

УДК 543.544

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы

Я. И. Яшин, А. Я. Яшин

ЯКОВ ИВАНОВИЧ ЯШИН — доктор химических наук, профессор, директор НТЦ «Хроматография» при ОАО НПО «Химавтоматика», лауреат Государственных премий СССР и России Область научных интересов газовая и жидкостная хроматография, применение хроматографии в различных областях науки, техники и производства

АЛЕКСАНДР ЯКОВЛЕВИЧ ЯШИН — кандидат химических наук, начальник отдела жидкостной хроматографии НТЦ «Хроматография» при ОАО НПО «Химавтоматика» Область научных интересов высокоэффективные жидкостные и ионные хроматографы, электрохимическое детектирование, применение ВЭЖХ и ионной хроматографии для контроля загрязнений окружающей среды, в анализе пищевых продуктов и напитков, для ранней диагностики заболеваний по определению биохимических маркеров и метаболитов, разработка хроматографической аппаратуры

*129226 Москва, Сельскохозяйственная ул., д. 12А, ОАО НПО «Химавтоматика»,
E-mail yashunchrom@comail.ru*

Краткая история развития жидкостной хроматографии

Хроматография была открыта М. С. Цветом в 1903 г. [1] в виде колоночного жидкостно-адсорбционного метода. В этом методе использовались адсорбенты с размером зерен более 50–100 мкм, элюент проходил через колонку самотеком за счет силы тяжести, проточных детекторов не было. Разделение происходило медленно, в течение нескольких часов, и в таком режиме жидкостная хроматография не могла быть использована для аналитических целей.

В 1965–1970 гг. усилия специалистов в различных странах были направлены на создание экспрессной жидкостной хроматографии. Было ясно, что для увеличения скорости разделения нужно сократить пути внешней и внутренней диффузии. Этого можно было добиться за счет уменьшения диаметра зерен адсорбентов. Заполнение колонок мелкими зернами (5–10 мкм) создавало большое входное давление, что требовало применения насосов высокого давления. Так появилась жидкостная хроматография высокого давления.

При переходе к адсорбентам мелкой фракции сильно возросла эффективность колонок (в расчете на единицу длины в сотни раз выше эффективности колонок в газовой хроматографии),

поэтому современную экспрессную аналитическую жидкостную хроматографию назвали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Разработка жестких адсорбентов мелкого зернения (5 или 10 мкм), создание насосов высокого давления (свыше 200 атм) и проточных детекторов — все это обеспечило высокие характеристики ВЭЖХ. По временам разделения она не уступала газовой хроматографии, а по областям применения значительно ее превзошла. Этот период времени стали называть вторым рождением жидкостной хроматографии, возрождением, периодом ее ренессанса.

Одним из первых коммерческих жидкостных хроматографов была модель 820 фирмы «DuPont» (1968). Этому предшествовала разработка серии детекторов для жидкостной хроматографии: кондуктометрического детектора (1951), детектора по теплоте адсорбции (1959), рефрактометрического детектора (1962), УФ-детектора (1966), системы жидкостный хроматограф/масс-спектрометр (1973), первого варианта детектора на лиоидной матрице (1976).

В 1969 г. И. Халаш и И. Себастьян [2] предложили сорбенты с химически привитыми алкильными цепями («щеточные сорбенты») со связями Si—O—C. Эта связь оказалась неустойчивой. В 1970 г. Дж. Киркланд [3] разработал сорбенты с

более устойчивыми связями Si—O—Si. Ради справедливости следует отметить, что такое модифицирование значительно раньше (1959) было предложено К.Д. Щербаковой и А.В. Киселевым [4].

Истории и развитию ВЭЖХ посвящены обзоры [5—12]. В работе [7] подведены итоги 40-летнего развития ВЭЖХ, а в обзоре [8] — 20-летнего.

У нас в стране жидкостные хроматографы были разработаны в 1969—1972 гг., это модели Цвет-1-69, Цвет-304, ХГ-1301 [13], а первыми публикациями отечественных хроматографистов по жидкостной хроматографии являются статьи [14, 15].

Современный этап ВЭЖХ

В настоящее время ВЭЖХ занимает ведущие позиции среди других методов хроматографии как по объему выпускаемой аппаратуры (более 40000 хроматографов в год на сумму более 2 млрд. долл.), так и по числу публикаций (5—6 тыс. публикаций в год).

Современная ВЭЖХ реализована в различных вариантах (табл. 1). Эти варианты позволяют разделять различные смеси молекул (включая смеси всех типов изомеров); макромолекулы синтетических и биополимеров (включая вирусы и молекулы с массами до нескольких миллионов); ионы и устойчивые радикалы. Велика роль ВЭЖХ и в та-

ких жизненно важных областях науки и производства, как биология, биотехнология, пищевая промышленность, медицина, фармацевтика, судебно-медицинская экспертиза, контроль загрязнения окружающей среды и др. ВЭЖХ сыграла одну из основных ролей в расшифровке генома человека, в последние годы успешно решает задачи протеомики.

Вопросы теории ВЭЖХ

В ВЭЖХ теория размывания хроматографических зон к настоящему времени более или менее завершена. Разработка этой теории позволила на практике реализовать эффективность колонок, близкую к теоретической. Так, при использовании сорбентов с диаметром зерен менее 3 мкм была получена эффективность до 300000 теоретических тарелок на метр длины колонки.

Из последних обзоров по эффективности колонок отметим работу Д. Нокса по общим вопросам размывания в ВЭЖХ [52], обзор по оценке чистоты хроматографических пиков [53], работу по соотношению динамики и термодинамики в теории разделения [54] и обзор по математическим функциям представления хроматографических пиков [55].

Большое внимание хроматографистов обращено на исследования селективности разделения

Таблица 1

Варианты ВЭЖХ, применяемые в последнее десятилетие

Варианты	Ссылка	Варианты	Ссылка
Обращенно-фазная	[16]	Комплексообразующая	[35]
Нормально-фазная	[17]	Инверсионная эксклюзионная	[36]
Ионная	[18]	Нелинейная	[37]
Ион-парная	[19]	Капиллярная	[38]
Ионообменная	[20]	Микронасадочная	[39]
Эксклюзионная	[21]	Многомерная	[40]
Гель-фильтрационная	[22]	Перфузионная	[41]
Лигандообменная	[23, 24]	Вытеснительная	[42]
Хиральная	[25]	Сверхбыстрая	[43]
Аффинная	[26]	Турбулентная	[44]
Иммунная	[27]	Непрерывная	[45]
Мицеллярная	[28, 29]	Противоточная	[46]
Гидрофобная	[30]	Центрифужная	[47]
Серебряная обращенно-фазная	[31]	С движущимся слоем	[48]
Жидко-жидкостная	[32]	Высокотемпературная	[49]
Экстракционная	[33]	Мембранная	[50, 51]
Донорно-акцепторная	[34]		

[56]. В ВЭЖХ, в отличие от газовой хроматографии, селективность определяется как природой сорбента, так и природой элюента. Стратегии выбора растворителя в ВЭЖХ посвящен большой обзор [57]. Продолжаются работы по изучению взаимодействия вещество—растворитель, которое коррелирует со свободной энергией сорбции [58]. В высокотемпературной ВЭЖХ предложено использовать в качестве элюента сверхнагретую воду [59], так как растворимость неполярных и слабополярных соединений возрастает в сверхнагретой воде.

Острыми темами в теории ВЭЖХ являются компьютерная оптимизация процесса разделения, в частности в обращенно-фазной хроматографии [60], влияние в этом варианте температуры на селективность [61], связь удерживания со структурой молекул. Последний вопрос обсуждается на примере *o*-бензохинонов [62] и фуллеренов [63], и здесь выдвинута геометрическая модель удерживания.

Ранее предложенное уравнение, моделирующее удерживание слабополярных веществ в обращенно-фазной хроматографии [64], было применено к описанию удерживания молекул фуллеренов C_{60} и C_{70} . Рассчитана энергия сольватации фуллеренов элюентами с различным соотношением органический модификатор/вода, причем в качестве органических модификаторов были использованы нормальные спирты C_1 — C_5 . Показано, что природа элюента определяет селективность разделения неполярных веществ. При замене метанола на более тяжелые спирты имеет место обращение порядка выхода C_{60} и C_{70} .

Как указано выше, основные усилия хроматографистов в настоящее время направлены на теоретическое исследование вопросов селективности разделения. Имеются десятки публикаций по изучению связи структуры молекул с их удерживанием на сорбентах разной химической природы и в многомерных вариантах хроматографии. Для улучшения селективности разделения, как в газовой хроматографии, так и в ВЭЖХ, широко используется стерический фактор, когда для селективного разделения изомеров применяются циклодекстрины, краун-эфиры, жидкие кристаллы. Продолжаются исследования по изучению механизма удерживания в обращенно-фазной хроматографии на привитых фазах. Все чаще для этого привлекаются спектральные методы.

Весьма перспективным представляется направление по оптимизации разделения с помощью экспертных систем, включая оптимизацию градиентного элюирования. Показано, что компьютерная оптимизация (программы DryLab и

ChromSword) обращенно-фазной хроматографии в изократическом режиме для нейтральных соединений на основе связи структуры с удерживанием менее точна, чем оптимизация с использованием одного или двух первоначальных экспериментальных данных. Все еще не до конца выяснен механизм ион-парной хроматографии и здесь предлагаются и изучаются все новые и новые модели.

В области препаративной хроматографии исследуются особенности нелинейной хроматографии (работа Ж. Гийошона, А.И. Калиничева). Впечатляют достижения в теории разделения оптических изомеров, как в газовой, так и в жидкостной хроматографии. Получены результаты на уровне открытия, показывающие возможности разделения оптических изомеров при контактах на двух точках (третьей точкой контакта может служить поверхность ахирального адсорбента) (В.А. Даванков).

Успешно продолжается развитие теории хроматографии полимеров в критических условиях. Достигнут прогресс в установлении связи параметров хроматографического удерживания с биологической и химической активностью молекул. Это особенно перспективно для фармацевтики при поиске новых типов лекарств.

В последние годы повышенный интерес вызывает проблема, касающаяся влияния температуры на весь процесс разделения в ВЭЖХ. Предложена высокотемпературная ВЭЖХ и разрабатывается аппаратура для программирования температуры в этом методе. Многообещающими выглядят работы по оптимизации разделения при одновременном варьировании температуры и силы элюента.

Продолжаются работы по созданию банка индексов удерживания в ВЭЖХ, с использованием в качестве стандартных веществ из ряда нитроалканов и алкилбензолов.

Исследовалось влияние электрического поля, приложенного вдоль колонки, на удерживание и размывание кортикостероидов на колонках с пористым углеродным адсорбентом [65], а также влияние магнитного поля на удерживание на колонках, заполненных магнитными частицами — стальными шариками, покрытыми политетрафторэтиленом [66].

Сорбенты для ВЭЖХ

Для ВЭЖХ разработан и выпускается широкий ассортимент сорбентов. Около 100 фирм во всем мире выпускают более 300 типов наименований сорбентов. Однако реальный ассортимент значительно уже, так как сорбенты многих фирм одинаковы по химической природе поверхности и отличаются только названиями.

Таблица 2

Относительная доля применения разных методов ВЭЖХ на разных сорбентах

Метод хроматографии/Тип сорбента	Процент пользователей
Обращенно-фазный	50,4
Силикагель с привитыми группами	
C ₁₈	24
C ₈	15,9
Фенил	7,1
C ₄	2,3
C ₁ -C ₂	1,1
Нормально-фазная	24,1
Силикагель с привитыми группами	
CN-	8,9
Силикагель	8,5
NH ₂ -	4,7
Диол	2
Ионообменная и ионная	14
Анионы	7,4
Катионы	6,6
Эксклюзионная	6,7
Водная	3,5
Неводная	3,2
Хиральная	2,8
Гидрофобная	1,1
Прочие	1,1

Перечень сорбентов, выпускаемых для разных вариантов ВЭЖХ, приведен в табл. 2. Чаще всего применяют чистые силикагели и силикагели с привитыми неполярными и полярными группами. Разработаны и продолжают разрабатывать сорбенты на основе оксидов алюминия, циркония, титана и др. Доля применения различных сорбентов в ВЭЖХ такова: силикагели — 70%, пористые полимеры (сополимер стирола и дивинилбензола, полиметакрилаты, целлюлозы и др.) — 20%, пористые углеродные сорбенты, оксид титана, оксид циркония — 4%, оксид алюминия — 1%.

В табл. 3 представлены новые сорбенты, предложенные в последнее десятилетие. В аналитической практике наибольшее применение находит обращенно-фазный вариант хроматографии (более 70%) с использованием силикагеля с привитыми алкильными группами C₁₈ и C₈. Несмотря на широкое использование, эти сорбенты имеют ряд недостатков, основным из которых является недостаточная химическая стабиль-

ность. При pH < 3 происходит гидролиз связи ≡Si—O—Si≡, а при pH > 10 растворяется силикагельная основа, особенно при повышенных температурах. Эти сорбенты неселективны при разделении полярных соединений и изомеров. Вещества основного характера элюируются, как правило, в виде несимметричных пиков вследствие взаимодействия с остаточными гидроксильными группами. Свойства силикагельных материалов сильно зависят от чистоты, геометрической и химической природы силикагеля, способа прививки алкильных групп и пр.

В последние годы активно проводятся исследования, направленные на устранение указанных недостатков. Прежде всего, значительно усовершенствовано производство исходных силикагелей, что позволило воспроизводимо получать сферические частицы с ничтожным содержанием тяжелых металлов. Полное связывание гидроксильных групп поверхности силикагеля никогда не достигается. Остаточные гидроксильные группы приводят к нежелательным взаимодействиям и несимметричным пикам соединений, состоящих из небольших полярных молекул. Чтобы

Таблица 3

Сорбенты для ВЭЖХ

Типы сорбентов и колонок	Ссылка
На основе целлюлозы	[67]
Флорисил	[68]
Углеродные сорбенты	[69, 70]
Циклодекстрины	[71]
Полимеры с пораи молекулярных размеров	[72]
Сверхсшитые полистиролы	[73]
Монолитные полимерные колонки	[74]
Монолитные колонки на основе силикагеля	[75]
Бипористые полимеры	[76]
Макроциклические антибиотики	[77]
Керамический диоксид титана	[78]
Поверхностно-пористые	[79]
Силикагели с привитым фуллереном C ₆₀	[80, 81]
Силикагели с привитыми жидкими кристаллами	[82]
Силикагели с привитыми ферроценовыми группами	[83]
Силикагели с иммобилизованным амминным комплексом меди	[84]
Силикагели с алкиламидными группами	[85]
Силикагели с каликсареновыми группами	[86]
Силикагели с фталоцианином меди	[87]
Силикагели с металлопорфиринами	[88]

устранить влияние остаточных силанолов, было предложено закрывать (блокировать) их более объемными изопропильными или изобутильными группами. Примером такого сорбента является Zorbax Stable Bond [89]. Применяют также бидентатные заместители, когда две соседние алкильные цепи связаны с атомами кремния через 3—4 метиленовые группы. Эта «перемычка» закрывает остаточные гидроксильные группы и такие фазы оказываются стабильными даже при повышенных $\text{pH} < 12$ (Zorbax Extend — C_{18}) [90].

Для улучшения селективности к полярным соединениям в алкильную цепь включают полярные группы, в частности карбамидные. Поверхность силикагелей можно легко модифицировать и полимерами, например полистиролом [91], который затем легко можно перевести в сульфированную форму [92], или поли-1,2-бутадиеном с последующей шивкой [93].

Силикагели со средними размерами пор, 80, 100, 120 Å, применяют для разделения низкомолекулярных соединений, силикагели с порами 300 Å и более — для разделения макробиомолекул.

Длина алкильных цепей, привитых на силикагелях, колеблется от C_1 до C_{34} . Описано применение силикагелей с привитыми алкильными группами C_1 , C_3 , C_4 , C_8 , C_{18} , C_{21} , C_{30} . Чаше всего применяют фазы C_{18} и C_8 . Фаза C_{30} впервые предложена в 1987 г. для разделения полиядерных ароматических углеводов [94], олигонуклеотидов [95], фуллеренов [96], алкилбензолов [97]. В работе [98] синтезирована фаза C_{34} , но селективность разделения на ней, в частности, изомеров каротиноидов мало отличается от селективности фазы C_{30} . В зависимости от способа синтеза C_{18} сорбенты могут быть мономерными и полимерными. Полимерные сорбенты C_{18} синтезируют с использованием трехфункциональных силанов в присутствии воды. В некоторых случаях полимерные C_{18} предпочтительнее, в частности при разделении сложной смеси изомеров полиядерных ароматических углеводов [99].

Удерживающая способность и селективность мономерных фаз C_{18} к неполярным и слабополярным соединениям зависит от числа привитых алкильных цепей или от содержания общего углерода на единицу массы сорбента, содержание которого колеблется от 8 до 20%.

Отметим, что каждый год на Питтсбургской конференции-выставке в США предлагаются десятки новых сорбентов для ВЭЖХ и по ним можно судить о новых направлениях и тенденциях. В 2001—02 гг. были предложены [100, 101] новые серии сорбентов и колонок: для аналитических целей — 9, для препаративной хроматографии — 9, для обращенно-фазной — 11, для нормально-фазной — 6, для ионообменной — 4

и для аффинной — 1. Фирмы предлагают широкий выбор колонок: длина колонок варьируется от 10 до 250 мм, а внутренний диаметр — от 1 до 50 мм. Фирма «Alltech Brava» предложила серию новых общецелевых колонок 50-150×2,1-4,6 мм с силикагелями C_8 (5,5% С) и C_{18} (8,5%). Исходный силикагель имеет удельную поверхность 185 м²/г, средний диаметр пор 145 Å, размер зерен 3 мкм и более 5 мкм. Небольшая доля углерода на сорбенте приводит к малой емкости, быстрому разделению и быстрому равновесию при градиентном элюировании. Предложены полимерные колонки на основе полидивинилбензола с порами 500 и 1000 Å (фирма «Jordi»). Из 38 новых сорбентов для обращенно-фазной хроматографии только четыре приготовлены на основе сополимера стирола и дивинилбензола. Получена фаза на основе пористого TiO_2 .

В разделе специальных колонок представлены: 7 колонок для хиральных разделений, 6 — для капиллярной хроматографии, 4 — для варианта жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, 2 — для аффинной хроматографии, 2 — для разделения биомолекул и др. В качестве основы специальных сорбентов предлагаются: силикагель, полимеры, метакрилатный монолит, полисахарид, с группами 18-краун-6-эфир-аминопропил или 2,4-динитроанилинопропил. Доступны также капиллярные колонки с внутренним диаметром 0,3; 0,5 и 0,7 мм.

Для турбулентной хроматографии разработаны колонки диаметром 1 мм, заполненные частицами размером 50 мкм. В этом методе реализуются высокие скорости потока, при которых большие молекулы белков не удерживаются, а небольшие молекулы успевают диффундировать в поры и удерживаются.

В 2002 г. на Питтсбургской выставке было предложено 23 новые системы ВЭЖХ (из них 12 для обращенно-фазной хроматографии, 9 для нормально-фазной и 4 для гель-проникающей), а также 25 колонок для обращенно-фазного процесса и более 20 специальных насадок с полярными группами. Из сорбентов для обращенно-фазной хроматографии следует выделить сорбенты на основе полиэтиленгликолей для разделения фенолов, перфторированные для анализа галогенсодержащих соединений, C_{18} с большим количеством углерода (~20% С), монолитные колонки фирмы «Merck» (Chromolith Flash RP-18e и др.), сорбенты с полярными группами для обращенно-фазных колонок.

Коммерческие сорбенты для обращенно-фазной хроматографии

Как уже упоминалось выше, наибольшее применение в ВЭЖХ находят сорбенты с привитыми алкильными группами. Фирмы выпускают

сотни типов таких сорбентов. Для правильного выбора сорбентов для обращенно-фазных колонок предложены разные системы оценок. По одной из них проводят измерения эффективности, факторов удерживания, гидрофобности, стерической селективности, а также оценивают водородные связи, ионообменную емкость при разных значениях рН элюента [32]. В табл. 4 дано

описание этих параметров, а в табл. 5 по этим параметрам дано сопоставление наиболее известных коммерческих сорбентов C₁₈. В табл. 6 и 7 приведены специальные хроматографические колонки и новые сорбенты.

В последнее десятилетие достигнут большой прогресс в технологии получения новых типов сорбентов и колонок для ВЭЖХ (см. табл. 3), в

Таблица 4

Параметры и методы оценки сорбентов для обращенно-фазной хроматографии

Параметр	Метод оценки
Эффективность N	Число теоретических тарелок на метр длины колонки
Фактор удерживания K_{AB}	Для пентилбензола время выхода несорбируемого компонента определяется по метанолу; оценка плотности прививки на поверхности силикагеля
Гидрофобность, или гидрофобная селективность α_{CH_2}	Отношение факторов удерживания пентилбензола и бутилбензола $\alpha_{CH_2} = K_{PB}/K_{BB}$. Это мера плотности покрытия поверхности фазой и ее лигандной емкости
Стерическая селективность $\alpha_{T/O}$	Отношение факторов удерживания между трифениленом и терфенилом $\alpha_{T/O} = K_T/K_O$. Этот показатель оценивает селективность к молекулам разной геометрической формы и связи с типом силилирующего реагента
Емкость взаимодействия по типу водородной связи $\alpha_{K/\Phi}$	Отношение факторов удерживания между кофеином и фенолом $\alpha_{K/\Phi} = K_K/K_\Phi$. Это оценивает число свободных гидроксильных групп и степень дозакрытия (экранирования)
Ионообменная емкость при рН = 7,6 $\alpha_{B/\Phi}$	Отношение факторов удерживания бензиламина и фенола $\alpha_{B/\Phi} = K_B/K_\Phi$. Эта величина определяет общую силанольную активность
Ионообменная емкость при рН = 2,7 $\alpha_{B/\Phi}$	Отношение факторов удерживания бензиламина и фенола в кислой среде. Этот параметр определяет общую кислотную активность силанольных групп

Таблица 5

Характеристики коммерческих сорбентов C₁₈ для обращенно-фазной хроматографии

Тип фазы	Фирма	K_{PB}	α_{CH_2}	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{K/\Phi}$	$\alpha_{B/\Phi}$		N на 1 м длины колонки
						рН=7,6	рН=2,7	
Develosil ODS	Phenomenex	6,7	1,49	1,24	0,51	0,1	0,07	63000
Discovery C ₁₈	Supelco	3,32	1,48	1,51	0,39	0,28	0,1	80000
Genesis C ₁₈	Jones Chrom	6,25	1,5	1,41	0,44	0,29	0,1	73000
Hypersil 100 C ₁₈	Waters	7,66	1,53	1,4	0,42	1,01	0,25	79000
Hypersil Elite C ₁₈	Waters	3,2	1,47	1,6	0,37	0,29	0,1	79000
Intersil ODS	GLScience	6,31	1,47	1,57	0,36	0,53	0,01	44000
Jupiter C ₁₈ 300 Å	HiChrom	2,26	1,48	1,65	0,37	0,47	0,27	25000
Kromasil C ₁₈	Eka-Nobel	7,01	1,48	1,53	0,4	0,31	0,11	85000
Lichrospher RP18	Merck	7,92	1,48	1,73	0,54	1,39	0,19	46000
Luna C ₁₈ (16,5% C)	Phenomenex	5,97	1,47	1,17	0,4	0,24	0,68	90000
Luna C ₁₈ (19% C)	Phenomenex	6,34	1,47	1,23	0,41	0,26	0,06	81000
Novapak C ₁₈	Waters	4,49	1,49	1,44	0,48	0,27	0,14	70000
Nucleosil C ₁₈	Macherey-Nagel	4,8	1,44	1,68	0,7	2,18	0,13	50000

Таблица 5
(продолжение)

Тип фазы	Фирма	$K_{ПБ}$	α_{CH_2}	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{K/\Phi}$	$\alpha_{B/\Phi}$		N на 1 м длины колонки
						pH=7,6	pH=2,7	
Optimal-ODS H	Phenomenex	6,15	1,48	1,38	0,44	0,24	0,09	83000
Prodigy ODS 3	Phenomenex	7,27	1,49	1,26	0,42	0,27	0,09	73000
Purospher RP18	Merck	4,78	1,44	1,93	0,72	1,29	0,07	28000
Purospher RP18c	Merck	6,51	1,48	1,75	0,46	0,34	0,08	66000
Selectosil C ₁₈	Waters	4,94	1,45	1,69	0,68	1,98	0,14	61000
Spherisorb ODS1	PhaseSeparation	1,78	1,47	1,64	1,57	2,84	2,55	86000
Spherisorb ODSB	PhaseSeparation	5,09	1,46	1,78	0,8	3,56	0,06	51000
Summit ODS (W)	Supelco	5,45	1,47	1,29	0,56	0,4	0,1	88000
Supelcosil LC18	Supelco	4,82	1,47	1,42	0,46	1,93	0,89	61000
Superspher RP18c	Merck	5,47	1,47	1,64	0,44	0,42	0,11	50000
Symmetry C ₁₈	Waters	6,51	1,46	1,49	0,41	0,68	0,01	56000
Symmetry Shield	Waters	4,66	1,41	1,22	0,27	0,2	0,04	83000
Xterra MC C ₁₈	Agilent	3,52	1,42	1,26	0,42	0,35	0,1	42000
Xterra RP18	Agilent	2,38	1,29	1,83	0,33	0,2	0,07	41000
YMC Pro C ₁₈	YMC	7,42	1,53	1,29	0,46	0,26	0,08	80000
Zorbax Rx C ₁₈	Agilent	5,68	1,57	1,61	0,54	0,55	0,11	88000
Zorbax SB-C ₁₈	Agilent	6	1,49	1,2	0,65	1,46	0,13	77000
Zorbax Extend C ₁₈	Agilent	6,66	1,5	1,49	0,38	0,55	0,11	88000
	Среднее	5,4	1,47	1,52	0,52	0,81	0,21	65000

Таблица 6

Специализированные колонки в ВЭЖХ

Сорбент	Назначение колонок
Hypersil Green Env	Для анализа загрязнений окружающей среды (фенолов, фталатов, пестицидов и др.)
Hypersil Green PAH	Для анализа полиароматических соединений, включая и 1,2-бензопирен
Hypersil Green Carbamate	Для анализа карбаматных пестицидов (по методу EPA)
Hypersil PeP	Для анализа и выделения синтетических и природных пептидов и белков (размер пор 100 и 300 Å)
Hypersil Duet (C18/SAX, C18/SCX)	Колонки со смешанными фазами, для анализа одновременно гидрофобных и ионных соединений, для анализа метаболитов лекарственных препаратов
HyperREZ XP CarboHydrate	Для анализа спиртов, сахаров (высокая стабильность при низких значениях pH)

Таблица 7

Сорбенты для обращенно-фазной хроматографии, приготовленные по нетрадиционной технологии или на несиликагелевой основе

Сорбент	Фирма-изготовитель	Характеристики
Diamond Band C18	ZirChrom Separation	Фаза C ₁₈ на оксиде циркония, рекомендуется для работы при высоких pH и температурах
Hydrocell RP 10D	BioChrom Labs. Inc	На основе сополимера стирола и дивинилбензола, размер пор 1000 Å, сферические частицы 10 мкм, рекомендуется для разделения белков
Poroshell 300SB-C18	Agilent Technologies	Фаза C ₁₈ на поверхностно-пористом сферическом силикагеле (зерна 5 мкм), колонка 75×2,1 мм для быстрого разделения белков
Presto FT-C16	Imtant Corp	Фаза C ₁₈ на непористых частицах сферического кремнезема (зерна 2 мкм), колонка 30×4,6 мм для сверхбыстрого разделения
Aquasil C18	Thermo Hypersil	Наличие гидрофильных и гидрофобных групп, предназначенных для анализа полярных соединений, в частности, водорастворимых витаминов, сорбент устойчив в водных элюентах (до 100%)
Fluophase PFP	Thermo Hypersil	Перфторированные фенильные группы
Fluophase RP	Thermo Hypersil	Перфторированные алкильные цепи
Fluophase WP	Thermo Hypersil	Перфторированные алкильные цепи на силикагеле (зерна 300 Å), перфторированные сорбенты рекомендуются для разделения фосфолипидов, галогенсодержащих соединений, фенолов, изомеров
Aster Polymer C18	Astec	На основе поливинилового спирта
Spherisorb ASY	Waters	На основе оксида алюминия
Supelcogel ODS (W)	Supelco	На основе сополимера стирола и дивинилбензола
ZirChrom PBD	ZirChrom Separation	На основе оксида циркония
Hu Purity	THKSo	Сферические частицы силикагеля 3 и 5 мкм (диаметр пор — 180 Å), фазы C ₁₈ , C ₈ и CN для приготовления капиллярных колонок
Pico Frit	New Objective Inc	Для капиллярных колонок 75 мкм × 10;50;100 мм

частности сорбентов для перфузионной хроматографии, монолитных колонок, пористых полимеров с порами молекулярных размеров и др.

Сорбенты для перфузионной хроматографии

Перфузионные колонки рассматривают как промежуточные между обычными насадочными колонками и монолитными. В перфузионных колонках микропотоки элюента проходят через зерна сорбента, а не огибают их, как в обычных насадочных колонках. Перфузионные сорбенты имеют два типа пор: большие поры (6000—8000 Å), через которые поток элюента может проходить через зерна, и диффузионные поры (800—1500 Å), через которые молекулы и макромолекулы могут легко проникать в поры сорбента. Улучшение процесса массообмена в таких колонках позволяет использовать высокие скорости элюента, что сокращает время разделения. Это особенно важно для разделения больших молекул.

Перфузионные сорбенты созданы для разных вариантов хроматографии: обращенно-фазной,

нормально-фазной, ионообменной, гидрофобной и аффинной. Диаметр частиц сорбентов около 20 мкм.

Перфузионная хроматография была предложена в 1990 г. [102], а позднее разработана и теория метода [103]. Сорбенты для этого метода в основном созданы на основе сополимера стирола и дивинилбензола. Данный метод ВЭЖХ чаще всего применяется для препаративного выделения веществ в чистом виде, в частности белков [104], в меньшей степени используется для аналитических целей [105]. В обзоре [106] описано применение перфузионной хроматографии для анализа пищевых белков. Разработан вариант соединения перфузионных колонок с масс-спектрометром [107].

Монолитные колонки

В монолитных колонках сорбционный слой представляет собой единый жесткий пористый стержень. Впервые такие колонки на полимерной основе были описаны в работе [108]. В качестве полимерных материалов были использованы

сополимер стирола с дивинилбензолом, полимеры на основе акрилатов, метакрилатов, глицидилметакрилата, этилен-диметакрилата и др. Получены монолитные колонки большого диаметра (более 5 см), предназначенные для препаративных разделений [109—111], микронасадочные [112], капиллярные [113, 114] и нанокolonки на базе чипа [115]. Созданы и специальные монолитные колонки, в частности для разделения энантиомеров [116], белков и полинуклеотидов [117]. Все типы монолитных колонок и их области применения описаны в вышедшем в 2001 г. обзоре [118].

Создано новое поколение монолитных колонок на основе силикагеля типа Chromolith [119]. В 2001 г. фирма «Merck» изготовила 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), за что получила в этом же году золотую медаль на Питтсбургской конференции «За лучший новый продукт». На таких колонках можно работать при больших скоростях элюента без ухудшения разделения, при этом давление на входе колонки значительно ниже, чем у насадочных колонок. Колонки Chromolith RP-18e пригодны для разделения кислых, основных и неполярных веществ.

Сорбенты с порами молекулярных размеров (molecular imprinting)

Сорбенты этого типа предназначаются для сорбции только одного типа молекул или близких групп молекул. Синтез таких сорбентов впервые описан в работах [120, 121]. В основном такие сорбенты синтезируются на полимерной основе, в частности, на основе метакриловой кислоты и этилен-диметакрилата.

Сорбенты с порами молекулярных размеров — это селективные сорбенты для разделения и концентрирования. (Для их обозначения более подходит выражение «молекулярное распознавание» (molecular recognition) [122].)

На таких специальных сорбентах были успешно разделены энантиомеры анилидов фенилаланина [123], D- и L-триптофана [124], они могут селективно связать неполярные супертоксианты, в частности 2,3,7,8-тетрахлордифенилдиоксин [125]. В большей степени эти сорбенты подходят для избирательного концентрирования вредных веществ, например пестицидов [126], для обогащения и разделения лекарственных средств [127].

Углеродные адсорбенты

Впервые углеродные адсорбенты в ВЭЖХ были применены в работах [128, 129]. В 1979 г. Дж. Нокс и М. Гильберт предложили технологию получения макропористых углеродных ад-

сорбентов с поверхностью, как у графитированной термической сажи [130—132], по технологии шаблонов («template»). В качестве шаблонов были использованы макропористые силикагели со сферическими частицами размером 5 мкм. Поры таких частиц заполняются феноло-формальдегидным полимером. Этот материал карбонизируется при нагревании в инертной среде до 1000 °С, при этом поры заполняются углеродными частицами. Затем силикагель растворяют в 5 M растворе NaOH и получается макропористый углеродный адсорбент — зеркальная реплика пористого силикагеля.

В процессе карбонизации образуются поры размером 30 Å. Эти поры не желательны для ВЭЖХ-процесса. На этой стадии синтеза поверхность углеродного адсорбента аморфная, с удельной поверхностью ~400 м²/г. Графитизация при температуре выше 2000 °С приводит к полной перестройке структуры углеродного сорбента, в частности удаляются микропоры и формируется однородная кристаллическая поверхность. После графитизации остаются только те поры, которые были в исходном силикагеле. Последняя технологическая стадия — рассев для получения узкой фракции зерен.

Фирма «Шендон» освоила серийное производство углеродных сорбентов Hurecarb. Эти адсорбенты в настоящее время широко применяются для разделения и анализа различных смесей: структурных изомеров, ароматических соединений, всевозможных фармацевтических препаратов, катионов и анионов и др. Как уже указывалось выше, основные недостатки обращенно-фазной хроматографии с использованием в качестве сорбента фаз C₁₈ заключаются в том, что сильнополярные соединения практически не удерживаются на колонках, а селективность по отношению к изомерам невысока. Сорбенты Hurecarb не имеют этих недостатков. Так, например, фактор удерживания для фенола равен 1,8, для 1,3-дигидроксибензола — 2,35, для 1,3,5-тригидроксибензола — 2,7. В случае колонки с фазой C₁₈ порядок выхода этих веществ обратный и последние два соединения не разделяются. Кроме того, сорбенты Hurecarb можно использовать для разделения углеводов, соединений, содержащих карбоксильные и аминные группы.

Структурные характеристики сорбентов Hurecarb: удельная поверхность ~120 м²/г, средний диаметр пор около 250 Å, объем пор 75%, размер частиц 5 и 7 мкм. Для ВЭЖХ эти адсорбенты интересны тем, что они стабильны во всем интервале рН (0—14), не растворяются и не гидролизуются, не набухают ни в одном растворителе, выдерживают давление до 400 атм. Колонки, наполненные Hurecarb, обладают высокой эффективностью, до 60000 теоретических тарелок на метр длины колонки.

Аппаратура для ВЭЖХ

Современные жидкостные хроматографы выпускаются в трех исполнениях: блочно-модульном, моноблочном и промежуточном (модульное исполнение в едином блоке). Выбор конфигурации модульного прибора определяется аналитической задачей. Модульная система позволяет быстро и легко собирать конкретную систему с минимальными затратами. На базе гибкой блочно-модульной системы можно создавать как простые приборы, так и сложные, с наращиванием блоков, пригодные для решения рутинных технологических задач и выполнения сложных научно-исследовательских измерений. Моноблочная система в некоторых случаях выгодна в случае специализированных конкретных задач. Подобные преимущества имеет и интегрированная система с заменяемыми блоками.

В настоящее время серийно выпускаются следующие типы жидкостных хроматографов (данные LC-GC Europe 2001, v.14, № 8, в скобках указано число фирм, выпускающих эти модели): высокого давления (закрытые системы) (34), градиентные (33), изократические (39), препаративные (33), ионные (16), эксклюзионные (13), низкого давления (открытые системы) (15), многомерные (12), анализаторы on-line (11), высокотемпературные непрерывные (7), противоточные (2), с движущимся слоем (2), аминокислотные анализаторы (15). В комплект этих жидкостных хроматографов могут входить следующие детектирующие системы: УФ-Вид-фотометры с переменной длиной волны (45), УФ-Вид-фотометры с фиксированными длинами волн (с фильтрами) (39), УФ-Вид-фотометры, сканирующие (25), УФ-Вид-фотометры с фотодиодной матрицей (28), рефрактометрические (34), флуоресцентные (36), электрохимические (24), кондуктометрические (23), амперометрические (10), по светорассеянию (11), хемилюминесцентные (11), масс-спектрометрические (16), хиральные (5), микроколоночные (5), радиоактивные (8), ИК-спектроскопические (2), пламенно-ионизационные (8) и др. Развивается ВЭЖХ с микро- и наноконками.

Зарубежные жидкостные хроматографы

Фирма «Waters», разрабатывающая и выпускающая только ВЭЖХ-системы, является лидером в производстве жидкостных хроматографов (объем продаж приборов в год на сумму 800 млн. долл.). Наиболее известные жидкостные хроматографы этой фирмы — модели «Альянс» и «Бриз».

Модель «Альянс» комплектуется наиболее распространенными детекторами: двухволновым УФ-спектрофотометрическим на фотодиодной матрице, рефрактометрическим, сканирующим флуоресцентным, кондуктометрическим, электрохимическим, масс-спектрометрическим (про-

изводство фирмы «Micromass»). Измерения на этом приборе хорошо воспроизводимы за счет использования новых насосов, автоматического инжектора и совершенного программного обеспечения. Прибор предназначен для круглосуточной работы.

Модель «Бриз» — недорогая компактная ВЭЖХ-система, может работать как в изократическом, так и градиентном режимах. Ввод проб производится вручную и с помощью автодозатора. Детекторы: спектрофотометрический, работающий в диапазоне волн 190—700 нм, рефрактометрический, программируемый флуоресцентный, кондуктометрический и масс-спектрометрический.

Фирма «Agilent» (бывшая фирма «HP») — одна из ведущих фирм по разработке и выпуску жидкостных хроматографов. Модульный жидкостной хроматограф Agilent 1100 широко применяется в аналитической практике. Его модульное исполнение позволяет создавать разные системы — от простых до самых сложных, как для выполнения рутинных анализов, так и для проведения исследований. Прибор снабжен встроенной программой автоматической диагностики и слежения за состоянием отдельных модулей и всего прибора в целом, имеются аттестации методик на соответствие заданным рабочим параметрам.

Передовые позиции в ВЭЖХ занимает также фирма «Shimadzu». В 2002 г. фирма выпустила новую модель LC-2010, реализовавшую концепцию высокой производительности и автоматического контроля работы прибора. В программу заложена новая система общения с прибором через легко понимаемый интуитивный графический интерфейс пользователя. Прибор снабжен автодозатором (среднеквадратичное отклонение дозирования 0,3%, возможно охлаждение пробы), эффективным мембранным дегазатором, УФ-ВИД-детектором (уровень шума $\pm 0,25 \cdot 10^{-5}$ А · В), термостатируемой ячейкой, встроенной ртутной лампой для проверки точности длины волны. Диапазон скоростей потока 0,001—5 мл/мин.

В новом приборе «Summit HPLC Dionex» этой фирмы реализован принцип самотестирования, модель отличается повышенной надежностью, обеспечивает высокую точность поддержания расхода и дозирования элюента.

Фирма «Thermo-Finnigan» выпускает жидкостный хроматограф Surveyor в модульном исполнении. К сожалению, фирма не приводит технических характеристик, а только декларирует высокую чувствительность УФ-ВИД-детектора и детектора на диодной матрице за счет изменения длины оптического пути от 10 до 50 мм по технологии LightPipe, что позволяет работать с малыми пробами (5 мкл).

Современному техническому уровню соответствует хроматографическая серия 200 HPLC фир-

мы «Perkin-Elmer». Эта серия выпускается с 1996 г., а в 2001 г. она претерпела существенное обновление: улучшены технические характеристики детекторов УФ-ВИД и на диодной матрице (уровень шума $1 \cdot 10^{-5}$ А·В), повышена стабильность работы насосов (среднеквадратичное отклонение по временам удерживания менее 0,1%), введен автосамплер с точным и воспроизводимым дозированием (среднеквадратичное отклонение по площадям пиков 0,5%) и со скоростью дозирования до трех проб в минуту. Детекторы управляются как с помощью клавиатуры, так и с помощью программного обеспечения Totalchrom. В случае детектора на диодной матрице широкие возможности для работы со спектрами предоставляет программа TurboScan 200, в частности, можно создать библиотеки спектров соединений, а также проверять чистоту пика, анализировать неразделенные пики по их спектрам.

Значительно обновилась система ProStar HPLC Systems фирмы «Varian». На базе этой системы можно компоновать приборы для аналитических и препаративных целей. В системе ProStar предусмотрена гибкость перестройки, она обладает высокой надежностью и соответствует всем официальным требованиям к анализам методом ВЭЖХ. Основные детекторы (УФ-ВИД, флуоресцентный на диодной матрице) имеют высокие технические характеристики.

К хроматографам высокого класса следует отнести жидкостный хроматограф LaChrom 200 фирмы «Merck и Hitachi», хроматографы System Y Series 1100 фирмы «Cecil», VLC-10 HPLC фирмы «Buck Scientific», 2000 HPLC фирмы «Jasco».

Многие фирмы выпускают жидкостные хроматографы, предназначенные для рутинной аналитической практики (фирмы «Knauer», «Aktabasic Systems», «Amersham GBC Scientific Equipment», «Dönnick Hunter», «Gilson», «Spark Holland», «Wyatt Technology Corporation», «Viscotek Europe», «D-Star» и др.).

В последние годы выпускаются жидкостные хроматографы с капиллярными и микронасадочными колонками: Ultimate фирмы «LC Packing Inc.», Spark Holland, Picometrics, Agilent и др.

Значительные успехи достигнуты в области создания детекторов для ВЭЖХ. Разработаны высокочувствительные электрохимические детекторы (кулонометрические, амперометрические, потенциометрические), хемилюминесцентные детекторы, лазерные флуоресцентные, универсальные детекторы по светорассеянию. И, конечно же, следует отметить создание надежных высокочувствительных систем ВЭЖХ/масс-спектрометр и организацию их серийного выпуска. В ближайшие годы можно ожидать широкого использования этих систем в биотехнологии, биологии, медицине, фармацевтике, анализе

экстрактов лекарственных трав и в других областях. За создание этих систем и внедрение их в биохимию разработчикам была присуждена в 2001 г. Нобелевская премия.

В современных системах жидкостный хроматограф/масс-спектрометр используются следующие масс-анализаторы: квадрупольные, ионные ловушки, времяпролетные, секторные (магнитные), с Фурье-преобразованием, тандемные, квадрупольные триплетные, сочетание квадрупольного с времяпролетным.

Интерфейсы жидкостная хроматография/масс-спектрометрия на ранних этапах развития представляли собой систему, включающую устройство прямого ввода пробы, движущуюся ленту, термораспылители и др. Однако все эти системы не обеспечивали получение надежных результатов. Сегодня наиболее широко используется принцип электрораспыления с ионизацией при атмосферном давлении, с химической или фотоионизацией. В качестве ионного источника применяется и индуктивно связанная плазма.

В связи с развитием протеомики возникла очень важная проблема — анализ и идентификация белков. Такие анализы проводятся на уровне фемтомолей. Наилучшие системы подобного типа: LC/MS/MS Finnigan LC Duo, HPLC/MC/MC Bruker Esquire 2000, LC MS QP-8000 Shimadzu, Agilent LC-MSD, LC/MS/MS Applied Biosystems, MSQ Dionex, KS/MS Waters.

Отечественные жидкостные хроматографы

Из отечественных хроматографов следует выделить хроматографы серии Стайер фирмы «Аквилон» и хроматограф ЦветЯуза НПО «Химавтоматика». Высокого уровня хроматограф Миллихром А-02 по многим характеристикам не уступает лучшим зарубежным образцам. Но, к сожалению, он имеет насос низкого давления, один тип детектора и короткие колонки, так что проведение на нем некоторых стандартных анализов невозможно. Эти же недостатки присущи и прибору Миллихром-5. Жидкостные хроматографы Минихром — уникальные портативные хроматографы, не имеющие аналогов за рубежом.

Жидкостные хроматографы серии ЦветЯуза имеют надежный насос высокого давления, инжектор-дозатор фирмы «Риодайн», колонки разной длины и разного диаметра (от 5 до 250 мм) для выполнения анализов по всем аттестованным методикам. Приборы комплектуются четырьмя детекторами (по желанию заказчика): амперометрическим (работающем как при постоянном потенциале, так и в импульсном режиме), кондуктометрическим, УФ-детектором и флуоресцентным. Этот набор детекторов позволяет охватить большинство аналитических задач ВЭЖХ. Исключительные возможности имеет амперометрический детектор, работающий в импульсном

режиме. Наряду с низким пределом детектирования к некоторым соединениям (на уровне 10^{-9} – 10^{-12} г) детектор обладает хорошей селективностью. Это позволяет применять его для контроля загрязнений окружающей среды, пищевых продуктов и напитков, в медицине для ранней диагностики заболеваний, в энергетике, нефтехимии, в сельском хозяйстве и других областях. Многие вредные вещества можно определять без предварительного концентрирования.

Области применения ВЭЖХ

Востребованность в методах и приборах ВЭЖХ наглядно показывают данные табл. 8, где приведена доля публикаций по разным областям применения, по общим вопросам и по определяемым соединениям. Наибольшее число публикаций приходится на биологические соединения (более 40%), много публикаций по анализу лекарств, энантиомеров и по общим вопросам ВЭЖХ. О доли публикаций по другим разделам и другим соединениям можно ознакомиться в работе [10].

Таблица 8

Доля публикаций по ВЭЖХ по разным областям применения и соединениям

Усредненные данные за 1995–2000 гг., общее число публикаций 5300

Тема публикаций	Доля публикаций (в процентах)
Область применения	
Анализ лекарств	16
Энантиомерные разделения	5,5
Анализ неорганических соединений	5
Анализ пищевых продуктов	4,5
Контроль загрязнений окружающей среды	3
Клинические анализы	2,8
Токсикология	1,3
Общие вопросы	
Сорбенты	5,3
Обзоры и книги	5,3
Комбинации ВЭЖХ с другими методами	5,3
Теория	4
Детекторы	3,3
Автоматизация, компьютеризация	2,5
Анализируемые соединения	
Белки	13
Ферменты	9
Сахара	4,4
Липиды	2,8
Витамины	2,7
Аминокислоты	2,6
Пептиды	2,2
Стероиды	2

Методы ВЭЖХ в качестве официальных методов вошли в фармакопеи разных стран, в ЕРА (агентство США по анализу загрязнений окружающей среды), в ГОСТы и рекомендации по анализу многих вредных соединений. При контроле загрязнений окружающей среды методами ВЭЖХ определяют нефтепродукты в поверхностных и питьевых водах; пестициды (особенно нелетучие гербициды на основе фенилмочевины, феноксисукусных кислот, карбаматы, триазины и др.) в воде, почве, пище и фураже; фталаты в воде; ароматические амины и полиядерные ароматические соединения в пище и воде; фенол, хлорфенол и нитрофенолы в питьевой воде; нитрозамины в пище; тяжелые металлы (в виде комплексов) в воде, почве и пище; микотоксины (афлатоксины, зеараленон и др.) в пище и кормах и многие другие загрязнители.

В табл. 9 приведены основные публикации по применению сочетания ВЭЖХ/масс-спектрометрии.

Таблица 9

Обзоры основных применений ВЭЖХ/масс-спектрометрии

Область применения	Ссылка
Токсикология	[133]
Разработка новых лекарств	[134]
Исследование экстрактов лекарственных растений	[135]
Определение пищевых белков и пептидов	[136]
Элементный анализ ^a	[137]
Обнаружение новых лекарств ^b	[138]
Биоаналитические применения в фармакокинетике и токсикологии	[139]
Создание библиотеки спектров	[140]
Исследования в фармацевтике	[141]
Анализ растений	[142]
Изучение химии окружающей среды	[143]
Анализ пищевых загрязнений	[144]
Анализ пищевых продуктов	[145]
Анализ нуклеозидов, нуклеотидов	[146]
Анализ природных веществ в пище	[147]
Анализ загрязнений on-line ^c	[148]
Контроль загрязнений окружающей среды	[149]
Чувствительный и селективный анализ дитерпеновых эфиров, протонируемых опухолей	[150]
Анализ ионогенных соединений	[151]
Определение пищевых добавок	[152, 153]

^a ВЭЖХ/масс-спектрометрия с ионизацией в индуктивно связанной плазме.

^b ВЭЖХ/танDEMная масс-спектрометрия.

^c Твердофазная микроэкстракция/жидкостная хроматография/масс-спектрометрия.

Анализ пищевых продуктов

Можно выделить следующие основные цели хроматографического анализа пищевых продуктов: установление пищевой ценности продуктов; определение подлинности, доброкачественности, свежести пищевых продуктов; определение стадии порчи продуктов; обнаружение фальсификации пищевых продуктов; обнаружение трансгенных продуктов; контроль техногенных загрязнителей; контроль природных загрязнителей; определение пищевых искусственных добавок; контроль ароматов пищевых продуктов; анализ ветеринарных лекарств; контроль загрязнений от упаковок пищевых продуктов; контроль при специальных обработках пищевых продуктов, в частности, радиацией или термообработкой.

Пищевую ценность продуктов устанавливают путем определения в них аминокислотного состава белков, жирных кислот и глицеридов, углеводов, органических кислот и витаминов. В последние годы большинство из этих анализов выполняются только с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для оценки безопасности пищевых продуктов в них определяют различные загрязняющие компоненты, пищевые добавки (консерванты, антиоксиданты, подслащивающие вещества, красители и др.), выявляют их фальсификацию. Чтобы установить доброкачественность и свежесть пищевых продуктов, выявляют ранние стадии порчи и оценивают допустимые сроки их хранения.

Основные загрязняющие вещества в пищевых продуктах, определяемые с помощью хроматографии, включают пестициды, нитрозамины, микотоксины (афлатоксины, охратоксин А, зеараленон и др.), полиядерные ароматические соединения, биогенные амины и другие.

Ранняя диагностика заболеваний по анализам биохимических маркеров

ВЭЖХ все шире используется для определения биохимических маркеров и метаболитов при массовом медицинском обследовании населения и выявлении опасных заболеваний. Обычно для диагностики заболеваний достаточно определение только маркеров, однако в некоторых случаях требуется определять метаболический профиль уровня многих компонентов.

Биологическими маркерами служат сравнительно небольшие молекулы: катехоламины, аминокислоты (гомоцистеин), индолы, нуклеозиды, порфирины, сахара, стероиды, гормоны, витамины, птерины и липиды. В ряде случаев используются и большие молекулы: ферменты, белки, нуклеиновые кислоты.

Профиль концентраций физиологических жидкостей у пациентов с различными заболеваниями может значительно различаться от про-

филя здоровых людей. Этот показатель необходимо определять и у больных с наследственными метаболическими нарушениями. Кроме того, профильные анализы проводятся в случае онкологических, сердечно-сосудистых, психических и неврологических заболеваний, а также при диабете и порфириазе. Профиль концентраций биологических жидкостей определяют у больных с определенными симптомами, но он не дает точного диагноза болезни. Недавно было показано, что у пациентов со СПИДом в профиле появляются измененные нуклеозиды.

Для анализа таких объектов, как сложные и многокомпонентные биологические жидкости, пригодна именно высокоэффективная жидкостная хроматография, которая имеет явные преимущества перед газовой хроматографией в виду нестабильности многих биологически активных соединений при повышенных температурах.

Содержание многих маркеров в биологических жидкостях находится на уровне 10^{-9} — 10^{-12} г, поэтому для их определения необходимы высокочувствительные и селективные детекторы, в частности амперометрические и флуоресцентные. Желательно, чтобы анализы завершались быстро, в течение 5—20 минут.

В настоящее время с проведением анализов биохимических маркеров в медицинских центрах различных стран мира уже детектируется более 200 метаболических болезней.

Применение хроматографии в судебных и судебно-медицинских экспертизах

Аналитические задачи в судебной экспертизе весьма разнообразны: от точных количественных анализов до простого сравнения или установления идентичности различных объектов. Аналитический контроль важен при расследовании преступлений, связанных с употреблением наркотиков и спиртных напитков, при неумышленных и умышленных отравлениях, при злоупотреблениях лекарствами, при убийствах, пожарах, кражах, взрывах, авариях и пр.

Объектами хроматографического анализа (по последним публикациям) чаще всего являются наркотики (морфин и его производные, кокаин, каннабиноиды, ЛСД и др.) амфетамины, барбитураты, различные лекарства, дихлорэтан и растворители.

В судебных экспертизах методом хроматографии анализируют также нефтепродукты и горюче-смазочные материалы, которые могут быть использованы в качестве горючих средств при поджогах, выявляют подделки и фальсификации горюче-смазочных материалов. Анализируют также лакокрасочные материалы и покрытия, в том числе частицы окраски автомобилей, краски в чернилах для выявления материалов письма

или давности документов, древесину, взрывчатые вещества, продукты выстрела и др

Много опубликованных работ из области судебной экспертизы посвящено хроматографическим анализам биологических объектов, в частности крови, сыворотки, мочи, слюны, пота выдыхаемого воздуха, волос человека и др Только за последние два года опубликованы сотни статей по применению хроматографии в судебной и судебно-медицинской экспертизе Для быстрого скрининга разработаны систематические токсикологические методы анализы лекарств и их метаболитов В последние годы уникальные применения находит комбинация ВЭЖХ/масс-спектрометрия

Исследования и анализы в биохимии

Как показывают данные табл 8, ВЭЖХ наиболее широко применяется для разделения биологических соединений: белков, ферментов, сахаров, липидов, аминокислот, пептидов, витаминов и др В связи с развитием протеомики резко возрос интерес к разделению и анализу белков, пептидов и аминокислот Проблема разделения белков в связи с задачами протеомики рассматривается в работе [154], ВЭЖХ пептидов посвящен обзор [155]. Отметим обзоры по определению других соединений: липидов [156], фрагментов ДНК [157], фитоэкдистероидов в растениях [158], биогенных аминов [159], растительных токсинов [160–161] Методом ВЭЖХ проводятся исследования взаимодействия лекарство—мембрана [162], лекарство—белок [163], оценки степени окисления белков [164]

Установленная связь между хроматографическими параметрами и биологическими свойствами [165] позволяет более осознанно осуществлять поиск новых лекарств и других биологически активных соединений в фармацевтике

ВЭЖХ — один из наиболее важных методов исследования метаболитов лекарств [166], разделения и изоляции аллергенов [167], изучения процессов фармакокинетики [168] Освоено в промышленном масштабе разделение энантиомерных лекарственных веществ [169]

Другие применения

В виде комплексов ВЭЖХ позволяет определять металлы [170], разделять и анализировать смеси таких высокомолекулярных и нелетучих соединений, как порфирины и фталоцианины [171], определять отравляющие вещества (зарин, зоман и их продукты гидролиза) в почве [172], проводить изотопное фракционирование органических соединений [173].

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Цвет М С* Тр Варшавского об-ва естествоиспытателей Отд биол, 1903, т 14, с 1
- 2 *Halasz I, Sebastian I* Angew Chem Inter, 1969, v 8, p 433
- 3 *Kirkland J J, Destefano J J* J Chromat Sci, 1970, v 8, p 309
- 4 *Киселев А В, Щербакова К Д и др* Докл АН СССР, 1959, т 129, № 1, с 131
- 5 *Яшин Я И, Фролов И И* Ж аналит химии, 1972, т 27, № 5, с 923
- 6 *Яшин Я И* Там же, 1982, т 37, № 11, с 2043
- 7 *Scott R P W J* Liq Chromat, 1987, v 10, № 819, p 1547
- 8 *Kaiser R E* Labor Praxis, 1997, v 21, p 3
- 9 *Яшин Я И* Ж физ химии, 1991, т 65, № 10, с 2593
- 10 *Яшин Я И, Яшин А Я* Ж аналит химии, 1999, т 54, № 6, с 593
- 11 *Snyder L R* Anal Chem, 2000, v 72, p 412 A
- 12 *Ettre L S* Chromatographia, 2000, v 51, p 71
- 13 *Яшин Я И* Ж аналит химии, 1989, т 44, № 9, p 1695
- 14 *Kiselev A V, Frolov I I, Yashin Ya I* 5th Int Symp on separation Methods Column Chromatography Lausanne 1969 (Supplement, Chimia, 1970) Ed E ez Kovats, Swiss Chemists, Association, Aarau, 1970, p 60
- 15 *Bebris N K, Kiselev A V, Moneev V Ya e a* Chromatographia, 1971, v 4, № 3, p 93
- 16 *Schluter H J* Chromat Libr 61 (Protein Liquid Chromatographia), 2000, p 469–504
- 17 *Caude M, Jardy A* Chrom Sci Ser 78 (Hand book of HPLC), 1998, p 325–333
- 18 *Lopez-Ruiz B J* Chromat, 2000, v 881, p 607
- 19 *Chervet J -P, Von Ling R e a* Int Lab, 1999, v 29, № 5, p 26
- 20 *Ross P H J* Chromat Libr 61 (Protein Liquid Chromatographia), 2000, p 2
- 21 *Timpa J D* Trends Polym Sci, 1993, v 1, p 105
- 22 *Anderson D G* Anal Chem, 1997, v 69, p 15R
- 23 *Davankov V A* Chromat Sci, 1992, v 57, p 197–245
- 24 *Kurganov A J* Chromatogr, 2001, v 906, p 51
- 25 *Ward T J* Anal Chem, 2000, v 72, p 4521
- 26 *Burton S J* In Downstream Process Nat Prod Ed M S Verrall Chichester Wiley, 1996, p 193
- 27 *Hage D S, Nelson M A* Anal Chem, 2001, v 73, p 199A
- 28 *Khaledi M G J* Chromat, 1997, v 780, p 3–40
- 29 *Jandera P e a* Ibid, 2001, v 914, p 233
- 30 *Vailaya A, Horvath C* Ind Eng Chem Res, 1996, v 35, p 2964
- 31 *Yurawecz M P, Morehouse K M* Eur J Lipid Su Technol, 2001, v 103, p 609
- 32 *Hansson V B, Wingren C J* Chromat Libr 61 (Protein Liquid Chromatographia), 2000, p 469–504
- 33 *Dietz M L, Horwitz E Ph, Bond A H* ACS Symp Ser, 1999, v 716, p 234
- 34 *Felix G* Chromatogr Sci, 1992, v 57, p 33–95
- 35 *Nondek L* Ibid, 1992, v 57, p 1–31
- 36 *Jerabek K* ACS Symp Ser, 1996, v 635, p 211
- 37 *Калиничев А И* Успехи химии, 1996, № 65, с 103
- 38 *Rosing G e a* Amer Lab (Shelton), 2001, v 33, № 10, p 26

- 39 *Vissers J P C, Claessens H A, Cramers C A* J Chromat , 1997, v 779, p 1
- 40 *Cramer S M, Jayaraman G* Curr Opin Biotechnol , 1993, v 626, p 217
- 41 *Cortes H J* J Chromat , 1992, v 626, p 3
- 42 *Garcia M C, Marina M L, Torre M* Ibid , 2000, v 880, p 169
- 43 *Freitag R, Vogt S* Bioforum Int , 1997, p 114
- 44 *Kirkland J J* J Chromatogr Sci , 2000, v 38, p 535
- 45 *Zimmer D* CLB Chem lab Biotech , 1999, v 50, p 291
- 46 *Schulte M, Derwenskus K H, Ditz R* Nachr Chem Tech Lab , 1997, Bd 45, S 487
- 47 *Dai D, Wong Y, Luo G* Fenxi Huaxue 2001, v 29, p 586
- 48 *Rolet M C e a* Analisis, 1992, v 20, p 1
- 49 *Scott R P W* J Liq Chromat Relat Technol , 2000, v 23, p 3061
- 50 *Longen D e a* Analyst, 2001, v 126, p 1625
- 51 *Pilette J F* Spectra Anal , 1994, v 23
- 52 *Knox J H* Adv Chromatogr , 1998, v 38, p 1
- 53 *Sharof M A* Ibid , 1997, v 57, p 1
- 54 *Liang H, Lin B C* J Chromat , 1998, v 828, p 3
- 55 *Di Marco V B, Bombi G G* Ibid , 2001, v 931, p 1
- 56 *Rizzi A* Chrom Sci Ser 78 (Hand Book of HPLC), 1998, p 1
- 57 *Barwick V Y* TrAC, 1997, v 16, p 293
- 58 *Oumada F Z e a* Anal Chim Acta, 1999, v 382, p 301
- 59 *Fields S M e a* J Chromat , 2000, v 913, p 197
- 60 *Baczan T, Kaliszczan R e a* LC-GC Eur , 2001, v 14, p 304
- 61 *Sander L C, Wise S A* J Sep Sci 2001, v 24, p 910
- 62 *Макаренко Н П, Куликов Т И, Дружков Н О, Черкасов В Н, Яшин Я И* Ж физ химии, 2001, № 75, с 1063
- 63 *Gulliance Y C, Peyrin E* Anal Chem , 1999, v 71, p 1326
- 64 *Gulliance Y C e a* Ibid , 1998, v 70, p 608
- 65 *Ting E, Porter M D* Ibid , 1997, v 69, p 675
- 66 *Nomizu T e a* Anal Sci , 1996, v 12, p 829
- 67 *Gemeiner P* J Chromat B, 1998, v 715, p 245
- 68 *Waksmundzka-Haynos M* Chem Anal , 1998, v 43, p 301
- 69 *Ross P, Knox J H* Adv Chromatogr , 1997, v 37, p 121
- 70 *Leboda R e a* Mater Chem Phys , 1998, v 55, p 1
- 71 *Schneiderman E, Stalcup A M* J Chromat B, 2000, v 745, p 85
- 72 *Remcho V T, Tan Z* J Anal Chem , 1999, v 71, p 248A
- 73 *Пеннер Н А, Нестеренко П Н, Рыбалко М А* Ж анал химии, 2001, т 56, с 934
- 74 *Zeng Ch M e a* J Chromat , 1997, v 753, p 227
- 75 *Nakaniski K, Soga N* J Non-Cryst Solids, 1992, v 139, p 1
- 76 *Shi Y e a* Chromatographia, 2002, v 55, p 405
- 77 *Ward T J, Farris A B* J Chromat , 2001, v 906, p 73
- 78 *Marme S, Hirthe B* GIT Spez Sep , 2000, v 20, p 86
- 79 *Zorbax-Poroshell 300 SB-C₁₈*, 2001 Agilent
- 80 *Davydov V Ya, Filatova G N, Khokhlova T D* Mol Cryst Liq Cryst Sci Technol Sect C , 1998, v 10, p 125
- 81 *Chang C S e a* Explos , Pyrotech , 1998, v 23, p 111
- 82 *Gritti F, Felix G* Chromatographia, 2002, v 55, p 523
- 83 *Huai Q Y, Wang X L, Zuo Y M* Ibid , 2002, v 55, p 549
- 84 *Silva C R, Jardim I C, Airolidi C* JHRC, 1999, v 23, p 103
- 85 *Huang X, Wang J, Lin X* Anal Sci , 2002, v 18, p 69
- 86 *Sokolness T e a* GIT Spez Sep , 2001, v 21, p 50
- 87 *Jinno K e a* J Microcolumn Sep , 1996, v 8, № 1, p 13
- 88 *Xiao J, Meyerhoff M E* Anal Chem , 1996, v 68, p 2818
- 89 *Claessens H A* LC-GC Europe, 1999, v 12, № 11, p 716
- 90 *Kirkland J J e a* Anal Chem , 1998, v 70, p 4344
- 91 *Kurganov A, Kuzmenko O, Davankov V* J Chromat , 1990, v 506, p 391
- 92 *Kurganov A, Davankov V, Unger K* Ibid , 1991, v 548, p 207
- 93 *Kurganov A, Davankov V e a* Ibid , 1999, v 660, p 97
- 94 *Sander L C, Wise S A* Anal Chem , 1987, v 59, p 2309
- 95 *Makino K e a* Chem Lett , 1987, p 1251
- 96 *Ohta H, Jinno K e a* Chromatographia, 1996, v 42, p 56
- 97 *Bell C M e a* J Chromat , 1996, v 753, p 37
- 98 *Sander L C e a* Ibid , 2000, v 880, p 189
- 99 *Sander L C e a* In Retention and Selectivity Studies in HPLC Ed R M Smith Amsterdam Elsevier, 1994, p 337, ch 10
- 100 *Majors R E* LC-GC Europe, 2001, v 14
- 101 *Majors R E* Ibid , 2002, v 15, p 248
- 102 *Afeyan N B e a* J Chromat , 1990, v 519, p 1, 1996, v 743, p 221
- 103 *Ljapis A I e a* Ibid , 1992, v 599, p 87, 1997, v 760, p 55
- 104 *Lloyd L L, Warner F P* Ibid , 1990, v 512, p 365
- 105 *Garcia M C e a* Ibid , 1998, v 822, p 225
- 106 *Garcia M C, Marina M L, Torre M* Ibid , 2000, v 880, p 169
- 107 *Banks J F* Ibid , 1995, v 691, p 325
- 108 *Hjerten S e a* Ibid , 1989, v 473, p 273
- 109 *Peters E C, Svec F, Frechet J M* J Chem Mater , 1997, v 9, p 1898
- 110 *Podgornik A e a* Anal Chem , 2000, v 72, p 5693
- 111 *Chose S, Cramers S M* J Chromat , 2001, v 928, p 13
- 112 *Gusev I e a* Ibid , 1999, v 855, p 273
- 113 *Maruska A e a* Ibid , 1999, v 837, p 25
- 114 *Oberacher H, Huber C G* TrAC 2002, v 21, p 166
- 115 *Yu C e a* Anal Chem , 2001, v 73, p 5088
- 116 *Chen Z e a* J Chromat , 2002, v 942, p 85
- 117 *Josic D e a* Chromat B, 2001, v 752, p 191
- 118 *Tanaka N e a* Anal Chem , 2001, v 73, p 420A
- 119 *Kalina M* CHE Magazin, 2001, v 11, № 3, p 27
- 120 *Wulff G, Sarhon A* Angew Chem , 1972, p 84
- 121 *Wulff G, Sarhon A, Zabrocki K* Tetrahedron Lett , 1973, p 4329
- 122 *Shea K J, Dougherty J* J Am Chem Soc , 1986, v 108, p 1091
- 123 *Kempe M, Mosbach K* J Chromat , 1994, v 664, p 276
- 124 *Yu C e a* Anal Lett , 1997, v 30, p 2123

- 125 *Shetty A S e a* J Am Chem Soc, 1996, v 118, p 1019
- 126 *Lanza F, Sellergren B* Anal Chem, 1999, v 71, p 2092
- 127 *Andersson L I* Ibid, 1996, v 68, p 111
- 128 *Bebris N K, Vorobieva R G, Kiselev A V e a* J Chromat, 1976, v 117, p 257
- 129 *Colin H, Guiochon G* Ibid, 1976, v 126, p 43
- 130 Патент Великобритании № 7 939 449, 1979, патент США № 4263268, 1979
- 131 *Gilbert M T, Knox J H, Kaur B* Chromatographia, 1982, v 16, p 138
- 132 *Enerby M R* LC-GC Europe, 2000, v 13, № 9, p 665
- 133 *Hoja H e a* J Anak Toxicol, 1997, v 21, p 116—126
- 134 *Lec M S, Kerns E H* Mass Spectram Rev, 1999, v 18, № 3/4, p 187—279
- 135 *He X-G* J Chromat, 2000, v 880, p 203—232
- 136 *Leonil J e a* Ibid, 2000, v 881, p 1—21
- 137 *Donais M K* Spectroscopy, 1998, v 13, p 30—35
- 138 *Michalke B* TrAC, 2002, v 21, p 142—153, p 154—165
- 139 *Gilbert J D e a* Methodol Surn Bioanal Drugs, 1998, v 25, p 235—243
- 140 *Cheng K N, Chasseand L F* Yakubutsu Dotai, 1998, v 13, p 352—393
- 141 *Rittner M e a* GIT Labor Fachz, 2001, v 45, p 1208—1221
- 142 *Krstulovic A M e a* LC-GC Eur, 2002, v 15, p 31—41
- 143 *Wolfender J L, Hostettmann K* Spectrosc Sur, 1996, v 8, p 7—12
- 144 Application of LC-MS in Environmental chemistry Ed D Barcelo J Chrom Libr v 59 Amsterdam Elsevier, 1996, 543 p
- 145 *Gilbert J* In Prog Food Contam Anal Ed J Gilbert London Blackie, 1996, p 254—304
- 146 *Ikai Y, Ito Y, Oka H* Gekkan Fudo Kemikaru, 1997, v 13, p 115—121
- 147 *Esmans E L e a* J Chromat, 1998, v 794, p 109—127
- 148 *Careti M e a* Ibid, 1998, v 794, p 263—297
- 149 *Kataoka H e a* Chromatographia, 1999, v 20, p 237—246
- 150 *Levsen K e a* TrAC, 2000, v 19, p 27—48
- 151 *Vogg G, Achatz S e a* J Chromat, 1999, v 885, p 563—573
- 152 *Dreher W* Biol Abwassereinig, 1999, Bd 11, S 3—23
- 153 *Almarcha M M, Rovira L J* Aliment Equipos Technol, 1993, v 12, p 85—93
- 154 *Kazmi S, Krull I S* Pharmia Genomics, 2001, August, p 14
- 155 *Aguilar M-I* Drugs Pharm Sci (Peptide and Protein Drug Analysis), 2000, v 101, p 309
- 156 *Volin P J* Chromat, 2001, v 935, p 125
- 157 DNA Chromatography Wiley-VCH Verlag Eds D T Gjerde, C P Hanna, D Hornby Weinheim Wiley, 2002, p 228
- 158 *Bottori M, Kalasz H* LC-GC Eur, 2001, v 14, p 626
- 159 *Galler J e a* J Chromat, 2000, v 870, p 395
- 160 *Gallard T J* Assoc off Anal Chem, 2000, v 83, p 454
- 161 *Quillam M A* Ibid, 2000, v 83, p 448
- 162 *Lundahl P, Beigi F* Adv Drug Delivery Rev, 1997, v 23, p 221
- 163 *Hage D S, Tweed S A* J Chromat B, 1997, v 699, p 499
- 164 *Griffiths H R* In Meos in Vivo Oxid Damago Eds J Lunec, H R Griffiths Chichester John Wiley, 2000, p 27
- 165 *Abraham M N e a* J Chromat B, 2000, v 745, p 103
- 166 *Kondo T e a* Gendai Kagaku Zokan, 1997, v 31, p 276
- 167 *Ticha M e a* J Chromat B, 2002, v 771, p 343
- 168 *Savchuk S A e a* Pharm Chem J, 1999, v 33, p 545
- 169 *Francothe E R* J Chromat, 2001, v 906, p 379
- 170 *Sazzanini C* Adv Chromat, 2001, v 41, p 249
- 171 *Уварова М И, Брыкина Г Д, Шнигун О А* Ж аналит химии, 2000, т 55, № 10, с 1014
- 172 *D'Agostino P A e a* J Chromat, 2001, v 912, p 291
- 173 *Fiber C N* J habelled Compd Radiopharm, 1999, v 42, p 169