица 22 – Перечень этапов, работ и распределение исполнителей

Основные этапы	№ раб	Содержание работ	Должность исполнителя
1	2	3	4
Разработка технического задания	1	Составление и утверждение технического задания	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, бакалавр
Выбор направления исследований	2	Выбор направления исследований	Научный руководитель, консультант, бакалавр
	3	Подбор и изучение материалов по теме	Консультант, бакалавр
	4	Патентный обзор литературы	Бакалавр
	5	Календарное планирование работ по теме	Научный руководитель, консультант, бакалавр
Теоретические исследования	6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	Консультант, бакалавр
Обобщение и оценка результатов	7	Оценка эффективности полученных результатов	Консультант, бакалавр
	8	Определение целесообразности проведения ВКР	Научный руководитель, консультант, бакалавр
Проведение ВКР			
Разработка технической документации и проектирование	9	Разработка вольтамперометрической методики определения холекальциферола в БАД	Бакалавр



	10	Оценка эффективности производства и применения разработки	Бакалавр, консультант по ЭЧ
	11	Разработка социальной ответственности по теме	Бакалавр, консультант СО
Оформление комплекта документации по ВКР	12	Составление пояснительной записки	Бакалавр

### 4.3.2 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 [38]. Для определения ожидаемого (среднего) значения трудоемкости  $t_{ожi}$  используется формула (4.2):

$$t_{ожi} = \frac{3t_{\min i} + 2t_{\max i}}{5}, \quad (4.2)$$

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

$t_{\min i}$  – минимально возможная трудоемкость выполнения заданной  $i$ -ой работы, 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:

$$T_{pi} = \frac{t_{ожi}}{Ч_i}, \quad (4.3)$$

где  $T_{pi}$  – продолжительность одной работы, раб.дн.;

$t_{ож i}$  – ожидаемая трудоемкость выполнения одной работы, чел.-дн.;

$Ч_i$  – численность исполнителей, выполняющих одновременно одну и ту же работу на данном этапе, чел.

Таблица 23 – Временные показатели проведения научного исследования

№	Название работ	Трудоемкость работ									Исп олни тели	T <sub>р</sub> , раб. дн.			T <sub>к</sub> , кал. дн.		
		t <sub>min</sub> , чел- дн.			t <sub>max</sub> , чел- дн.			t <sub>ож</sub> , чел- дн.				Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3
		Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3	Исп.1	Исп.2	Исп.3							
1	Составление технического задания	0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	Р	0,13	0,13	0,13	0,16	0,16	0,16
		0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	Б	0,13	0,13	0,13	0,16	0,16	0,16
		0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	К <sup>1</sup>	0,13	0,13	0,13	0,16	0,16	0,16
		0,5	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0,5	0,5	К <sup>2</sup>	0,13	0,13	0,13	0,16	0,16	0,16
2	Выбор направления исследований	0,5	0,5	0,5	2	2	2	1	1	1	Р	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
		0,5	0,5	0,5	2	2	2	1	1	1	К	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
		0,5	0,5	0,5	2	2	2	1	1	1	Б	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
3	Подбор изучение материалов	6	6	6	12	12	12	8,4	8,4	8,4	К	4,2	4,2	4,2	5,2	5,2	5,2
		6	6	6	12	12	12	8,4	8,4	8,4	Б	4,2	4,2	4,2	5,2	5,2	5,2
4	Литературный обзор	10	10	10	14	14	14	11,6	11,6	11,6	Б	11,6	11,6	11,6	14,4	14,4	14,4
5	Календарное планирование работ по теме	1	1	1	2	2	2	1,4	1,4	1,4	Р	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
		1	1	1	2	2	2	1,4	1,4	1,4	К	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
		1	1	1	2	2	2	1,4	1,4	1,4	Б	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6
6	Проведение теоретических расчетов обоснований	5	5	5	10	10	10	7	7	7	Б	3,5	3,5	3,5	4,3	4,3	4,3
		5	5	5	10	10	10	7	7	7	К	3,5	3,5	3,5	4,3	4,3	4,3
7	Оценка эффективности результатов	2	2	2	3	3	3	2,4	2,4	2,4	К	1,2	1,2	1,2	1,5	1,5	1,5
		5	5	5	7	7	7	5,8	5,8	5,8	Б	2,9	2,9	2,9	3,6	3,6	3,6
8	Определение целесообразност и проведения ВКР	2	2	2	3	3	3	2,4	2,4	2,4	Р	0,8	0,8	0,8	1	1	1
		6	6	6	7	7	7	6,4	6,4	6,4	К	2,1	2,1	2,1	2,6	2,6	2,6
		6	6	6	7	7	7	6,4	6,4	6,4	Б	2,1	2,1	2,1	2,6	2,6	2,6

9	Разработка методики и обработка результатов	7	7	7	10	10	10	18,2	18,2	18,2	Б							
10	Оценка эффективности производства	7	7	7	10	10	10	7,6	7,6	7,6	Б							
		7	7	7	10	10	10	7,6	7,6	7,6	К <sup>1</sup>	4,1	4,1	4,1	5	5	5	5
11	Разработка СО	7	7	7	10	10	10	8,2	8,2	8,2	Б							
		7	7	7	10	10	10	8,2	8,2	8,2	К <sup>2</sup>	4,1	4,1	4,1	5	5	5	5
12	Составление пояснительной записки	15	15	15	30	30	30	21	21	21	Б							
												21	21	21	26	26	26	22,6
																		22,6
																		22,6

В таблице 23: Р – руководитель;

К – консультант;

Б – бакалавр;

К<sup>1</sup> – консультант по экономической части;

К<sup>2</sup> – консультант по социальной ответственности;

T<sub>ki</sub> – продолжительность одной работы в календарных днях (рассчитывается по формуле 4.4).

Суммарная оценка трудозатрат каждого участника рабочей группы приведена в таблице 24.

Таблица 24 - Рабочая группа проекта

ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, час.
Профессор ОХИ, Короткова Е.И.	Руководитель НИР	Выбор направления исследований, контроль над ходом выполнения проекта.	64
Ассистент ОХИ, Дерина К.В.	Консультант	Выбор направления исследований, контроль над ходом выполнения проекта, консультации по поводу проведения эксперимента, получения и анализа результатов НИР	160
Лукина А.А.	Исполнитель	Выполнение проекта (проведение	640

		эксперимента, получение и анализ результатов НИР)	
Рыжакина Т. Г.	Консультант по экономической части	Оценка эффективности применения анализа	10
Винокурова Г.Ф.	Консультант по части социальной ответственности	Разработка социальной ответственности по теме	10
Итого:			<b>884</b>

Трудозатраты были рассчитаны на основании следующих данных: проект выполняется 4 месяца (16 недель), руководитель проекта принимает участие 2 раза в неделю на протяжении 2-х часов, консультант принимает участие в среднем 5 раз в неделю по 2 часа, инженер дипломник работает в среднем 5 дней в неделю по 8 часов.

#### 4.3.3. 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 (таблица 36, приложение А), на котором работы по теме представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ [37]. Данный график строится на основе таблицы 23.

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

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (4.4)$$

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.

Коэффициент календарности определяется по следующей формуле:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (4.5)$$

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), тогда количество календарных дней составит 120. Количество выходных и праздничных дней примем 16 (6-ти дневная рабочая неделя) и 7 соответственно. Тогда коэффициент календарности составит:

$$k_{\text{кал}} = \frac{120}{120 - 16 - 7} = 1.24 \quad (4.6)$$

Результаты расчетов приведены в таблице 23. Календарный план проекта представлен в таблице 25.

Таблица 25 – Календарный план проекта

№	Название работы	Длительность, рабочие дни	Длительность, календарные дни	Количество исполнителей	Должность исполнителя
1	Составление и утверждение технического задания	0,5	0,6	4	Научный руководитель, консультант ЭЧ, СО, бакалавр
2	Выбор направления исследований	1	1,2	3	Научный руководитель, консультант, бакалавр
3	Подбор и изучение материалов по теме	8,4	10,4	2	Консультант, бакалавр
4	Патентный обзор литературы	11,6	14,4	1	Бакалавр
5	Календарное планирование работ по теме	1,4	1,7	3	Научный руководитель, консультант, бакалавр

6	Проведение теоретических расчетов и обоснований	7	8,7	2	Консультант, бакалавр
7	Оценка эффективности полученных результатов	5,8	7,2	2	Консультант, бакалавр
8	Определение целесообразности проведения ВКР	6,4	7,9	3	Научный руководитель, консультант, бакалавр
9	Разработка вольтамперометрической методики определения холекальциферола в БАД и обработка результатов	18,2	22,6	1	Бакалавр
10	Оценка эффективности производства и применения разработки	7,6	9,4	2	Бакалавр, консультант по ЭЧ
11	Разработка социальной ответственности по теме	8,2	10,1	2	Бакалавр, консультант СО
12	Составление пояснительной записки	21	26	1	Бакалавр
	Итого:	98	121		

#### 4.4. Бюджет научно-технического исследования (НТИ)

Целью составления бюджета на выполнение НТИ является оценка необходимых затрат на его проведение, сгруппированных между собой. Основными позициями бюджета в данном случае будут являться следующие группы затрат: материальные затраты НТИ; затраты на оборудование; основная заработная плата исполнителей темы; дополнительная заработная плата исполнителей темы; отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления); накладные расходы [39].

##### 4.4.1. Расчет материальных затрат НТИ

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). Расчет стоимости материальных затрат производился по действующим прейскурантам и ценам с учетом НДС. В стоимость материальных затрат включили транспортно-заготовительные расходы (3 – 5 % от цены). Результаты расчета представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Материальные затраты

Наименование	Ед. изм.	Количество			Цена за ед., руб.	Затраты на материалы, (З <sub>м</sub> ), руб.		
		Исп.1	Исп.2	Исп.3		Исп.1	Исп.2	Исп.3
Холекальциферол стандартный образец в ацетонитриле	мл	10	10	-	400	4000	4000	0
Холекальциферол 98% (ВЭЖХ)	г	-	-	1	8493	0	0	8493
Стандарт-титр буферные растворы, набор	шт	1	1	1	569,5	569,5	569,5	569,5
Гексацианоферрат калия (II)	кг	0,1	-	-	900	90	0	0
Гексацианоферрат калия (III)	кг	0,1	-	-	800	80	0	0
Аскорбиновая кислота	г	-	50	50	1080	0	54000	54000
Тритон X-100	мл	100	100	100	72,4	7240	7240	7240
Наночастицы никеля	г	50	-	-	17,905	895,25	0	0
Изопропанол	л	0,5	1	1	9788	4894	9788	9788
Ацетонитрил	л	0,1	1	3	13874	1387,4	13874	41622
Гексан	л	0,1	1	1	13304	1330,4	13304	13304
Этанол	л	-	1	1	15205	0	15205	15205
Метанол	л	-	1	1	3041	0	3041	3041
N,N-Диметилформамид	л	0,1	-	-	237	23,7	0	0
Агар-агар	г	50	-	-	4	200	0	0
Хитозан	г	10	-	-	2,5	25	0	0
Декстран	г	10	-	-	5	50	0	0
АкваДетрим	шт	1	1	1	98	98	98	98
Natural Factors Vitamin D <sub>3</sub> , таблетки	шт	1	1	1	392	392	392	392
Now Foods Vitamin D <sub>3</sub> , капсулы желатиновые	шт	1	1	1	329	329	329	329
Now Foods Vitamin D <sub>3</sub> , капли масляные	мл	1	1	1	659	659	659	659
Электрод композитный	шт	3	-	-	1000	3000	0	0
Электрод хлоридсеребрянный	шт	6	-	-	1200	7200	0	0
Электрохимическая ячейка	шт	3	-	-	600	1800	0	0
Стакан химический на 5,	шт	5	5	10	80	400	400	800

10, 50 см <sup>3</sup>								
Обратный холодильник	шт	-	1	1	648	0	648	648
Колбы мерные на 10, 50 и 100 см <sup>3</sup>	шт	6	8	12	120	720	960	1440
Наконечники для дозатора	шт	50	50	50	5	250	250	250
Микропробирки эппендорф 2 мл	шт	30	-	-	1,5	45	0	0
Кювета кварцевая	шт	1	1	1	25743	25743	25743	25743
Хроматографическая колонка C18	шт	-	-	1	91800	0	0	91800
<b>Итого:</b>						<b>61421</b>	<b>150501</b>	<b>275422</b>

#### 4.4.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ

В данную статью включены все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по данной теме. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам с учетом НДС. При приобретении спецоборудования учтены затраты по его доставке и монтажу в размере 15 % от его цены. Все расчеты по приобретению спецоборудования и оборудования, используемого для каждого исполнения темы, сводятся в таблице 27.

Таблица 27 – Затраты на оборудование для научно-экспериментальных работ

№, п/п	Наименование оборудования	Количество единиц оборудования, шт	Цена единицы оборудования, руб.	Общая стоимость оборудования, руб.
1	Дистиллятор для приготовления воды очищенной (Россия, Тюмень)	1	20000	20000
2	Весы аналитические (класс точности 0,0001 г., Россия)	1	19000	19000
3	Встряхиватель Вортекс V-3	1	11000	11000
4	Armed 80-2S - центрифуга медицинская лабораторная	1	16000	16000



5	Дозатор 1-канальный, переменного объема 10-1000 мкл (Россия);	1	6828	6828
6	Дозатор 1-канальный, переменного объема 2-10 мл (Россия)	1	5470	5470
<b>Итого:</b>				<b>78298</b>

#### 4.4.3 Расчет основной заработной платы

Статья заработной платы исполнителей темы включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИТ, (включая премии и доплаты) и дополнительную заработную плату [39]. Также включается премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы в размере 12-20 % от тарифа или оклада:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (4.7)$$

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

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

Основная заработная плата ( $Z_{осн}$ ) руководителя НИР рассчитывается по формуле:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_p, \quad (4.8)$$

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

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

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{дн} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}, \quad (4.9)$$

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 28 приведен баланс рабочего времени каждого работника НТИ.

Таблица 28 – Баланс рабочего времени на 2019 год

Показатели рабочего времени	Руководитель	Бакалавр
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	118	118
- праздничные дни		
Потери рабочего времени		
- отпуск	24	-
- невыходы по болезни	-	-
Действительный годовой фонд рабочего времени	223	247

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{tc} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p, \quad (4.10)$$

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

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

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

$k_p$  – районный коэффициент, который для г. Томска составляет 1,3.

Расчет основной заработной платы приведен в таблице 29.

Таблица 29 – Расчет основной заработной платы

Категория	$Z_{мс}$ , руб.	$k_d$	$k_p$	$Z_m$ , руб.	$Z_{дн}$ , руб.	$T_p$ , раб. дн.	$Z_{осн}$ , руб.
Руководитель							
ППС3	28000	0,35	1,3	60060	6108	8	48864
Консультант							
ППС2	11000	0,35	1,3	23595	1185	20	23700
Бакалавр							
ППС1	2200	0,35	1,3	4719	480	80	38400
Консультант по ЭЧ							
ППС3	22450	0,35	1,3	48155	4897	4,1	20078
Консультант по СО							
ППС3	33240	0,35	1,3	71300	7251	4,1	29729

Общая заработная плата исполнителей представлена в таблице 30.

Таблица 30 – Общая заработная плата исполнителей НИР

Исполнитель	$Z_{осн}$ , руб.	$Z_{дон}$ , руб.	$Z_{зп}$ , руб.
Руководитель	48864	5863,68	54727,68
Консультант	23700	2844	26544
Бакалавр	38400	4608	43008
Консультант ЭЧ	20078	2409,36	22487,36

Консультант СО	29729	3567,48	33296,48
<b>Итого:</b>	160771	19292,52	180063,52

#### 4.4.4 Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

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

Представленные затраты на отчисление на социальные нужды рассчитываются по формуле:

$$Z_{o.c.n.} = 0,30 \cdot \sum Z_{раб.}, \quad (4.11)$$

где:  $Z_{o.c.n.}$  – затраты на отчисления на социальные нужды, руб.

$$Z_{o.c.n.} = 0,30 \cdot (23700 + 48864 + 38400 + 20078 + 29729) = 48231,3 \text{ рублей.}$$

#### 4.4.5 Накладные расходы

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:

$$Z_{накл} = k_{нр} \cdot (\text{сумма статей } 1 \div 5), \quad (4.12)$$

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

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

#### 4.4.6 Формирование бюджета затрат НИИ

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 31.

Таблица 31 – Расчет бюджета затрат НТИ

Наименование статьи	Сумма, руб.			Примечание
	Исп.1	Исп.2	Исп.3	
1. Материальные затраты НТИ	61421	150501	275422	Таблица 13
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	78298	78298	78298	Таблица 14
3. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	160771	160771	160771	Таблица 16
4. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	19292,52	19292,52	19292,52	Таблица 17
5. Отчисления во внебюджетные фонды	48231,3	48231,3	48231,3	30% от ст.3
6. Накладные расходы	58882,21	73135	93122,4	16 % от суммы ст.1-5
7. Бюджет затрат НТИ	<b>426896,03</b>	<b>530228,8</b>	<b>675137,2</b>	Сумма ст. 1-6

#### 4.5. 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:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{\Phi_{ri}}{\Phi_{\text{max}}}, \quad (4.13)$$

где:  $I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i}$  – интегральный финансовый показатель разработки;

$\Phi_{ri}$  – стоимость i-го варианта исполнения;

$\Phi_{\max}$  – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги). Рассчитаем этот показатель относительно нашего НТИ:

$$I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{426896,03}{675137,2} = 0,63; \quad I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{530228,8}{675137,2} = 0,78; \quad I_{\text{финр}}^{\text{исп.}i} = \frac{675137,2}{675137,2} = 1.$$

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

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

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i, \quad (4.14)$$

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 32 [39].

Таблица 32 – Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Объект исследования / Критерии	Весовой коэффициент параметра	Исп.1	Исп.2	Исп.3
1.Точность определения	0,2	4	3	5
2.Экспрессность	0,3	5	5	3
3.Простота эксплуатации	0,2	5	5	4
4.Простота пробоподготовки	0,15	5	4	3
5.Селективность	0,15	2	2	5
ИТОГО:	1	4,35	4	3,9

$$I_{\text{рискп.1}} = 4 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,3 + 5 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,15 + 2 \cdot 0,15 = 4,35;$$

$$I_{\text{рискп.2}} = 3 \cdot 0,2 + 5 \cdot 0,3 + 5 \cdot 0,2 + 4 \cdot 0,15 + 2 \cdot 0,15 = 4;$$

$$I_{\text{рискп.3}} = 4 \cdot 0,2 + 3 \cdot 0,3 + 4 \cdot 0,2 + 3 \cdot 0,15 + 5 \cdot 0,15 = 3,9.$$

Интегральный показатель эффективности разработки ( $I_{финр}^P$ ) и аналога ( $I_{финр}^a$ ) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{исп.1} = \frac{I_{р-исп1}}{I_{финр}^1} \quad (4.15)$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{исп.1}}{I_{исп.2}} \quad (4.16)$$

где  $\mathcal{E}_{cp}$  – сравнительная эффективность проекта;  $I_{мэ}^P$  – интегральный показатель разработки;  $I_{мэ}^a$  – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет понять и выбрать более эффективный вариант решения поставленной в бакалаврской работе технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности [39]. Наглядно данное сравнение представлено в таблице 33.

Таблица 33 – Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Исп. 1	Исп. 2	Исп. 3
1	Интегральный финансовый показатель	0,63	0,78	1
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности	4,35	4	3,9
3	Интегральный показатель эффективности	6,91	5,12	3,9
4.1	Сравнительная эффективность относительно исполнения 2	1,35	1	0,76
4.2	Сравнительная эффективность относительно исполнения 3	1,77	1,33	1

Проведенная в данном разделе работа позволяет сделать вывод о том, что представленная разработка – вольтамперметрическое определения холекальциферола – является более ресурсоэффективным, экономичным и конкурентоспособным методом, чем существующие: спектрофотометрическая и хроматографическая методики.

## **Глава 5. Социальная ответственность**

Данная работа направлена на разработку методики определения холекальциферола на композитных углеродсодержащих электродах вольтамперометрическим методом. Областью применения представленной работы может стать фармацевтическая отрасль, в частности, лаборатория по контролю качества готовой продукции – для проведения рутинного анализа.

Разработка методики проводилась в лаборатории физико-химических методов анализа НИ ТПУ, расположенной в 223 аудитории 2 корпуса, на компьютеризованном вольтамперометрическом анализаторе TA-Lab («Томьаналит» г. Томск), который предназначен, прежде всего, 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.

Работа является актуальной, поскольку представленная методика позволяет определить содержание холекальциферола в различных объектах, и может стать как самостоятельным методом определения, так и тандемным в качестве детектора для хроматографии (ВЭЖХ).

### **5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности**

Трудовой кодекс Российской Федерации устанавливает следующие виды компенсаций для работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда [40]:

- сокращение продолжительности рабочего времени;
- дополнительные отпуска – 1 раз в год;
- повышение размера оплаты труда;

- выдача молока (либо денежная компенсация за молоко за вредность);
- специальное и лечебное питание;
- обязательное проведение периодических медосмотров за счет работодателя;
- назначение трудовой пенсии досрочно.

Основные меры по обеспечению безопасности в рабочей зоне для проектируемого решения регламентируются нормативной документацией, в частности [41], которая устанавливает следующие необходимые меры:

- достижение возраста 18 лет и медицинское освидетельствование для приема на работу в аналитическую лабораторию;
- обязательное проведение вводного и периодического (дважды в год) инструктажей;
- обязательное проведение внеплановых инструктажей при переводе сотрудников на новые виды работ; регистрация проведения инструктажей в журнале;
- назначение в каждое рабочее помещение ответственного за соблюдение правил техники безопасности;
- обязательная обеспеченность всех сотрудников ИСЗ и необходимой спецодеждой.

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. Основные организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны:

- технический перерыв,
- проветривание,
- полная изоляция от производственных источников шума и вибрации.

## 5.2 Профессиональная социальная ответственность

Основной рабочей зоной данного проектируемого решения является химическая лаборатория, для безопасной работы в которой требуется соблюдение техники безопасности и охраны труда, использование средств индивидуальной защиты, для обеспечения максимально безвредных условий труда, следовательно, неблагоприятные факторы производственной среды могут воздействовать на работников в случае нарушения санитарно-гигиенического режима в аналитической лаборатории. Перечень наиболее вероятных вредных и опасных факторов согласно [42], которые могут возникнуть при разработке и эксплуатации проектируемого решения, представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Возможные опасные и вредные факторы при вольтамперометрическом определении холекальциферола в БАД

Факторы [42]	Этапы работ			Нормативные документы
	Разработка	Изготовление	Эксплуатация	
1. Использование токсичных веществ	+	+	+	<a href="#">ГОСТ 12.1.005-88</a> [43]
2. Отклонение показателей микроклимата	+	+	+	<a href="#">ГОСТ 12.1.007-76</a> [44] <a href="#">ГОСТ 9805-84</a> [45] <a href="#">СанПиН 2.2.4.548-96</a> [46] <a href="#">СП 60.13330.2016</a> [47]

2. Превышение уровня вибрации	+	+	+	ГОСТ 12.1.012-90 [48] СН 2.2.4/2.1.8.566–96[49] СП 52.13330.2016 [50] ГОСТ 12.1.019-2017 [51] ГОСТ 12.1.030-81 [52] ГОСТ 12.4.011-89[53] ПНД Ф 12.13.1-03[54]
3.Отсутствие или недостаток естественного света	+	+	+	
4.Недостаточная освещенность рабочей зоны	+	+	+	
5.Повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека	+	+	+	

### *Работа с вредными веществами*

В представленной работе объект исследования не является токсичным веществом, но в процессе работы используется токсичный реактив – изопропиловый спирт, его характеристика указана в таблице 35.

Таблица 35 – Характеристика токсичных веществ

Наименование	Нормативная документация	Величина ПДК, мг/м <sup>3</sup>	Класс опасности	Примечание
Изопропиловый спирт	ГОСТ 9805-84 [45]	10	3	Изопропиловый спирт обладает наркотическим действием. Отравление возможно при вдыхании паров при превышении ПДК.

Поскольку изопропиловый спирт пожароопасен и относится к легковоспламеняющимся жидкостям, то существуют правила при работе с ним:

- все работы с изопропиловым спиртом должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования. Должна быть соблюдена герметизация оборудования, аппаратов, процессов слива и налива;
- электрооборудование и освещение должны быть во взрывобезопасном исполнении, оборудование и трубопроводы – заземлены;
- средства пожаротушения: воздушно-механическая пена на основе пенообразователей ПО-1Д, ПО-ЗАИ; "САМПО" с оптимальной интенсивностью подачи пены 0,3 дм<sup>3</sup>·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Кроме того, песок, вода, кошма и другие средства;

- контроль воздушной среды производственных помещений осуществляют с помощью автоматического стационарного сигнализатора и газоанализаторов, позволяющих определять дозрывоопасную и предельно допустимую концентрацию паров изопропилового спирта.

Также все необходимые работы необходимо выполнять, пользуясь ИСЗ и вытяжными шкафами.

Мероприятия по снижению риска воздействия вредных факторов на работников:

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

#### *Микроклимат в аналитической лаборатории*

Основными показателями микроклимата воздуха в лаборатории, удовлетворяющими требованиям, являются: температура воздуха( $t$ ) – 19-21°C, его относительная влажность – 60 – 65 % и скорость движения ( $v$ ) – 0,2 м/с [46].

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 [48]. По уровню шума, локальной и общей вибрации лабораторию 2 корпуса НИ ТПУ можно отнести к допустимому классу, ПДУ < 25 дБ, позволяющему безопасно выполнять работу. Поскольку в работе используется оборудование, обладающее вибрационным

воздействием, то вибробезопасность труда в соответствии с [48] должна быть обеспечена:

- улучшением условий труда (в т.ч. снижением или исключением действия сопутствующих неблагоприятных факторов);
- применением средств индивидуальной защиты от вибрации;
- введением и соблюдением режимов труда и отдыха, в наибольшей мере снижающих неблагоприятное воздействие вибрации на человека;
- санитарно-профилактическими и оздоровительными мероприятиями, предусмотренными рекомендациями Минздрава РФ.

#### *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. 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.

#### *Электробезопасность*

В работе использовались весы аналитические лабораторные, электроплитка с водяной баней, анализатор вольтамперометрический ТА-Lab.

Все помещения лаборатории 2 корпуса НИ ТПУ соответствуют требованиям [51] 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 [51] принадлежит к первой категории. Для предотвращения воздействия тока на человека в лаборатории 2 корпуса НИ ТПУ приняты следующие меры:

1. до токоведущих частей соблюдаются соответствующие расстояния либо произведено заземление электрооборудования;
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.

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 защищает металлический корпус приборов, кроме того - зануление первого класса защиты.

### **5.3 Экологическая безопасность**

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

При выполнении работы в качестве исследуемого объекта был использован холекальциферол, который не оказывает негативного влияния на окружающую среду. Также в ходе работы используется изопропиловый спирт, который может оказывать вредное влияние на окружающую среду, однако это может происходить лишь при значительных потерях вещества (испарения) в атмосферу, а поскольку для анализа используются небольшие количества соединения, то воздействие на окружающую среду отсутствует. Основными отходами при выполнении работы были: сточные воды с содержанием в них таких веществ, как холекальциферол, изопропиловый

спирт, фосфатный буферный раствор, ДАГУДФК, агар-агар, и слив воды, которой мылась посуда после работы с реактивами.

Утилизация химических отходов, как и предварительный сбор и погрузка должны проводиться лишь персоналом организации, которая занимается этим видом деятельности и имеет лицензию. В городе Томске утилизацией отходов, в том числе медицинских и химических, занимается АО «Полигон», а обезвреживанием отходов кислот, щелочей, концентратов, оксидов, гидроксидов, солей и т.п. – компания "ЭкоАрхитектура", работающая по всей России.

#### **5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях**

Признаки ЧС – разрушение зданий, сооружений, материальных ценностей, гибель людей.

Вероятными ЧС, характерными для данного типа работ и зданий, при разработке проектируемого решения могут стать: пожар, взрыв, поражение электрическим током, землетрясения, ураган, разряды атмосферного электричества.

Но наиболее типичной ЧС для лаборатории является пожар, возникающий вследствие неисправности электрооборудования или неправильной его эксплуатации.

##### *Правила пожарной безопасности в лаборатории*

Рабочая зона – лаборатория НИ ТПУ – соответствует требованиям пожарной безопасности по [55], а именно:

- осуществляются плановые инструктажи по работе с электрооборудованием, пожаро- и взрывоопасными веществами и средствами пожаротушения;
- все нагревательные приборы установлены на термоизолирующих подставках;
- все электрооборудование оснащено изоляцией;

- в помещении лаборатории на видном месте вывешен план эвакуации сотрудников в случае возникновения пожара;
- лаборатория оснащена необходимыми средствами пожаротушения (огнетушители, песок, асбестовое одеяло и др.);
- наличие свободных проходов между лабораторными столами и незагроможденных выходов.

Также для предотвращения пожара существуют еще несколько правил поведения в лаборатории [55]:

- В помещениях лаборатории и в непосредственной близости от них (в коридорах, под лестницами) запрещается хранить горючие материалы;
- Курить разрешается только в отведенном и оборудованном для этой цели месте. Курить в помещениях лаборатории строго запрещается!
- Без разрешения начальника лаборатории и лица, ответственного за противопожарные мероприятия, запрещается установка лабораторных и нагревательных приборов, пуск их в эксплуатацию, переделка электропроводки;
- Запрещается эксплуатация неисправных лабораторных и нагревательных приборов;
- После окончания работы необходимо отключить электроэнергию, газ и воду во всех помещениях.

При возникновении загорания все сотрудники должны обладать знаниями об инструкции и плане эвакуации по заранее разработанной программе. Каждый сотрудник лаборатории, заметивший пожар, задымление или другие признаки пожара, обязан:

- немедленно вызвать пожарную часть по телефону;
- принять меры по ограничению распространения огня и ликвидации пожара;

- поставить в известность начальника лаборатории, который в свою очередь должен известить сотрудников, принять меры к их эвакуации и ликвидации пожара.

Также для обнаружения пожара и оповещения людей в лаборатории и в корпусе установлена система пожарной сигнализации.

### **Выводы по разделу**

Проведенная в данном разделе работа позволяет выявить особенности представленного разрабатываемого решения с точки зрения социальной ответственности, в частности: определить потенциально опасные факторы разработки, влияние на человека и окружающую среду; сформировать необходимые меры по обеспечению безопасности в ходе работы; обозначить специальные правовые нормы в соответствии с нормативной документацией по отношению к предложенной разработке.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения НИР были получены результаты и сделаны следующие выводы:

1. прямое электрохимическое окисление холекальциферола на немодифицированных углеродсодержащих и металлических электродах затруднено;

2. подобран состав модифицирующего слоя, при котором холекальциферол обладает наибольшим электрохимическим откликом – ДАГУДФК и НЧ никеля, в качестве связующего агента – раствор агар-агара;

3. исследовано влияние параметров проведения анализа на аналитический сигнал и проведен подбор рабочих условий проведения анализа:

- материал рабочего электрода – композитный углеродсодержащий;
- фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с рН=6,86;
- скорость развертки потенциала – 70 мВ/с;

4. исследовано электрохимическое поведение холекальциферола и некоторые физико-химические особенности процесса его электроокисления:

- влияние водородного показателя среды, поскольку катионы водорода непосредственно участвуют в электрохимической реакции, ввиду особенностей природы аналита;
- процесс является квазиобратимым, но при рабочих условиях носит обратимый характер;
- природа аналитического сигнала – адсорбционная, что подтверждают исследованные зависимости;

5. построена концентрационная зависимость, которая линейна в диапазоне содержания холекальциферола от 0,2 до 4 мкг/см<sup>3</sup>, предел определения и предел обнаружения составляют  $C_{lim} = 0,17$  мкг/см<sup>3</sup> и  $C_{min} = 0,05$  мкг/см<sup>3</sup> соответственно, предел повторяемости –  $\sigma_r = 0,91 \cdot 10^{-2}$  мкг/см<sup>3</sup>;

6. проведена качественная оценка содержания холекальциферола в объектах анализа. Положительная реакция наблюдалась для объектов «Now

Foods Vitamin D<sub>3</sub>» (США) в форме капсул желатиновых и масляных капель и «Natural Factors Vitamin D<sub>3</sub>» (Канада) в форме таблеток, отрицательная – для объекта «АкваДетрим» (Россия) в форме водного раствора;

7. вольтамперометрические сигналы окисления холекальциферола в исследуемых объектах полностью соответствуют вольтамперометрическим сигналам ГСО холекальциферола;

8. в качестве методики сравнения использовалась спектрофотометрия, максимум поглощения наблюдался при длине волны 268 нм, оценка содержания объекта проводилась по показателю оптической плотности;

9. построена концентрационная зависимость для спектрофотометрической методики – диапазон линейной зависимости интенсивности поглощения от содержания холекальциферола в растворе наблюдался от 0,5 до 9 мкг/см<sup>3</sup>;

10. для методики сравнения проведен подбор растворителя, обеспечивающего максимальную экстракцию, которым является ацетонитрил;

11. определены содержания холекальциферола в объектах по градуировочному графику по двум методикам, результаты определения являются сходимыми, что подтверждается расчетами критерия Стьюдента для независимых выборок.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яхимович Р. И., Химия витаминов D, Киев: Наукова думка, 1978. — 248с.
2. Захарова, И. Н. Недостаточность и дефицит витамина D: что нового? / И. Н. Захарова, Ю. А. Дмитриева, С. В. Яблочкова [и др.] // Вопросы современной педиатрии – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 134-140.
3. Holick, M. F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application / M. F. Holick // Ann. Epidemiol. – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 73-78
4. Heaney, R. P. Why the IOM recommendations for vitamin D are deficient / R. P. Heaney, M. F. Holick // J. Bone Miner. Res. – 2011. – Vol. 26. – P. 455-457.
5. WHO global report on Falls Prevention in older age. Geneva: WHO, 2007 – 48 p.
6. Heaney R.P. Vitamin D in health and disease // Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2008. - Vol. 3, № 5. – P. 1535—1541.
7. Плещева А.В. Витамин D и метаболизм: факты, мифы и предубеждения. Ожирение и метаболизм. / Плещева А.В., Пигарова Е.А., Дзеранова Л.К. – 2012. № 2. С. 33-42.
8. Holick, M. F. Vitamin D deficiency / M. F. Holick // N. Engl. J. Med. – 2007. – Vol. 357. – P. 266-281.
9. Anderson P.H. Modulation of CYP27B1 and CYP24 mRNA expression in bone is independent of circulating 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels/O'Loughlin P.D., May B.K., Morris H.A. // Bone – 2005 – Vol. 36. – P. 654–662.
10. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. / Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, Shoenfeld Y, Lerchbaum E, Llewellyn DJ, Kienreich K, Soni M. // Autoimmun Rev. – 2013 Aug;12(10): P. 976-89.
11. Vitamin D and Cardiovascular Disease: An Appraisal of the Evidence / Peter F. Schnatz and JoAnn E. Manson // Clinical chemistry – 2014 – Vol. 60. – P. 600-609.

12. Пигарова Е. А. Влияние витамина D на иммунную систему / Пигарова Е. А., Плещева А. В., Дзеранова Л. К. // Иммунология – 2015. – Т. 36(1). – с. 62-66.
13. Клинические рекомендации: дефицит D / URL: <https://minzdrav.gov-murman.ru/documents/poryadki-okazaniya-meditsinskoy-pomoshchi/20194.pdf> / (дата обращения 01.04.2019)
14. Johnson D.D. D vitamin deficiency and insufficiency is common during pregnancy / Johnson D.D. Wagner C.L., Hulsey T.C. // Am. J. Perinatol. – 2011. – Vol. 28, № 1. – P. 7-12.
15. L. Carlucci. Several approaches for vitamin D determination by surface plasmon resonance and electrochemical affinity biosensors / L. Carlucci, G. Favero, C. Tortolini, M. Di Fusco, E. Romagnoli, S. Minisola, et al. // Biosens. Bioelectron. – 2013. – Vol. 40. — P. 350-355.
16. K. A. Tartivita, and J. P. Sciarello, and B. C. Rudy, J. // Pharm. Sci. –1976. – P. 1024.
17. R. Strohecker. Vitamin-Bestimmungen / Verlag R. Strohecker and H. M. Henning // Chemil. Weinheim – 1963. – P. 264 – 290.
18. Герег Ш. Количественный анализ стероидов. М: Мир, 1985. – 504 с.
19. Казанцев Е.В. Идентификация и определение содержания витамина d в водных растворах методом инфракрасной спектроскопии / Казанцев Е.В. // Сільськогосподарські Науки – 2015. – с. 36-39.
20. Государственная фармакопея СССР, 10-е изд., Медицина, М. – 1968. – с. 707.
21. European Pharmacopoeia 8<sup>th</sup> Edition. Council of Europe, Strasbourg, 2014. — P. 2133.
22. ГОСТ EN 12821-2014 Продукты пищевые. Определение содержания холекальциферола (витамина D(3)) и эргокальциферола (витамина D(2)) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. М., 2016 – 32с.
23. Определение жирорастворимых витаминов в пищевых продуктах, витаминноминеральных комплексах, комбикормах, премиксах и сыворотке

- крови методом обращеннофазовой ВЭЖХ / В. А. Чиркин, С. И. Карпов, В. Ф. Селеменев, Н. И. Шумский // Журнал аналитической химии – 2013., Т. 68, №8 – с. 820-825.
24. Количественное определение витаминов А, D<sub>3</sub> и Е в составе премиксов «МАУЭРВИТ» И «ГРАНДВИТАМ» методом УльтраВЭЖХ / А.В. Баклыков, Г.А. Артемьев, С.А. Главатских, Д.С. Копчук // Разработка и регистрация лекарственных средств – 2017., №4 – с. 88-96.
25. В.Г. Майрановский, Г.И. Самохвалов, Электрохимия учеб. пособие для студентов. М., 1965. – Т.1 – 996 с.
26. A. Manz, N. Pamme, D. Iossifidis Bioanalytical Chemistry /2nd edition, Imperial College Press, London – 2015. – P. 452.
27. Aidan Fagan-Murphy. Chemically modified multiwall carbon nanotube composite electrodes: An assessment of fabrication strategies / Aidan Fagan-Murphy, Marcus C Allen, Bhavik Anil Patel // Electrochimica Acta – Vol. 152 – 2015 – P. 249-254.
28. Gomes F.P. Recent trends in the determination of vitamin D / Gomes FP, Shaw PN, Whitfield K, Koorts P, and Hewavitharana A.K. // Bioanalysis – 2013. – Vol. 5. – P. 3063–3078.
29. Bard A., Inzelt G., Scholz F. (ed.) Electrochemical Dictionary 2nd, Revised and Extended Edition. - Springer, 2012. – 991 p.
30. Золотов Ю.А. (ред.) и др. Основы аналитической химии. Кн. 2: Методы химического анализа. В 2 кн. Учебник для ВУЗов. — Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В. И. Фадеева и др. Под ред. Ю.А. Золотова. — 2-е изд. перераб. и доп. — М.: ФГУП "издательство"Высшая школа", 2002. — 494 с.: ил.
31. The United States Pharmacopeia 33 – National Formulary 28, Reissue 2010.
32. Дёрина К. В. Определение холестерина в пищевых продуктах и биологических объектах методом вольтамперометрии : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук : спец. 02.00.02 / К. В. Дёрина ; Национальный исследовательский Томский политехнический

- университет (ТПУ) ; науч. рук. Е. И. Короткова. — Томск, 2016. — 167 л. : ил.
33. Будников Г.К. Основы современного электрохимического анализа / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев. – М: Мир: Бином ЛЗ, 2003. – 592 с.
  34. РМГ 29-2013 «ГСИ. Метрология. Основные термины и определения. Расчет повторяемости результатов»
  35. РМГ 61-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки»
  36. Савицкая Г.В. Анализ хозяйственной деятельности предприятия. – М.: ИНФРА-М, 2008. – 512 с.
  37. Ильин А.И. Планирование на предприятии. – М.: Новое знание, 2010. – 700 с.
  38. Фатхутдинов Р.А. Производственный менеджмент. – М.: Банки и биржи: ЮНИТИ, 2011. – 496 с.
  39. Лапуста М.Г., Мазурина Т.Ю., Скамай Л.Г. Финансы организаций (предприятий) М.: Инфра-М, 2008. – 575 с.
  40. 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). – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901807664/> (дата обращения 10.05.2019)
  41. ПНД Ф 12.13.1-03 Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения) / Министерство природных ресурсов РФ. - М., 2003 год
  42. ГОСТ 12.0.003-2015 «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация». Официальное издание. М.: Стандартинформ, 2016 год
  43. ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны». – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200003608/> (дата обращения 10.05.2019)

44. ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны. М.: Стандартинформ, 2008. – 49 с.
45. ГОСТ 9805-84 Спирт изопропиловый. Технические условия (с Изменением N 1, с Поправкой) М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. – 16 с.
46. СанПиН 2.2.4.548–96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997. – 21 с.
47. СП 60.13330.2016 Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха. – М.: Стандартинформ, 2017. – 62 с.
48. ГОСТ 12.1.012-90 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вибрационная безопасность. Общие требования». – URL: <http://docs.cntd.ru/document/5200329/> (дата обращения 10.05.2019)
49. СН 2.2.4/2.1.8.566–96. «Производственная вибрация, вибрация в помещениях жилых и общественных зданий ». – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901703281/> (дата обращения 10.05.2019)
50. СП 52.13330.2016 Естественное и искусственное освещение. М.: Стандартинформ, 2017. – 121 с.
51. ГОСТ 12.1.019-2017 ССБТ. «Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты». – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200161238/> (дата обращения 10.05.2019)
52. ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. «Электробезопасность. Защитное заземление, зануление ». М.: ИПК Издательство стандартов, 2001. – 10 с.
53. ГОСТ 12.4.011-89 ССБТ. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация. М.: ИПК Издательство стандартов, 2001. – 10 с.
54. ПНД Ф 12.13.1-03 Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения) / Министерство природных ресурсов РФ. - М., 2003. – 30 с.
55. ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования (с Изменением N 1). М.: Стандартинформ, 2006. – 68 с.





Продолжение таблицы 36

Вид работ	Исполнители	T <sub>кi</sub> , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ											
			Февраль		Март			Апрель			Май			
			2	3	1	2	3	1	2	3	1	2		
Оценка эффективности полученных результатов	К	1,5				■								
	Б	3,6				■	■							
Определение целесообразности проведения ВКР	Р	1				■	■							
	К	2,6				■	■	■						
	Б	2,6				■	■	■						
Разработка вольтамперометрической методики определения холекальциферола в БАД и обработка результатов	Б	22,6					■	■	■	■	■	■	■	■
Оценка эффективности производства и применения разработки	Б	5								■	■			
	К <sup>1</sup>	5								■	■			
Разработка социальной ответственности по теме	Б	5									■	■		
	К <sup>2</sup>	5									■	■		
Составление пояснительной записки	Б	26										■	■	■

Условные обозначения в таблице 36: Р – руководитель; К – консультант; Б – бакалавр; К<sup>1</sup> – консультант по экономической части (ЭЧ); К<sup>2</sup> – консультант по социальной ответственности (СО).

Научный руководитель	Консультант	Бакалавр	Консультант ЭЧ	Консультант СО
■	■	■	■	■