

УДК 541.1  
ББК 24.5  
Х94



Составители:

кандидат химических наук Л.Н. Коломиец,  
А.А. Волков,  
кандидат химических наук Э.С. Якубов

Ответственный редактор:

доктор химических наук А.А. Курганов

Рецензенты:

доктор химических наук Л.Д. Белякова,  
доктор химических наук А.К. Буряк,  
доктор химических наук О.Г. Ларионов

Х94

**Хроматография на благо России.** – М.: Издательская группа «Граница», 2007. – 688 с.

ISBN 978-5-94691-302-7

В сборник статей по хроматографии, созданный с целью популяризации этого метода, вошли работы, демонстрирующие достижения и возможности хроматографической науки в нашей стране. Статьи написаны ведущими специалистами в области хроматографии России и дают представление об основных научных и практических направлениях исследований в этой области. В книге содержатся материалы по выпуску хроматографических приборов и материалов отечественными производителями. В книге содержатся статьи, демонстрирующие всю широту применения этого метода, начиная от анализа пищевой продукции и заканчивая его применением в таких наукоёмких областях, как ракетно-космическая отрасль.

Книга предназначена для специалистов химико-аналитического, медико-биологического и физико-химического профиля, а также для студентов и аспирантов соответствующих высших учебных заведений.

УДК 541.1

ББК 24.5

ISBN 978-5-94691-302-7

© Институт физической химии

Российской академии наук, 2007

© Издательская группа «Граница», 2007

## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ: БАЗЫ ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

*И.Н. Азарова<sup>1</sup>, С.С. Барсегян<sup>2</sup>, Г.И. Барам<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", 630090, Новосибирск, ул. Николаева, 8;

<sup>2</sup>Экспертно-криминалистический отдел Управления Федеральной службы РФ по контролю за оборотом наркотиков по Кемеровской области

Вторая половина XX столетия и начало нового века характеризуются небывалым развитием во всех областях деятельности человека. Неотъемлемая черта происходящего научно-технического прогресса – все возрастающая "химизация" общества, постоянное увеличение числа используемых веществ, как полезных, так и опасных. На фоне происходящих в России в последние два десятилетия общественно-политических изменений, эта общемировая тенденция приобретает свои черты:

- внедрение на промышленных и сельскохозяйственных предприятиях совершенно новых технологий, основанных на применении ранее не использовавшихся химических веществ;
- возрастающая химическая нагрузка на окружающую среду, обусловленная не только ростом производства и добычи сырья внутри страны, но и интенсивным экономическим развитием в соседних странах Европы и, особенно, Юго-Восточной Азии;
- постоянный рост нецентрализованного импорта продовольственного сырья и пищевых добавок, продуктов питания и лекарственных средств, строительных материалов и средств бытовой химии, далеко не всегда являющихся качественными и безопасными;
- расширение ассортимента и рост незаконного оборота наркотических средств.

Эти изменения нашей жизни диктуют необходимость создания современных систем контроля химической безопасности и качества продукции и многократно усложняют работу специалистов в области аналитической химии. Если еще недавно задачей химика-аналитика было определение вещества из списка, включающего несколько десятков названий, то сейчас счет идет на сотни соединений. Решение таких задач становится возможным благодаря развитию и внедрению высокопроизводительных методов анализа, важнейшими из которых являются газовая хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Метод ВЭЖХ имеет более чем 30-летнюю историю интенсивного развития, и на сегодняшний день условно характеризуется скоростью анализа "1 вещество в минуту" и типичной производительностью порядка 20 веществ за хроматографическую процедуру. В распоряжении аналитиков появилось надежное автоматическое оборудование и мощные компьютерные программы обработки данных. Казалось бы, созданы все предпосылки для внедрения метода в практику большого круга лабораторий, однако до сих пор ВЭЖХ считается одним из самых трудоемких, продолжительных и дорогостоящих аналитических методов. Главным фактором, сдерживающим широкое внедрение ВЭЖХ, является сложившийся подход к разработке методического обеспечения.

Традиционно при выборе условий анализа хроматографисты, исходя из своего опыта и имеющихся в распоряжении реактивов и оборудования, руководствуются принципом "для каждого вещества (группы веществ) – своя методика анализа". Это означает: "своя" хроматографическая колонка, "свои" растворители и "своя" процедура градуировки хроматографа. Для воспроизведения такой методики анализа, кроме аналогичного набора реактивов и вспомогательных материалов, часто требуются значительные затраты времени и высокая квалификация персонала. Характерные примеры методик такого типа содержатся в многочисленных фармакопейных статьях, регламентирующих процедуры анализа лекарственных

---

\* Адрес для переписки: [baram@econova.nsk.su](mailto:baram@econova.nsk.su)

средств. При переходе от анализа одного лекарства к другому, как правило, необходимо заменять колонку, готовить новые элюенты и серию градуировочных растворов, проверять пригодность хроматографической системы, получать градуировочную зависимость, и только затем хроматографировать исследуемый образец. Таким образом, проведение даже относительно несложного анализа может потребовать много часов.

Коренным образом изменить такое положение дел и сделать ВЭЖХ быстрым и доступным методом может переход к унифицированным методикам анализа, построенным по принципу "для многих сотен веществ – одна методика". Такой подход в последние годы используется в ряде лабораторий токсикологического и фармакологического направления [1-12]. Принципы построения таких унифицированных ВЭЖХ-методик можно обобщить следующим образом:

- анализ всех веществ, включенных в определенный список (до нескольких сотен и даже тысяч веществ), проводится в одной и той же хроматографической системе (колонка с обращенно-фазовым сорбентом, фиксированный градиентный режим элюирования, многоволновая УФ-детекция);
- градуировка для каждого из определяемых веществ выполняется однократно, с использованием растворов стандартных образцов, и полученные хроматографические и спектральные характеристики формируют базу данных (БД);
- идентификация пиков на хроматограмме исследуемого образца проводится сравнением хроматографического удерживания и спектральных параметров с соответствующими характеристиками из БД; при однозначной идентификации выдаются количественные данные о концентрации аналита (аналитов) в образце.

Жидкостный хроматограф, используемый в описанном режиме, переходит в категорию "ВЭЖХ-анализатора", и его может эксплуатировать любой химик-лаборант, не имеющий специальной подготовки в области ВЭЖХ. Такой инструмент становится незаменимым при проведении скрининговых анализов, например, фармацевтических препаратов, объектов окружающей среды, пищевых продуктов и, особенно, в токсикологических и криминалистических исследованиях при отсутствии априорной информации.

Что препятствует широкому внедрению "ВЭЖХ-анализаторов" в российскую и мировую практику? Можно выделить две основные причины:

- производители хроматографического оборудования обычно не ставят задачу сделать все хроматографы, даже одной серии, "одинаковыми". Различия метрологических характеристик не позволяют без корректировки использовать базу данных, созданную с помощью конкретного прибора, на другом аналогичном оборудовании;
- при производстве наполнителей для колонок не обеспечивается требуемая воспроизводимость свойств даже между различными партиями сорбента одной и той же марки.

Таким образом, для решения проблемы тиражируемости баз данных "ВЭЖХ-УФ" необходимо иметь в распоряжении "одинаковые" хроматографы и "одинаковые" колонки.

Нам удалось создать первую в мире неспециализированную тиражируемую Базу хроматографических и спектральных данных ("БД-2003") для микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром А-02" (ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова", г. Новосибирск). Технология производства этих хроматографов обеспечивает беспрецедентную воспроизводимость характеристик от прибора к прибору. Решена также и задача производства колонок с достаточно воспроизводимыми параметрами.

Методика формирования "БД-2003" состоит в следующем. Растворы стандартных образцов УФ-поглощающих веществ с концентрацией 0,2 мг/мл хроматографируют в фиксированных условиях:

Колонка: Ø2x75 мм;

Сорбент: ProntoSIL 120-5-C<sub>18</sub> AQ (Bischoff Anal. GmbH", Германия);

Элюенты: "А" - [4М LiClO<sub>4</sub> – 0,1М HClO<sub>4</sub>] : H<sub>2</sub>O (5:95); "Б" – CH<sub>3</sub>CN;

Поток: 100 мкл/мин;

Градиент: от 5% до 100% "Б" за 40 мин; 100% "Б" 3 мин;

Температура: 40°C;

Детектор: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм одновременно;

Объем образца: 4 мкл.

Эти условия можно считать универсальными: градиентный режим позволяет работать с веществами, значительно отличающимися по гидрофобности; присутствие в подвижной фазе кислоты обеспечивает удерживание органических кислот, а высокая концентрация перхлорат-ионов способствует удерживанию и улучшает форму пиков соединений основного характера. Используемые 8 длин волн детектирования вполне достаточно характеризуют спектры веществ в наиболее информативной области УФ-диапазона.

Из полученных хроматограмм с помощью программы обработки данных [13] для каждого вещества вычисляют объем удерживания ( $V_R$ , мкл), площадь пика при длине волны детектирования 210 нм ( $S_{210}$ , е.о.п.·мкл) и спектральные отношения как отношения площадей пика при всех используемых длинах волн к площади пика при базовой длине волны ( $S_\lambda/S_{210}$ ). Совокупность таких наборов хроматографических и спектральных параметров веществ составляет Базу данных "БД-2003".

Анализ с использованием БД сводится к хроматографированию раствора исследуемого образца в тех же условиях. Идентификация пика на хроматограмме проводится автоматически с помощью компьютерной программы [13]: предварительно по величине объема удерживания в пределах "окна"  $\pm 10\%(V_R)$  и окончательно – по спектральным отношениям. Если идентификация положительна, по площади пика вычисляется концентрация определяемого компонента в образце. В случае отрицательной или неоднозначной идентификации приводится список близких по удерживанию "веществ-кандидатов" из БД. Относительная погрешность определения массовой концентрации на уровне 0,2 мг/мл составляет 10%; время анализа, включая обработку данных, 1 час.

Для контроля метрологических характеристик хроматографической системы разработана специальная процедура проверки ее пригодности (валидации) для работы с БД. Суть этой процедуры заключается в следующем:

- в "стандартных" (см. выше) условиях хроматографируют пятикомпонентную тестовую смесь (*KBr*, уридин, кофеин, *m*- и *o*-нитроанилины; рис. 1);
- из хроматограммы автоматически вычисляются 14 параметров (табл. 1), каждый из которых количественно характеризует работу определенных узлов хроматографа;
- если все параметры соответствуют установленным значениям в пределах погрешностей, то система пригодна для проведения анализа с использованием БД;
- если какой-либо параметр отклоняется от "правильного" значения, то требуется настройка соответствующего узла.

Таким образом, достаточно полная метрологическая поверка оборудования занимает всего 30 мин.

Методики формирования и использования "БД-2003" аттестованы Государственным комитетом РФ по стандартизации и метрологии [14-16] в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725-2002 (Части 1-6). Метрологические характеристики методик были получены на большом массиве экспериментальных данных для компонентов тестовой смеси и 10 веществ с разными кислотно-основными и гидрофобными свойствами. Было показано, что используемая в БД двухточечная линейная градуировка, на основе которой проводится количественный расчет, при концентрациях до  $10^{-3}$  моль/л выполняется для всех исследованных веществ. К настоящему времени в БД включены более 500 соединений (лекарственные вещества, примеси в фармацевтических субстанциях, наркотики, взрывчатые вещества, пестициды, микотоксины, пищевые красители, консерванты, природные соединения и т.д.). Поскольку БД имеет открытую архитектуру, она постоянно пополняется и, в пер-

спективе, может быть расширена до нескольких тысяч веществ. Теоретическая емкость "БД-2003" (т.е. количество веществ с отличающимися, в пределах установленных погрешностей, наборами хроматографических и спектральных параметров) оценивается как:

$$Q = P \cdot Z = 100 \cdot 10^9 = 10^{11},$$

где  $P$ - пиковая емкость колонки, равная 100 пикам;  $Z$ - количество разрешенных восьмиточечных УФ-спектров.

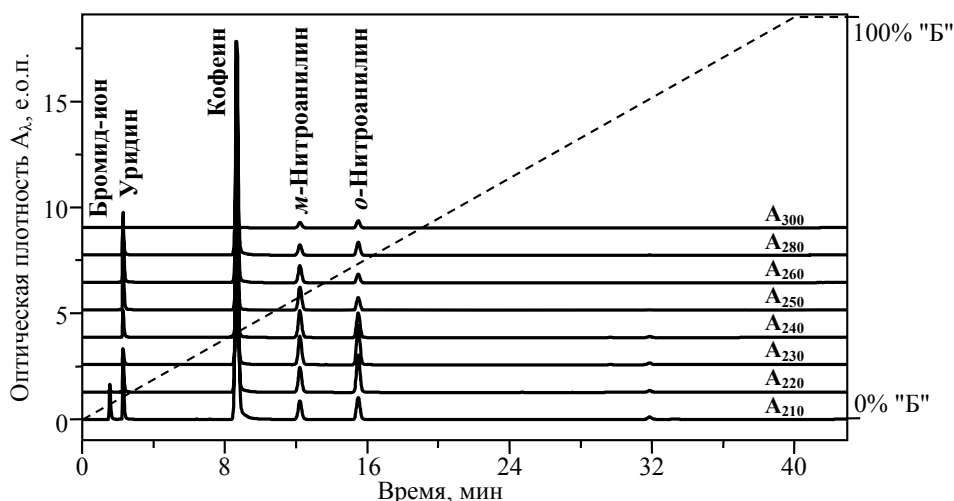


Рис. 1. Хроматограмма тестовой смеси. Условия анализа в тексте.

Строго говоря, предлагаемый подход рассчитан на определение индивидуальных веществ. Однако, в случае хорошего разделения пиков, с помощью БД удастся анализировать и многокомпонентные образцы (рис. 2, 3), и такие сложные смеси, как растительные экстракты (рис. 4).

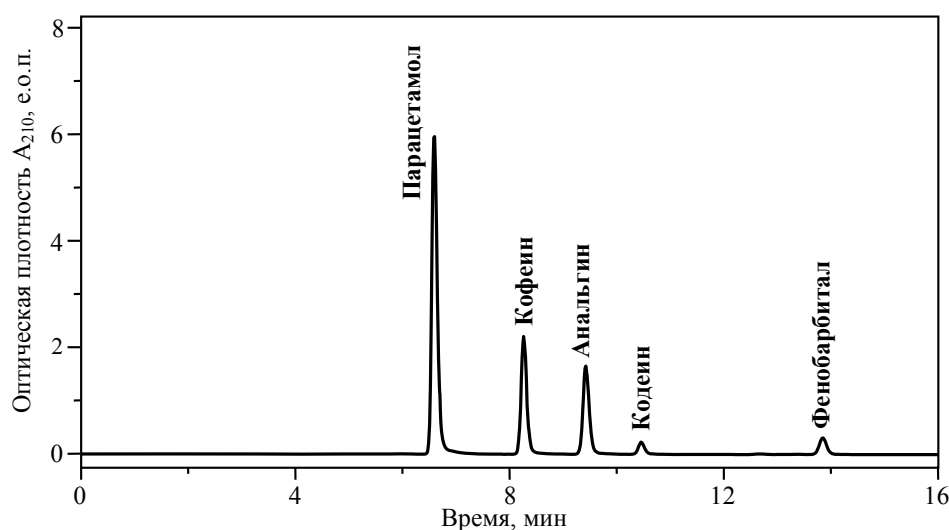


Рис. 2. Хроматограмма водного раствора таблеток "Седал-М" в условиях "БД-2003". Концентрации веществ (мг/мл)  $\pm 10\%$ : парацетамол- 0,35; кофеин- 0,060; анальгин- 0,18; кодеин- 0,014; фенобарбитал- 0,020.

Таблица 1.

Значения хроматографических и спектральных параметров компонентов тестовой смеси "БД-2003" и контролируемые характеристики хроматографической системы.

Вещество	Наименование параметра	Контролируемые характеристики хроматографической системы	Значение параметра	Границы относительной погрешности, %, $P=0,95$	Предел повторяемости, %, $r$ ( $n=2$ ; $P=0,95$ )	Предел воспроизводимости, %, $R$ ( $m=2$ ; $P=0,95$ )
1. Бромид-ион	$V_R$ , мкл	Свободный объем	150	$\pm 6$	4	6
2. Уридин	$S_{280}/S_{250}$	Точность настройки детектора в диапазоне от 250 до 280 нм	0,50	$\pm 6$	2	8
3. Кофеин	$S_{260}/S_{280}$	Линейный диапазон детектора	0,76	$\pm 5$	2	6
4. <i>m</i> -Нитроанилин	$S_{260}/S_{230}$	Пригодность (рН) элюента "А"	0,60	$\pm 4$	4	5
5. <i>o</i> -Нитроанилин	$V_R$ , мкл	Отклонение градиента от заданной формы	1525	$\pm 4$	2	4
	$S_{220}/S_{210}$	Точность настройки детектора в диапазоне от 210 до 300 нм	1,69	$\pm 3$	1	3
	$S_{230}/S_{210}$		1,74	$\pm 5$	1	7
	$S_{240}/S_{210}$		1,07	$\pm 7$	1	9
	$S_{250}/S_{210}$		0,57	$\pm 7$	1	8
	$S_{260}/S_{210}$		0,39	$\pm 6$	1	7
	$S_{280}/S_{210}$		0,59	$\pm 4$	1	5
	$S_{300}/S_{210}$		0,31	$\pm 7$	2	9
	Асимметрия пика $A_{10\%}$	Нарушения в упаковке колонки	1,04	$\pm 7$	3	8
$S_{210}$ , е.о.п.·мкл	Точность дозирования образца	24,8	$\pm 4$	3	6	

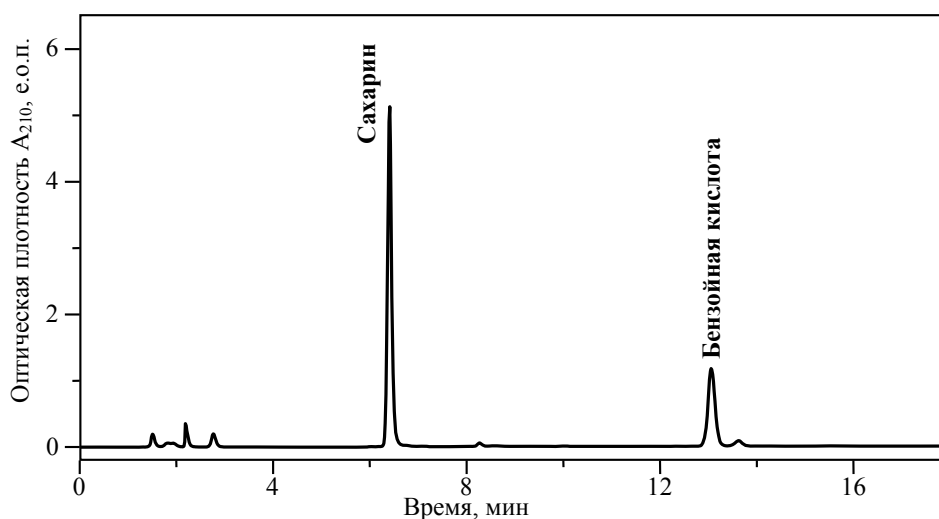


Рис. 3. Хроматограмма безалкогольного напитка "Крем-сода" (ООО "ЗапСибКола", г. Новосибирск). Условия анализа в тексте.

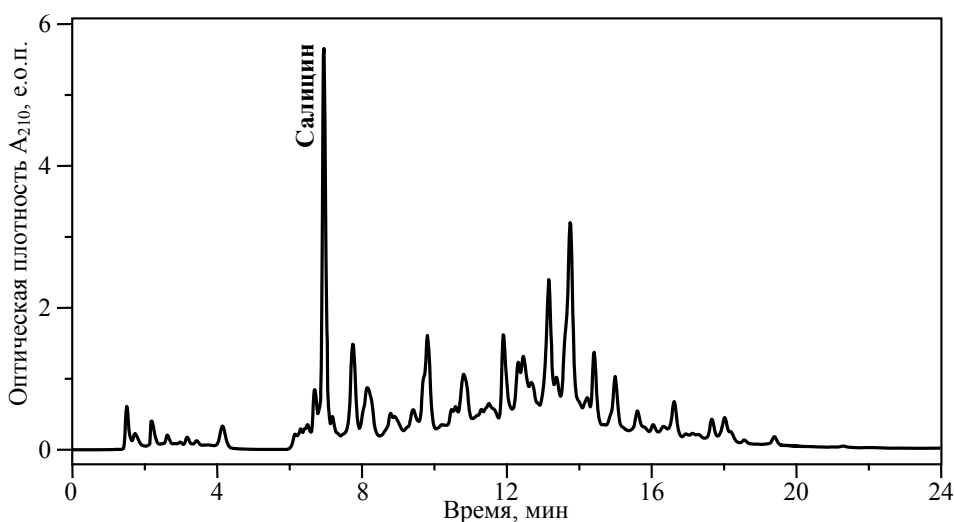


Рис. 4. Хроматограмма водного экстракта биологически-активной добавки к пище (БАД) "Популин" (ООО "Биолит", г. Томск). Состав БАД: экстракты коры осины, травы солянки холмовой, концентрат минеральной воды оз. Шира. Условия анализа в тексте. Концентрация салицина в анализируемом образце  $0,50 \pm 0,05$  мг/мл.

Для достижения более высокого разрешения пиков, в рамках предлагаемого "стандартного" метода можно, до определенной степени, изменять форму градиента концентрации элюента **Б**. Разумеется, при этом предварительная идентификация по объемам удерживания не проводится, и для распознавания пиков пригодна только спектральная информация, которая в большинстве случаев при варьировании состава растворителя в весьма широком интервале изменяется в допустимых пределах. Примером такого использования БД может служить работа, проводимая специалистами Экспертно-криминалистического отдела Управления Федеральной службы РФ по контролю за оборотом наркотиков по Кемеровской области [17]. На рис. 5 и 6 показаны типичные хроматограммы экстракта опия, записанные в "стандартном" и более пологом градиенте концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Во втором

случае обеспечивается хорошее разделение не только основных, но и минорных компонентов опиума (пики между пиками кодеина и тебаина), что дает возможность надежно сравнивать их удерживание, спектральные отношения и относительное содержание для разных исследуемых образцов. Таким образом, каждый образец опиума характеризуется:

- абсолютным содержанием основных наркотически активных компонентов и фармакологически активных добавок;
- относительным содержанием кодеина, тебаина и наркотина по отношению к морфину;
- наличием и относительным содержанием ряда минорных веществ, структура которых неизвестна.

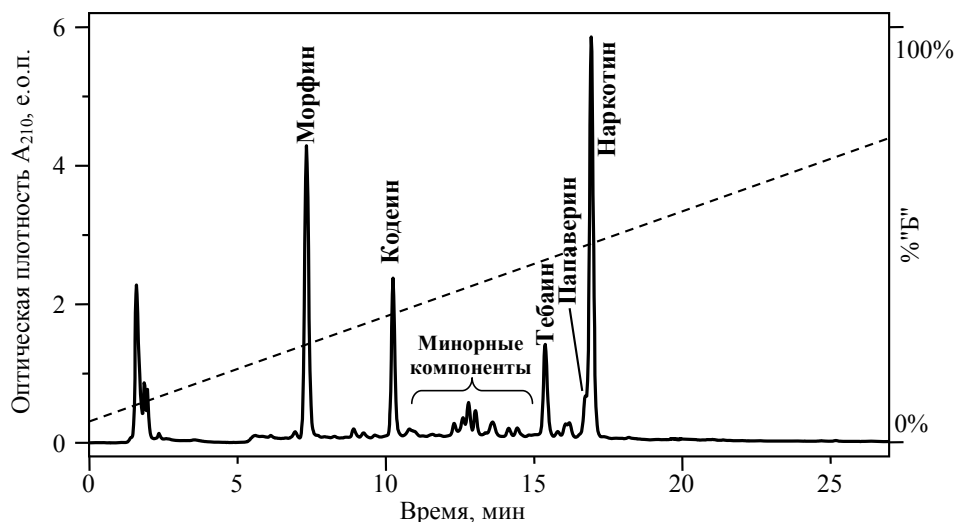


Рис. 5. Хроматограмма водно-спиртового экстракта опиума в условиях "БД-2003" (см. в тексте).

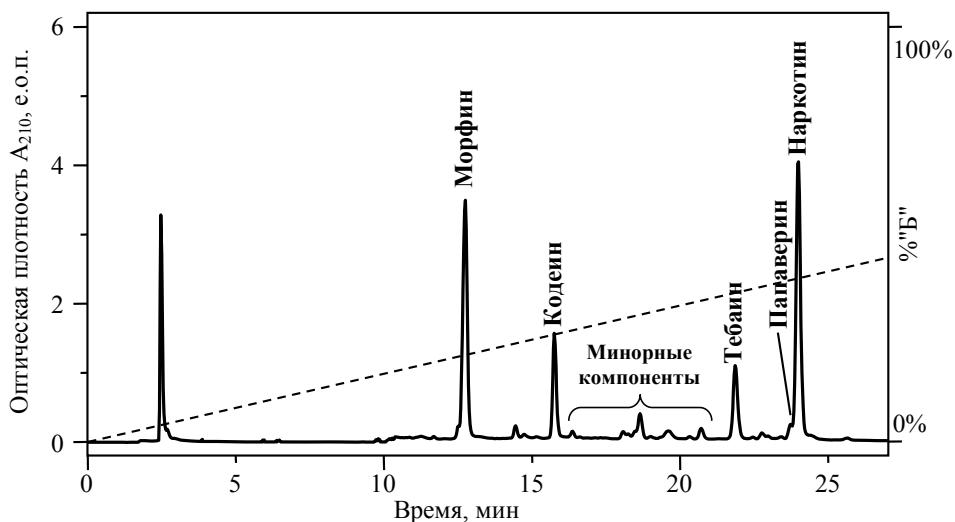


Рис. 6. Хроматограмма водно-спиртового экстракта опиума в градиенте концентрации ацетонитрила в подвижной фазе от 0% до 45% за 27 мин. Остальные условия в тексте.

Все эти характеристики как "паспорт" каждого исследованного образца вносятся в Банк данных "Опий". Сравнение таких "паспортов" с учетом доверительных интервалов позволяет делать вывод о принадлежности исследуемого образца к той или иной (или к неизвестной) партии наркотика.



Очевидно, что "паспортизировать" можно и другие, в том числе, и ненаркотические многокомпонентные препараты, что позволит объективно и надежно сравнивать между собой многочисленные растительные экстракты, представляющие собой лекарственные средства, биологически активные добавки (БАДы), ликеры и настойки и пр. Создание специализированных Банков данных должно в первую очередь может заинтересовать такие федеральные контролирующие и надзорные службы как ФСКН, ФСБ, МВД, Росздравнадзор, Роспотребнадзор и таможня.

Преимущества работы с БД уже давно оценили специалисты многих токсикологических лабораторий и бюро судебно-медицинской экспертизы (рис. 7), где особенно остро стоит вопрос наличия и поддержки обширной коллекций стандартных образцов и установлены жесткие сроки проведения анализа.

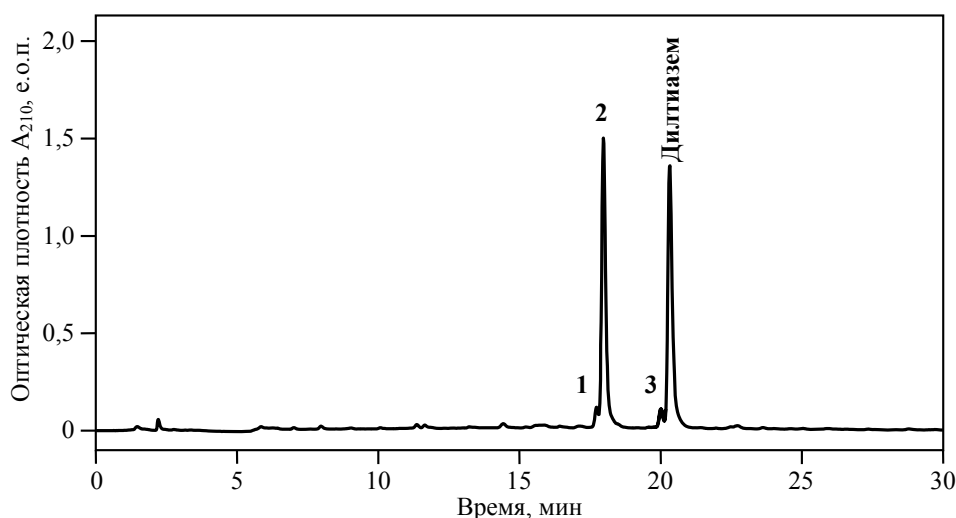


Рис. 7. Хроматограмма экстракта гидролизованной желчи скорострительно умершего человека. Условия анализа в тексте. Идентифицировано лекарственное вещество дилтиазем. Пики 1-3 – предположительно, метаболиты дилтиазема. Данные Л.Н. Алферовой (Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы); публикуется с разрешения автора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baker J.K., Skelton R.E., Ma C-Y. Identification of Drugs by HPLC with Dual Wavelength Ultraviolet Detection // J.Chromatogr. 1979. V. 168. P. 417.
2. Jinno K., Hayashida M., Watanabe T. Computer-Assisted Liquid Chromatography for Automated Qualitative and Quantitative Analysis of Toxic Drugs // J.Chromatogr.Sciences. 1990. V. 28. P. 367.
3. Bogusz M., Wu M. Standartized HPLC/DAD System, Based on Retention Indices and Library, Applicable for Systematic Toxicological Screening // J.Analyt. Toxicology. 1991. V. 15. P. 188.
4. Зенкевич И.Г. Формирование базы данных по индексам удерживания лекарственных веществ в обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. прикл. химии. 1994. Т. 67. №11. С. 1877.
5. Koves E.M. Use of HPLC-DAD in Forensic Toxicology // J.Chromatogr. A. 1995. V. 692. P. 103.
6. Maier R.D., Bogusz M. Identification Power of Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis // J. Analyt. Toxicology. 1995. V. 19. P. 79.

7. Gaillard Y., Pepin G. Use of HPLC with Photodiodearray UV Detection for the Creation of a 600 Compound Library. Application to Forensic Toxicology // J. Chromatogr. A. 1997. V. 763. P. 149-163.
8. Elliot S.P., Hale K.A. Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indices and UV Spectra // J. Analyt. Toxicology. 1998. V. 22. P. 279.
9. Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Potential of HPLC-DAD in Forensic Toxicology // J. Chromatogr. B. 1997. V. 689. P. 45.
10. Herzler M., Herre S., Pragst F. Selectivity of Substance Identification by HPLC-DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds // J. Analyt. Toxicology. 2003. V. 27. P. 233-242.
11. Pragst F., Herzler M., Erxleben B.-T. Systematic Toxicological Analysis by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD) // Clin. Chem. Lab. Med. 2004. V. 42(11). P. 1325-1340.
12. Stoll D.R., Paek C., Carr P.W. Fast Gradient Elution Reversed-Phase Liquid Chromatography with Diode Array Detection as a High-Throughput Screening Method for Drugs of Abuse. I. Chromatographic conditions // J.Chromatogr. A. 2006. V. 1137. P. 153-162.
13. Программный комплекс для обработки хроматографических данных "МультиХром-СПЕКТР". © ЗАО "Амперсенд", г. Москва. 1993-2007.
14. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. № ФР.1.31.2003.00950.
15. Хроматографические и спектральные параметры УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. № ФР.1.31.2003.00951.
16. Массовая концентрация УФ-поглощающих веществ. Методика выполнения измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. № ФР.1.31.2006.02966.
17. Барсегян С.С., Барам Г.И. Применение жидкостного хроматографа "Миличром А-02" при создании коллекции наркотических средств в экспертно-криминалистических подразделениях // Эксперт-криминалист. 2006. №3. С. 23-25.