

Аналитическая хроматография. Методы, аппаратура, применение

Я.И.Яшин, А.Я.Яшин

Научно-технический центр «Хроматография»

Научно-производственного объединения «Химавтоматика»

129226 Москва, ул. Сельскохозяйственная, 12а, факс (495) 181–1402

Охарактеризовано состояние и рассмотрены перспективы развития основных аналитических методов хроматографии: газовой, высокоэффективной жидкостной и ионной. Перечислены достижения последних 10–15 лет в области теории и общей методологии хроматографии, а также в области разработки новых сорбентов, колонок и хроматографических приборов. Рассмотрено применение хроматографии в охране окружающей среды, биологии, медицине, фармацевтике, в контроле пищевых продуктов и продуктов химической, нефтехимической и газовой промышленности и др.

Библиография — 153 ссылки.

Оглавление

I. Введение	366
II. Развитие теории и общей методологии	367
III. Разработка новых сорбентов и аппаратуры для хроматографических исследований	367
IV. Основные преимущества аналитической хроматографии	370
V. Хроматографическое приборостроение	372
VI. Основные области аналитического применения хроматографических методов	373
VII. Заключение	377

I. Введение

В конце XX–начале XXI вв. перед аналитической химией постоянно ставились задачи оперативного контроля объектов окружающей среды; оценки качества и безопасности пищевых продуктов и напитков, качества и подлинности лекарственных средств; обеспечения безопасности, связанной с уничтожением химического оружия; предотвращения террористических угроз путем экспрессного контроля отравляющих и взрывчатых веществ в аэропортах, на вокзалах и в других местах массового скопления людей; обнаружения сильных наркотических веществ. Роль хроматографических методов в решении этих задач была решающей.

Я.И.Яшин. Доктор химических наук, профессор, директор НТЦ «Хроматография» НПО «Химавтоматика».

Телефон: (495) 181–5327, e-mail: yashinchrom@mtu-net.ru

Область научных интересов: научные основы хроматографии, сорбенты, аппаратура, применение хроматографии в экологии, медицине, контроле пищевых продуктов, фармацевтике и др.

А.Я.Яшин. Кандидат химических наук, начальник отдела жидкостной хроматографии того же центра. Телефон: (495) 181–5327.

Область научных интересов: высокоэффективная жидкостная и ионная хроматография, амперометрическое и кулонометрическое детектирование, применение хроматографии для ранней диагностики заболеваний в медицине.

Хроматография была открыта русским ботаником М.С.Цветом в 1903 г.¹ Он был не только первооткрывателем метода, но им были детально разработаны методические основы хроматографии. Достаточно сказать, что Цвет исследовал более 100 разных адсорбентов. Предложенная им техника хроматографического анализа почти без изменения использовалась в течение 50–60 лет. Хроматографические колонки Цвета имели высокую эффективность. Он также впервые продемонстрировал высокую результативность многоколоночных вариантов хроматографии. В 1931 г. Р.Кун, А.Винтерштейн и Е.Ледерер² практически повторили эксперименты М.С.Цветова и убедились в их огромных возможностях. С этого времени началось быстрое распространение хроматографического метода в европейских странах.

В течение первых 50 лет хроматографию использовали либо для разделения и выделения веществ в чистом виде, либо как исследовательский метод. Как метод анализа хроматография стала широко применяться только во второй половине XX столетия.

С 1937 по 1972 г. четырнадцать работ по химии, биохимии, физиологии и медицине, в которых хроматографические методы играли решающую роль, были удостоены Нобелевских премий. Хроматография, несомненно, способствовала прогрессу во многих направлениях науки, техники и промышленности, вот почему она была отнесена к 20 выдающимся открытиям двадцатого столетия, которые в наибольшей степени преобразовали жизнь человечества.

Используя комбинацию методов хроматографии, можно решать большинство аналитических задач. Газы и летучие соединения хорошо определяются с помощью газовой хроматографии (ГХ); высокомолекулярные соединения — мето-

дом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ); смеси ионов (как анионов, так и катионов) разделяют методами ионной (ИХ) и ион-парной хроматографии (ИПХ), а также методом капиллярного электрофореза (КЭФ); разделение макромолекул (полимеров, биополимеров) проводится методами гель-проникающей и эксклюзионной хроматографии (ЭХ); для разделения оптических изомеров разработаны методы хиральной хроматографии, а для анализа микрочастиц применяют метод фракционирования в поле сил (ФПС).

Темпы развития основных аналитических методов хроматографии (газовой, жидкостной, ионной) были очень высокими. В литературе неоднократно публиковались работы по наукометрическому исследованию состояния и перспектив развития методов хроматографии;^{3–5} обзоры, посвященные 20-летию ВЭЖХ,⁶ 25-летию ионной хроматографии,⁷ 30-летию аффинной хроматографии,⁸ 40-летию газохроматографического приборостроения,⁹ 90-летию хроматографии,¹⁰ 100-летию хроматографии.^{11–13} Опубликованы обзоры по непрерывной эволюции методов хроматографии.^{14–16} Рейтинг хроматографических методов среди других аналитических методов рассмотрен в обзоре¹⁷.

В настоящем обзоре кратко проанализированы наиболее существенные результаты, достигнутые в последние 10–15 лет в области развития теории и общей методологии хроматографии, а также в области создания новых сорбентов и аппаратуры для хроматографических исследований.

II. Развитие теории и общей методологии

Основные усилия в области теории хроматографии в настоящее время направлены на исследование вопросов селективности разделения. Прежде всего изучается связь структуры исследуемых молекул с их удерживанием на сорбентах разной химической природы. Предпринимаются попытки создания единой теории удерживания для методов газовой, жидкостной и сверхкритической флюидной хроматографии, развивается теоретическое моделирование. Для повышения селективности хроматографического разделения в последние годы широко используют геометрический фактор. В этом случае в качестве сорбентов применяют циклодекстрины, краун-эфиры, жидкие кристаллы, молекулярные сита и др.

Степень разделения R в хроматографии определяется соотношением:

$$R \approx \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K_e}{1 + K_e} \right) \sqrt{N},$$

где α — фактор разделения, равный отношению приведенных времен удерживания разделяемых веществ; K_e — фактор удерживания, равный отношению чистого объема удерживания к свободному объему колонки; N — число теоретических тарелок. Хорошо разработанная теория размытия позволила получить колонки с эффективностью, близкой к теоретической (как в газовой, так и в жидкостной хроматографии). Особенно высокая эффективность достигается при использовании капиллярных вариантов хроматографии. Приняв средние значения эффективности (число теоретических тарелок на метр, т. е. м^{-1}) насадочных колонок равными $1.5 \cdot 10^3$ (в ГХ) и $5 \cdot 10^4$ (в ВЭЖХ), а капиллярных колонок — $4 \cdot 10^3$ (в ГХ), $3 \cdot 10^5$ (в ВЭЖХ) и $> 1 \cdot 10^6$ (в КЭФ и капиллярной электрохроматографии (КЭХ)), можно оценить предельные раздельные возможности колонок в хроматографии. На насадочных колонках в ГХ можно разделять только смеси с $\alpha > 1.05$, на капиллярных колонках в ГХ — с $\alpha > 1.005$, а на капиллярных колонках в КЭХ — с $\alpha > 1.003$.

Продолжаются исследования механизма удерживания в обращенно-фазовой хроматографии на привитых фазах. Для этого привлекаются спектральные методы. Весьма перспек-

тивно направление оптимизации разделения с помощью экспертных систем, включая оптимизацию градиентного элюирования. Значительные успехи достигнуты в теории разделения оптических изомеров (как в газовой, так и в жидкостной хроматографии).^{18, 19}

Большим достижением является разработка теории хроматографии при критических условиях в гель-фильтрационном методе.²⁰ Имеются успехи в установлении связи параметров удерживания с биологической и химической активностью молекул.²¹ Это особенно перспективно для фармацевтики при поиске новых лекарств.

В последние годы активно изучается влияние температуры на удерживание в ВЭЖХ, что привело к созданию высокотемпературной ВЭЖХ, характеризующейся высокими разрешениями и скоростями анализа. Ведется разработка термо- и гидролитически стойких полимерных сорбентов для этого варианта хроматографии. Сейчас разрабатывается аппаратура для программирования температуры в этом методе.[†] Большое значение имеет оптимизация разделения при одновременном изменении температуры и скорости элюента.²⁵

Проводятся работы по созданию банков индексов удерживания в ВЭЖХ с использованием нитроалканов и алкилбензолов в качестве стандартных веществ.²⁶

Исследовано влияние электрического поля на удерживание и размытие соединений на колонках с углеродным адсорбентом,²⁷ а также влияние магнитного поля на удерживание на колонках, заполненных магнитными частицами.²⁸

III. Разработка новых сорбентов и аппаратуры для хроматографических исследований

1. Газовая хроматография

Основными достижениями ГХ являются получение стабильных сорбентов с химически привитыми (иммобилизованными) фазами для насадочных и капиллярных колонок, а также разработка и внедрение капиллярных колонок относительно большого диаметра (0.32 и 0.53 мм) и большой емкости с толщиной привитой пленки жидкой фазы до 5 мкм (и даже до 16 мкм),²⁹ а также капиллярных колонок PoraPLOT с закрепленным адсорбционным слоем (оксида кремния или алюминия, цеолита, углеродных адсорбентов и пористых полимеров).³⁰

На таких стабильных колонках можно создавать банки (библиотеки) параметров удерживания для идентификации неизвестных компонентов смесей. Весьма информативным считается сочетание банков параметров удерживания с банками масс-спектров.³¹ В целом создание стабильных хроматографических колонок привело к большей надежности и точности хроматографических определений. Для определения микропримесей на капиллярных колонках разработаны методы дозирования больших проб в колонки (наколочный ввод, криофокусировка, ввод пробы с отдувкой растворителя и др.).³² Стабильности работы хроматографов способствовало внедрение электронного контроля расхода газа-носителя и давления. Электронно-управляемый режим регулирования расхода газа-носителя позволил создать программу автоматического поддержания времени удерживания при смене колонок.³³

В последние годы в аналитическую практику были внедрены поликапиллярные колонки,[‡] которые позволяют про-

[†] Впервые применение высокотемпературной хроматографии (при 200°С) для целей анализа было описано в работах^{22–24}.

[‡] Изобретение новосибирских хроматографистов (А.с. 986181 СССР (1980)).

водить экспрессное разделение смесей без режима программирования температуры колонки.³⁴ Использование адсорбционных поликапиллярных колонок описано в работе³⁵.

2. Жидкостная хроматография

Последние достижения в аналитической жидкостной хроматографии связаны с разработкой и внедрением методов высокоэффективной капиллярной электрохроматографии, которая сочетает хроматографические и электрофоретические способы разделения.³⁶ Только благодаря сочетанию разнообразных методов жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза стали возможными расшифровка нуклеотидной последовательности ДНК и завершение работ по программе «Геном человека».³⁷

Возможности жидкостной хроматографии значительно расширились с внедрением методов хиральной,³⁸ иммуноаффинной,³⁹ высокотемпературной⁴⁰ и перфузионной⁴¹ хроматографии. Представляет интерес экспрессная хроматография белков на непористых частицах.⁴²

Ведется интенсивная разработка новых высокостабильных и селективных сорбентов на основе диоксидов циркония и титана, пористых полимеров и углеродных адсорбентов, устойчивых во всем диапазоне pH.⁴³ Для ВЭЖХ разработан и выпускается широкий ассортимент сорбентов. Десятки фирм в мире производят более 300 типов сорбентов. Чаще всего в ВЭЖХ применяют чистые силикагели и силикагели с привитыми неполярными и полярными группами (их доля составляет 70%). Реже используют полимеры, например сополимеры стирола с дивинилбензолом, полиметакрилаты, целлюлозы и др. (20%); пористые углеродные сорбенты и пористые оксиды титана или циркония (4%); оксид алюминия (1%).

В аналитической практике наибольшее применение находит обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ (более 70% хроматографических анализов проводится с использованием этого варианта ЖХ), где в качестве сорбентов используется силикагель с привитыми алкильными группами (длина алкильных цепей колеблется от C₁ до C₃₄; чаще всего применяют C₁₈ и C₈).

В зависимости от способа синтеза сорбенты C₁₈ бывают мономерными или полимерными. Полимерные сорбенты C₁₈ получают с использованием трифункциональных силанов в присутствии воды, а мономерные — с использованием монофункциональных силанов. В некоторых случаях, в частности при разделении сложной смеси изомеров полиядерных ароматических углеводородов, полимерные сорбенты C₁₈ предпочтительнее. Удерживающая способность и селективность мономерных C₁₈ к неполярным и слабополярным соединениям зависит от числа привитых алкильных цепей (или от общего содержания углерода на единицу веса сорбента, которое колеблется от 8 до 20%). Небольшая доля углерода приводит к малой емкости сорбента, быстрому разделению и быстрому установлению равновесия при градиентном элюировании.

Однако сорбенты на основе силикагеля с привитыми алкильными группами имеют много недостатков. Они неустойчивы в кислых и щелочных средах: при pH < 3 происходит гидролиз связи Si—O—Si, а при pH > 10 — растворение силикагеля (особенно при высоких температурах). Эти сорбенты не селективны при разделении полярных соединений и изомеров, а характеристики соединений основного характера, определяемые с помощью этих сорбентов, существенно зависят от чистоты, геометрии и химической природы силикагеля, а также от способа прививки алкильных групп и пр.

В последние годы ведется большая работа по устранению перечисленных недостатков. Прежде всего, усовершен-

ствуется производство исходных силикагелей. Налажен выпуск силикагелей особой чистоты (с ничтожным содержанием тяжелых металлов) в виде сферических частиц, причем их состав и форма от партии к партии не меняются. К сожалению, добиться связывания всех гидроксильных групп в силикагеле никогда не удастся. Остаточные гидроксильные группы могут участвовать в нежелательных взаимодействиях с небольшими полярными молекулами, что приводит к появлению несимметричных пиков. Предложено блокировать ОН-группы более объемными изопропильными или изобутильными группами (сорбент Zorbax Stable Bond). Заблокировать остаточные гидроксильные группы можно, прививая на силикагель бидентатные реагенты, в которых две соседние алкильные цепи связаны между собой мостиком из 3–4-х метиленовых групп. Эти мостики закрывают ОН-группы, в результате чего такие сорбенты намного стабильнее и работают даже при повышенных pH (Zorbax Extend-C₁₈). Для повышения селективности сорбентов на основе силикагеля, содержащего привитые алкильные группы, к полярным соединениям алкильные цепи модифицируют полярными группами, в частности карбамидными.

Силикагели со средними размерами пор 80, 100 и 120 Å применяют для разделения низкомолекулярных соединений, а силикагели с порами ≥ 300 Å — для разделения высокомолекулярных соединений и биополимеров. Так, силикагель, модифицированный C₃₀-алкильными группами, был использован для разделения полиядерных ароматических соединений, олигонуклеотидов, фуллеренов и алкилбензолов.

Среди других сорбентов, применяемых в обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ), следует выделить сорбенты на основе полиэтиленгликолей, которые используются для разделения фенольных соединений, а также перфторированные сорбенты для анализа галогенсодержащих соединений.

Предложены полимерные сорбенты на основе поли(дивинилбензола) с порами 500 и 1000 Å (фирма «Jordi»).

В настоящее время выпускаются сотни типов сорбентов. Для правильного выбора сорбентов для ОФХ разработаны разные системы оценок.

К достижениям последних лет следует отнести разработку колонок для турбулентной хроматографии. В колонках диаметром 1 мм, заполненных частицами размером 50 мкм, используются большие скорости потока, при этом крупные молекулы белков не удерживаются, а небольшие молекулы успевают диффундировать в поры и удерживаются.

В последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в технологии получения новых типов сорбентов и колонок для ВЭЖХ. В частности, разработаны сорбенты для перфузионной хроматографии (ПХ); созданы монолитные колонки с единым пористым блоком полимерного материала или силикагеля.

Перфузионная хроматография впервые была применена в 1990 г., а позднее была разработана ее теория. Перфузионную хроматографию чаще всего используют для препаративного выделения веществ (в частности, белков) в чистом виде, и в меньшей степени — для целей анализа (например, для анализа пищевых белков). Перфузионные колонки считаются промежуточными между обычными насадочными колонками и монолитными. В перфузионных колонках микропотоки элюента проходят сквозь зерна сорбента, а не обтекают их, как в обычных насадочных колонках. Обычно в качестве сорбентов в ПХ используют сополимеры стирола и дивинилбензола. Такие сорбенты представляют собой частицы диаметром ~20 мкм, содержащие два типа пор: большие поры (6000–8000 Å), по которым элюент проходит через зерна, и диффузионные поры (800–1500 Å), по которым вещества легко проникают в поры сорбента. В связи с улучшением процесса массообмена в перфузионных колон-

ках можно использовать большие скорости элюента, сокращая при этом время разделения. Это особенно важно для больших молекул. В настоящее время производятся перфузионные сорбенты для разных вариантов хроматографии: для ОФХ, нормально-фазовой, ионообменной, гидрофобной и аффинной.

В монолитных колонках сорбционный слой представляет собой сплошной жесткий пористый стержень. В качестве материалов используют полистирол (ПСТ), сополимеры стирола с дивинилбензолом, полиакрилаты, полиметакрилаты (ПМА), поли(глицидилметакрилат), поли(этилендиметакрилат) и др. (табл. 1). Выпускаются монолитные колонки большого диаметра (> 5 см) для препаративных целей. Разработаны специальные монолитные колонки для разделения энантиомеров, а также для разделения полипептидов и полинуклеотидов. Создано новое поколение монолитных колонок на основе силикагелей типа Chromolith. В 2001 г. фирма «Merck» выпустила серию аналитических монолитных колонок (Chromolith Performance RP-18e, Chromolith Flash RP-18e и др.; размеры колонок 100×4.6 мм, 50×4.6 мм, 25×4.6 мм) и получила в этом же году золотую медаль на Питтсбургской конференции «За лучший новый продукт». На таких колонках можно работать при больших скоростях пропускания элюента без ухудшения разделения, при этом входное давление значительно ниже, чем на насадочных колонках. Колонки Chromolith RP-18e пригодны для разделения кислых, основных и неполярных соединений.

Таблица 1. Монолитные хроматографические колонки, применяемые в обращенно-фазовой хроматографии.

Название	Форма	Фирма-производитель	Материал
CIM-Disk	Диск	BIA Separations	ПМА и ПСТ
CB Silica Plate	«	ConChrom	Силикагель
Onyx	Цилиндр	Phenomenex	Силикагель
SWIFT	«	ISCO	ПМА и ПСТ
Chromolith	«	Merck	Силикагель
Monoliths	«	LC Packing	ПСТ

Для сорбции только одного типа молекул или близких групп молекул созданы сорбенты с порами молекулярных размеров (СПМР). Основным способом получения СПМР является полимеризация метакриловой кислоты или этилендиметакрилата. Эти селективные сорбенты применяют для разделения и концентрирования (в основе разделения лежит принцип «молекулярного распознавания»). Они селективно связывают неполярные супертоксиканты, в частности 2,3,7,8-тетрахлордифенилдиоксин, и хорошо подходят для избирательного концентрирования вредных веществ (например, пестицидов), а также для обогащения и разделения лекарственных средств. На специальных СПМР были успешно разделены энантиомеры фенилаланина и триптофана.

Разработана темплатная технология получения макропористых углеродных сорбентов с поверхностью, как у графитизированной термической сажи. В качестве шаблонов были использованы макропористые силикагели со сферическими частицами размером 5 мкм. Поры таких частиц заполняли фенолформальдегидным полимером, после чего осуществляли его карбонизацию нагреванием в инертной среде до 1000°C , при этом поры заполнялись углеродом. Затем силикагель растворяли в 5 М растворе NaOH и получали макропористый углеродный сорбент — зеркальную реплику пористого силикагеля. К сожалению, на этой стадии углеродный сорбент содержал слишком мелкие поры (размером 30 Å), мало подходящие для ВЭЖХ, и характеризовался аморфной поверхностью (удельная поверхность

$\sim 400 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$). Графитизация при температурах выше 2000°C привела к полной перестройке структуры углеродного сорбента, в частности к удалению микропор и образованию однородной кристаллической поверхности. После графитизации остались только те поры, которые были в исходном силикагеле. Последняя технологическая стадия — фракционирование.

Фирма «Шендон» освоила серийное производство таких сорбентов под названием «Нурескарб». Удельная поверхность сорбента Нурескарб составляет $\sim 120 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, средний диаметр пор ~ 250 Å, объем пор — 75%, размер частиц — 5 или 7 мкм. Этот сорбент стабилен во всем диапазоне pH (0–14), он не растворяется и не гидролизует, не набухает в растворителе, выдерживает давление до 400 атм. Колонки, наполненные Нурескарб, характеризуются высокой эффективностью — до 60 000 теоретических тарелок.

В настоящее время Нурескарб широко используется для разделения и анализа разных смесей: ароматических соединений, всевозможных фармацевтических препаратов, катионов и анионов, а также структурных изомеров. Сорбент Нурескарб не имеет недостатков сорбента C_{18} для ОФХ, в частности, полярные соединения хорошо удерживаются на колонках с Нурескарб: например, фактор удерживания для фенола составляет 1.8, для 1,3-дигидроксibenзола — 2.35, для 1,3,5-тригидроксibenзола — 2.7. На колонке C_{18} последние два соединения не разделяются. Кроме того, Нурескарб можно использовать для разделения углеводов и соединений, содержащих карбоксильные и аминные группы.

В последние годы интенсивно развивается эксклюзионная хроматография, чему способствовало внедрение в практику хроматографических анализов сефадексов — сшитых эпихлоргидрином декстрановых гелей. Сефадексы широко используют в медицине.

В настоящее время методы ВЭЖХ активно применяются в протеомике⁴⁴ и при изучении метаболизма,⁴⁵ а также для определения содержимого одной клетки.⁴⁶

3. Ионная хроматография^{47, 48}

К основным достижениям ионной хроматографии следует отнести разработку экспрессных монолитных колонок для сверхбыстрого разделения веществ, в частности, неорганических анионов (H_2PO_4^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , ClO_3^- , I^- , SO_4^{2-}); колонок для одновременного разделения и детектирования анионов и катионов; создание сорбентов для микронасадочных и капиллярных колонок; расширение набора используемых детектирующих систем для ионных хроматографов (до 10 типов), в частности, создание импульсного амперометрического детектора для определения углеводов, аминокислот, биогенных аминов и спиртов; разработку генератора элюента (система «добавь только воду») и 10-портового крана для анализа проб с сильно различающимися концентрациями; использование неметаллических материалов (керамики, пластика РЕЕК, сапфира, тефлона и др.) в насосах и трактах для жидкостей в ионных хроматографах; внедрение системы «heart-cut» для сброса части пробы с целью исключения ее попадания в колонку; повышение чувствительности и стабильности детектирующих систем в определении ионов до уровня ppt (1 ppt = $1 \cdot 10^{-10}\%$).

4. Тонкослойная хроматография

В своем обычном исполнении тонкослойная хроматография (ТСХ) — массовый, простой и дешевый метод хроматографии, использующийся для обнаружения и определения веществ разных классов.^{49–51} В ТСХ разделение обычно проводят на пластинах из стекла, металла или пластмассы размером 100×100 мм, содержащих слой адсорбента толщи-

ной 50–300 мкм с размером зерен от 3 до 15 мкм. В настоящее время чаще всего применяют четыре типа пластин: классические, высокоэффективные, микропластины и препаративные.

Основными адсорбентами, используемыми в ТСХ, являются силикагель, силикагель с привитыми алкильными группами, оксид алюминия, целлюлоза, циклодекстрины, флорисил (силикат магния), неорганические ионообменники и др. К основным преимуществам ТСХ относятся одновременное параллельное разделение нескольких проб (до 10 и более), высокая производительность, возможность двумерного разделения, быстрота и дешевизна определения. Положительным фактором является то, что процесс разделения можно наблюдать; в частности, на старте можно увидеть остатки нерастворимой пробы. К недостаткам ТСХ относятся открытость разделительных пластин, из-за чего соединения, неустойчивые к действию кислорода и влаги, могут разлагаться.

Для детектирования пятен на пластине используются различные методы, включая масс-спектрометрию, рамановскую спектрометрию, спектрофотометрию с диодной матрицей, пламенно-ионизационный детектор, флуоресцентные индикаторы. Применяют также электрохимическое детектирование.

В последние годы методы ТСХ постоянно развивались и совершенствовались. Были предложены новые варианты ТСХ: полиамидная, тонкопленочная, высокоэффективная, ротационная, двухразмерная, мицеллярная, проточная и др.^{52,53} Для количественного определения веществ с помощью ТСХ разработаны денситометры. Для разделения оптических изомеров используют хиральные пластины.

Стандартизация метода ТСХ — подготовка адсорбентов, создание пластинок, обработка результатов разделения — способствовала широкому внедрению ТСХ в аналитическую практику лабораторий многих отраслей промышленности.

IV. Основные преимущества аналитической хроматографии

По классификации Ю.А.Золотова,⁵⁴ хроматография относится к гибридным методам анализа. В хроматографах анализируемая смесь предварительно разделяется на колонке за счет различной сорбируемости разных компонентов смеси, а затем на выходе из колонки чувствительный элемент — детектор — по отдельности регистрирует разделенные компоненты.

Так как разделительная способность современных хроматографических колонок исключительно высока (возможно разделение десятков и даже сотен компонентов в одной смеси), то хроматография в настоящее время не имеет конкурентов при анализе сложных природных и производственных многокомпонентных смесей. В принципе, можно разделить любые смеси молекул, включая все виды изомеров, в том числе и энантиомеры. Однако за это преимущество хроматография должна платить: метод анализа в этом случае не прямой, а косвенный. Дело в том, что начальная концентрация вещества в исходной смеси не сохраняется. При вводе в хроматограф компонент разбавляется элюентом, затем размывается в колонке за счет диффузионных и кинетических факторов, и на выходе детектор регистрирует концентрацию, отличающуюся от начальной. Это обстоятельство требует градуировки, т.е. установления связи между начальной концентрацией вещества и его концентрацией на выходе из колонки.

Другой особенностью хроматографических методов анализа является их периодичность.

Рассмотрим преимущества хроматографии перед другими методами анализа.

1. Универсальность и высокая разделительная способность

С помощью хроматографических методов можно разделять и анализировать практически все виды смесей.[§] Современные хроматографические методы обладают высокой разделительной способностью. Они позволяют разделять многокомпонентные смеси, включая сложные смеси изомеров всех типов, а также некоторые изотопы и изотопно-замещенные соединения.

Методом газовой хроматографии за один ввод можно разделить более тысячи компонентов в бензиновых фракциях; на эффективных ТСХ-пластинах при двумерном элюировании — сотни и даже тысячи компонентов; методом капиллярной электрохроматографии — более тысячи белков (большинство ученых, работающих в области протеомики, уверены, что методы, комбинирующие ВЭЖХ и тандемную масс-спектрометрию, могут обеспечить быстрый прорыв в протеомике).

2. Низкие пределы обнаружения (высокая чувствительность)

Одно из преимуществ хроматографии — совместимость едва ли не со всеми известными методами определения. На этом основании сопоставлять хроматографию с другими современными аналитическими методами некорректно, так как в ней используются все их достижения. Однако нужно отметить, что в этих методах специально для хроматографического применения были разработаны проточные чувствительные ячейки, а сами методики модернизированы под хроматографические режимы.

Для хроматографических методов разработаны разнообразные детектирующие системы, как универсальные, так и селективные (специфические). В табл. 2 приведены типы детекторов, чаще всего применяемых в газовых хроматографах. Кроме указанных в таблице, в настоящее время выпускаются электролитические детекторы Холла, хемилуминесцентные, инфракрасные, флуоресцентные, гелиевые ионизационные, радиоактивные и ультразвуковые детекторы, а также денситометры. Всего же описано более 50 типов детекторов. На самых чувствительных детекторах можно определять примеси без концентрирования на уровне 10^{-5} – $10^{-7}\%$.

Селективные детекторы имеют большое преимущество при определении примесей в составе сложных смесей. Можно создать условия, когда примеси определяются, а основные вещества в смеси не регистрируются, как, например, хлорорганические пестициды в окружающей среде при определении с помощью электрозахватного детектора.

Для целей ВЭЖХ применяют детектирующие системы на основе почти всех известных методов определения. В табл. 3 приведены типы детекторов, используемых в высокоэффективных жидкостных хроматографах. В благоприятных случаях электрохимические и флуоресцентные детекторы позволяют определять примеси на уровне пико- или фемтограммов (10^{-12} – 10^{-15} г) без концентрирования.

К сожалению, пределы обнаружения даже самых чувствительных детектирующих систем не позволяют определять микропримеси некоторых загрязнений окружающей среды, например супертоксикантов. В этих случаях применяют методы предварительного концентрирования пробы, которые позволяют снижать пределы обнаружения на два–

[§] Понятно, что в данном случае проанализировать можно только те смеси, которые можно разделить.

Таблица 2. Технические характеристики детекторов, наиболее часто применяемых в ГХ.

Детектор	Предел детектирования, $\text{г} \cdot \text{с}^{-1}$	ЛДД ^a	Тип детектора	Определяемые соединения
Пламенно-ионизационный (ПИД)	$2 \cdot 10^{-12}$	10^7	Селективный	Органические соединения, ионизируемые в пламени водорода
По теплопроводности (ДТП, катарометр)	$4 \cdot 10^{-10}$ (см. ^b)	10^6	Универсальный	Все соединения, отличающиеся по теплопроводности от газа-носителя
Электронозахватный (ЭЗД)	$1 \cdot 10^{-14}$	$10^3 - 10^4$	Селективный	В основном галогенорганические соединения
Фотоионизационный (ФИД) ^c	$2 \cdot 10^{-12}$	10^7	«	Все соединения с потенциалом ионизации менее 10.7 эВ
Термоионный (ТИД)	$4 \cdot 10^{-13}$ (для N), $2 \cdot 10^{-13}$ (для P)	10^4	«	Гетероциклические соединения, содержащие в составе молекулы атомы N и P
Пламенно-фотометрический (ПФД)	$2 \cdot 10^{-11}$ (для S), $9 \cdot 10^{-13}$ (для P)	10^3 10^4	Специфический	S- и P-Содержащие соединения
Атомно-эмиссионный (АЭД)	$2 \cdot 10^{-11} - 1 \cdot 10^{-13}$	10^4	Универсальный	Все соединения, имеющие в своем составе 12 основных элементов (H, C, O, S, N, P и др.)
Масс-спектрометрический (МСД) ^d	$1 \cdot 10^{-9} - 1 \cdot 10^{-11}$	10^5	«	Все соединения

^a ЛДД — линейный динамический диапазон; ^b в $\text{г} \cdot \text{мл}^{-1}$; ^c за счет УФ-излучений; ^d идентифицирует соединение по масс-спектрам.

Таблица 3. Технические характеристики детекторов, применяемых в ВЭЖХ.

Детектор	Предел детектирования, $\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$	Селективность	Преимущества и недостатки
Кулонометрический	$10^{-11} - 10^{-12}$	Высокая	Возможно трехмерное измерение сигнала. Полное окисление или восстановление определяемого вещества
Амперометрический	$10^{-10} - 10^{-11}$	«	Низкая стоимость. Селективность для электроактивных соединений
Масс-спектрометрический	10^{-10}	Очень высокая	Позволяет идентифицировать неизвестные вещества. Высокая стоимость
Флуоресцентный	$10^{-7} - 10^{-10}$	Высокая	Необходимость дериватизации проб для многих примесей. Высокая стоимость
Хемилюминесцентный	$10^{-7} - 10^{-10}$	Очень высокая	Высокая стоимость. Ограниченность применений (только для N- и S-содержащих соединений)
Спектрофотометрический на диодной матрице	$10^{-6} - 10^{-7}$	Высокая	Возможность трехмерной регистрации сигналов. Высокая стоимость
Спектрофотометрический на основе светорассеяния	$10^{-5} - 10^{-7}$	Низкая	Низкая стоимость, универсальность
Рефрактометрический	10^{-5}	«	Универсальность
		«	Универсальный детектор, весьма чувствительный к изменению температуры и скорости элюента

четыре порядка и определять некоторые загрязнители, например диоксины, на уровне ppt.

В последнее десятилетие интерес к методам концентрирования сильно возрос (им посвящены монография⁵⁵ и несколько обзоров (см., например,^{56–59})). Усовершенствуются старые методы концентрирования и предлагаются новые, разрабатывается новая аппаратура.

Раньше для концентрирования применяли жидкостно-жидкостную экстракцию, однако из-за того что в этом

методе используются особо чистые растворители, которые дороги, а полнота жидкостной экстракции иногда недостаточна, из-за чего требуется регенерация или утилизация больших количеств загрязненных растворителей, в настоящее время в своем классическом варианте жидкостно-жидкостная экстракция применяется все реже и реже. Сейчас используют новые методы жидкостной экстракции: экстракцию небольшим количеством растворителя (всего несколько миллилитров) в специальной колбе; экстракцию небольшим

количеством растворителя при повышенных давлениях и температурах в динамических условиях (аппаратура близка жидкостному хроматографу), экстракцию одной каплей органического растворителя в воде, экстракцию сверхгорячей водой[†] под давлением (возможно в динамических условиях). В последнем случае нет проблемы с утилизацией, так как вода «дружественна» окружающей среде.

В настоящее время на первое место по частоте применения вышла твердофазная экстракция, благодаря большей полноте (близкой к 100%) извлечения микрокомпонентов, а также благодаря возможности автоматизации концентрирования и непосредственного соединения с хроматографами в режиме on-line. Для твердофазной экстракции разработаны разнообразные полимерные, углеродные и неорганические адсорбенты (полярные, неполярные и ионообменные).⁶⁰ Многие фирмы выпускают картриджи с широким ассортиментом адсорбентов. Для концентрирования из больших объемов жидкостей применяют фильтры широкого диаметра и платформы с 96 картриджами.

Для определения примесей в водных средах весьма эффективно использование микротвердофазной экстракции — концентрирование на выдвигаемом из иглы специального шприца стержне с сорбционным слоем. В тех случаях, когда требуется селективная твердофазная экстракция только определенных классов соединений или даже одного вещества, применяют методы ион-парной⁶¹ и иммуноаффинной⁶² твердофазной экстракции. В последние годы интенсивно разрабатываются технологии получения пористых полимеров с заданной величиной пор молекулярных размеров, которые используются для экстракции молекул с размерами, отвечающими размеру пор.

Перспективно применение сверхкритической флюидной экстракции,⁶³ однако аппаратура для нее слишком дорога. В процессах сверхкритической экстракции используют вещества, находящиеся при температуре и давлении выше критических значений. Наиболее часто для сверхкритической экстракции используют диоксид углерода. Показана принципиальная возможность применения экстракции сверхкритическим CO₂ для переработки отработанного ядерного топлива.

Для концентрирования легких примесей из растворов чаще всего применяют газовую экстракцию (head space). Этот метод хорошо автоматизирован. Сам метод и аппаратура для него постоянно совершенствуются. В частности, разработаны метод газовой экстракции при повышенных температурах, комбинированный метод газовой экстракции с микротвердофазной экстракцией и др.⁶⁴ Среди динамических вариантов экстракции следует отметить метод выдувания и улавливания⁶⁵ и мембранную экстракцию,⁶⁶ которая позволяет непрерывно выделять микрокомпоненты из потоков.

3. Воспроизводимость определений и экспрессность разделения

На современных хроматографах можно достичь хорошей воспроизводимости измеряемых величин. На лучших образцах приборов среднеквадратичное отклонение (СКО) параметров удерживания на капиллярных колонках достигает рекордных значений — 0.1 и даже 0.01%.

На рядовых хроматографах среднеквадратичное отклонение параметров удерживания, высот и площадей пиков обычно нормируется в пределах 1–3%. При определении микропримесей эти величины, естественно, возрастают.

[†] При высоких температурах увеличивается растворимость неполярных соединений в воде.

Хроматографические методы чаще всего применяют для определения микрокомпонентов (10^{-1} – $10^{-10}\%$). При определении примесей в пределах 10^{-1} – $10^{-5}\%$ среднеквадратичные отклонения на серийных хроматографах вполне сопоставимы с таковыми для других методов.

Время разделения и определения чаще всего составляет 5–30 мин. В течение этого времени разделяют и определяют десятки и даже сотни веществ. В пересчете на одно вещество анализ проводится за нескольких минут. В настоящее время разработаны экспрессные методы разделения в ГХ, ВЭЖХ, ТСХ и КЭХ, в которых за две минуты разделяются десятки компонентов.^{67–70}

V. Хроматографическое приборостроение

Успехи аналитической хроматографии в значительной степени связаны с совершенствованием хроматографической аппаратуры. Массовое внедрение в аналитическую практику того или иного метода хроматографии связано с серийным выпуском соответствующих хроматографов. Так, с разработки Муром и Штейном в 1956 г. аминокислотного анализатора, основанного на ионообменной хроматографии, постколоночной дериватизации и фотометрическом детектировании, началось его массовое применение для анализа смесей аминокислот. Освоение во многих странах серийного производства газовых хроматографов в 1955–1960 гг. привело к взрывному интересу к применению газовой хроматографии во многих отраслях промышленности, в науке и технике. Создание в 1965–1970 гг. насосов высокого давления, проточных жидкостных детекторов, колонок с прочными тонкодисперсными сорбентами и других узлов современных жидкостных хроматографов позволило превратить классическую жидкостную хроматографию в экспрессный высокоэффективный метод, пригодный для аналитических целей.

В конце XX века хроматографическое приборостроение представляло собой отдельную, достаточно большую отрасль промышленного производства. Сотни фирм во всем мире выпускали хроматографы разного типа и вспомогательное оборудование для них на общую сумму более 10 млрд. долл.

Аппаратурное оформление хроматографических методов достигло очень высокого уровня, управление и обработка результатов анализа на них осуществляется с помощью микропроцессоров, большинство процедур в хроматографах автоматизировано. В этих приборах используются последние достижения электроники, точной механики, пневматики, планарной технологии, оптики.

Основное достижение в газохроматографическом приборостроении — это доведение до серийного выпуска газовых хромато-масс-спектрометров (ГХ-МС). Масс-спектрометр (МС) в последние годы стал одним из основных детекторов в газовых хроматографах, он постоянно совершенствуется, а его стоимость снижается. Ежегодно продается 3000–3500 таких детекторов, 80% из них квадрупольные, остальные с ионной ловушкой. Значительная их часть (более 25%) применяется при контроле загрязнений окружающей среды.⁷¹ В табл. 4 приведены основные типы газовых хроматографов, среди которых аналитические лабораторные приборы, промышленные, портативные, препаративные и многомерные хроматографы, хроматографы как газовые анализаторы, ГХ-МС, ГХ-ИКС, радиохроматографы.^{71,72}

Для расширения аналитических возможностей газовые хроматографы помимо детекторов комплектуют также набором дополнительных устройств: устройствами для концентрирования проб (устройствами твердофазной, микротвердофазной, сверхкритической или газовой экстракции, системами выдувания и улавливания и др.), дополнитель-

Таблица 4. Основные типы газовых хроматографов.

Основные типы хроматографов	Назначение	Преимущества, особенности
Лабораторные	Для стационарных лабораторий	Широкий набор комплектующих и дополнительных устройств
Промышленные автоматические	Для контроля производственных процессов	В большинстве случаев взрывозащищенное исполнение
Двумерные, многомерные	Для полного разделения сложных многокомпонентных смесей	Разделение на двух колонках с разной селективностью
Хромато-масс-спектрометры	Для идентификации разделенных соединений	Количественный и качественный анализ смесей неизвестного состава
Малогабаритные	Для передвижных и стационарных лабораторий	Экономичность при сохранении аналитических характеристик, небольшой вес (10 – 25 кг)
Портативные, транспортируемые, полевые	Для анализа на месте	Экспрессность анализа, автономность по электрическому и газовому питанию, небольшой вес (5 – 15 кг)
Микрохроматографы на чипах (кремниевая технология), персональные, карманные	Для анализа на месте	Экспрессность анализа, полная автономность, небольшой вес (0.2 – 3 кг). Применяются для решения только простых задач
Специальные микрохроматографы	Для космических исследований	Автоматизация анализа, устойчивость к ударам и тряске

ными системами ввода проб (автосамплерами, системами с криофокусировкой, газовыми кранами), пиролизными устройствами, устройствами для пред- и постколоночной дериватизации (в частности, метанаторами и др.).

К основным достижениям последних лет относятся создание портативных полевых хроматографов,⁷³ портативных промышленных хроматографов во взрывозащищенном исполнении, термостатов с нагревом нового типа (микро-волновым, за счет ИК-излучения), устройств с программированием температуры для непосредственного нагрева колонки; разработка методов и устройств дозирования больших проб в капиллярные колонки (криофокусировка, выдувание растворителя, программируемый нагрев, наколочный ввод), создание и широкое внедрение в аналитическую практику капиллярных колонок большого диаметра (0.53 мм) с толстыми привитыми слоями неподвижных фаз (до 5 мкм) и капиллярных адсорбционных колонок со слоями до 10–20 мкм типа PoraPlot,^{74,75} введение электронного контроля за расходом и давлением газовых потоков и др.

Аппаратуру для аналитической жидкостной хроматографии начали разрабатывать на 15 лет позже, чем для газовой, тем не менее в настоящее время жидкостных хроматографов выпускается и продается значительно больше, чем газовых. Среди них следует выделить жидкостные хроматографы высокого давления (закрытые системы), градиентные, изократические, ионные, эксклюзионные, микроколоночные, противоточные, многомерные и высокотемпературные хроматографы, приборы для ВЭЖХ-МС и др. (около 20 типов приборов). Коммерческие жидкостные хроматографы могут комплектоваться сразу несколькими детектирующими системами: оптическими, электрохимическими, люминесцентными, масс-спектрометрическими, элементными, газохроматографическими, иммунными и др. Самые низкие пределы детектирования (менее фемтомолей и аттомолей) имеют электрохимические (кулонометрические и амперометрические) жидкостные хроматографы.

Отдельно следует сказать о разработке хроматографов для ВЭЖХ-МС. Этот метод интенсивно развивается с 1990 г. В настоящее время созданы достаточно надежные и чувствительные системы на основе электрораспыления и ионизации при атмосферном давлении, пригодные для массовых аналитических применений. За разработку этих систем и использо-

вание их в биохимических исследованиях в 2002 г. была присуждена Нобелевская премия. Метод ВЭЖХ-МС нашел широкое применение в фармацевтике, медицине, для анализа экстрактов лекарственных трав, в биологии и биотехнологии (в частности, в протеомике). В качестве анализаторов масс в ВЭЖХ-МС используются квадрупольные, ионные, время-пролетные, магнитные (секторные) и другие ловушки.^{71,72}

VI. Основные области аналитического применения хроматографических методов

Хроматографические методы последние 10 лет бесспорно занимают лидирующие позиции среди других аналитических методов.⁷⁶

Согласно публикациям последних 20 лет газовая хроматография применяется главным образом для анализа объектов окружающей среды (12.5%), пищевых продуктов и напитков (10%), лекарств (10%), для клинических исследований (4%), в судебной медицине (3.5%), для определения энантиомеров (2.5%). Она широко используется также в газовой, химической и нефтехимической промышленности, хотя публикаций по этим вопросам мало.

Основной областью применения ВЭЖХ (> 50% публикаций) является обнаружение и идентификация биологических соединений (в частности, аминокислот, белков, липидов, углеводов, витаминов, стероидов и др.). Среди других областей применения ВЭЖХ следует отметить анализ лекарств (16%), продуктов химической и нефтехимической промышленности (более 10%), разделение и определение энантиомеров (5.5%), анализ неорганических соединений (в основном определение анионов и катионов методом ИХ), анализ пищевых продуктов и напитков (4.5%), контроль объектов окружающей среды (3%), клинические анализы (2.8%), токсикология (1.3%).

В настоящее время практически нет отрасли промышленности, науки и техники, где хроматографические методы не нашли бы применения. Перечислим наиболее важные аналитические достижения, полученные с использованием хроматографических методов:

- расшифровка генома человека;
- разделение многокомпонентных смесей белков для задач протеомики;

- анализ содержимого одной клетки;
- исследования в области фармакокинетики (изучение действия лекарств в организме человека);
- ранняя диагностика заболеваний (по нахождению и определению биохимических маркеров);
- разделение оптических изомеров, анализ энантиомерной чистоты лекарств;
- допинговый контроль спортсменов;
- судебные и судебно-медицинские экспертизы, обнаружение наркотиков и наркотических средств;
- контроль загрязнений окружающей среды, включая определение супертоксикантов (диоксинов, полихлорированных бифенилов, полиядерных ароматических соединений на уровне ppt);
- контроль загрязнителей пищевых продуктов и напитков, в том числе самых опасных микотоксинов, нитрозаминов, пестицидов и др.;
- изучение компонентов запахов и ароматов пищевых продуктов и напитков;
- анализ природного газа, газового конденсата, бензинов, керосинов, нефтепродуктов и сырой нефти, проведение имитированной разгонки нефти;
- разделение и определение ионов металлов, в том числе трансурановых;
- полный анализ атмосферы загрязненных городов;
- определение фреонов в стратосфере;
- обнаружение и определение феромонов насекомых;
- анализ атмосферы и грунта планет (Венеры, Марса, лунного грунта);
- изучение изотопно-замещенных соединений.

Рассмотрим более подробно некоторые из этих достижений.

1. Анализ объектов окружающей среды^{77–81}

Метод газовой хроматографии совместно с масс-спектрометрией используется для обнаружения и количественного определения органических примесей в атмосфере крупных промышленных городов. Вначале примеси концентрируют на неполярном сорбенте, на котором не удерживается влага, затем десорбируют и собирают в верхней части капиллярной колонки (криофокусировка); разделяют в режиме программирования температуры; регистрируют и идентифицируют с помощью масс-спектрометрического детектора.

Вредные газы в атмосфере (NO_2 , SO_2 , SO_3 , HCl , HF , Cl_2 , NH_3 и др.) определяют с использованием газовой и ионной хроматографий. Нефтепродукты — распространенные загрязнители воды и почвы — чаще всего определяют с помощью аттестованных ВЭЖХ-методик. Остатки пестицидов в окружающей среде в большинстве случаев определяют методами ГХ, ВЭЖХ и ТСХ. Тысячи анализов проводятся на станциях защиты растений, в ветеринарных лабораториях и в разных экологических центрах.

Канцерогенные соединения — некоторые хлорорганические[†] и ароматические соединения, фталаты, полиамины и др. — самые опасные загрязнители окружающей среды. Для их обнаружения и определения в воде, воздухе и почве используют главным образом методы ГХ и ВЭЖХ. Так, полиядерные органические соединения (например, 3,4-бензопирен) в воде и почве определяют методом ВЭЖХ, а бензол, толуол, этилбензол и ксилолы в атмосфере городов — с помощью ГХ с фотоионизационным детектором. Фенол и

его производные на уровне ПДК без концентрирования можно определять на жидкостном хроматографе «ЦветЯуза» с амперометрическим детектором. На этом же приборе определяют цианид-ион в питьевой воде.⁸¹

Все основные анионы в питьевой воде определяются методом ионной хроматографии (за 10–15 мин на уровне $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-5}\%$), а летучие хлорорганические соединения — методом ГХ в сочетании с АРП (анализ равновесного пара). Ионная хроматография используется также для определения нитратов и тяжелых металлов в воде и почве.

2. Контроль качества пищевых продуктов и напитков

Контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов в настоящее время является одной из наиболее актуальных аналитических задач. В определенном смысле она даже важнее задачи определения загрязнений окружающей среды, так как, по мнению специалистов, более 70% вредных загрязнителей попадает в организм человека через пищу, 20% — с водой и 10% — с вдыхаемым воздухом.⁸² Пищевые продукты помимо техногенных загрязнений, которые попадают в них через почву, воду и воздух, могут содержать также природные загрязнители, образующиеся при неправильном хранении, при нарушении технологий пищевых обработок или попадающие в них через упаковку и т.д.^{83, 84}

В последние годы безопасность человека (особенно в нашей стране[‡]) в большой степени определяется чистотой и доброкачественностью пищевых продуктов, алкогольных и безалкогольных напитков, так как многие вредные загрязнители обладают канцерогенным, мутагенным, тератогенным и иммуноугнетающим действием. Загрязненные пищевые продукты помимо прямых отравлений могут привести к ухудшению иммунитета и изменениям наследственности. В ряде случаев они могут стать непосредственной причиной болезней (аллергических, онкологических, сердечно-сосудистых и др.), которые возникают в результате нарушения биохимических реакций в организме.

Для контроля качества пищевых продуктов очень часто применяют хроматографические методы.^{85, 86} Их используют для определения доброкачественности и свежести пищевых продуктов; для обнаружения фальсифицированных пищевых продуктов, для контроля техногенных и природных загрязнителей, для определения пищевых искусственных добавок и остатков ветеринарных препаратов в мясных продуктах (табл. 5).

В последние годы возникло новое направление — энантиоселективный анализ компонентов пищи, позволяющий по соотношению оптических изомеров аминокислот, оксикислот и др. соединений судить, является ли данный продукт натуральным или содержит синтетические имитаторы и добавки. Например, разработка методики газохроматографического разделения и анализа всех изомеров жирных кислот заставила производителей в несколько раз снизить содержание *транс*-изомеров ненасыщенных кислот в маргарине.

[‡] В последнее время большое распространение получила фальсификация пищевых продуктов и напитков (сливочного и растительного масла, минеральной воды, соков, вин, коньяков, водки и многих др.). Распространение мелкорозничной торговли привело к тому, что продукты зачастую долго хранятся в неприемлемых условиях (без холодильного оборудования) и транспортируются на большие расстояния в необорудованных автомобилях.

[†] Хлорорганические соединения (полихлорбифенилы, диоксины и др.) входят в число 12 самых опасных загрязнителей.

Таблица 5. Основные применения хроматографических методов в контроле пищевых продуктов.

Цель анализа	Определяемые соединения	Ссылки
Определение пищевой ценности продуктов	Пищевые белки	87
	Аминокислоты	88
	Липиды	89
	Органические кислоты	90
	Углеводы	91
	Витамины	92
Определение загрязнителей в пищевых продуктах	Каротиноиды	93
	Пестициды	94
	Микотоксины, в том числе:	95
	афлатоксины	96
	патулин	97
	ократоксины	98
	фумонизины	99
	зеараленон	100
	Нитрозоамины	101
	Полиароматические углеводороды	102
Определение пищевых добавок	Диоксины	103
	Биогенные амины	104
	Антиоксиданты	105
	Синтетические красители	106
	Подслащивающие соединения	107
Определение остатков ветеринарных лекарств в продуктах	Ароматизаторы	108
	Горчащие вещества	109
	Антибиотики (тетрациклин и др.)	110
Определение остатков ветеринарных лекарств в продуктах	Сульфамидные препараты	111
	Гормоны	112
	Анаболические стероиды	113
	Цитостатин	82

3. Ранняя диагностика заболеваний по определению биохимических маркеров

Успех лечения многих опасных заболеваний в значительной степени зависит от их ранней диагностики. О многих заболеваниях можно судить по маркерам — веществам, содержащимся в биологических жидкостях и выдыхаемом воздухе.

Маркерами чаще всего являются низкомолекулярные биологически активные соединения: нуклеозиды, нуклеотиды, катехоламины, углеводороды, производные аминокислот (в частности, гомоцистеин и др.), стероиды, углеводы, индолы, порфирины, органические кислоты, витамины и др.¹¹⁴ Маркерами могут быть и большие молекулы: белки, липиды.

Хроматографические методы позволяют определять многие биохимические маркеры на уровне 10^{-9} – 10^{-15} г (в зависимости от методов концентрирования и применяемых детекторов).^{115, 116} Высокая информативность (за счет разделения и определения десятков–сотен соединений за один цикл), низкие пределы обнаружения,[§] надежное аппаратное оформление, автоматизация анализа с выдачей полного протокола, сохранение данных анализа в архиве ПЭВМ, универсальность (один и тот же хроматограф можно использовать для решения многих задач), использование в основном неинвазивных проб (моча, слюна, слезы, пот, волосы, выдыхаемый воздух и др.) делают хроматографические методы незаменимыми в анализе маркеров.

§ Благодаря низкому пределу обнаружения необходимы лишь небольшие количества биологических проб для анализа (часто несколько микролитров).

Таблица 6. Биохимические маркеры онкологических заболеваний.

Диагностируемая болезнь	Соединения — маркеры заболеваний	Ссылки
Рак молочной железы	1) Измененные нуклеозиды (1-метилгуанозин, 2-метилгуанозин, псевдоуридин, 5,6-дигидроуридин) в моче 2) Полиамины (спермин, спермидин, путресцин, кадаверин) в моче	117 – 119
Рак легких	Углеводороды (<i>n</i> -бутан, <i>n</i> -пентан, <i>n</i> -гептан, 2-метилгексан, 3-метилгексан, 4-метилоктан, 5-метилдекан, 3-метилтридекан, 7-метилтридекан) в выдыхаемом воздухе.	120
Злокачественная меланома	Цистеин и индолы производные в моче	121
Рак яичников	Полиамины в моче	119, 122
Эстроген-инициированные опухоли	4-Гидроксистероиды в моче	123
Карциноидные заболевания	5-Гидроксииндолы в моче	124
Злокачественные опухоли у детей	Фукоза в моче	125
Нейробластома у детей	Гомованилиновая и ванилилминдальная кислоты в моче	126
Феохромоцитома	Катехоламины (адреналин, норадреналин и дофамин) в плазме крови или моче	127

Для определения маркеров чаще всего применяют методы ГХ и ВЭЖХ.

Естественно, наибольший интерес представляют маркеры опасных заболеваний, в частности онкологических (табл. 6).

Остановимся на диагностике наиболее распространенных онкологических заболеваний: рака молочной железы и рака легких.

Специалисты американского онкологического центра, изучающие возможности ранней диагностики онкологических заболеваний по биологическим маркерам, установили, что наличие у онкологических больных повышенного содержания измененных нуклеозидов в крови свидетельствует о присутствии опухоли. Такой анализ позволяет установить наличие заболевания на самой ранней стадии. Для определения нуклеозидов в моче используют ВЭЖХ. В работе¹¹⁹ были проанализированы пробы мочи у 62 женщин, больных раком молочной железы (достоверно подтвержденным), и 100 здоровых женщин. Статистическая обработка результатов показала, что диагностическая ценность этих анализов выше, чем при использовании обычных онкомаркеров рака груди — СЕА и СА 15-3. Чувствительность и специфичность диагноза по измененным нуклеозидам превышает 80%. По изучению измененных нуклеозидов можно диагностировать также некоторые виды лейкемии, рака легких, мозга.^{117–119}

Большие перспективы ранней диагностики рака легких связывают с анализом выдыхаемого воздуха.¹²⁰ Найдено, что у больных раком легких в выдыхаемом воздухе возрастает концентрация алканов и метилалканов, таких как *n*-бутан, *n*-пентан, 3-метилтридекан, 7-метилтридекан, 4-ме-

тилоктан, 3-метилгексан, гептан, 2-метилгексан, 5-метилдекан. Эти углеводороды присутствуют на уровне нано-(пико)молей, поэтому для их определения требуется предварительное концентрирование на специальных адсорбентах, не поглощающих влагу. Хроматографический метод диагностики по выдыхаемому воздуху имеет преимущества перед другими методами, так как он безопасный, неинвазивный, недорогой, чувствительный и специфичный, поэтому он предлагается для раннего первичного скрининга онкологических больных.

4. Применение в фармацевтике и фармакологии

Перечислим основные области применения хроматографии в анализах и исследованиях лекарственных препаратов (фармацевтике), а также при определении лекарственных препаратов в биологических жидкостях (фармакологии):

- фармакопейный контроль качества лекарственных препаратов;¹²⁸
- мониторинг примесей в лекарственных препаратах;¹²⁹
- исследование стабильности лекарственных препаратов;¹³⁰
- анализ экстрактов лекарственных трав;¹³¹
- анализ лекарственных препаратов из растений традиционной китайской медицины;¹³²
- использование метода ЖХ-МС в разработке новых лекарственных препаратов;¹³³
- применение сверхкритической флюидной хроматографии для разделения энантиомеров лекарственных препаратов;¹³⁴
- использование ВЭЖХ для разделения энантиомеров лекарств;¹³⁵
- применение ВЭЖХ в фармацевтической промышленности;¹³⁶
- определение природных фенольных соединений в растениях (флавоноидов, гидроксикислот, природных красителей и др.);^{137–140}
- анализ лекарственных препаратов при допинг-контроле;¹⁴¹
- клиническая фармация;¹⁴²
- хроматография в фармакокинетике;¹⁴³
- токсикологический анализ;¹⁴⁴
- связывание лекарственных препаратов в организме.¹⁴⁵

Применению хроматографии в фармацевтике посвящены также монографии^{146, 147}.

Основной метод анализа лекарственных препаратов на фармацевтических фабриках — ВЭЖХ. Ионная хроматография широко применяется для определения ионов в лекарственных препаратах, анионов и катионов в особо чистой воде и воде для инъекций. Методом ионной хроматографии с импульсным амперометрическим детектором можно определять моно-, ди-, три- и полисахариды, спирты и свободные аминокислоты (без предварительной дериватизации). Газовая хроматография применяется для анализа остаточных растворителей, которые могут присутствовать в фармацевтических продуктах.

5. Хроматографические методы анализа природных газов, газовых конденсатов, нефтепродуктов и сырых нефтей

Хроматография широко применяется в газовой, нефтяной и нефтеперерабатывающей промышленности.^{148–151} Анализы проводятся на всех этапах: в процессах геологоразведки газоносных и нефтеносных районов, добычи газа и нефти, транспортировки; на разных стадиях технологической переработки и, наконец, при контроле готовой продукции. Кроме того, хроматографические методы используются для кон-

троля загрязнений окружающей среды (почвы, воды, воздуха, донных отложений и др.) нефтепродуктами.

В настоящее время на современных высокоэффективных капиллярных колонках можно полностью покомпонентно разделять бензиновые фракции (200–1000 компонентов из одной пробы). Подобные анализы невозможно выполнить никаким другим методом.

Хроматографические методы (ГХ, ВЭЖХ, ИХ, гель-фильтрационная хроматография) применяют для контроля природных и попутных нефтяных газов, газовых конденсатов, бензиновых и керосиновых фракций, дизельного топлива, смазочных масел, тяжелых фракций нефтей, асфальтенов и даже сырых нефтей. Методы анализа природных газов и разных фракций нефтепродуктов регламентируются отечественными ГОСТами.

С помощью хроматографии определяют как индивидуальный (покомпонентный), так и групповой состав; проводят имитированную разгонку нефти и нефтепродуктов по температурам кипения; оценивают экологические характеристики нефтепродуктов, в частности, определяют содержание в них бензола, общей серы и общего азота, тяжелых металлов и полиароматических соединений.

Высокоэффективная жидкостная хроматография позволяет легко разделять за 30 мин сырую нефть на четыре основные группы — асфальтены, насыщенные углеводороды, ароматические углеводороды и полярные соединения. После группового разделения возможно последовательное разделение насыщенных, ароматических и полярных соединений на индивидуальные компоненты. Групповое разделение (на парафины, нафтены и ароматические соединения) бензинов проводят на колонках с цеолитами 13X, а последовательное разделение — на капиллярных колонках. Хроматографическое определение оксигенатов в бензине осуществляют с помощью пламенно-ионизационного детектора, селективного к кислородсодержащим соединениям. Принцип действия детектора основан на переводе кислородсодержащих соединений в метан, что позволяет избежать влияния углеводородного фона и определять оксигенаты на следовом уровне.

Многомерная газовая хроматография[¶] применяется для разделения сложных многокомпонентных смесей в нефтехимии, а также для определения углеводородного состава природного и попутного газов, газовых конденсатов и сжиженного газа. С ростом цены на газ возросли требования, предъявляемые к надежности анализа природного газа, что необходимо для осуществления взаиморасчетов между добывающими, транспортирующими и потребляющими предприятиями.

Хроматография играет исключительно важную роль в химической, целлюлозно-бумажной и многих других отраслях промышленности. Ее применяют, во-первых, для технологического контроля (анализ на всех стадиях технологии) и поддержания оптимального режима производства, во-вторых, для анализа исходного сырья, готовой продукции и выбросов. На сотнях российских заводов в технологическом контроле занято более 50 тысяч газовых хроматографов. Тысячи газовых, жидкостных и ионных хроматографов постоянно эксплуатируются в лабораториях и центрах Госсанэпиднадзора, комитетах по охране природы, экологических центрах, токсикологических лабораториях, в организациях типа «Водоканал», в лабораториях Госкомгидрометецентра, в ветеринарных лабораториях, в лабораториях станций защиты растений, судебной и судебно-медицинской экспертизы и др.

[¶] Вопросам применения двумерной газовой хроматографии (ГХ × ГХ) посвящены обзоры^{152, 153}.

В последние годы возросло значение хроматографии для энергетики: с ее помощью определяют теплотворную способность газов и анализируют выбросы. Наконец, хроматография находит применение в археологии и искусстве (для изучения старых красок, лаков, покрытий и др).

По числу публикаций хроматография опережает другие методы анализа. Опубликовано более 300 тыс. книг, обзоров и статей (в том числе по жидкостной колоночной хроматографии — 110 тыс., по газовой хроматографии — 65 тыс., по плоскостным методам хроматографии — 65 тыс., по капиллярному и плоскостному электрофорезу — около 50 тыс.).

VII. Заключение

В заключение рассмотрим основные направления развития хроматографии.

Повышение селективности разделения за счет создания новых сорбентов. В ГХ — это синтез новых жидких фаз с двумя или тремя функциональными группами, разработка адсорбционных капиллярных колонок типа PoraPlot разной химической природы, применение геометрического фактора для повышения селективности. В ВЭЖХ — синтез сорбентов с обращенными фазами, содержащих в алкильной цепи полярные группы, а также сорбентов с порами молекулярных размеров для удерживания одного типа молекул или близких групп молекул; применение углеродных адсорбентов Нурегсарб на основе пористой графитизированной сажи для повышения селективности разделения изомеров.

Повышение эффективности колонок за счет перехода к капиллярным колонкам. В настоящее время более 60% исследований проводят с использованием капиллярных колонок. Существенно возросла доля микронасадочных, капиллярных и нанокколонок в ВЭЖХ. В КЭХ разделение проводят только на капиллярных колонках. (В ГХ, ВЭЖХ и КЭХ используются колонки с эффективностью более миллиона теоретических тарелок.)

Разработка новых методов для экспрессного разделения. В ГХ экспрессность разделения достигается за счет снижения емкости колонок, а также за счет больших скоростей изменения температур (до 1800 град·мин⁻¹). В течение одной минуты можно разделить десятки компонентов. В ВЭЖХ экспрессность разделения достигается за счет использования колонок, заполненных тонкодисперсными непористыми частицами (размером 1.0–1.5 мкм), монолитных колонок, колонок с перфузионными сорбентами и турбулентными потоками.

Миниатюризация аппаратуры — общая тенденция всех методов хроматографии, особенно значительные достижения имеются в ГХ, ВЭЖХ и ИХ. Разработаны портативные полевые хроматографы, hand-held (карманные) хроматографы, а также хроматографы на чипах.

Совершенствование микропроцессорных программ обработки результатов анализа и управления параметрами хроматографов. Компьютерной обработке результатов хроматографического анализа уделяется много внимания. Постоянно обновляются и совершенствуются системы регистрации, обработки и хранения хроматографической информации. Растет число работ по моделированию хроматографических процессов, в частности по применению нейронных сетей, линейного и нелинейного регрессионного анализа для их моделирования и оптимизации. Постоянно пополняются хроматографические базы данных.

Литература

1. М.С.Цвет. *Тр. Варшавск. о-ва естествоиспытателей. Отд. биологии*, **14**, 1 (1903)
2. R.Kuhn, A.Winterstein, E.Lederer. *Z. Physiol. Chem.*, **197**, 141 (1931)

3. В.Г.Березкин, И.В.Малюкова. *Журн. аналит. химии*, **52**, 798 (1997)
4. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **54**, 593 (1999)
5. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **56**, 231 (2001)
6. R.E.Kaiser. *Lab. Praxis*, **21**, 8 (1997)
7. P.R.Haddad. *Anal. Chem.*, **73**, 266A (2001)
8. M.Wilchek, T.Miron. *React. Funct. Polym.*, **41**, 263 (1999)
9. Я.И.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **53**, 7 (1998)
10. Я.И.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **49**, 1047 (1994)
11. В.А.Даванков, Я.И.Яшин. *Вестн. РАН*, **73**, 637 (2003)
12. *A Century of Separation Science*. (Ed. H.J.Issa). Marcel Dekker, New York, 2002
13. *Chromatography — A Century of Discovery 1900–2000*. (Eds C.W.Gehrke, R.L.Wixom, E.Bayert). Elsevier, Amsterdam, 2001
14. M.S.Vigdergaus. *Chromatographia*, **25**, 681 (1988)
15. L.S.Ettre. *Milestones in the Evolution of Chromatography*. ChromSource, Portland, OR, 2002
16. P.C.Weston. *Trends Anal. Chem.*, **14**, R8 (1995)
17. N.Dimov, T.Kowalska. *Acta Chromatogr.*, **8**, 190 (1998)
18. В.А.Даванков, Дж.Навратил, Х.Уолтон. *Лигандно-обменная хроматография*. Мир, Москва, 1989
19. E.R.Francotte. *J. Chromatogr.*, **A**, **906**, 379 (2001)
20. S.G.Entelis, V.V.Evreinov, A.V.Gorshkov. *Adv. Polym. Sci.*, **76**, 129 (1986)
21. M.H.Abraham, J.M.R.Gola, R.Kumarsingh, J.E.Cometto-Muniz, W.S.Cain. *J. Chromatogr.*, **B**, **745**, 103 (2000)
22. Ya.I.Yashin. *Chromatographia*, **16**, 368 (1982)
23. А.Н.Агеев, Я.И.Яшин. *Журн. физ. химии*, **68**, 1749, 1873 (1971)
24. N.P.Lebedeva, I.I.Frolov, Ya.I.Yashin. *J. Chromatogr.*, **58**, 11 (1971)
25. D.V.McCalley. *J. Chromatogr.*, **A**, **902**, 311 (2000)
26. R.M.Smith. In *Retention and Selectivity in Liquid Chromatography. Vol. 57. (J. Chromatogr. Library)*. Elsevier, Amsterdam, 1995. P. 93
27. Ph.Lam, P.R.Elliker, G.E.Wnek, T.M.Przybycien. *J. Chromatogr.*, **707**, 29 (1995)
28. S.Wang, M.D.Porter. *J. Chromatogr.*, **A**, **828**, 157 (1998)
29. V.G.Berezkin, A.B.Lapin, J.B.Lipsky. *J. Chromatogr.*, **A**, **1084**, 13 (2005)
30. V.G.Berezkin, J.de Zeeuw. *Capillary Gas Adsorption Chromatography*. Wiley-VCH, New York, 1998
31. Б.В.Столяров, И.М.Савинов, А.Г.Витенберг, А.А.Карцова, И.Г.Зенкевич, В.И.Калмановский, Ю.А.Каламбет. *Практическая газовая и жидкостная хроматография*. Изд-во СПбГУ, С.-Петербург, 2002
32. J.Namiesnik. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **30**, 221 (2000)
33. J.V.Hinshaw. *LC-GC North America*, **20**, 948 (2002)
34. В.М.Грузнов, В.Г.Филоненко, А.Т.Шишмарев. *Журн. аналит. химии*, **54**, 1134 (1999)
35. В.Г.Березкин, В.Н.Сидельников, Ю.В.Патрушев, В.С.Хотимский. *Журн. физ. химии*, **78**, 520 (2004)
36. J.S.Fritz. *J. Chromatogr.*, **A**, **884**, 261 (2000)
37. D.T.Gjerde, C.P.Hanna, D.Hornby. *DNA Chromatography*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002
38. T.J.Ward. *Anal. Chem.*, **72**, 4521 (2000)
39. J.Zhang. *Sepu (Chinese J. Chromatogr.)*, **17**, 253 (1999)
40. R.P.W.Scott. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **23**, 3061 (2000)
41. H.J.Cortes. *J. Chromatogr.*, **A**, **626**, 3 (1992)
42. M.Oh-Ishi, M.Maeda. *J. Chromatogr.*, **B**, **771**, 49 (2002)
43. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Рос. хим. журн.*, **47**, 64 (2003)
44. R.Westermeier, T.Naven. *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002
45. H.Liebich. *Investigation of Metabolic Disorders by Chromatography*. Hüthig, Oxford, 1998
46. E.Gelpi. *J. Chromatogr.*, **A**, **1000**, 567 (2003)
47. J.Weiss, T.Weiss. *Handbook of Ion Chromatography*. (3rd Ed.). Wiley-VCH, New York, 2004
48. Ya.I.Yashin, A.Ya.Yashin, H.F.Walton. In *Encyclopedia of Analytical Science* (2nd Ed.). Elsevier, Amsterdam, 2004
49. В.Д.Красиков. *Основы планарной хроматографии*. Химиздат, С.-Петербург, 2005
50. С.Н.Штыков, Е.Г.Сумина, Н.В.Тюрина. *Рос. хим. журн.*, **47**, 119 (2003)

51. В.Г.Березкин, Е.Ф.Литвин, А.О.Балушкин, Я.К.Рожило, И.Малиновска. *Завод. лаб.*, **70**, 3 (2004)
52. H.Kalasz, M.Bathori. *LC-GC Intern.*, (6), 440 (1997)
53. Ю.Д.Коган. *Журн. аналит. химии*, **54**, 1102 (1999)
54. Ю.А.Золотов. *Очерки аналитической химии*. Химия, Москва, 1977
55. J.Pawliszyn. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-Interscience, New York, 1997
56. C.W.Huck, G.K.Bonn. *J. Chromatogr., A*, **885**, 51 (2000)
57. M.-C.Hennion. *J. Chromatogr., A*, **885**, 73 (2000)
58. V.Pichon. *J. Chromatogr., A*, **885**, 195 (2000)
59. U.J.Nilsson. *J. Chromatogr., A*, **885**, 305 (2000)
60. L.Liska. *J. Chromatogr., A*, **885**, 3 (2000)
61. M.C.Carson. *J. Chromatogr., A*, **885**, 343 (2000)
62. D.Stevenson. *J. Chromatogr., B*, **745**, 39 (2000)
63. M.Szumski, B.Buszewski. *Intern. Lab.*, **11**, 28 (1999)
64. А.Г.Витенберг. *Рос. хим. журн.*, **47**, 7 (2003)
65. J.G.Schnable. *LC-GC Intern.*, (5), 43 (1992)
66. B.M.Cordero, J.L.P.Pavon, C.G.Pinto, E.F.Laespada, R.C.Martinez, E.R.Gonzalo. *J. Chromatogr., A*, **902**, 227 (2000)
67. E.Matisova, M.Domotorova. *J. Chromatogr., A*, **1000**, 199 (2003)
68. F.J.Santos, M.T.Galceran. *J. Chromatogr., A*, **1000**, 125 (2003)
69. C.A.Cramers, P.A.Leclercq. *J. Chromatogr., A*, **842**, 3 (1999)
70. F.David, D.R.Gare, F.Scanlan, P.Sandra. *J. Chromatogr., A*, **842**, 309 (1999)
71. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Завод. лаб.*, **69**, 19 (2003)
72. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Приборы*, **12**, 29 (2002)
73. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **56**, 902 (2001)
74. *Modern Advances in Chromatography. Vol. 76*. (Ed. R.Freitag). Springer, Heidelberg, 2002
75. Z.Ji, R.E.Majors, E.J.Guthrie. *J. Chromatogr., A*, **842**, 115 (1999)
76. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Лаб. журн.*, (1), 58 (2002)
77. L.Matter. *Food and Environmental Analysis by Capillary Gas Chromatography*. Hüthig, Heidelberg, 1997
78. T.Shibamoto. *Chromatographic Analysis of Environmental and Food Toxicants*. Marcel Dekker, New York, 1998
79. Ю.С.Другов, А.А.Родин. *Мониторинг органических загрязнителей природной среды. (Практическое руководство)*. Наука, С-Петербург, 2004
80. Ю.С.Другов, А.А.Родин. *Анализ загрязненной воды. (Практическое руководство)*. Мир, Москва, 2004
81. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **54**, 949 (1999)
82. В.Эйхлер. *Яды в нашей пище*. Мир, Москва, 1993
83. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Партнеры и конкуренты*, (8), 9 (2003)
84. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Журн. аналит. химии*, **59**, 1237 (2004)
85. H.Sorensen, S.Sorensen, C.Bjergegaard. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999
86. R.E.Wrolstad, E.A.Decker, S.J.Schwartz, P.Sporns. *Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*. Wiley-Interscience, New York, 2005
87. S.Dierckx, A.Huyghebaert. In *Food Analysis by HPLC. Vol. 100. (Food Science and Technology Series)*. (Ed. L.M.L.Nollet, 2nd Ed.). Hogeschool Gent, Ghent, 2000. P. 127
88. I.Molnar-Perl. *J. Chromatogr., A*, **891**, 1 (2000)
89. D.Marini. In *Food Analysis by HPLC. Vol. 100. (Food Science and Technology Series)*. (Ed. L.M.L.Nollet, 2nd Ed.). Hogeschool Gent, Ghent, 2000. P. 169
90. D.B.Gonus. In *Food Analysis by HPLC. Vol. 100. (Food Science and Technology Series)*. (Ed. L.M.L.Nollet, 2nd Ed.). Hogeschool Gent, Ghent, 2000. P. 477
91. M.Peris-Tortajade. In *Food Analysis by HPLC. Vol. 100. (Food Science and Technology Series)*. (Ed. L.M.L.Nollet, 2nd Ed.). Hogeschool Gent, Ghent, 2000. P. 287
92. D.Blanco, M.P.Fernandez, M.D.Gutierrez. *Analyst (Cambridge, U.K.)*, **125**, 427 (2000)
93. J.Olivier, A.Palou. *J. Chromatogr., A*, **881**, 543 (2000)
94. M.J.M.Wells, L.Z.Yu. *J. Chromatogr., A*, **885**, 237 (2000)
95. M.W.Traekses. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **83**, 442 (2000)
96. K.H.Otta, E.Papp, B.Bogocsi. *J. Chromatogr., A*, **882**, 11 (2000)
97. G.S.Shephard, N.L.Leggoti. *J. Chromatogr., A*, **882**, 17 (2000)
98. A.Visconti, M.Pascale, G.Centonze. *J. Chromatogr., A*, **888**, 321 (2000)
99. F.I.Meredith. *Methods Enzymol.*, **311**, 361 (2000)
100. A.Visconti, M.Pascale. *J. Chromatogr., A*, **815**, 133 (1998)
101. H.Khalof, J.Steinert. *Nippon Yakagak Kaishi*, **49**, 1377 (2000)
102. K.Hartmann. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **96**, 163 (2000)
103. W.L.Shelver, J.K.Huwe. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **22**, 813 (1999)
104. A.L.Cinquina, A.Cali, F.Longo, L.De Santis, A.Severoni, F.Abballe. *J. Chromatogr., A*, **1032**, 73 (2004)
105. S.L.Abidi. *J. Chromatogr., A*, **881**, 197 (2000)
106. M.B.A.Gloria. In *Food Analysis by HPLC. Vol. 100. (Food Science and Technology Series)*. (Ed. L.M.L.Nollet, 2nd Ed.). Hogeschool Gent, Ghent, 2000. P. 523
107. Z.Qi. *Huanjing Huaxue*, **18**, 380 (1999)
108. E.Jagerdo. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **83**, 237 (2000)
109. D.De Keukeleire, J.Vindevoel, R.Szücs, P.Sandra. *Trends Anal. Chem.*, **11**, 275 (1992)
110. H.Oka, Y.Ito, H.Matsumoto. *J. Chromatogr., A*, **882**, 109 (2000)
111. A.S.Pena. *Ars. Pharm.*, **38**, 27 (1997)
112. H.Steinhardt, G.Biernoth. *Chromatographia*, **45**, 11 (1997)
113. D.R.Bobbitt, K.W.Ng. *J. Chromatogr., A*, **624**, 153 (1992)
114. G.Xu, H.Liebich. *Am. Clin. Lab.*, **3**, 22 (2001)
115. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. В кн. *Материалы I Московского научного форума (Московская наука — проблемы и перспективы)*. Москва, 2004, С. 312
116. K.M.De Antonis, P.R.Brown. *Intern. Lab.*, **17**, 6 (1993)
117. G.Xu, C.Di Stefano, H.M.Liebich, Y.Zhang, P.Lu. *J. Chromatogr., B*, **732**, 307 (1999)
118. H.M.Liebich, C.Di Stefano, A.Wixforth, H.R.Schmid. *J. Chromatogr., A*, **763**, 193 (1997)
119. M.Y.Kuhawar, G.A.Qureshi. *J. Chromatogr., B*, **764**, 385 (2001)
120. M.Phillips, K.Gleeson, J.M.B.Hughes, J.Greenberg, R.N.Cataneo, L.Baker, W.P.McWay. *Lancet*, **353**, 1930 (1999)
121. J.Hartleb, R.Arndt. *J. Chromatogr., B*, **764**, 409 (2001)
122. E.F.Petricoin III, A.M.Ardekani, B.A.Hitt, P.J.Levine, V.A.Fusar, S.M.Steinberg, G.B.Mills, C.Simone, D.A.Fishman, E.C.Kohn, L.A.Liotta. *Lancet*, **359**, 572 (2002)
123. R.Todorovic, P.Devanesan, S.Higginbotham, J.Zhao, M.L.Gross, E.G.Rogan, E.L.Cavaleri. *Carcinogenesis*, **22**, 905 (2001)
124. T.J.Degg, K.R.Allen, J.H.Barth. *Ann. Clin. Biochem.*, **37**, 724 (2000)
125. S.C.Fleming, M.Gill, M.F.Laner. *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 173 (1995)
126. P.Mathien. *Peak*, **3**, 10 (1991)
127. R.L.Taylor, R.J.Singh. *Clin. Chem. (Washington)*, **48**, 533 (2002)
128. J.Subert. *Farm. Obz.*, **57**, 219 (1988)
129. И.Н.Глазков, Н.Л.Бочкарева, И.А.Ревельский. *Журн. аналит. химии*, **60**, 124 (2005)
130. Н.Н.Деметьева. *Фармация*, **41**, 83 (1992)
131. T.A.Van Beek. *J. Chromatogr., A*, **967**, 21 (2002)
132. F.Li, S.Sun, J.Wang, D.Wang. *Biomed. Chromatogr.*, **12**, 78 (1998)
133. M.S.Lee. *LC/MC Applications in Drug Development*. Wiley, New York, 2002
134. K.W.Phinney. *Anal. Chem.*, **72** (5), A204 (2000)
135. C.Pettersson, B.-A.Persson. *Chromatogr. Sci. Ser.*, **78**, 669 (1998)
136. B.Law. *LC-GC Intern.*, (7), 417 (1997)
137. J.Vicek, B.Klejdus, V.Kuban. *Chem. Listy*, **96**, 39 (2002)
138. G.T.Khalifa, A.El-Gindy. *Bull. Fac. Pharm. (Cairo University)*, **39**, 197 (2001)
139. P.E.Milbury. *Methods Enzymol.*, **335**, 15 (2001)
140. F.Tian, Y.Zhu, F.Xie, H.Long, C.T.Duda, E.M.Janle, P.T.Kissinger. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **25**, 475 (2002)
141. R.K.Müller, J.Grosse, D.Thieme, R.Lang, J.Teske, H.Trauer. *J. Chromatogr., A*, **843**, 275 (1999)
142. L.Vogel, J.Boumann. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, **138**, 2829 (1998)
143. K.W.Cheng, L.F.Chasseand. *Yakubutsu Dotoi*, **13**, 382 (1998)
144. H.Sachs, P.Kintz. *J. Chromatogr., B*, **713**, 147 (1998)
145. R.K.Gilpin, L.A.Pachla. *Anal. Chem.*, **63**, 130R (1991)
146. *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*. (Ed. J.A.Adamovics). Marcel Dekker, New York, 1989

147. G.Lunn, N.R.Schmuff. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. Wiley-Interscience, New York, 1997
148. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Нефть, газ, промышленность*, **8**, 50 (2004)
149. Я.И.Яшин, А.Я.Яшин. *Хим. техника*, **6**, 17 (2003)
150. B.D.Barman, V.L.Cebolla, L.Membrodo. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **30**, 75 (2000)
151. J.Beens, U.A.T.Brinkman. *Trends Anal. Chem.*, **19**, 260 (2000)
152. W.Bertsch. *J. High Res. Chromatogr.*, **23**, 167 (2000)
153. P.Q.Tranchida, P.Dugo, G.Dugo, L.Mondello. *J. Chromatogr., A*, **1054**, 3 (2004)

ANALYTICAL CHROMATOGRAPHY. METHODS, INSTRUMENTATION AND APPLICATIONS

Ya.I.Yashin, A.Ya.Yashin

Research Technical Centre «Khromatografiya», Research and Production Association «Khimavtomatika» 12a, Ul. Sel'skokhozyaistvennaya, 129226 Moscow, Russian Federation, Fax + 7(495)181–1402

The state-of-the-art and prospects of development of the key analytical methods of chromatography (gas, high performance liquid and ionic chromatography) are characterised. The achievements of the last 10–15 years in the theory and general methodology of chromatography and in the field of development of new sorbents, columns and chromatographic instruments are listed. The applications of chromatography in the environment protection, biology, medicine, pharmaceuticals, foodstuff control and for quality control in the chemical, petrochemical, gas and other industries are considered.

Bibliography — 153 references.

Received 19th September 2005