УДК 543.544:543.544.1:543.544.7

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, ПРИНЦИПИ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Рижкова Т.А.[1], Бабич Е.М.[1], Калініченко С.В.[1], Скляр Н.І.[1], Рябовол О.В.[2], Плугатор Т.М.[2], Горбач Т.В.[3], Антушева Т.І.[1], Касьяненко Т.М.[4]

1. - ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України», м. Харків; 2 – ЗАО «Біолік», м. Харків; 3 – Харківський національний медичний університет; 4 –МДП № 14, м. Харків

Термін хроматографія (від древньогрецької χρῶμα - колір) включає групу аналітичних методів, які застосовуються для розділення та аналізу сумішей речовин, на основі певних фізичних властивостей окремих сполук. Принцип вказаних методів базується на вибірковому розподіленні компонентів сумішей між двома фазами, що не змішуються (рухомою та стаціонарною) [1-4]. Уперше метод хроматографії (рідинно-твердофазний) у 1900 році застосував російський вчений Михайло Семенович Цвєт, який використав колонку, заповнену карбонатом кальцію, для розділення пігментів рослинного походження. Кольорові смужки, які були отримані на шарі адсорбуючої речовини, й дали назву вказаному методу розділення. Незважаючи на те, що колір не має нічого спільного з сучасною хроматографією, назва закріпилася та дотепер використовується для усіх видів сепараторних технік [2-5]. Описана Цвєтом методика була несправедливо забутою аж до кінця 1930-х – початку 1940-х років, коли А. Дж. Мартін та Р.Л.М. Сінг представили новий різновид рідинно-рідинної хроматографії, де стаціонарна фаза (вода) підтримувалась на ущільненому кварцовому шарі; використовували цей метод для розділення певних ацетиламінокислот. Вони ж рекомендували застосовувати відповідний газ у якості мобільної фази, оскільки швидке транспортування зразків сприяло більш ефективному розділенню компонентів суміші. Таким чином була створена й концепція газової хроматографії, яка була практично реалізована десятиріччям пізніше (Мартін та Джеймс). У тій самій публікації у 1941 році було визначено необхідні умови для проведення високоефективної рідинної хроматографії (найбільше розрішення можна отримати, використовуючи дуже маленькі часточки сорбентів та велику різницю тиску в колонці). Незважаючи на такі рекомендації, близько чотирьох десятиріч минуло до того часу, коли вказана концепція стала сприйматися серйозно, а прогнозоване обладнання для високоефективної рідинної хроматографії стало реальністю. У середині 1960-х розвиток хроматографічних методів був практично завершений, і з того часу, попри безліч публікацій, які з'являлися стосовно цього предмета та описували застосування методики, тільки поодинокі науковці розкривали фундаментальні аспекти проблеми та висвітлювали новітні інструментальні концепції [3, 5].

На сьогодні хроматографія це надзвичайно різнобічний метод; він допомагає розділяти гази та леткі субстанції за допомогою газової хроматографії (ГХ), нелеткі хімічні речовини та матеріали з надзвичайно великою молекулярною вагою (включаючи біополімери) за допомогою рідинної хроматографії (РХ) і, якщо необхідно, низьковартісної тонкошарової рідинної хроматографії (ТРХ). Між тим, усі названі техніки мають спільні риси, що дозволяють віднести їх до хроматографічних систем.

Таким чином, хроматографію визначають як процес розділення, що досягається за допомогою розподілення компонентів суміші між двома фазами: стаціонарною та рухливою. Ті компоненти, що утримуються переважно стаціонарною фазою, довше залишаються у системі, ніж ті, що розподіляються селективно у мобільній фазі. Як результат – розчини екстрагуються з системи в порядку підвищення їх коефіцієнтів розподілення по відношенню до стаціонарної фази; тим самим і досягається розділення [2-4].

Для досягнення оптимального розподілення компонентів сумішей необхідно обрати оптимальну комбінацію стаціонарної та мобільної фази. Залежно від агрегатного стану рухливої фази виділяють газову, флюїдну (надкритичну флюїдну) та рідинну хроматографію. Види хроматографії, у відповідності до агрегатного стану мобільної та стаціонарної фаз, наведені у таблиці 1.

Таблиця 1. Класифікація хроматографічних методів

Мобільна фаза	Стаціонарна фаза
Газ Газова хроматографія (ГХ)	**Рідина** Газо-рідинна хроматографія (ГРХ) чи газо-рідинно-твердофазна хроматографія (ГРТХ)
	Тверда речовина Газо-твердофазна хроматографія (ГТХ) чи газо-адсорбційна хроматографія (ГАХ)
Рідина Рідинна хроматографія (РХ)	**Рідина** Рідинно-рідинна хроматографія (РРХ)
	Тверда речовина Рідинно-твердофазна хроматографія (РТХ)
Флюїд Флюїдна хроматографія (ФХ)	**Рідина** Флюїдо-рідинно-твердофазна хроматографія (ФРТХ)
	Тверда речовина Флюїдо-твердофазна хроматографія (ФТХ)

Газо-рідинна хроматографія на сьогодні ще не реалізована, на практиці використовують лише газо-рідинно-твердофазний метод, коли стаціонарною фазою є твердий носій з нанесеною на його поверхню рідиною [2, 3, 6, 7].

Окрім основної класифікації залежно від агрегатного стану двох фаз **за механізмом розділення** речовин виділяють адсорбційну, розподільчу, іонообмінну, іон-парну, лігандообмінну, ексклюзійну (ситову, гель-проникну, гель-фільтраційну), афінну (біоспецифічну), осадову хроматографію. Слід зазначити, що більшість з цих механізмів використовують у рідинній хроматографії. Осадова РХ базується на різній розчинності осадів, що утворюються при взаємодії компонентів аналізуємої суміші з реагентом-осадником. Перевагами цього методу є те, що розташовані вздовж сорбенту зони мають чіткі межі. При адсорбційній РХ адсорбція речовин відбувається на полярному сорбенті з неполярного елюенту завдяки донорно-акцепторній взаємодії чи утворенню водневих зв'язків (нормально-фазна) або на поверхні гідрофобізуючого сорбенту з полярного елюенту за допомогою дисперсійної (гідрофобної) взаємодії розподіляємих молекул із поверхнею (збагачено-фазна). Розділення в розподільчій хроматографії відбувається за рахунок розподілення хімічних сполук між двома фазами – нерухомою та мобільною. Залежно від полярності фаз можливими є нормально-фазний та збагачено-фазний варіанти. У основі іонообмінної РХ – різна здатність іонів до реакцій іонного обміну з фіксованими іонами сорбенту, які утворюються у результаті дисоціації іоногенних груп останнього. Розділення іонів при цьому регулюють шляхом підбору оптимальних показників pH елюенту та його іонної сили. Іон-парну РХ можна розглядати як комбінацію адсорбційної та іонообмінної; як нерухому фазу використовують гідрофобізуючий адсорбент, як мобільну – водно-органічний елюент з додаванням поверхнево-активних іоногенних з'єднань (іон-парних реагентів). Розділення основане на утриманні іон-парного реагенту на гідрофобній поверхні сорбенту з утворенням іоніту, який розділяє іонні сполуки. Лігандообмінна РХ базується на різній здатності сполук утворювати комплекси з катіонами перехідних металів (Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II), тощо) та фіксованими лігандами нерухомої фази. Афінна РХ передбачає утворення міцного зв'язку зі специфічними групами (лігандами, афінатами) нерухомої фази на основі біологічних властивостей останніх. Так при розділенні ферментів лігандами служать їх субстрати, інгібітори чи коферменти, токсинів – рецептори, білків – антитіла. Розподілення в ексклюзійній (ситовій, гель-проникній, гель-фільтраційній) РХ відбувається за рахунок різниці у розмірах молекул. Метод грунтується на розділенні молекул суміші за розміром з урахуванням їх різної здатності проникати у пори носія. При цьому першими з колонки виходять більші за розміром молекули (більшої молекулярної маси), які здатні проникати у мінімальне число пор носія. Останніми елююють речовини з малими розмірами молекул, які вільно проникають у пори сорбенту. На практиці часто застосовується декілька механізмів розділення одночасно (адсорбційно-розподільчий, адсорбційно-ексклюзійний, тощо) [2-4, 8, 9].

За геометрією сорбційного шару нерухомої фази розрізняють колонкову та плоскошарову хроматографію. До плоскошарової відносять тонкошарову та паперову хроматографії; у колонковій – виділяють капілярну, коли сорбент розташований на внутрішніх стінках колонки, а центральна частина залишається вільною від сорбенту, відкритою для потоку елюенту (хроматографія на відкритих капілярних колонках) [2-4].

У залежності від способу введення проб та переміщення (розподілення) хроматографічних зон у шарі сорбенту розрізняють наступні варіанти хроматографії: проявний (або елюентний), фронтальний та витискаючий.

Найбільш часто використовують проявний метод, коли досліджувану суміш періодично імпульсно вводять до потоку рухливої фази, при цьому суміш розділяється на окремі компоненти, між яким знаходяться зони мобільної фази. Елюентний метод на сьогодні практично єдиний, який може бути використаний як для ГХ, так і для РХ, однак для препаративної РХ інколи застосовують витискаючий варіант методу.

Фронтальний тип хроматографічного розподілення використовується рідко, він представляє насамперед академічний інтерес та може бути ефективно застосований у колоночній системі розподілення. При цьому варіанті хроматографії пробу безперервно подають у колонку; можна також подавати в колонку одночасно пробу та мобільну фазу. У фронтальній хроматографії тільки перший компонент, що найменше сорбується, можна отримати у відносно чистому вигляді на виході з колонки; друга та наступні зони містять два або більше компонентів суміші. Таким чином, фронтальний аналіз є непридатним для більшості практичних аналітичних потреб. Він майже повністю заміщений елюентним типом.

Витискаючий варіант хроматографії ефективний лише при твердій стаціонарній фазі, коли розчини адсорбуються на її поверхні. Він передбачає після подавання аналізуємої суміші введення спеціальної речовини (так званий витискувач), яка сорбується краще за будь-який з компонентів, що розділяються. Зразок подається до системи розподілення й окремі компоненти змагаються за доступні сайти сорбції. У першу чергу всі найближчі сайти адсорбції насичуються компонентами, що найбільш сильно зв'язуються. Оскільки дослідний зразок переміщується по системі, наступний вільний сайт адсорбції насичується подальшим за силою зв'язування компонентом. Таким чином, компоненти розташовуються вздовж розподільчої системи в порядку зниження їх адсорбційної сили. Компоненти зразка зазвичай зв'язуються зі стаціонарною фазою настільки сильно, що вимиваються дуже повільно, або взагалі не вимиваються. Тому розчини повинні бути заміщені компонентом, який зв'язується з адсорбентом набагато сильніше за будь-яку речовину (витискувач). Цей витискувач міститься у мобільній фазі в низькій концентрації та, в першу чергу, заміщує найбільш сильно зв'язані компоненти, далі – наступні компоненти по черзі, доки

всі вони не пройдуть крізь систему. Компоненти суміші характеризуються за порядком, у якому вони виходять, а кількість кожного представленого компоненту на хроматограмі пропорційна довжині піків, а не їх висоті. Як правило, компоненти суміші не достатньо відокремлюються один від одного, вони покидають систему послідовно, контактуючи між собою та змішуючись деякою мірою з сусідніми компонентами. При цьому утворюються зони компонентів суміші, що прилягають одна до одної. Цей тип розподілення не використовується у аналітичній хроматографії та рідко використовується в препаративній РХ. Фронтальний та витискаючий варіанти хроматографії потребують регенерації колонки перед наступним дослідом [2-4].

Для хроматографічного розділення речовин чи визначення їх фізико-хімічних характеристик використовують спеціальні прилади – хроматографи. Основними складовими частинами хроматографу є система розподілення (частина апарату, де розчини розподіляються між двома фазами - найчастіше має форму колонки), детектор та прилад для вводу проб. Колонка виконує функцію розділення аналізуємої суміші на окремі складові компоненти; детектор, розташований на виході з колонки, безперервно визначає компоненти аналізуємої суміші у потоці мобільної фази та їх концентрацію.

При хроматографічному розділенні компоненти суміші під впливом потоку мобільної фази переміщуються вздовж колонки з різними швидкостями, значення яких обернено пропорційні коефіцієнтам розподілення (константам розподілення) аналізуємих компонентів. Речовини, що добре сорбуються та мають великі константи розподілення, проходять уздовж шару сорбенту повільніше ніж ті, що погано сорбуються. Тому, при дослідженні трьохкомпонентної суміші (А+Б+В), при константах розподілення (К) (КА<КБ<КВ), насамперед колонку залишить компонент А, потім – Б, останнім вийде з колонки компонент В. Сигнал детектора, сила якого пропорційна концентрації речовини в потоці елюенту, автоматично безперервно записується потенціометром (самописцем) або реєструється на екрані комп'ютера. Отримана хроматограма є первинним результатом хроматографічного розділення та відображає розміщення хроматографічних зон на шарі сорбенту чи у потоці мобільної фази за певний проміжок часу (рис. 1.).

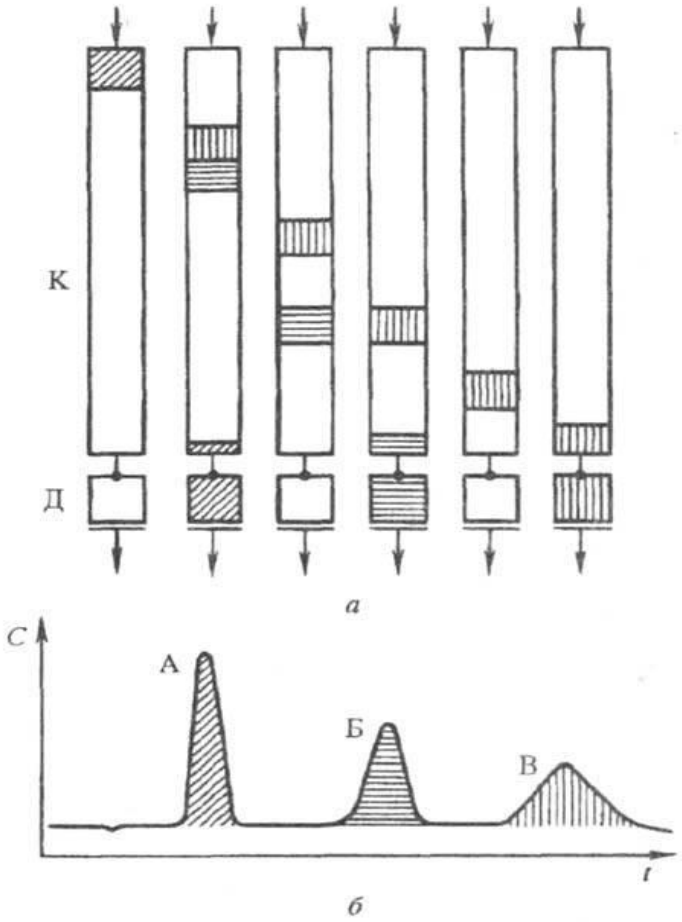

Рис.1. Розділення суміші з трьох компонентів (А, Б, В) на хроматографічній колонці (К) із детектором (Д) [2].
а – розташування хроматографічних зон компонентів, що розділяються, у колонці через певні інтервали часу; б - хроматограма (С – сигнал детектора, t – час).

Використовуючи хроматограму визначають основні характеристики хроматографічного процесу: параметри утримування, розмивання та розділення досліджуваних сполук. Основною характеристикою речовини при використанні колонкової хроматографії є об'єм чи час утримання, який залежить від константи розподілення речовини. Для якісної характеристики сполук,

що розподіляються, переважно використовують відносні величини утримування, оскільки вони в меншій мірі, ніж абсолютні величини, залежать від умов постановки досліду.

Для характеристики часу утримання у хроматографії використовують системи з двома стандартами, у якості яких в найбільш розповсюдженій системі індексів утримання Ковача Ii використовують сполуки одного гомологічного ряду. Стандарти обираються таким чином, щоб аналізуєма сполука виходила з колонки після стандарту (наприклад алкану), молекула якого містить z атомів вуглецю, та раніше стандарту, молекула якого містить z+1 атомів вуглецю. Ii визначають за формулою у відповідності до отриманої хроматограми (рис. 2.):

$$Ii = 100z + 100\frac{\lg(t'_{Ri}/t'_{Rz})}{\lg(t'_{R(z+1)}/t'_{Rz})}, \quad [2]$$

де *Ii* – індекс утримування;

$t'_{R(z+1)}$ – час утримання алкану $C_{(z+1)}$;

t'_{Rz}, $t'_{R(z+1)}$, t'_{Ri} – виправлений час утримання відповідно для алканів C_z, $C_{(z+1)}$ та і-го компонента;

t_m – час утримання компоненту, що не сорбується.

Ідентифікацію піків невідомих компонентів досліджуваної суміші проводять шляхом співставлення (порівняння) відносних величин, визначених безпосередньо за хроматограмою, із відповідними табличними даними для відомих сполук. Однак під час ідентифікації в хроматографії вірогідним є тільки негативний результат, наприклад пік ***i*** не є речовиною А, якщо час утримання піку ***i*** та речовини А не співпадають. Збіг часу утримання піку ***i*** та речовини А – необхідна, але недостатня умова для висновку, що пік ***i*** – це речовина А. Аналіз даних у сучасних хроматографах автоматизований. Як правило, отримані дані обробляються за допомогою комп'ютерів, зіставляються з існуючими базами даних та піддаються статистичній обробці.

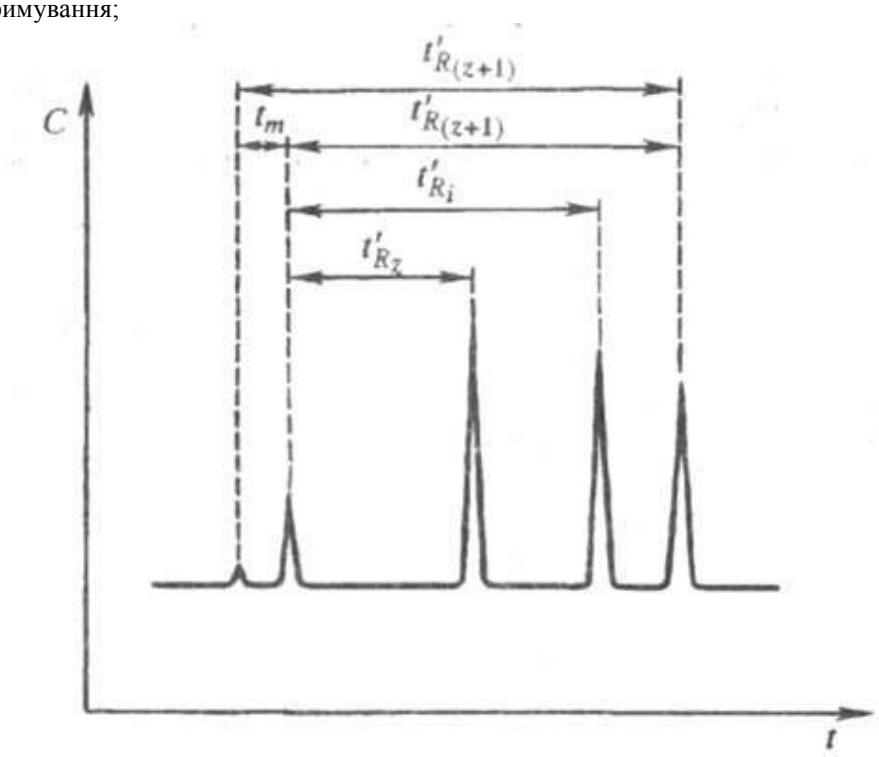

Рис. 2. Визначення індексу утримання Ii з використанням н-алканів із вмістом атомів вуглецю у кількості z та z+1 [2].

При переміщенні зон речовин, що розділяються, під впливом потоку мобільної фази вздовж шару сорбенту одночасно відбувається два протилежних процеси: збільшується відстань між максимумами концентрації хроматографічних зон (що покращує розділення) та збільшується ширина хроматографічних полос (що погіршує розділення). Якісна ефективність колонки тим вище, чим вужче та гостріше піки сполук, що хроматографуються. Кількісною характеристикою ефективності хроматографії є кількість теоретичних тарілок N, яка розраховується для ***i***-го компоненту за формулою:

$$N_i = 5{,}45(t_{Ri}/W_{hi})^2, \quad [2]$$

де N_i – кількість теоретичних тарілок;

t_{Ri} – час утримання і-го компоненту;

W_{hi} – ширина піку, що виміряна на половині його висоти (рис. 3.).

Число N пропорційне квадрату кількості піків, які можна розмістити на відрізку хроматограми, що відповідає часу утримання вказаної сполуки.

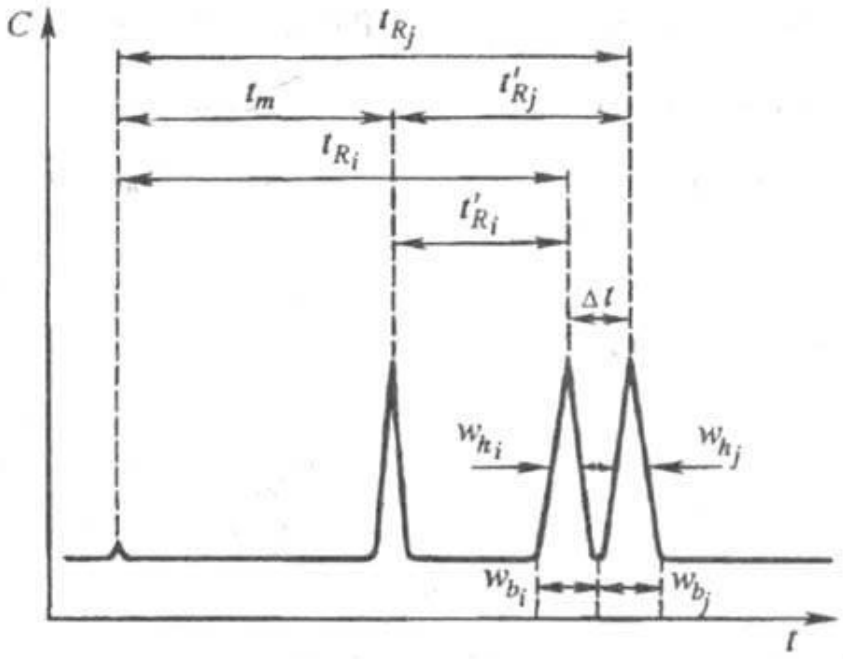

Рис. 3. Визначення ефективності хроматографічної колонки (N) та ступеня розділення (R_{ij}) [2].

Основна мета аналітичної та препаративної хроматографії – розділення компонентів. Для характеристики розділення пар сполук, що важко відокремлюються (критичних), використовують таку характеристику, як ступень розділення (рис. 3.):

$$R_{ij} = \frac{2(t_{Rj} - t_{Ri})}{W_{bi} + W_{bj}},$$

[2]

де R_{ij} – ступінь розділення ***i***-го та ***j***-го компонентів;

t_{Ri} та t_{Rj} – час утримання ***i***-го та ***j***-го компонентів;

W_{bi} W_{bj} – ширина хроматографічних зон вказаних компонентів, виміряна у основі піків на хроматограмі.

Частку ***i***-го компоненту у багатокомпонентній суміші розраховують за формулою:

$$P_i = \frac{a_i S_i}{\sum_1^n a_i S_i} \bullet 100,$$

[2]

де P_i – частка ***i***-го компоненту в суміші;

a_i , a_j - поправочні коефіцієнти, що визначаються чутливістю детектора до аналізуємих сполук;

S_i, S_j – площа піків аналізуємих компонентів.

Для кількісного та якісного визначення речовин у досліджуваній суміші в потоці мобільної фази використовують хроматографічні детектори. При постійних умовах експерименту сила сигналу детектора прямо пропорційна концентрації компоненту у мобільній фазі, а площа його піку на хроматограмі – кількості аналізуємої сполуки. На сьогодні існує великий спектр детекторів, доступних для РХ та ГХ, кожен з яких має свою область застосування. Вибір оптимального детектора для хроматографічного аналізу є принципово важливим. Основними критеріями вибору є чутливість (мінімальна концентрація речовини, що може бути виявлена за допомогою детектора) та діапазон використання. У цілому, за механізмом виявлення хроматографуємих речовин, детектори можуть бути розділені на дві великі групи. Перші вимірюють об'ємні фізичні властивості елюенту, такі як діелектрична стала чи індекс рефракції; інші – деякі хімічні або фізичні властивості, притаманні саме досліджуваній речовині. Також детектори можуть бути диференційного (реєструють миттєві показники характеристик) та інтегрального (реєструють сумарні показники за певний проміжок часу) типів. Ще один метод класифікації дозволяє поділити детектори на специфічні та неспецифічні. Наприклад, азотно-фосфорний детектор є специфічним, оскільки дозволяє виявити тільки сполуки, що містять азот чи фосфор. Неспецифічним детектором є катарометр (використовується у ГХ), який чутливий до будь-яких пароподібних сполук, термоелектро- чи теплопроводність яких відрізняється від відповідних характеристик газу-носія [2, 3, 10, 11].

У ГХ використовують практично лише детектори диференційного типу, які підрозділяють на концентраційні (катарометр) та потокові, що чутливі до маси (полум'яно–іонізаційний детектор - ПІД). Концентраційні детектори, як правило є недеструктивними (не руйнують речовини, які аналізують), а потокові – деструктивними.

Ідеальний детектор для ГХ повинен мати чутливість порядку 10^{-12} – 10^{-11} г/мл, лінійний динамічний діапазон близько п'яти порядків величини. Він повинен

володіти всебічною відповіддю, але бути незалежним від характеристик мобільної фази, швидкості потоку мобільної фази та змін температури і тиску. Детекторів, які відповідають усім цим вимогам не існує, ближче за все до ідеальних характеристик стоїть полум'яно – іонізаційний детектор [2, 3, 10].

При використанні полум'яно–іонізаційного детектора відбувається іонізація органічних сполук у водневому полум'ї, у результаті між двома електродами сила електричного струму збільшується пропорційно масовій швидкості органічної речовини, що надходить до полум'я детектора. Модифікований ПІД-термоіонний детектор хроматографічний містить джерело іонів лужних металів (напр., K, Rb, Cs), які подаються у полум'я, та характеризується підвищеною чутливістю до фосфор-, азот- та галогенвмісних сполук. Фотоіонізаційний детектор передбачає використання ультрафіолетового випромінювання як джерела іонізації. Речовина, що досліджується, іонізується, утворюються іон та електрон (при цьому енергія фотону повинна перевищувати потенціал іонізації хімічної речовини), у результаті провідність газового середовища підвищується пропорційно концентрації сполуки. Цей детектор відноситься до концентраційних недеструктивних, тому доцільно використовувати його при послідовному з'єднанні з іншими детекторами, наприклад ПІД. Електронозахватний детектор є камерою з двома електродами, які використовують для вимірювання іонного струму, та радіоізотопним джерелом для іонізації газів. Під впливом радіоактивного випромінювання газ іонізується з утворенням електронів, а при застосуванні до електродів відповідного потенціалу, виникає значний фоновий струм. Молекули аналізуємої речовини, які володіють спорідненістю до електронів, при надходженні до детектора захоплюють електрони, зменшуючи їх концентрацію та відповідно знижуючи силу фонового струму. Полум'яно-фотометричний детектор вимірює інтенсивність випромінювання речовин у водневому полум'ї. Його можна розглядати як варіант полум'яно-емісійного фотометру. Оптичні фільтри, які використовуються в детекторі, дозволяють виділити лінію, що є характерною для сполук певного класу (наприклад, для сірковмісних сполук – це 394 нм, для фосфоровмісних – 526 нм). Випромінювання, яке відповідає певній лінії, посилюється фотопомножувачем. Дія катарометру (детектор за теплопровідністю) заснована на зміні опору нагрітої металевої нитки у потоці газу з колонки. При коливанні складу газової суміші змінюється тепловіддача та, відповідно, її температура й опір. У детекторі за щільністю вихідний сигнал залежить від розбіжності щільностей досліджуваної речовини та газу-носія. Для незалежної ідентифікації домішок використовують також високочутливі та надселективні масспектральний детектор та інфрачервоний детектор із перетворювачем Фур'є. Метод мас-спектрометрії заснований на дослідженні сполук шляхом визначення співвідношення маси до заряду та кількості заражених часточок, що утворюються при іонізації. Суттєвою відмінністю від інших аналітичних фізико-хімічних методів, які фіксують випромінювання чи поглинання енергії молекулами або атомами, є те, що мас-спектрометрія безпосередньо виявляє саме часточки речовин. ГХ якнайкраще поєднується з іонним джерелом масспектрометру при іонізації електронним ударом чи хімічній іонізації [2, 3, 10].

Єдиного універсального детектора для РХ також не існує. Найбільш розповсюджений та високочутливий – ультрафіолетовий (УФ) фотометричний детектор, принцип дії якого заснований на вимірюванні кількості випромінювання, що адсорбується при проходженні світла через проточну камеру детектора. Концентрація речовини визначається за законом Бугера-Ламберта-Бера. У випадках, коли сполука, яка детектується, не поглинає УФ випромінювання, в елюент додають невелику кількість речовини, що поглинає вказані промені, тоді сполука визначається за негативним піком на детекторі. Флуоресцентний детектор вимірює інтенсивність флуоресценції (чи хемілюмінесценції) при опроміненні досліджуваної речовини УФ випромінюванням (або при хімічній реакції). Рефрактометричний детектор вимірює розбіжності між показниками переломлювання аналізуємої та чистої мобільної фази, при цьому у певному діапазоні сигнал детектора прямопропорційний концентрації сполуки у мобільній фазі. Дія електрохімічного детектора базується на вимірюванні електрохімічних характеристик елюенту при виході з колонки. У кондуктометричному детекторі вимірюють електропровідність елюенту. Інколи після виходу з колонки елюент піддають УФ опроміненню та кондуктометрично визначають продукти фотолітичної деструкції, що іонізуються. Полярографічні детектори використовують для виявлення електроактивних сполук, радіаційні – для ізотопно-позначених сполук, наприклад ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P, ^{3}H, тощо. У РХ інколи застосовуються ПІД та електронозахватний детектори, що виявляють продукти піролізу сполук після випаровування розчинника (на стрічці, що рухається, чи дроті) та деструкції нелетких сполук у печі–піролізаторі. Перспективним є використання високочутливих масспектрометричних детекторів, зазвичай їх використовують в поєднанні з мікроколоночною РХ [11, 12, 13].

У РХ на сьогодні, нажаль, немає детектора, який за своїми характеристиками наближався би до ПІД, що використовується у ГХ. Взагалі, чутливість детекторів для РХ на 2-3 порядки величини нижче за показники детекторів для ГХ, а їх лінійний динамічний діапазон – на 2 порядки нижчий [2, 3, 11].

Таким чином, хроматографічні дослідження характеризуються багатим рядом приладів для введення проб, розділення багатокомпонентних сумішей на окремі сполуки, детекції отриманих речовин. Саме тому існує багато різновидів вказаної методики розподілення. Враховуючи різноманітність хроматографічних методик, не будемо детально зупинятися на кожній з них, лише коротко окреслимо сфери їх практичного застосування.

Ареали використання газової та рідинної хроматографії суттєво відрізняються. У цілому, ГХ використовують для розділення летких матеріалів, а РХ – для нелетких рідин та твердих матеріалів. Однак існують деякі компоненти, які можуть бути розділені за допомогою обох методик, і, що більш важливо, багато

нелетких субстанцій, таких як амінокислоти, стероїди та високомолекулярні жирні кислоти, які можуть бути розділені за допомогою ГХ. Капілярні колонки для ГХ набагато ефективніші, ніж їх РХ аналоги, а тому вони можуть забезпечити розділення мультикомпонентних сумішей, таких як ефірні олії. З іншого боку, тільки РХ використовують для розділення пептидів, поліпептидів, протеїнів та інших великих біополімерів, які мають біотехнологічну значимість [3, 6, 8].

Газову хроматографію використовують в багатьох медичних галузях: у гігієні та екології для визначення вмісту шкідливих домішок у повітрі, воді та харчових продуктах; у токсикології та судовій медицині для виявлення отруєнь технічними рідинами та пестицидами різноманітної структури; у фармакології – для контролю якості препаратів, дослідження метаболізму лікарських речовин. За допомогою ГХ визначають склад ліпідів крові, який є передумовою профілактики та лікування атеросклерозу та ішемічної хвороби серця; визначають спектр карбонових кислот циклу Кребса, що дозволяє розкрити особливості внутріклітинного метаболізму при різних патологічних процесах. Методом ГХ визначають підвищений вміст ацетону, гептанолу-2 та інших кетонів при цукровому діабеті, розроблено методи визначення катехоламінів (адреналіну та норадренліну) і споріднених сполук, гормонів щитоподібної залози, надниркових залоз. У медичній мікробіології використовують методи диференціації бактерій за їх жирнокислотними профілями, визначеними у ГХ (рис. 4.) ГЖХ та ГАХ широко використовують для визначення деяких фізико-хімічних характеристик речовин (константа розподілення, константа комплексоутворення, теплота розчинення, коефіцієнти активності, ізотерми та енергія адсорбції, енергії водневих зв'язків, тощо), а також для вимірювання кінетики хімічних реакцій [1, 6, 7, 14].

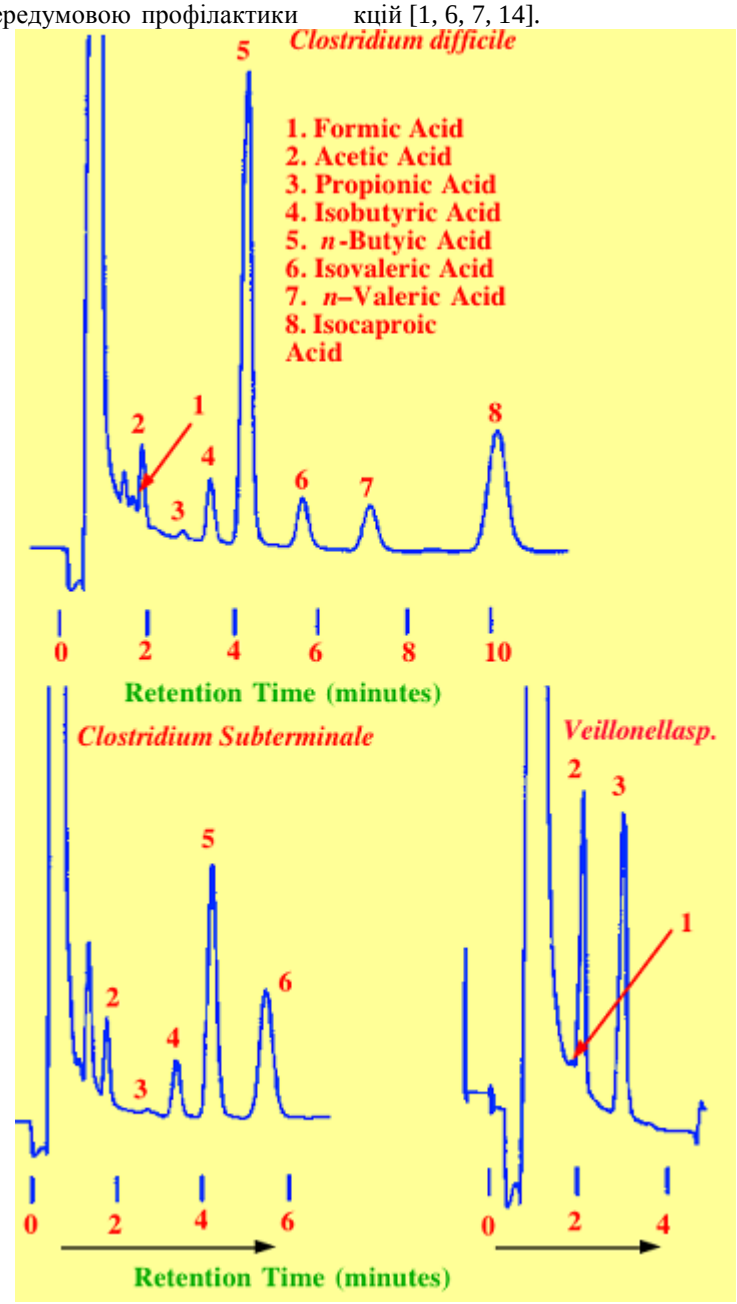

Рис.4. Жирнокислотні профілі для деяких бактерій [3].

Рідинна хроматографія використовується для розділення високополярних речовин та речовин з великою молекулярною вагою, що нелеткі та не можуть бути розділені за допомогою ГХ. РХ є одним з найважливіших методів досліджень у хімії, біології, біохімії, медицині та біотехнології. Лігандообмінна РХ є найбільш ефективною для розділення ізомерів. Загальноприйнятим підходом до розподілу пептидів вважають рідинну гель-хроматографію. Метод адсорбції у завислому шарі широко використовується в біотехнологічній промисловості для очистки продуктів синтезу (секреції) мікроорганізмів, ендоплазматичних продуктів, периплазматичних продуктів та продуктів із тілець включень. РХ використовують для аналізу, розділення, отримання та очистки амінокислот, пептидів білків, ферментів, нуклеотидів, вуглеводів, ліпідів, гормонів, тощо; вивчення процесів метаболізму лікарських речовин у живих організмах; аналізу продуктів хімічного та нафтохімічного синтезу; вивчення ізотерм сорбції з розчинів, кінетики та селективності хімічних процесів. У хімії високомолекулярних сполук та виробництві полімерів РХ використовують для контролю, аналізуючи якість мономерів, вивчаючи молекулярно-масове розподілення та розподілення за типами функціональності олігомерів та полімерів. Знайшла використання РХ також у парфумерній та харчовій промисловості, криміналістиці та екології [3, 8, 15-23].

Таким чином, хроматографія – один з найпотужніших аналітичних методів. Лише за один крок він допомагає розділити багатокомпонентні суміші на окремі компоненти та одночасно дає кількісну характеристику кожного компоненту. Хроматографічні методи на сучасному етапі використовуються спеціалістами в різноманітних сферах науки та промисловості, зокрема, в таких як медицина, біологія, фізика, геологія, біотехнологія, хімічна та фармацевтична промисловість тощо.

Список літератури

1. Зеленин, К. Н. Газовая хроматография в медицине [Електронний ресурс] / К.Н. Зеленин / Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 11. – С. 20-25. Режим доступу: http://www.pereplet.ru/nauka/Soros/pdf/9611_020.pdf.
2. Рудаков, О. Б. Спутник хроматографиста [Текст] / О. Б. Рудаков, И.А. Востров. – Воронеж : Водолей, 2004. – 528 с. – ISBN 5-88563-049-6.
3. Scott, R. P. W. Principles and practice of chromatography : Chrom-Ed Book Series, BOOK 1 [Електронний ресурс] / Raymond P. W. Scott. – LIBRARYFORSCIENCE LLC, 2003. – 104 p. Режим доступу: http://www.chromatography-online.org/.
4. Heltmann, E. Chromatography : 6th edition [Text] / E. Heltmann. – Elsevier, 2004. – p. 1155. – ISBN 0-444-51108-3.
5. Chromatography a century of discovery 1900-2000 : the bridge to the science/technology [edited by C. W. Gehrke, R. L. Wixom and E. Bayer] [Text]. – Elsevier science BV, 2001. – 708 p. – ISBN 0-444-50114-2.
6. Scott, R. P. W. Gas chromatography : Chrom-Ed Book Series : BOOK 2 [Електронний ресурс] / Raymond P. W. Scott. – LIBRARYFORSCIENCE LLC, 2003. – 92 p. Режим доступу: http://www.chromatography-online.org/.
7. Яшин, Я. И. Газовая хроматография [Текст] / Яшин Я. И., Яшин Е. Я., Яшин А. Я. — М. : ТрансЛит, 2009. — 528 с. — ISBN 978-5-94976-825-9
8. Scott, R. P. W. Liquid chromatography : Chrom-Ed Book Series : BOOK 3 [Електронний ресурс] / Raymond P. W. Scott. – LIBRARYFORSCIENCE LLC, 2003. – 103 p. Режим доступу: http://www.chromatography-online.org/.
9. Interlaced size exclusion liquid chromatography of monoclonal antibodies [Text] / Dell Farnan, George Tony Moreno, John Stults, Andreas Becker [et al.] // Journ. of chromatogr. A. – 2009. – V. 1216 (51). – P. 8904-8909. – ISSN 0021-9673.
10. Scott, R. P. W. Gas chromatography detectors : Chrom-Ed Book Series : BOOK 4 [Електронний ресурс] / Raymond P. W. Scott. – LIBRARYFORSCIENCE LLC, 2003. – 94. p. Режим доступу: http://www.chromatography-online.org/.
11. Scott, R. P. W. Liquid chromatography detectors : Chrom-Ed Book Series : BOOK 5 [Електронний ресурс] / Raymond P. W. Scott. – LIBRARYFORSCIENCE LLC, 2003. – 106 p. Режим доступу: http://www.chromatography-online.org/.
12. Aznar, M. Quantitative determination of 22 primary aromatic amines by cation-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry [Text] / Margarita Aznar, Elena Canellas, Cristina Nerín // Journ. of chromatogr. A. – 2009. – V. 1216 (27). – P. 5176-5181. – ISSN 0021-9673.
13. Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in Radix Scrophulariae by rapid resolution liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [Text] / Q. Wu, Q. Yuan, E-Hu Liu, L.-W. Qi, Z [et al.] // Biomedical chromatogr. – 2010. – V. 24 (8). – P. 808–819. – ISSN 1099-0801.
14. Development of a multiresidue method for the determination of multiclass pesticides in soil using GC [Text] / J.-H. Park, I. R. Mamun, J.-H. Choi, A. M. Abd El-Aty [et al.] // Biomedical chromatogr. – 2010. – V. 24 (8). – P. 893–901. – ISSN 1099-0801.
15. Черкашина, Д. В. Якісний аналіз пептидного та білкового складу цитозольних фракцій фетальних тканин людини [Електронний ресурс] / Д. В. Черкашина, О. Ю. Семенченко, О. Ю. Петренко // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2008. – № 1. – С. 23—27. – ISSN 1814-9766. Режим доступу: http://www.bioorganica.org.ua/UBAdenovo/pubs_6_1_08/Cherkashina_2008_1.pdf
16. Волков, Г. Л. Очистка биомолекул методом адсорбционной хроматографии в расширенном слое I. Принцип метода [Текст] / Г. Л. Волков, С. И. Андрианов, Т. В. Горошникова, Е. С. Гаврилюк // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 6. – С. 5-16. – ISSN 0201 -8470.
17. Волков, Г. Л. Очистка биомолекул методом адсорбционной хроматографии во взвешенном слое II. Проектирование эксперимента [Текст] / Г. Л. Волков, С. И. Андрианов, Е. С. Гаврилюк, Т. В. Горошникова //

Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 2. – С. 20-30. – ISSN 0201 -8470.
18. Очистка биомолекул методом адсорбционной хроматографии во взвешенном слое III. Оптимизация метода. Практическое применение [Текст] / Г. Л. Волков, С. И. Андрианов, Е. С. Гаврилюк, Т. В. Горошникова [та ін.] // Укр. біохім. журн. - 2005. – Т. 77, № 2. – С. 26-57. – ISSN 0201-8470.
19. Копа, М. Р. Гигиеническое значение жирнокислотной составляющей липидного комплекса крови у работников транспорта: методы определения жирных кислот [Текст] / Копа М. Р., Третьякова Е. В. // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2007. – № 2 (8). – С. 139-143. – ISSN 1818-9385.
20. Uglea, C. V. Liquid chromatography of oligomers [Text] / C. V. Uglea. – USA : Marcel Dekker, 1996. – 344 p. – ISBN 0-8247-09720-5.
21. Simple high-performance liquid chromatography—fluorescence detection method for plasma, kidney and liver of rat as a tool for toxicology studies [Text] / Ariane Vettorazzi, Elena Gonzalez-Peñas, Leire Arbillaga [et al.] // Journ. of chromatogr. A. – 2008. – V. 1215 (1-2). – P. 100-106. – ISSN 0021-9673.
22. Determination and pharmacokinetics of periplocin in rat plasma by LC-MS [Text] / Lixin Yi, Kaishun Bi, Xinyang Chen, Qiufeng Zhang [et al.] // Biomedical chromatogr. – 2010. – V. 24 (10). – P. 1089–1093. – ISSN 1099-0801.
23. Simultaneous determination of niacin and its metabolites—nicotinamide, nicotinuric acid and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide—in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study [Text] / J. K. Inamadugu, R. Damaramadugu, R. Mullangi, V. Ponneri // Biomedical chromatogr. – 2010. – V. 24 (10). – P. 1059–1074. – ISSN 1099-0801.

УДК 543.544:543.544.1:543.544.7
Хроматографічні методи: класифікація, принципи та практичне застосування
Рижкова Т.А., Бабич Е.М., Калініченко С.В., Скляр Н.І., Рябовол О.В., Плугатор Т.М., Горбач Т.В., Антушева Т.І., Касьяненко Т.М.
У статті коротко висвітлена історія розвитку хроматографічних методів дослідження, наведені класифікації зазначених методик за агрегатним станом стаціонарної та мобільної фаз, за механізмом розділення, за геометрією сорбційного шару стаціонарної фази, за способом введення проб. Окреслений загальний принцип роботи хроматографічних приладів, у тому числі хроматографічних детекторів. Зазначені основні хроматографічні характеристики та методи їх розрахунків відповідно до хроматограм. Наведені сфери практичного застосування різних видів хроматографічних технік.
Ключові слова: хроматографічні методи дослідження, розділення, сорбція, стаціонарна фаза, мобільна фаза.

УДК 543.544:543.544.1:543.544.7
Хроматографические методы: классификация, принципы и практическое применение.
Рыжкова Т.А., Бабич Е.М., Калиниченко С.В., Скляр Н.И., Рябовол Е.В., Плугатор Т.Н., Горбач Т.В., Антушева Т.И., Касьяненко Т.Н.
В статье кратко освещена история развития хроматографических методов исследования, приведены классификации указанных методов по агрегатному состоянию стационарной и мобильной фаз, по механизму разделения, по геометрии сорбционного слоя, по способу введения проб. Описан общий принцип работы хроматографических приборов, в том числе и хроматографических детекторов. Определены основные хроматографические характеристики и методы их расчета в соответствии с хроматограммами. Приведены сферы практического использования разных видов хроматографических техник.
Ключевые слова: хроматографические методы исследования, разделение, сорбция, стационарная фаза, мобильная фаза.

UDC 543.544:543.544.1:543.544.7
Chromatography: the classification of chromatography, principles and practice of chromatography.
Ryzhkova T. A., Babych E.M., Kalinichenko S.V., Sklyar N.I., Rjabovol O.V., Plugator T.N., Gorbach T.V., Antusheva T.I., Kasjanenko T.N.
The history of chromatographic technique development is briefly described in this article. The classifications of above mentioned methods by stationary and mobile phases aggregate state, by mechanism of separation, by form of stationary phase, by type of development process are presented. The main principles of operation of chromatographic apparatus, including chromatographic detectors, are characterized. Chromatography nomenclature and formula evaluation of the main chromatographic characteristics are presented. The different chromatographic techniques applications are described.
Key words: Chromatographic methods of analysis, separation, sorption, stationary phase, mobile phase.