

# ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ: РАЗРАБОТКИ КОМПАНИИ SEVKO&CO ДЛЯ АМИНОКИСЛОТНОГО АНАЛИЗА

Рассказывает генеральный директор компании Sevko&Co Александр Всеволодович Севко



Компания Sevko&Co занимает уникальную позицию на российском рынке, сочетая в своей деятельности разработку и производство собственного оборудования и продажи приборов известных брендов: Sykam и Ingos. Интересы специалистов компании в основном сконцентрированы на жидкостной хроматографии: освоен выпуск хроматографических градиентных насосов и аналитических колонок, ведется разработка многоволновых детекторов. Особой популярностью пользуется единственный производимый в России автоматизированный модуль для постколоночной дериватизации АРМ-1000Н, совместимый с любой системой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Система может применяться для определения аминокислот и афлатоксинов согласно методикам ГОСТ 32195-2013 "Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот", ГОСТ 54743-2011 "Продукция соковая. Определение свободных аминокислот методом ионообменной хроматографии", ГОСТ Р 53162-2008 "Продукты пищевые. Определение афлатоксина В (1) и общего содержания афлатоксинов В (1), В (2), G (1) и G (2) в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки".

Об истории создания, реализуемых инновационных решениях и перспективах развития компании рассказывает ее основатель и генеральный директор Александр Всеволодович Севко.

## Чем занимается ваша компания? Какое оборудование вы производите?

Наша компания производит оборудование для жидкостной хроматографии. Причем мы занимаемся не отверточной сборкой из готовых комплектующих, как это делают многие, а именно производством, начиная от металла или пластиковой заготовки. В начале нашей деятельности мы пытались работать на подряде и заказывать какие-то детали по нашей конструкторской документации, но поняли, что путь тупиковый. Во-первых, в России чертеж вроде бы всем один даешь – а результат

получается совершенно разный. А во-вторых, ценник оказался абсолютно неадекватным.

Первое созданное нами устройство – модуль для постколоночной дериватизации. Он был разработан нами и сделан в России. Серию таких блоков мы продали компании Shimadzu, и эта система оказалась хорошо востребованной. Деньги с первых продаж были вложены в покупку производственного оборудования. Мы купили фрезерные, токарные станки с числовым программным управлением и начали осваивать нелегкое дело производства деталей для себя, начиная

с закупки материала и включая все токарные и фрезерные работы. Этим мы и продолжаем заниматься. Самым популярным решением нашей компании так и остался модуль для постколоночной дериватизации. Он позволяет проводить определение аминокислот, афлатоксинов и некоторых лекарственных средств, которые в обязательном порядке требуют постколоночной дериватизации. Ближайшие наши конкуренты – американская компания Pickering Laboratories, цена в которой даже при закупке в Европе отличается от нашей продажной цены в России примерно в 5 раз. Это наша основная ниша.

На сегодняшний день нами также освоено производство насосов для жидкостной хроматографии полностью из отечественных комплектующих, включая даже сапфировые поршни, которые нам делают в Подмосковье. На базе наших насосов был разработан аминокислотный анализатор, и за последние два года мы поставили порядка шести таких анализаторов, в том числе для научно-исследовательских институтов, по № 44-ФЗ "О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд". Аминокислотный анализатор – частный случай специализированного жидкостного хроматографа со спектрофотометрическим детектированием на двух длинах волн в видимой области 440 и 570 нм. Он сделан полностью из собственных комплектующих за исключением программного обеспечения. Мы используем чешское ПО Clarity – оно нам очень нравится по духу и своей идеологии, поскольку поддерживает более 500 блоков разных производителей и позволяет из всех блоков собрать единую систему для пользователя. Система бесшовна, хотя оборудование используется совершенно разное – Shimadzu, Agilent, наши блоки, для пользователей этот конструктор работает как один прибор.

Следующим шагом стало производство аналитических колонок, поскольку коммерческие колонки для аминокислотных анализаторов имеют очень высокую стоимость. Мы нашли в Москве производителя ионообменной смолы, вместе с ним прошли весь путь многочисленных синтезов и тестирований и в результате получили дешевый в производстве сорбент, который обладает такими же характеристиками, что и сорбент Mitsubishi, применяемый всеми производителями аминокислотных анализаторов в мире. Себестоимость материала для колонки снизилась кардинально. Для сравнения: колонка анализатора Hitachi до увеличения курса стоила 400 тыс. рублей, а наша – 80 тыс. рублей, то есть разница примерно в 5 раз. Естественно,

мы сейчас продаем расходные материалы для анализаторов всех производителей.

### **Зачем нужна дериватизация и в чем преимущество постколоночной дериватизации перед предколоночной?**

Проблема заключается в том, что аминокислоты в чистом виде на обращенной фазе не делятся, для хроматографического разделения их нужно каким-то образом модифицировать, что-то к ним пришить. Кроме того, чистые аминокислоты сложно детектировать, потому что в большинстве своем они не светятся и не поглощают в УФ- и ВИД-диапазонах. Для их разделения и обнаружения часто используется предколоночная дериватизация. Этот метод отличается высокой чувствительностью (для проведения одного анализа требуется от 0,5 до 1,0 мкг гидролизованного белка) и подходит для образцов достаточно высокой чистоты. Но существует целый ряд недостатков.

Во-первых, реакция дериватизации всегда сильно зависит от матрицы, которая содержит много мешающих компонентов. Поэтому мы не можем никаким образом узнать, прошла ли дериватизация полностью или нет. Во-вторых, в качестве дериватирующего агента чаще всего применяется ортофталевый альдегид. В этом случае реакция может быть автоматизирована и проводиться непосредственно в автомате, что удобно для рутинного анализа. Но получаемые производные не очень стабильны, и если время анализа достаточно длительное, например, 35–40 минут, то происходит их частичная деградация. Одна из важных аминокислот, лизин, выходит одной из последних, и по лизину всегда получается очень большой разброс, поскольку за время проведения анализа производное лизина частично расщепляется. Существует метод дериватизации фенилизотиоцианатом, в этом случае производные более стабильные, но метод невозможно автоматизировать, он требует ручной подготовки, включающей нагрев, высушивание досуха и перерастворение. Это очень неудобно для больших количеств образцов, а результаты в значительной степени зависят от оператора, проводящего пробоподготовку. И наконец, третья проблема – очень низкий ресурс колонок из-за того, что для дериватизации используются агрессивные буферы плюс меркаптоэтанол. В результате постепенно колонка необратимо модифицируется. Компания Agilent предлагает специальную колонку для разделения аминокислот с предколоночной дериватизацией, но и ее ресурс составляет всего от 150

до 200 вколов. После этого колонку за 60 тыс. рублей приходится выкидывать, потому что она перестает обеспечивать необходимые характеристики.

В то же время в Европе золотым стандартом считается метод постколоночной дериватизации. Предколоночной дериватизацией там занимаются только от случая к случаю, чтобы не покупать прибор, если надо провести анализ единичной пробы. Постколоночной дериватизации отдают предпочтение при разделении более концентрированных образцов (от 5 до 10 мкг гидролизованного белка), а также в случае их недостаточной чистоты, например, при загрязнении мочевиной, детергентами и другими компонентами солевых растворов. В настоящее время эта процедура получила наибольшее распространение в аминокислотном анализе.

### **Как возникла идея создания модуля для постколоночной дериватизации?**

Очень просто. Я занимался сервисным обслуживанием аминокислотных анализаторов чешской фирмы Ingos. Несмотря на то что эти анализаторы очень капризны, сам метод постколоночной дериватизации мне понравился. А затем получилось так, что я познакомился с пользователем, перед которым стояла задача анализа аминокислот. У него был жидкостной хроматограф, но денег на анализатор, например, чешский, в тот момент не было. Они хотели использовать метод предколоночной дериватизации, который предлагается компанией Agilent. Мы с моим сотрудником-химиком занимались этой методикой год, изучили все ее подводные камни и поняли, что она не подходит для рутинного анализа. И тогда у нас возникла мысль: а почему бы нам не сделать самим приставку для постколоночной дериватизации, и эта идея была подкинута пользователю. Он согласился, условия были понятны, это была не научно-исследовательская разработка, а договор поставки. Поскольку это государственная организация, мы получили минимальную предоплату и должны были через 4 месяца поставить заказ. И за короткое время была сделана первая приставка, но поскольку все комплектующие заказывались на 10 или более блоков, то после выполнения контракта у нас оказалось некоторое количество денег и некоторое количество приборов. Собственно, с этого все и началось.

### **Расскажите подробнее о вашем дериватизаторе: принципы работы, отличия от аналогичных систем, за счет чего обеспечивается конкурентная цена прибора?**

В сравнительно низкой цене основную роль, конечно, играет то, что комплектующие мы делаем

сами. А кроме того, на рынке научного аналитического приборостроения цена не всегда имеет прямое отношение к себестоимости: оборудование может быть очень дорогим исключительно по коммерческим соображениям или из-за известности бренда. Поэтому ценник на оборудование не всегда адекватен.

Стандартный модуль нашего дериватизатора АРМ-1000Н представляет собой комбинацию насоса и высокотемпературного реактора. Но поскольку для многих пользователей удобно, чтобы в этом модуле был размещен еще термостат колонки, мы реализуем два варианта исполнения: либо просто насос и реактор, либо к ним еще добавляется достаточно большой термостат колонки.

Мы начали создание нашего дериватизатора с разработки хроматографического двухплунжерного насоса с последовательной схемой, которая исключает нестабильность и пульсации потока. Насос может качать непрерывно и неограниченно, пока в емкости не закончится раствор – а это очень значительное преимущество в сравнении с аналогичными приборами конкурентов. В нашей системе времена анализа могут быть любыми, один анализ может идти хоть целый день. Это особенно актуально для анализа аминокислот в физиологических жидкостях, когда программа может быть растянута на 5 часов, например, чтобы точно определить все компоненты, которые есть в крови. Все элементы, контактирующие с жидкостями, выполнены из инертного полимерного материала, в основном из полиэфирэфиркетона. Это позволяет избежать нежелательных реакций с агрессивными дериватирующими реагентами и дозировать практически любые смеси в диапазоне 0,001–4 мл/мин (возможна установка головки насоса с диапазоном 0,01–10 мл/мин). К примеру, для компании "Уралхим" мы сделали систему для онлайн-отбора реакционной смеси, которая по составу близка к царской водке, то есть содержащей концентрированные азотную, серную и соляную кислоты. Насос разбавлял эту смесь, а затем вводил в ионный хроматограф, система была реализована на их опытной установке.

Высокотемпературный реактор, входящий в состав дериватизатора, оснащен датчиком защиты от перегрева и датчиком давления и позволяет проводить реакции при температуре до 150 градусов. По сути, это масляный термостат с элементами Пельтье, который нагревает погруженную в него катушку стандартного хроматографического капилляра длиной до 30 метров. Он быстро нагревается, быстро охлаждается, реализуя быстрые температурные градиенты.

Бесперебойную работу системы обеспечивает 32-разрядный микроконтроллер 1986BE1T на современном ядре Cortex M1, который производит компания "ГКК Миландр" – клиентоориентированная российская компания, поставляющая качественные микросхемы с очень конкурентным ценником. Когда мы начинали работу, мы предполагали сделать плату на зарубежной базе. Но выяснилось, что нужного нам сочетания интерфейсов нет, и чтобы набрать все нужные нам интерфейсы и периферию, необходимо поставить на плату 3–4 чипа. А зеленоградский "Миландр" поставляет нам контроллер в одном корпусе, причем он сертифицирован даже для авиационного применения, то есть достаточно помехозащищенный. На основе этого контроллера мы сделали плату и теперь производим ее серийно. Понятно, что сначала были какие-то недоработки с прошивкой, но это все уже "вылизали", и последние 2,5–3 года мы аккуратно тиражируем эту плату, ничего не меняя, – все работает, как задумано.

Дериватизатор оснащен большим OLED-дисплеем, клавиатурой и 4 цифровыми входами/выходами для синхронизации сигналов.

### С какими компаниями вы сотрудничаете? И кто ваши основные потребители?

Наш основной партнер – компания Shimadzu, три ее дистрибьютора обеспечивают большое покрытие по стране, поэтому соотношение цена/качество получается оптимальным. Есть опыт работы с Кнауер: они либо к нам напрямую направляют клиентов, либо докупают дериватизатор. Пара поставок была в Agilent, один дериватизатор работает в комплекте с Waters.

Наши клиенты в основном работают в России. Был проект поставки двух дериватизаторов в сетевую пищевую структуру в Болгарии, но пока это все подвисло из-за коронавируса.

Главные потребители на сегодняшний день – крупные агрохолдинги, такие как АПХ "Мираторг", группа "Черкизово" и многие другие. Агропромышленные компании сегодня стали уделять пристальное внимание снижению себестоимости производства и рациональному расходованию всех реагентов и составляющих, а также точному следованию рецептуре, поэтому аминокислотный анализ им необходим.

Вторая группа потребителей – органы Роспотребнадзора. Ряд ГОСТов нормирует содержание афлатоксинов в пищевых продуктах, например, в хлебобулочных изделиях, а такие анализы удобно и надежно проводить с помощью нашего дериватизатора. За прошедший год мы поставили пять систем в территори-



Продукты компании Sevko&Co: аминокислотный анализатор (слева) и постколоночный дериватизатор (справа)

альные подразделения Роспотребнадзора, а в этом году еще один в ФБУЗ "Федеральный центр гигиены и эпидемиологии" Роспотребнадзора. После апробации эта организация будет рекомендовать к применению наши приборы в других своих подразделениях.

На третьем месте остаются фармацевты: за год в фармотрасль было продано порядка пяти систем. Наши дериватизаторы используются при производстве препаратов для человека и животных. Среди наших потребителей компания группы "Фармсинтез" – "Ист-фарм", которая приобрела один модуль и планирует приобретать еще. Сейчас эта компания разрабатывает смеси для перинатального питания, и методика с применением нашего модуля будет внесена в нормативную документацию, которая потом используется Росздравнадзором. Кроме того, наши установки приобрели два территориальных подразделения Росздравнадзора для осуществления контроля качества зарубежных препаратов. До сегодняшнего дня контроль проводился методом предколоночной дериватизации, который не всегда приемлем для такого рода задач.

### Обеспечиваете ли вы методическое и техническое сопровождение?

На сегодняшний момент около 90% продаваемых нами систем мы устанавливаем сами, однако все зависит от анализируемой смеси. Если задача простая и не требует отдельной постановки методики, как, например, в случае анализа афлатоксинов, неко-



торые дистрибьюторы Shimadzu устанавливают наши дериватизаторы самостоятельно.

Если дело касается аминокислотного анализа, то мы полностью закрываем установку и методическую техническую поддержку. Методика анализа сложная, в ней есть нюансы, которые без опыта работы в этой нише трудно объяснить. Поэтому даже при приобретении нашего оборудования через дистрибьютора мы обязательно приезжаем и проводим полное обучение, от взятия образца до получения результата. В более простых случаях наша помощь обычно не требуется, но при возникновении каких-либо технических вопросов мы всегда доступны для консультаций.

Что касается стандартного технического обслуживания, все операции, которые требуются для его проведения, считаются пользовательскими, для их выполнения не нужно лезть внутрь прибора: головка насоса находится снаружи, ее достаточно снять и промыть. Например, прибор для анализа витаминов, в который мы установили наш первый насос для хроматографа, работает на заводе производства лизина четвертый год даже без замены уплотнения насоса. Конечно, вначале у нас были некоторые недоработки, которые выяснялись непосредственно на заводах, но сегодня конструкция стабильно отлажена и работает без сбоев.

### **Вы планируете переносить производственную площадку в Белгородскую область. С чем связан переезд компании?**

С развитием производства растет количество производственного оборудования. Часто, когда начинаешь что-то производить, вдруг возникает потребность в какой-то специфической операции. Начинаешь искать, кто бы мог ее сделать, и выясняется, что проще и гарантированнее купить специфический станок и сделать эту операцию самому, чтобы все было полностью под контролем. Поэтому количество станков увеличивается. Поскольку мы, наверное, единственные, кто сами делает детали для аналитического жидкостного хроматографического оборудования, к нам обращаются другие производители, которые раньше использовали, например, американские насосы. Теперь они покупают наши. Соответственно, увеличивается номенклатура деталей, а значит, увеличивается количество станков, что позволяет, не задерживая по срокам, делать детали и для себя, и на сторону. Купить площади в Москве для нас нереально, аренда тоже дорогая, к тому же она неизбежно когда-нибудь заканчивается, и приходится переезжать. Если бы мы занимались отверточной сборкой, могли бы снять офис, а при необходимости погрузить

все в машину и собирать где-нибудь в другом месте. А у нас станки по 5–7 тонн, каждый день не напереезжаешься. А тут еще в технопарке то здание, где мы располагаемся, хотят снести и построить на его месте двенадцатиэтажный офис. То есть нам неизбежно придется перемещаться, а отключение оборудования и погрузка его на фуру необходимы для перемещения и на 500 метров, и на 500 км. Фура едет, а сколько она едет – без разницы: что в соседнее здание, что в соседнюю область.

Я всегда симпатизировал Белгородской области: там были одни из первых наших клиентов, да и в целом по экономическому развитию она занимает второе место после Московской. Это один из наиболее самодостаточных и перспективных регионов России. А тут еще и предложили удачный вариант: земля и производственное помещение за адекватную цену, которая меня устраивала полностью.

### **Последний традиционный вопрос: дальнейшие планы развития?**

К настоящему моменту мы наладили производство насосов и кранов ввода пробы. Следующий пункт нашей производственной программы – полноценный автосемплер. Мы хотим не просто ручной кран ставить в наши блоки, а именно блок автосемплера, который мы не будем закупать за рубежом, когда он требуется. К сожалению, сегодня покупка автосемплера забирает достаточно существенную часть денег пользователя.

Параллельно с этим идет разработка многоволновых детекторов. Флюоресцентный детектор мы пока не планируем, потому что это достаточно сложно, и в России этого точно никто не делал, но детектор типа диодной матрицы или с поворотной дифракционной решеткой мы сделаем. Уже закуплены решетки, идет конструирование оптической схемы. Мы стараемся максимально использовать отечественные комплектующие, например, решетки мы берем казанские. Государственный институт прикладной оптики делает отличные решетки и оказывает полную научно-практическую поддержку, обеспечивая при этом очень конкурентоспособный ценник. Таким образом, у нас будет реализована полноценная хроматографическая система с самым универсальным типом детектора, и на этом этапе ее можно будет продвигать как жидкостный хроматограф.

### **Спасибо за интересный рассказ**

*С А.В.Севко беседовала О.А.Шахнович  
Материал подготовила Н.И.Василевич*



XVIII МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

# БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

## ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Пленарное заседание "Фундаментальные исследования и биотехнология".

## ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Новое в создании молекулярных инструментов редактирования ДНК и в конструировании.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

- Биоматериалы в биотехнологии и медицине.
- Бактериофаги в биотехнологии, сельском хозяйстве и медицине.
- Болезни головного мозга: состояние и что нас ожидает.
- Лечение онкозаболеваний человека с помощью природных и рекомбинантных вирусов.
- Нанобиотехнологии в медицине.

## БИОФАРМА

- Биотехнология для профилактики и терапии инфекционных болезней. Вакцины нового поколения, внедрение в практику здравоохранения.
- От клеточных технологий к персонализированной медицине.
- Сателлитный симпозиум "Биофармацевтика на Барском лугу 2020: научные и технологические тренды развития современных ферментных и антительных лекарственных препаратов".

## БИОИНФОРМАТИКА И IT

- Задачи биоинформатики в геномных исследованиях и разработке генетических технологий для здравоохранения, сельского хозяйства и промышленности.

## БИОЭКОНОМИКА

- Биокаталитические технологии.
- Биотехнологические процессы в переработке минерального сырья.
- Биотехнологические подходы в создании сельскохозяйственных культур в растениеводстве и животноводстве с улучшенными хозяйственно-ценными признаками.
- Генетические технологии в животноводстве: от развития фундаментальной науки до практического использования.
- Генетические ресурсы и биотехнологические процессы для пищевой промышленности.
- Подготовка высококвалифицированных кадров в области биотехнологии.
- Биологическая трансформация загрязнений в окружающей среде: закономерности и практические аспекты.

## СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ ФОРУМА

в электронном виде доступен по ссылке:

<http://www.bimos.ru/conference/articles.htm>

# 2020

## ЗАОЧНЫЙ ФОРМАТ



МИНПРОТОРГ  
РОССИИ

RED  
GROUP

+7 (495) 780-41-09  
+7 (495) 722-20-74

info@bimos.ru  
www.bimos.ru