

Г. И. БАРАМ, В. В. БОЛотов, Б. Н. ИЗотов,
Г. П. ПЕТЮНИН, Н. П. МОЛИБОГА, В. Ф. ПЕРШИН

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В СКРИННИНГОВОМ АНАЛИЗЕ

Розглянуто перспективу застосування ВЕРХ у скринінговому аналізі. Запропоновано перейти від принципу розроблення аналітичних методик «кожній речовині – своя методика аналізу» до принципу створення уніфікованих методик, що можуть бути реалізовані за допомогою ВЕРХ-аналізаторів. Описано прототип такого аналізатора, розробленого на основі градієнтного хроматографа «МіліХром® А-02» із спектрофотометричним детектором та колонкою з оберненою фазою. Викладено методику валідації хроматографічної системи та градієнтну методику аналізу різних класів органічних сполук.

The prospect of use of HLCH in screening analysis is observed. It is suggested to move from the development principle of analytic methods «each material deserves its analysis method» to the principle of the creation of the unificating methods, implemented with the help of HLCH-analyzers. The prototype of such analyzer, developed on the basis of gradient chromatograph «MilliChrom® A-02» with spectrophotometric detector and column with transformational phase, is described. The metod validation of chromatographic system and gradient method for analysis of different classes of organic combinations is given.

Зачастую аналитики сталкиваются с необходимостью качественного и количественного определения большого числа органических соединений различных классов. Иногда эта задача усложняется необходимостью ее решения в условиях ограниченного времени либо определения неизвестного соединения из большого числа предполагаемых веществ, определяемые параметры которых находятся в заранее созданной базе данных. Эти проблемы постоянно сопровождают аналитиков, работающих в таких областях, как токсикология, криминалистика, при ликвидации последствий техноген-

ных катастроф, а также в практике лабораторий по определению качества лекарственных препаратов.

Для решения этих задач незаменимо применение скрининговых методов анализа с применением автоматизированных химико-аналитических комплексов и баз данных для большого числа химических соединений.

Следует отметить, что для решения этой задачи в последнее время стали активно развиваться так называемые гибридные методы исследований, в которых объединены, как минимум, два независимых метода анализа. Среди них наибольшее развитие получили аналитические комплексы, сочетающие масс-спектрометрию с газовой или жидкостной хроматографией, в которых вначале происходит разделение проб на отдельные компоненты, а затем при помощи масс-спектрометра извлекается дополнительная информация о строении молекул компонентов пробы, что позволяет одновременно произвести как качественный, так и количественный анализ.

Однако этот метод имеет ряд недостатков, связанных с особенностью масс-спектрометрического анализа. Для того, чтобы получить масс-спектр вещества, молекулу необходимо превратить в ион. Это достигается, как правило, ионизацией молекул вещества электронами, ускоренными до энергии 60 эВ. Избыток энергии электронов вызывает фрагментацию молекул на целый ряд осколков, причем зачастую в масс-спектре может отсутствовать и молекулярный ион. Восстановление первичной молекулы из осколков, которое производится с применением баз данных, возможно лишь при предельной воспроизводимости процедуры фрагментации. В случае даже незначительного отклонения условий фрагментации от тех, при которых формировалась база данных, вероятность ошибочной идентификации весьма высока. Кроме того, метрологические характеристики масс-спектрометрического детектора не позволяют обеспечить погрешность количественного определения вещества менее 15–20 %.

По этим причинам очень перспективным для получения необходимой дополнительной информации при качественном и количественном анализе состава пробы представляется сочетание метода ВЭЖХ с неразрушающим пробой многоволновым детектированием в УФ части спектра.

Необходимость экспрессного анализа большого количества органических соединений определила условия «универсальной» методики для качественного и количественного анализа веществ самых различных классов, например, таких как опиаты, каннабиноиды, амфетамины (включая экстази), кокаин, бензодиазепины, лекарственные препараты и взрывчатые вещества, с применением современных приборов для высокоэффективной жидкостной градиентной хроматографии с использованием многоволнового детектирования.

Для обеспечения режима анализатора были решены две проблемы:

1. Разработана «универсальная» методика, позволяющая качественно и количественно анализировать около 80–90 % органических соединений,

поглощающих УФ-излучение, с применением таких параметров, как объем удерживания и оптическое поглощение при восьми длинах волн.

2. Разработана методика валидации, позволяющая с высокой степенью точности контролировать основные параметры хроматографической системы, влияющие на результаты измерения. С этой целью применяется контрольная смесь веществ, селективно чувствительных к малейшим изменениям характеристик хроматографа, что позволяет по хроматограмме смеси контролировать правильность выполнения методики измерений.

Таким образом, данная методика позволяет стандартизировать условия анализа и, следовательно, дает возможность создавать и применять базы данных для большого числа органических соединений.

Известно, что высокоэффективная жидкостная хроматография – важнейший метод фармакопейного анализа субстанций и лекарственных средств. Однако и через 30 лет после своего появления он остается одним из самых трудоемких, длительных и дорогостоящих. Главная причина этого нам видится в консервативном подходе к использованию ВЭЖХ, закрепленном в ведущих фармакопеях мира и обусловленном тем, что разработка каждой процедуры ВЭЖХ-анализа осуществляется самими авторами фармакопейных статей в соответствии с их возможностями и знаниями. В итоге, каждому веществу ставится в соответствие своя «уникальная» процедура анализа, требующая использования «своей» хроматографической колонки, «своих» подвижных фаз, «своей» методики калибровки хроматографа. Даже относительно несложный анализ требует целого набора вспомогательных материалов, высокой квалификации специалистов и растягивается на многие часы. Так, например, ВЭЖХ-анализ ампициллина, по монографии Европейской Фармакопеи, занимает более 15 ч [10]. Такое положение дел в значительной степени затрудняет осуществление эффективного контроля качества лекарственных средств.

Альтернативой традиционной ВЭЖХ является подход, уже давно и активно используемый несколькими группами фармакологов [1–3] и токсикологов [4, 7–9, 12–15] для анализа большого числа веществ, в том числе и фармакопейных препаратов. Суть этого подхода заключается в проведении анализа всех соединений из определенного списка – от 20 до 500 названий – в одной и той же хроматографической системе (колонка с обращенной фазой, градиентное элюирование, УФ-детектирование), предварительно откалиброванной по каждому веществу в отдельности. Идентификация пиков на хроматограмме исследуемого образца осуществляется путем сравнения их времен удерживания и спектральных характеристик в области УФ-спектра с параметрами, заранее полученными для стандартных веществ. Совокупность таких «справочных» параметров представляет собой базу данных, а хроматограф, позволяющий осуществлять анализ с применением базы данных, можно назвать ВЭЖХ-анализатором. Очевидно, что применение ВЭЖХ-анализатора предельно упрощает процедуру анализа и сводит его продолжительность к минимуму. ВЭЖХ-анализ в токсикологии, в отличие

от фармакопеи, решает существенно более трудную задачу, т. к. определяемое вещество априори неизвестно.

Следует отметить, что, несмотря на явную привлекательность идеи ВЭЖХ-анализаторов, широкой практической реализации она пока не получила. Этому есть, как минимум, два объяснения. Первое – все описанные анализаторы созданы на базе «нестандартных» жидкостных хроматографов, которые существуют в единственном числе и не могут быть тиражированы. Созданные для них базы данных нельзя «перенести» даже на близкие по характеристикам хроматографы – любой такой переход потребует формирования нового массива данных. Второе объяснение связано с проблемой стандартизации колонок. Известно, что даже очень похожие по своим свойствам сорбенты типа «обращенная фаза» проявляют заметно различную селективность ко многим веществам. Только применение одного и того же сорбента из одной партии гарантирует необходимую воспроизводимость времен удерживания. Попытки ввести различные системы относительных индексов удерживания при бесконечном разнообразии химических структур выглядят в ВЭЖХ малосостоятельными.

Понимая эти проблемы, мы нашли свои подходы к их решению и разработали прототип тиражируемого ВЭЖХ-анализатора. Этот прототип выполнен на основе хроматографа «МилиХром® А-02» (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск), имеющего двухшприцевой градиентный насос, УФ-спектрофотометрический детектор, автодозатор и термостат колонки [5, 6]. В отличие от других хроматографов, «МилиХром® А-02» производится по технологии, гарантирующей сохранение его основных технических характеристик во всех изготовленных приборах.

Вторая важная особенность этого хроматографа – он предназначен для работы с колонками объемом всего 0,2 мл. Это позволяет, имея 1 кг сорбента одной партии, сделать 5 000 одинаковых колонок и несколько лет использовать их без какой-либо корректировки базы данных.

Методика анализа. В прототипе анализатора применяются колонки диаметром 2 мм и длиной 75 мм, упакованные обращенной фазой ProntoSIL-120-5-C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия). Они имеют эффективность не менее 5 000 теоретических тарелок и, по сравнению с колонками большого диаметра и большой длины, обеспечивают значительную экономию дорогостоящих подвижных фаз. Сорбент выдерживает до 1 000 анализов без заметного изменения своих свойств, не «коллапсирует» в подвижной фазе с большим (до 95 %) содержанием воды и не проявляет ионообменных свойств по отношению к аминам за счет остаточных силанольных групп силикагеля.

Градиентное элюирование осуществляется смешиванием двух элюентов: элюента А – $[4 \text{ M LiClO}_4 - 0,1 \text{ M HClO}_4] - \text{H}_2\text{O}$ (5:95) и элюента Б – ацетонитрила «для ВЭЖХ» («Криохром», СПб). Эти элюенты обладают высокой прозрачностью в коротковолновой области УФ-спектра и не содержат УФ-поглощающие примеси, проявляющиеся в виде «лишних» пиков на хромато-

грамме. Присутствие в подвижной фазе кислоты (pH=2,8) улучшает хромотографирование карбоновых кислот, а высокое содержание ионов лития улучшает хромотографирование аминов.

УФ-детектирование осуществляется одновременно при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. При этом каждому веществу на хромотограмме соответствует 8 пиков с одинаковым временем удерживания, но с разными амплитудами, прямо пропорциональными экстинкции (коэффициенту поглощения света при данной длине волны) вещества (см. рис. 1).

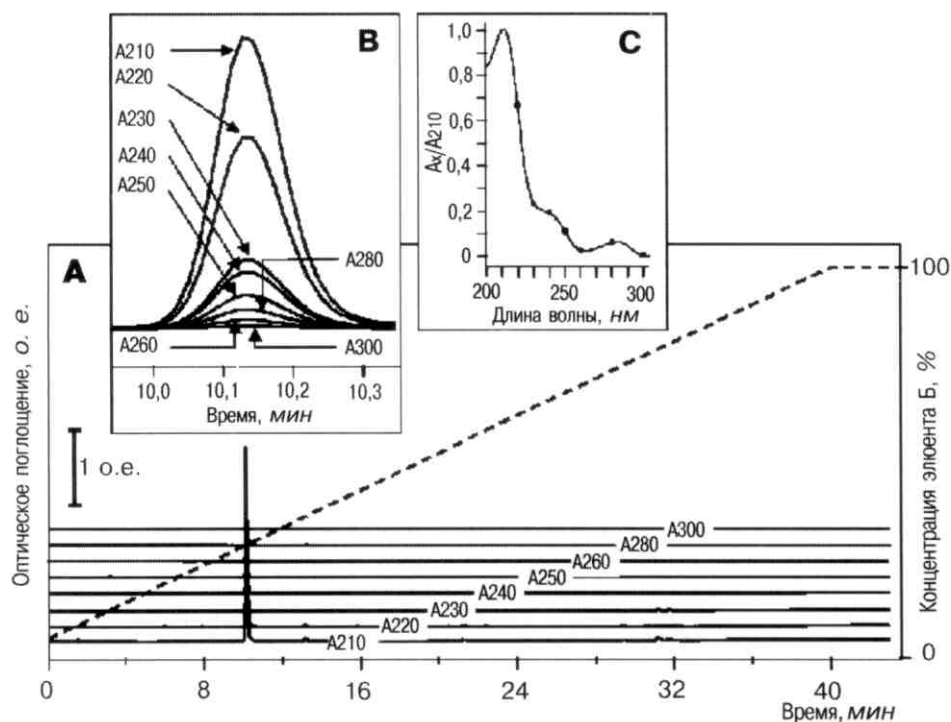


Рис. 1. Пример типичного анализа, выполненного на ВЭЖХ-анализаторе

(условия анализа в тексте): *A* – хромотограмма кодеина с детектированием при 8 длинах волн; *B* – увеличенный фрагмент хромотограммы; *C* – нормированный УФ-спектр кодеина, записанный после остановки потока вблизи максимума пика. Точками на спектре отмечены значения $R = S_{\lambda}/S_{210}$, найденные из хромотограмм

Для каждого вещества вычисляют 7 характерных нормированных спектральных параметров – отношения площадей пиков при длинах волн $\lambda_2 - \lambda_8$ к площади пика при длине волны $\lambda_1 = 210$ нм ($R = S_{\lambda}/S_{210}$). Совокупность этих спектральных отношений R , вместе с величиной объема удерживания (V_R), используют для идентификации пика вещества на хромотограмме.

ВЭЖХ-анализ проводят при следующих условиях: скорость потока – 100 мкл/мин; элюирование – линейный градиент от 5 до 100 % ацетонитрила за 40 мин, затем 100 % ацетонитрил в течение 3 мин; температура колонки –

40 °С; объем образца – 4 мкл; концентрация вещества в образце – около 0,2 мг/мл; растворитель – вода, метанол или их смесь.

Формирование базы данных осуществляли путем хроматографирования растворов контрольных веществ известной степени чистоты (90–100 %). Пример такой хроматограммы (контрольное вещество – кодеин) приведен на рис. 1. Значения V_R , S_{210} и R_I-R_7 вычисляли при помощи компьютерной программы «Мультихром» (ЗАО «Амперсенд», г. Москва), входящей в комплект хроматографа. Значения S_{210} пересчитывали для количества вещества в пике, равное 1 мкг ($S_{210}^{1\text{мкг}}$) и все данные в порядке увеличения значений V_R заносили в таблицу, фрагмент которой приведен в верхней части табл. 1. Для дополнительной информации о веществе записывали полный спектр его раствора в диапазоне 200–300 нм – после остановки потока вблизи максимума пика (рис. 1С).

Таблица 1

Фрагмент сводной таблицы базы данных веществ, расположенных в порядке увеличения V_R

Вещество	V_R , мкл	$S_{210}^{1\text{мкг}}$	$R = S_{\lambda}/S_{210}$						
			При длинах волн (λ), нм						
			220	230	240	250	260	280	300
Барбитал	933,00	40,4	0,62	0,09	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00
Анальгин	940,00	22,36	0,71	0,61	0,67	0,70	0,78	0,31	0,01
Фенилпропаноламин	956,00	53,56	0,14	0,01	0,01	0,03	0,03	0,01	0,00
Норпсевдоэфедрин	974,00	47,89	0,13	0,00	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00
Пропилгекседин	984,00	–	0,43	0,30	0,17	0,04	0,01	0,03	0,00
Сульфазол	993,00	45,53	0,56	0,30	0,38	0,65	0,86	1,04	0,89
Кодеин	1013,00	44,49	0,67	0,23	0,20	0,11	0,03	0,06	0,01
6-Фенилэтиламин	1038,00	59,34	0,09	0,01	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00
Эфедрон	1064,00	50,46	0,15	0,44	1,07	1,53	1,08	0,18	0,09
Псевдоэфедрин	1069,00	60,60	0,14	0,00	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00
Эфедрина гидрохлорид	1073,00	44,64	0,14	0,00	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00
Гексамидин	1074,00	39,19	0,49	0,15	0,03	0,02	0,02	0,00	0,00
Контрольные вещества									
Бромид-ион	148,00	25,79	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Уридин	202,00	41,14	0,56	0,26	0,44	0,85	1,14	0,41	0,00
Кофеин	779,00	–	0,42	0,25	0,15	0,15	0,30	0,38	0,01
Прозерин	1006,00	34,71	0,43	0,05	0,01	0,03	0,05	0,00	0,00
мета-Нитроанилин	1179,00	65,35	1,31	1,50	1,40	1,21	0,90	0,55	0,28
орто-Нитроанилин	1518,00	74,08	1,69	1,74	1,07	0,57	0,39	0,80	0,30
Трифтазин	2322,00	39,31	0,58	0,58	0,73	1,20	1,55	0,09	0,17

Примечание. В нижней части таблицы (контрольные вещества) приведены данные для компонентов проверочной смеси

Идентификацию пика вещества X при помощи данной таблицы производят следующим образом:

1. По величине V_R в интервале $\pm 0,05 V_R$ отбирают вещества-кандидаты.
2. Сравнивают полученные для вещества X отношения R со значениями R для веществ-кандидатов с учетом величины погрешности ($\pm 0,02$ для $R = 0,5-1,5$ и $\pm 0,01$ для $R = 0,01-0,5$).
3. При совпадении всех параметров идентификации (т. е. если вещество идентифицировано) по величинам S_{210} и $S_{210}^{I_{\text{МКЭ}}}$ вычисляют количественное содержание вещества в образце.

Валидация хроматографической системы. Правильность методики анализа периодически контролируют путем хроматографирования специального контрольного многокомпонентного раствора (рис. 2).

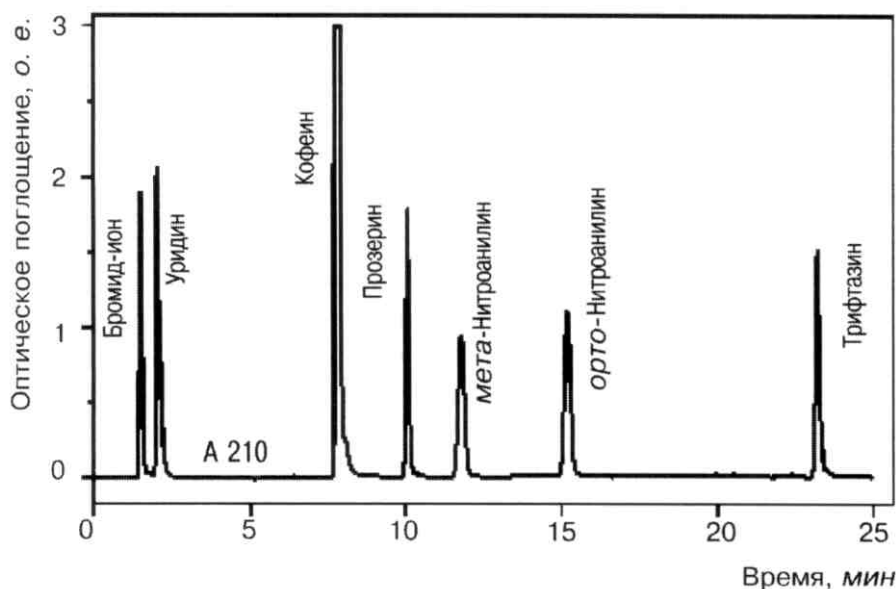


Рис. 2. Разделение смеси контрольных веществ для валидации методики анализа (условия анализа в тексте)

На хроматограмме приведено поглощение элюата только при $\lambda = 210$ нм

Сравнивая полученные в результате проверки данные с «правильными» данными, приведенными в таблице 2 и нижней части таблицы 1, можно сделать однозначный вывод о состоянии всех составляющих хроматографической системы. Компоненты раствора выбраны таким образом, что хроматографические и спектральные параметры каждого из них определенным и известным образом связаны с различными параметрами всей хроматографической системы.

Таблица 2

**Правильные значения хроматографических параметров
для компонентов проверочной смеси: h_{210} – высота пика
на хроматограмме при $\lambda = 210$ нм; $w_{h/2}$ – ширина пика на уровне $0,5 h_{210}$;
 $A_{5\%}$ – асимметрия пика на уровне $0,05 h_{210}$**

Вещество	V_R , мкл	$w_{h/2}$, мкл	h_{210} , о.е.	S_{210} , о.е. мкл	$A_{5\%}$, %
Бромид-ион	148,00	8,50	1,90	18,12	1,31
Уридин	202,00	10,40	2,10	27,66	2,14
Кофеин	779,00	10,10	18,30	209,23	1,18
Прозерин	1006,00	11,30	1,80	22,85	1,16
мета-Нитроанилин	1179,00	20,30	0,90	20,82	1,03
орто-Нитроанилин	1518,00	19,90	1,10	23,93	1,05
Трифтазин	2322,00	15,00	1,50	25,88	1,27

Отметим некоторые из этих связей.

1. V_R бромид-иона характеризует свободный объем колонки. Если он меньше «правильного» значения на 5 %, то система не герметична.

2. Отклонение значения $R = S_{250}/S_{280}$ для уридина на $\pm 0,02$ говорит о нарушении настройки детектора вблизи $\lambda = 260$ нм.

3. Увеличение значения $R = S_{250}/S_{280}$ для кофеина на 0,05 говорит о том, что отклонение линейности детектора при измерении поглощения растворов более 8–10 о. е. превысило 2 %.

4. Увеличение V_R прозерина на 100 мкл с одновременным увеличением асимметрии пика говорит о появлении на поверхности сорбента в результате гидролиза его силанольных групп.

5. Отклонение значения $R = S_{230}/S_{260}$ для мета-нитроанилина на $\pm 0,05$ говорит о том, что величина рН элюента неправильная.

6. Отклонение тех или иных значений R для орто-нитроанилина выше допустимых говорит о нарушении настройки детектора в той или иной области спектра. Отклонение его V_R более чем на ± 50 мкл говорит о неправильном формировании градиента насосами хроматографа.

7. Увеличение асимметрии пика трифтазина говорит о неработоспособности смесителя.

К настоящему времени прототип анализатора успешно апробирован в Фармакопейном комитете Украины (база данных – на более чем 150 веществ) при проведении фармакокинетических исследований [10], на кафедре токсикологической химии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова,

в НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, НИИЭКЦ МВД по Киевской области и в лабораториях некоторых других организаций.

Особые преимущества метода жидкостной хроматографии и испытываемого прибора отмечены при анализе взрывчатых веществ класса нитрамино (гексоген, октоген), обнаружение которых методом газовой хроматографии вызывает существенные трудности, а в ряде случаев практически невозможно. В частности, при обнаружении следовых количеств гексогена на реальных объектах криминалистической экспертизы удалось быстро и достоверно установить их наличие в условиях, когда газовая хроматография дала отрицательные результаты.

При проведении межлабораторных испытаний на разных образцах приборов «МилиХром® А-02»: в г. Иркутске (Лимнологический ин-т), г. Новосибирске (ЗАО «ЭкоНова»), г. Харькове (НПФ «Аналитика»), г. Киеве (ЗАО ФФ «Дарница») – среднее квадратичное отклонение (СКО) при количественном определении в градиентном режиме составило $\approx 0,9\%$, что позволяет сделать заключение о высокой стабильности предлагаемой контрольной системы и методики анализа.

Внедрение ВЭЖХ-анализаторов в практику фармакопейного анализа представляется нам чрезвычайно актуальным. Оно может быть осуществлено в виде введения в Фармакопею Украины общей фармакопейной статьи, описывающей алгоритм формирования баз данных и алгоритм их использования. Такой метод ВЭЖХ-анализа вполне мог бы рассматриваться на определенном этапе в качестве альтернативы уже существующим методикам. Особенно важным представляется использование ВЭЖХ-анализаторов в лабораториях контроля качества лекарственных средств и экспертных криминалистических центрах, имеющих дело с огромным ассортиментом веществ, проанализировать которые методом традиционной ВЭЖХ крайне трудно.

В заключение следует отметить, что один из вариантов «универсальной» методики определения веществ на хроматографе «МилиХром® А-02» при помощи базы данных аттестован в 2003 г. Госстандартом России. Вместе с методикой формирования базы данных обе методики внесены в Федеральный реестр методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора под номерами ФР.1.31.2003.00950 и ФР.1.31.2003.00951.

Литература

1. *Зенкевич И. Г.* – Журн. прикладн. химии. – 1994. – Т. 67. – С. 1877.
2. *Зенкевич И. Г., Казанков С. П., Кузьминых К. С.* – Журн. прикладн. химии. – 1996. – Т. 69. – С. 1712.
3. *Косман В. М., Зенкевич И. Г.* – Растит. ресурсы. – 1997. – Т. 33. – С. 14.
4. *Baker J. K., Skelton R. E., C.-Yu Ma.* – J. Chromatogr., 1979, v. 168. – P. 417.

5. **Baram G. I.** – J. Chromatogr. A, 1996, v. 728.– P. 387.
6. **М. П. Перельройзен, Г. И. Барам, В. Ф. Першин.** Универсальные аналитические лаборатории и высокоэффективный жидкостный хроматограф «МилиХром® А-02» // Журн. Хроматогр. т-ва. – К., 2003. – Т. III, № 4 – С. 14–31.
7. **Bogusz M. J.** – Analyt. Toxicol., 1991, v. 15. – P. 174.
8. **Bogusz M., Wu M.** – J. Analyt. Toxicol., 1991, v. 15. – P. 188.
9. **Elliott S. P., Hale K. A.** – J. Analyt. Toxicol., 1998, v. 22.– P. 279.
10. European Pharmacopoeia, Supplement 1998.– P. 179.
11. **Fedorova G. A., Baram G. I., Grachev M. A., et al.** – Chromatographia, 2001, v. 53. – P. 495.
12. **Hill D. W., Kind A. J.** – J. Analyt. Toxicol., 1994, v. 18.– P. 233.
13. **Jinno K., Hayashida M., Watanabe T.** – J. Chromatogr. Science, 1990, v. 28.– P. 367.
14. **Jinno K., Kuwajima M.** – J. Chromatogr. Science, 1989, v. 27.– P. 57.
15. **Maier R. D., Bogusz M.** – J. Analyt. Toxicol., 1995, v. 19.– P. 79.

*Лимнологический институт СО РАН
Россия, г. Иркутск;*

*Национальный фармацевтический университет,
Украина, г. Харьков;*

*НУМЦ по аналитической токсикологии Минздрава РФ,
Россия, г. Москва;*

*Харьковская медицинская академия последипломного образования,
Украина, г. Харьков;*

НИИЭКЦ МВД по Киевской области;

*НПФ "Аналитика",
Украина, г. Харьков*

Получено 27.07.2004