

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**Є. В. Баркарь**

# **Методи біотехнологічних досліджень**

*Курс лекцій*

Миколаїв

2019

УДК 60-047.37  
Б25

Автор: Є. В. Баркарь

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 24.01.2019 р., протокол № 5.

Рецензенти:

- І. Ю. Горбатенко – д-р біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет;
- Т. М. Манушкіна – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри землеробства, геодезії та землеустрою, Миколаївський національний аграрний університет.

**Баркарь Є. В.**

- Б25 Методи біотехнологічних досліджень : курс лекцій / Є. В. Баркарь. – Миколаїв : МНАУ, 2019. – 44 с.

У курсі лекцій викладено зміст питань щодо мети, напрямів та рівнів досліджень; огляду методів біотехнологічних досліджень; сутності, історії відкриття, основних термінів та понять хроматографії, хроматографії як методу аналізу, рідинної хроматографії, тонкошарової та електрохроматографії. Вивчення здобувачами вищої освіти дисципліни є складовою підготовки фахівця ступеня «бакалавр» галузі знань 16 «Хімічна та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

**УДК 60-047.37**

© Миколаївський національний аграрний університет, 2019

© Баркарь Є. В., 2019

**ЗМІСТ**

<b>Лекція №1</b>	
<b>Вступна</b>	4
<b>Лекція №2</b>	
<b>Огляд методів біотехнологічних досліджень</b>	10
<b>Лекція №3</b>	
<b>Хроматографія: сутність, історія відкриття, основні терміни та поняття</b>	14
<b>Лекція №4-5</b>	
<b>Хроматографія як метод аналізу</b>	20
<b>Лекція №6-7</b>	
<b>Рідинна хроматографія</b>	29
<b>Лекція №8</b>	
<b>Тонкошарова та електрохроматографія</b>	38
<b>Список джерел літератури</b>	43

## Лекція №1 ВСТУПНА

### Питання:

1. Мета та напрям досліджень
2. Характеристика рівнів дослідження

### 1. Мета та напрям досліджень

Сучасний етап науково-технічного розвитку суспільства висуває нові, набагато вищі вимоги до творчого потенціалу фахівців, що передбачає володіння новими науковими методами, вміння орієнтуватися в потоці наукової інформації, знаходити найраціональніші конструкторські, технологічні й організаційні рішення.

Перед спеціалістами різних напрямів підготовки все частіше постають завдання, які вимагають, окрім фахової кваліфікації, знання методів опрацювання результатів спостережень, планування експериментів, математичних методів моделювання та оптимізації процесів дослідження. Отже, сучасний фахівець повинен мати не тільки глибоку професійну підготовку, а й певний обсяг знань у галузі наукових досліджень, що передбачає засвоєння методологічних засад наукової праці, уміння збирати і опрацьовувати інформацію, розробляти програми наукових досліджень, аналізувати одержані результати та оформляти їх у вигляді наукового звіту.

Поряд із практичними вміннями здійснювати наукове дослідження, необхідною умовою ефективною та успішною науковою діяльністю є готовність особистості до науково-дослідної роботи, її пошукова активність, продуктивна дослідницька поведінка, стійке прагнення до творчого наукового пошуку та комплекс індивідуально-психологічних і характерологічних особливостей, що забезпечить високу ефективність її професійного функціонування.

Мета наукового дослідження – це всебічне та достовірне вивчення об'єкта, процесу або явища, їх структури, зв'язків та співвідношення на основі наукових принципів і методів пізнання, а також отримання і впровадження корисних результатів.

Будь-яке наукове дослідження має свій об'єкт і предмет дослідження.

Об'єкт дослідження – це матеріальна або ідеальна система.

Предмет дослідження – це структура системи, закономірності взаємодії елементів у середині системи і поза нею, закономірність її розвитку, різні властивості та якості цієї системи.

Науковий напрям – це наука або комплекс наук, у межах яких виконується певна наукова робота. Розрізняють технічні, біологічні, історичні та інші напрями з можливою їх деталізацією.

Структурні одиниці наукового напрямку:

- наукові комплексні проблеми (сукупність проблем, які мають одну мету);
- наукові проблеми (сукупність складних теоретичних і практичних

завдань, розв'язання яких назріло в певній галузі науки);

- наукові теми (складові частини проблеми або визначене коло наукових питань);

- наукові питання (складові частини теми або окремі завдання конкретної теми).

Кожна наукова робота належить до певного конкретного напрямку досліджень. Наукові роботи класифікують за такими ознаками.

За напрямом розвитку виробництва:

- створення нових технологічних процесів, машин, апаратів тощо;
- підвищення ефективності виробництва;
- поліпшення виробничих відносин та організації виробництва.

За ступенем важливості:

- найважливіші, що координуються на державному рівні;
- роботи, що виконуються Академією наук;
- роботи, що виконуються галузевими науковими установами.

За науковим рівнем:

- фундаментальні;
- прикладні;
- дослідно-конструкторські розробки.

За джерелом фінансування:

- держбюджетні;
- договірні.

Методика дослідження – це система правил використання методів, прийомів та способів для проведення будь-якого дослідження. Свідоме застосування науково обґрунтованих методів слід розглядати як найсуттєвішу умову отримання нових знань. Дослідник, який добре знає методи дослідження і можливості їх застосування, витрачає менше зусиль і працює успішніше, ніж той, хто у своєму дослідженні спирається лише на інтуїцію або діє за принципом «спроб і помилок». Звісно, що точні і правильні методи – не єдині компоненти, що забезпечують успішність наукового дослідження. Методи не можуть, наприклад, замінити творчу думку дослідника, його здібність аналізувати, робити висновки і передбачення. Але застосування правильних методів спрямовує хід думок дослідника, відкриває перед ним найкоротший шлях для досягнення мети і забезпечує таким чином можливість раціонально витратити енергію і час науковця. Кожний метод наукового пізнання слід розглядати як систему регулятивних принципів практичної і теоретичної діяльності людини.

## **2. Характеристика рівнів дослідження**

Виходячи з того, що кожне наукове дослідження може відбуватись на двох рівнях: емпіричному (коли здійснюється процес накопичення фактів) і теоретичному (на якому здійснюється узагальнення знань), відповідно до цих рівнів загальні методи пізнання умовно ділять на три групи:

- методи емпіричного дослідження (спостереження, порівняння,

вимірювання, експеримент);

– методи теоретичного дослідження (ідеалізація, формалізація, логічні й історичні методи);

– методи, що можуть бути застосовані на емпіричному і теоретичному рівнях (абстрагування, аналіз і синтез, індукція й дедукція, моделювання).

Спостереження – це систематичне цілеспрямоване, спеціально організоване сприймання предметів і явищ об'єктивної дійсності, які виступають об'єктами дослідження. Як метод наукового пізнання спостереження дає можливість одержувати первинну інформацію у вигляді сукупності емпіричних тверджень. Емпірична сукупність стає основою попередньої систематизації об'єктів реальності, роблячи їх вихідними об'єктами наукового дослідження.

Порівняння – це процес зіставлення предметів або явищ дійсності з метою установлення схожості чи відмінності між ними, а також знаходження загального, притаманного, що може бути властивим двом або кільком об'єктам дослідження.

Порівняння завжди є важливою передумовою узагальнення.

Узагальнення – логічний процес переходу від одиничного до загального чи від менш загального до більш загального знання, а також продукт розумової діяльності, форма відображення загальних ознак і якостей об'єктивних явищ.

Вимірювання – це процедура визначення числового значення певної величини за допомогою одиниці виміру. Цінність цієї процедури полягає в тому, що вона дає точні, кількісно визначені відомості про об'єкт. При вимірюванні необхідні такі основні елементи: об'єкт вимірювання, еталони, вимірювальні прилади, методи вимірювання. Вимірювання ґрунтується на порівнянні матеріальних об'єктів. Властивості, для яких при кількісному порівнянні застосовують фізичні методи, називають фізичними величинами. Фізична величина – це властивість, загальна в якісному відношенні для багатьох фізичних об'єктів, але у кількісному відношенні індивідуальна для кожного об'єкта. Наприклад, довжина, маса, електропровідність тощо. Але запах або смак не можуть бути фізичними величинами, тому що вони встановлюються на основі суб'єктивних відчуттів. Мірою для кількісного порівняння однакових властивостей об'єктів є одиниця фізичної величини – фізична величина, якій за визначенням присвоєно числове значення, що дорівнює 1. Одиницям фізичних величин присвоюють повні і скорочені символічні позначення – розмірності.

Найважливішою складовою наукових досліджень є експеримент – апробація знання досліджуваних явищ в контрольованих або штучно створених умовах. Це такий метод вивчення об'єкта, коли дослідник активно і цілеспрямовано впливає на нього шляхом створення штучних умов чи застосування звичайних умов, необхідних для виявлення відповідних властивостей. Сам термін «експеримент» (від латинського *experimentum* - спроба, дослід) означає науково поставлений дослід, спостереження досліджуваного явища у певних умовах, що дозволяють багаторазово відтворити його при повторенні цих умов. Експеримент – важливий елемент

наукової практики вважається основою теоретичного знання, критерієм його дійсності. Особливого значення набуває експеримент при вивченні екстремальних умов. З розвитком науки і техніки сфера експерименту значно розширюється, охоплюючи все більшу сукупність об'єктів матеріального світу. В методологічному відношенні експеримент передбачає перехід дослідника від пасивного до активного способу діяльності.

Експеримент проводять:

- при необхідності відшукати у об'єкта раніше невідомі властивості;
- при перевірці правильності теоретичних побудов;
- при демонстрації явища.

Переваги експериментального вивчення об'єкта порівняно зі спостереженням полягають у тому, що:

- під час експерименту є можливість вивчати явище «у чистому вигляді», усунувши побічні фактори, які приховують основний процес;
- в експериментальних умовах можна досліджувати властивості об'єктів;
- існує можливість повторюваності експерименту, тобто проведення випробування стільки разів, скільки в цьому є необхідність.

Дослідження об'єкта проводиться поетапно: на кожному етапі застосовуються найдоцільніші методи відповідно до конкретного завдання. На першому етапі збору фактичного матеріалу і його первинної систематизації використовують методи: опитування (анкетування, інтерв'ювання, тестування), експертних оцінок, а також лабораторні експерименти.

На другому етапі дослідження методи, що використовуються, мають цільове призначення – обробку отриманих даних, встановлення залежності кількісних та якісних показників аналізу, інтерпретацію їхнього змісту. Вибір і послідовність методів визначаються послідовністю обробки даних.

На даному етапі широко використовуються методи статистичного аналізу: кореляційний, факторний аналіз, метод імплікаційних шкал та інші.

Кореляційний аналіз – це процедура для вивчення співвідношення між незалежними змінними. Зв'язок між цими величинами виявляється у взаємній погодженості спостережуваних змін. Обчислюється коефіцієнт кореляції. Чим вищим є коефіцієнт кореляції між двома змінними, тим точніше можна прогнозувати значення однієї з них за значенням інших.

Факторний аналіз дає можливість встановити багатомірні зв'язки змінних величин за кількома ознаками. На основі парних кореляцій, отриманих у результаті кореляційного аналізу, одержують набір нових, укрупнених ознак – факторів. У результаті послідовної процедури отримують фактори другого, третього та інших рівнів. Факторний аналіз дає змогу подати отримані результати в узагальненому вигляді.

Метод імплікаційних шкал – це наочна форма виміру та оцінки отриманих даних, які градууються за кількістю або інтенсивністю ознак. Шкали класифікуються за типами або рівнем виміру. Прості шкали дають однозначну оцінку тієї чи іншої ознаки. Серію шкал (так звану батарею) можна перетворити в єдину шкалу значень окремих ознак. Ця процедура називається шкалюванням.

До методів, що застосовують на емпіричному й теоретичному рівнях досліджень, відносять, як правило, абстрагування, аналіз і синтез, індукцію та дедукцію, моделювання та ін.

Абстрагування – це уявне відвернення від неістотних, другорядних ознак предметів і явищ, зв'язків і відношень між ними та виділення декількох сторін, які цікавлять дослідника.

Аналіз – це метод пізнання, який дає змогу поділити предмет на частини з метою його детального вивчення. Синтез, навпаки, є наслідком з'єднання окремих частин чи рис предмета в єдине ціле.

Аналіз та синтез взаємопов'язані, вони являють собою єдність протилежностей. Залежно від рівня пізнання об'єкта та глибини проникнення в його сутність застосовуються аналіз і синтез різного роду.

Індукція являє собою умовивід від часткового до загального, від окремих фактів до узагальнень, коли на основі знань про частини предметів класу робиться висновок про клас в цілому. Як метод дослідження індукції – це процес дослідного вивчення явищ, під час якого здійснюється перехід від окремих фактів до загальних положень.

Дедукція – це такий умовивід, у якому висновок про деякий елемент множини робиться на основі знання про загальні властивості всієї множини. Дедуктивним у широкому розумінні вважається будь-який вивід взагалі, у більш специфічному і найбільш поширеному розумінні – доведення або виведення твердження (наслідку) з одного або кількох інших тверджень (посилань) на основі законів логіки, що мають достовірний характер. У випадку дедуктивного висновку наслідок міститься у посиланнях приховано, тому вони повинні бути одержані з них на основі застосування методів логічного аналізу.

Моделювання – непрямий, опосередкований метод наукового дослідження об'єктів пізнання (безпосереднє вивчення яких неможливе, ускладнене чи недоцільне), який ґрунтується на застосуванні моделі як засобу дослідження. Суть моделювання полягає в заміщенні досліджуваного об'єкта іншим, спеціально для цього створеним. Під моделлю розуміють уявну або матеріально реалізовану систему, котра, відображаючи чи відтворюючи об'єкт дослідження, здатна замістити його так, що вона сама стає джерелом інформації про об'єкт пізнання. Моделі можуть бути фізичні, математичні, природні, достатньо адекватні досліджуваному явищу, процесу.

Серед методів теоретичних досліджень передусім слід назвати історичний, логічний, системний, когнітивний, моделювання та ін. методи системного аналізу, які передбачають вивчення складних об'єктів, систем в комплексі. Тут широко використовуються ЕОМ для вирішення і аналізу складних математичних задач щодо оптимізації процесів і управління процесами на транспорті та великих підприємствах.

До методів теоретичного дослідження слід також віднести:

- метод сходження від абстрактного до конкретного;
- метод ідеалізації;
- метод формалізації;
- аксіоматичний метод.



Сходження від абстрактного до конкретного – це одна з форм наукового пізнання. Згідно з цим методом мислення бере свій початок від конкретного в дійсності до абстрактного в мисленні і від нього - до конкретного в мисленні.

Метод ідеалізації – мислене конструювання об'єктів, яких немає в дійсності, або які практично нездійсненні. Мета ідеалізації: позбавити реальні об'єкти деяких притаманних їм властивостей і наділити (мислено) ці об'єкти певними нереальними і гіпотетичними властивостями.

Формалізація – метод вивчення різноманітних об'єктів шляхом відображення їхньої структури в знаковій формі за допомогою штучних мов, наприклад мовою математики.

Загальнонауковий статус мають математичні (тобто кількісного вивчення процесів і явищ) і, зокрема, аксіоматичний, статистичний, а також системно-структурні, кібернетичні, теоретико-інформаційні методи досліджень. Математичні методи важливого значення набувають при обробці матеріалів дослідження.

Аксіоматичний метод – це засіб побудови наукової теорії, при якому без доведення приймаються деякі твердження (аксіоми), а потім використовуються для доведення інших тверджень (теорем) за логічними правилами.

## Лекція №2

### ОГЛЯД МЕТОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### Питання:

1. Класифікація методів біотехнологічних досліджень
2. Вимоги до методів аналізу

#### 1. Класифікація методів біотехнологічних досліджень

У біотехнологічному виробництві якість і склад сировини, ефективність виробничих процесів, екологічна безпека, відповідність продукції, що випускається, встановленим нормам, дотримання санітарно-гігієнічних вимог мають велике значення. Вирішення усіх цих питань вимагає знання методів дослідження сировини та готових продуктів і передбачає як розробку нових принципів й методів аналізу біотехнологічних систем, так і встановлення будови окремих речовин, їх функцій, взаємозв'язку з іншими компонентами.

Дослідження будь-якого біотехнологічного продукту – складне аналітичне завдання. Через особливості складу й багатокomпонентності продуктів необхідно адаптувати стандартні методи аналізу до особливостей складу й фізико-хімічної структури продукту, тобто в кожному конкретному випадку потрібне проведення тією чи іншою мірою аналітичної дослідницької роботи.

На сьогодні у біотехнологічній промисловості широкого застосування набули такі методи аналізу: газова та рідинна хроматографія, атомно-абсорбційна спектрометрія, фотометрія, люмінесценція, капілярний електрофорез, інфрачервона спектроскопія, електрохімія, класичні методи аналізу (титриметрія, гравіметрія), реологічні методи дослідження.

Нині відзначається збільшення частки хроматографічних методів і капілярного електрофорезу, що свідчить про першочергову важливість освоєння даних методів для біотехнологічної промисловості. Зростає використання спектральних, атомно-абсорбційних методів та методів капілярного електрофорезу для проведення досліджень якості сировини й готової продукції. Тобто, оволодіння методологією оцінки властивостей сировини й готової продукції для інженерів-біотехнологів має найважливіше значення.

Важливе практичне значення мають методи, основані на дослідженні випромінювання й поглинання електромагнітних хвиль різних областей спектру. До таких методів відносять спектроскопію (наприклад, люмінесцентний та спектральний аналіз), нефелометрію й турбідиметрію та ін. До важливих методів фізико-хімічного аналізу належать електрохімічні, що базуються на вимірюванні електричних властивостей речовини (вольтамперометрія, кондуктометрія, кулонометрія, потенціометрія і т.д.), а також хроматографія (наприклад, газова, рідинна іонообмінна, тонкошарова).

Успішно розвиваються методи, основані на вимірюванні швидкостей реакцій (кінетичні методи аналізу), теплових ефектів реакцій (термометричне

титрування, колориметрія), а також – на розподілі іонів у магнітному полі (мас-спектрометрія).

Фізико-хімічні методи аналізу ґрунтовані на залежності фізичних властивостей речовини від її природи, причому аналітичний сигнал являє собою величину фізичної властивості, функціонально пов'язану з концентрацією або масою обумовленого компонента. Фізико-хімічні методи аналізу можуть включати хімічні перетворення сполуки, що визначається, розчинення зразка, концентрування аналізуваного компонента, маскування речовин, що заважають визначенню тощо. На відміну від «класичних» хімічних методів аналізу, де аналітичним сигналом слугує маса речовини або її об'єм, у фізико-хімічному аналізі в якості аналітичного сигналу використовують інтенсивність випромінювання, силу струму, електропровідність, різницю потенціалів та ін.

При виконанні фізико-хімічного аналізу використовують спеціальну, іноді досить складну, вимірювальну апаратуру, у зв'язку з чим дані методи часто називають інструментальними. Багато сучасних приладів оснащені вбудованими ЕОМ, що дозволяє підбирати оптимальні умови аналізу (наприклад, спектральну область одержання найбільш точних результатів при аналізі суміші забарвлених речовин), виконують розрахунки і т.д.

На всіх стадіях будь-якого виробництва здійснюється технічний контроль або аналіз, тобто проводяться роботи з контролю якості продукції в ході технологічного процесу з метою уникнення браку й забезпечення випуску продукції, що відповідає технічним умовам і державним стандартам.

Технічний аналіз поділяють на загальний – аналіз речовин, що зустрічається на всіх підприємствах (вода, паливо, мастильні матеріали) і спеціальний – аналіз речовин, що зустрічаються тільки на даному підприємстві (сировина, напівпродукти, відходи виробництва, кінцевий продукт). Із цією метою щоденно тисячі хіміків-аналітиків виконують мільйони аналізів згідно відповідних Міжнародних державних стандартів.

Докладний опис виконання аналітичних реакцій із вказівкою умов їх виконання наведено у методиці аналізу, завданням якої є оволодіння навиками експерименту й сутністю аналітичних реакцій. Методи аналітичної хімії засновані на різних принципах.

Отже, за способом виконання методи аналізу поділяють на: хімічні, фізичні й фізико-хімічні (інструментальні) методи.

Залежно від об'єктів аналізу методи аналізу поділяють на неорганічні і органічні.

Хімічний аналіз залежно від поставленої мети класифікують на якісний і кількісний.

Кількісний аналіз дозволяє встановити кількісні співвідношення складових частин даної сполуки або суміші речовин. На відміну від якісного, кількісний аналіз дає можливість визначити вміст окремих компонентів речовини, що аналізується, або загальний вміст даної речовини в досліджуваному об'єкті.

Методи якісного й кількісного аналізу, які дозволяють визначити в

аналізованій речовині вміст окремих елементів, називають елементним аналізом; функціональних груп – функціональним аналізом; індивідуальних хімічних сполук, що характеризуються певною молекулярною масою – молекулярним аналізом.

Сукупність різноманітних хімічних, фізичних і фізико-хімічних методів розділення й визначення окремих структурних (фазових) складових гетерогенних систем, різних за властивостями і фізичною будовою та обмежених одна від одної поверхнями розділу, називають фазовим аналізом.

Залежно від маси проби, яку використовують для аналізу, розрізняють: макро- ( $\gg 0,10$  г), напівмікро- ( $0,10 - 0,01$  г), мікро- ( $0,01 - 10^{-6}$  г), ультрамікроаналіз ( $< 10^{-6}$  г).

Важливе місце в аналітичній хімії займають методи концентрування мікрокомпонентів. При цьому застосовують абсолютне концентрування – переведення мікрокомпонентів з великого об'єму розчину в малий, що знижує межу виявлення. Широко застосовується відносне концентрування – це відділення досліджуваних мікрокомпонентів від основи, інших мікрокомпонентів, що заважають визначенню.

Найбільшого поширення набули наступні методи попереднього концентрування й розділення: – фізичні (метод відгонки; метод флотації – оснований на різниці густини основної речовини й домішок); – хімічні (метод осадження; комплексоутворення); – фізико-хімічні (хроматографічне розділення – основане на вибірковій адсорбції і різній швидкості руху іонів у колонках з адсорбентом. Якщо адсорбент безбарвний, а іони, що адсорбуються, – забарвлені, то одержують кольорову хроматограму (наприклад,  $\text{Cu}^{2+}$  – синій,  $\text{Co}^{2+}$  – рожевий).

## 2. Вимоги до методів аналізу

До методів аналізу висувають ряд вимог: точність аналізу, правильність, відтворюваність, чутливість, експресність, простота, економічність, локальність, автоматизація, дистанційність.

Правильність – параметр, що характеризує близькість експериментальних і дійсних значень вимірюваної величини. Вона характеризується систематичною похибкою, яка залежить від роботи приладу, індивідуальних особливостей аналітика, помилок при розрахунках і методичних похибок.

Відтворюваність – параметр, який відображає випадкові помилки вимірювання, що й показує ступінь розсіювання паралельних визначень. Це міра того, як повторюються результати при багаторазовому проведенні аналізу. Відтворюваність визначає ймовірність того, що результати наступних вимірювань виявляться в деякому заданому інтервалі, у центрі якого знаходиться середнє значення. Цей показник можна оцінити за допомогою будь-якого доступного зразка, тоді як для оцінки правильності методу необхідно мати у своєму розпорядженні стандартні зразки.

Стандартні зразки – зразки речовин, склад яких типовий для певного класу аналізованих матеріалів, визначений з високою точністю (після

градування по еталонах або стандартах, що мають державну атестацію) й не змінюється при зберіганні. Необхідною умовою застосування в хімічному аналізі стандартного зразка є максимальна близькість його складу і властивостей з аналізованою пробою. Стандартні зразки застосовують для градування й перевірки аналітичних приладів і методів.

Точність аналізу визначається сумою правильності й відтворюваності.

Межа виявлення – це мінімальна концентрація речовини, яка може бути визначена даним методом з деякою допустимою похибкою (моль/дм<sup>3</sup>; мкг/см<sup>3</sup>; %).

Чутливість – параметр, що характеризує зміну аналітичного сигналу, (наприклад, оптичної густини або напруги) зі зміною концентрації досліджуваного компонента, тобто – це тангенс кута нахилу градуювального графіка.

Вибірковість (селективність) – можливість визначення тої чи іншої речовини (іона) у присутності інших.

У виробничих умовах, де аналізи проводяться у великій кількості, обирають найбільш прості та швидкі методи, якщо вони забезпечують необхідну точність і досить низьку межу виявлення. Вибір методу в кожному конкретному випадку визначається метою й завданнями дослідження, а також виробничими можливостями (наявність хімічних реактивів, приладів тощо).

### Лекція №3

## ХРОМАТОГРАФІЯ: СУТНІСТЬ, ІСТОРІЯ ВІДКРИТТЯ, ОСНОВНІ ТЕРМІНИ ТА ПОНЯТТЯ

### Питання:

1. Історія відкриття та сутність хроматографічного методу
2. Основні терміни та поняття

### 1. Історія відкриття та сутність хроматографічного методу

Хроматографія – процес і метод розділення гомогенних сумішей, але часто її використовують одночасно і для ідентифікації (виявлення) компонентів. Тому говорять, що хроматографія – це і метод аналізу.

Хроматографія заснована на різній швидкості переміщення компонентів рухомої фази через нерухому, фазу. Відмінність в швидкостях переміщення визначається відмінністю сорбції досліджуваних компонентів. Сорбція – поглинання парів, газів, розчинних речовин твердими або рідкими поглиначами (сорбентами). Рухомою фазою є гази або рідини, нерухомою фазою є тверда пориста речовина з великою поверхнею або нерухома рідина, нанесена на тверду речовину – носій нерухомої фази.

Розділення речовин в хроматографії може бути засноване не лише на різній адсорбції молекул речовин, але й на інших явищах – іонному обміні, розподілі речовини між двома компонентами, що не змішуються (екстракція) та ін. Хемосорбція для хроматографічного розділення не застосовується, оскільки при необоротній сорбції сполуки, що розділяються, будуть залишатися в колонці і інформації про них на виході із колонки не буде.

Засновником хроматографічного методу аналізу є російський ботанік і біохімік Михайло Семенович Цвет (1872–1919). Він розділив хлорофіл – зелений пігмент рослин, який складається із суміші декількох пігментів. Розділення М. С. Цвет проводив у скляній колонці (трубці), наповненій сухим твердим сорбентом – крейдою (кальцій карбонатом). Із рослин пігменти екстрагувалися органічним розчинником (бенzenом), потім отриманий екстракт вводили в колонку. Хлорофіл поглинається сорбентом і у верхній частині колонки спостерігається зона поглиненої (сорбованої) речовини, але при цьому розділення поглинутих пігментів ще не відбувається. Колонку промивали органічним розчинником (бенzenом), при цьому компоненти екстракту переміщалися по колонці із різною швидкістю, утворюючи окремі кольорові зони. Після повного розділення компонентів стовпчик вологого адсорбенту виштовхували з колонки, розрізали на окремі частини, екстрагували окремі компоненти і досліджували.

Отриманий стовпчик з кольоровими зонами М. С. Цвет назвав хроматограмою (від грецького слова «хроматос» – «колір»), а метод аналізу – хроматографією. За життя М. С. Цвета цей метод не отримав поширення і згодом був забутий.

Роком відродження хроматографічного методу вважається 1931 р., коли

Р. Кун, А. Вінтерштейн і Є. Ледерер стали проводити широкі дослідження різних рослинних і тваринних пігментів. Після відродження хроматографії, поряд з широким використанням і удосконаленням того варіанту методу, який був запропонований М. С. Цветом і визнаний класичним (елюентна рідинно-адсорбційна хроматографія), почали виникати і розвиватися нові варіанти методу. Японський вчений В. Кошара, на відміну від М. С. Цвета, після розділення зон на сорбенті і проявлення не виштовхував стовпчик вологого сорбенту з колонки, а продовжував подачу елюенту доти, доки всі розділені компоненти не виходили почергово з колонки. Так була одержана хроматограма в елюаті. В окремих фракціях елюату (розчину, який виходить із хроматографічної колонки) проводили якісне і кількісне визначення.

В 1940 р. шведський вчений А. Тизеліус розробив фронтальний і витискувальний методи хроматографічного аналізу. Одночасно хроматографія розвивалася і в інших напрямках. Так, були розроблені паперова і тонкошарова хроматографія. Початок методу тонкошарової хроматографії був закладений роботами радянських вчених М. А. Ізмайлова і М. С. Шрайбер в 1938 р. Широке розповсюдження отримала іонообмінна хроматографія. Однак найбільшим стрибком в розвитку хроматографії після основоположних робіт М. С. Цвета вважають створення методу розподільної хроматографії англійським хіміком А. Мартіном та його співробітниками Р. Сінджем та А. Джемсом. В 1941 р. була опублікована робота А. Мартіна і Р. Сінджа, в якій описаний метод розділення амінокислот на колонці з силікагелем, просоченим водою. В цьому методі процесом, на якому ґрунтується розділення, виявилась не адсорбція, а розчинення речовин в нерухомій фазі (в даному випадку водній), а точніше – розподіл компонентів суміші, що аналізують, між двома рідинами: нерухомою фазою (водою) і рухомою (органічним розчинником). Різниця в розподілі компонентів суміші між двома рідинами і визначає роздільчу здатність методу. В 1941 р. Мартін та Сіндж у своїй роботі по розподільній хроматографії розробили першу загальну теорію хроматографії, в якій як фізичну модель використали уже відому для описання процесу дистиляції концепцію теоретичних тарілок і припустили, що поєднання газової рухомої фази з рідкою нерухомою фазою мало б переваги для розділення речовин.

В 1944 р. А. Мартін з співробітниками Р. Консденом і А. Гордоном, також на прикладі розділення амінокислот, запропонували розподільний варіант хроматографії на папері (папір був просочений водою).

Історичний інтерес являє робота Тернера з аналізу природного газу поєднанням фронтальної і витискувальної методики проведення хроматографії.

Новий етап розвитку газової хроматографії почався в 1951–1952 рр., коли А. А. Жуховицький із співробітниками запропонували хроматермографічний метод аналізу суміші газів, заснований на різній сорбції газів у хроматографічній колонці при зміні температури, а А. Мартін і А. Джемс запропонували газо-рідинну хроматографію, хоча метод газо-рідинної хроматографії був передбачений ще в 1941 р. А. Мартіном і Р. Сінджем, задовго до її створення.

Поряд з класичною теорією хроматографії Мартіна та Сінджа (теорією тарілок) датськими хіміками Ван-Деємтером, Клінкенбергом и Зюйдервегом у 1956 р. запропонована кінетична теорія хроматографії. Подальший розвиток ця теорія одержала в роботах американського хіміка Дж. Калвіна Гіддінгса. Ці теорії хроматографії розроблені для колонкової хроматографії.

В даний час хроматографічний метод продовжує розвиватися. В науковій літературі щороку публікуються сотні робіт, присвячених питанням хроматографії.

Хроматографія – найбільш ефективний та універсальний метод розділення, застосовується до розділення газів та рідин.

Метод хроматографії застосовується для розділення складних сумішей в біології, органічній та неорганічній хімії, в технології. Вперше за допомогою хроматографії були розділені лужноземельні елементи, виділені в чистому вигляді й ідентифіковані нові трансуранові елементи; метод дозволяє розділити навіть ізотопи одного і того ж елемента. Крім того, метод застосовується для концентрування речовин, ідентифікації речовин і кількісного визначення, для препаративних цілей (для очищення хімічних препаратів, виділення індивідуальних речовин із сумішей). За сучасними оцінками приблизно 60% усіх аналізів у світі виконують із застосуванням хроматографічних методів. Переваги хроматографії, порівняно з класичними методами розділення, полягають у простоті і швидкості проведення процесу розділення, високій роздільчій здатності, можливості розділення близьких за властивостями і невеликих за кількістю речовин.

В залежності від способу одержання розрізняють внутрішні і зовнішні хроматограми. При одержанні внутрішньої хроматограми компоненти проби, що розділяються, проходять різну відстань за однаковий час. Після розділення вони знаходяться на нерухомій фазі і там же детектуються (в роботах М. С. Цвета). Внутрішні хроматограми одержують і в площинних варіантах, таких як паперова і тонкошарова хроматографія.

Зовнішні хроматограми одержують в колонковій хроматографії – в газовій чи рідинній хроматографії. В цьому випадку всі компоненти проходять однаковий шлях по колонці і, завдяки специфічним взаємодіям з нерухомою фазою, через різний час виходять з колонки і потім можуть бути детектовані. Розміри хроматографічних колонок і їх конструктивне оформлення змінюються в дуже широких межах.

Для визначення компонентів можна використати детектор з автоматичною реєстрацією, встановлений на виході з колонки. В результаті отримують графік. Кожний пік на зовнішній хроматограмі відповідає окремому компоненту суміші. Ідентифікацію компонентів суміші (якісний аналіз) проводять порівнянням характеристик утримування (часу утримування чи утримуваного об'єму) з характеристиками утримування стандартних речовин. Площа кожного піку характеризує відносний вміст даного компоненту в суміші.



## 2. Основні терміни та поняття

Хроматографія – динамічний процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, одна з яких нерухома, а інша – рухома, і пов'язаний з багатократним повторенням актів сорбції і десорбції.

Нерухома фаза – фаза, яка в хроматографічному шарі є нерухомою (активний твердий адсорбент, або гель, або плівка рідини, нанесена на твердий інертний носій). Нерухома фаза може бути завантажена в колонку, нанесена у вигляді шару, розподілена у вигляді плівки. Для будь-якої нерухомої фази використовується також термін «хроматографічний шар».

Рухома фаза – рідина або газ, що протікає крізь нерухома фазу. Рухома фаза включає частину зразка суміші, що міститься в цій фазі.

Газова хроматографія (ГХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухома фазою є газ.

Газо-рідинна хроматографія (ГРХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухома фазою є газ, а нерухома фазою є плівка рідини, нанесена на твердий інертний носій.

Газо-твердофазна хроматографія (ГТХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухома фазою є газ, а нерухома фазою є активна тверда речовина, наприклад, активоване вугілля. Розділення відбувається завдяки різній адсорбції компонентів проби на активній твердій речовині.

Рідинна хроматографія (РХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухома фазою є рідина.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) – рідинна хроматографія високого тиску (швидкісна рідинна хроматографія).

Рідинно-рідинна хроматографія (РРХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухома фазою є рідина, а нерухома фазою є плівка іншої рідини, нанесена на твердий носій.

Рідинно-твердофазна хроматографія (РТХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухома фазою є рідина, а нерухома фазою є тверда речовина.

Адсорбційна хроматографія – розділення, засноване головним чином на відмінностях у здатності компонентів, що розділяються, до адсорбції на поверхні активної твердої речовини.

Розподільна хроматографія – розділення, засноване головним чином на відмінностях в розчинності речовин в нерухомій рідкій фазі (газо-рідинна хроматографія) або на відмінностях в розчинності компонентів в рухомій і нерухомій рідких фазах (рідинно-рідинна хроматографія).

Іонообмінна хроматографія – розділення, засноване головним чином на

відмінності у здатності компонентів, що розділяються, до іонного обміну.

Гель-проникаюча хроматографія – розділення, засноване головним чином на ефектах проникнення молекул через структуру набряклого гелю. При цьому молекули диференціюються за розміром та масою.

Афінна хроматографія – розділення, засноване на специфічних взаємодіях, характерних для деяких біологічних та біохімічних процесів.

Осадова хроматографія – розділення, засноване на відмінності у розчинності осадів, що утворюють компоненти суміші, яка розділяється, з осаджувачем, який знаходиться в порах твердої інертної фази (твердий носій).

Колонкова хроматографія – розділення, яке проводять у спеціальних колонках.

Площинна хроматографія – розділення, яке проводять на спеціальному папері (паперова хроматографія) або в тонкому шарі сорбенту, що наноситься на якусь основу, наприклад, на скляну або алюмінієву пластинку (тонкошарова хроматографія).

Капілярна хроматографія – розділення, яке проводять у спеціальних капілярних колонках (в газо-рідинній або в газо-твердофазній хроматографії). Рідка фаза або активна тверда речовина наносяться на внутрішні стінки капілярів і діють як нерухома фаза.

Фронтальна хроматографія – методика хроматографічного розділення, відповідно до якої зразок (рідину або газ) безперервно вводять у хроматографічний шар до появи проскоку суміші, що розділяють.

Елюентна хроматографія – методика хроматографічного розділення, відповідно до якої елюент пропускають через хроматографічний шар після введення зразка, що міститься в рухомій фазі, доки речовини, що розділяють, не будуть детектовані на виході із колонки.

Витискувальна хроматографія – методика елюювання, відповідно до якої елюент містить сполуку, яка ефективніше утримується хроматографічним шаром, ніж компоненти досліджуваного зразка, і витісняє компоненти, які сорбуються слабше.

Аналітична хроматографія – розділення, яке проводять для якісного та кількісного аналізу.

Препаративна хроматографія – розділення, яке проводять для отримання речовин у чистому вигляді, для концентрування і відділення мікродомішок.

Промислова хроматографія – хроматографія для безперервного аналізу технологічної суміші з наступним автоматичним регулюванням процесу.

Хроматографія з програмуванням температури – методика, у відповідності з якою температура колонки систематично змінюється протягом частини процесу розділення або всього процесу.

Елюент – рідина або газ, які вводять в хроматографічний шар і використовують для проведення розділення шляхом елюювання.

Газ-носіє – газ, який застосовується для того, щоб елюювати пробу при протіканні через колонку. Цей термін зазвичай використовують для позначення елюенту в газовій хроматографії.

Елюат – рідина або газ, що виходить з хроматографічного шару під час

елюювання. Кожна порція елюату містить крім сполук, що розділяли, також елюент.

Елюювання – хроматографування методом елюентної хроматографії. Процес елюювання можна продовжувати до виходу компонентів з хроматографічного шару.

Хроматограма – графічна або інша залежність сигналу детектора або концентрації елюату або іншої величини, яка є мірою цієї концентрації, від об'єму елюату або часу. Цей термін застосовують також для позначення хроматографічного шару або паперу після закінчення процесу розділення.

Крива елюювання – хроматограма або частина хроматограми, яка була зареєстрована при використанні методики елюювання.

Хроматографування – розділення методом хроматографії.

Хроматограф – прилад для проведення хроматографічних розділень.

## Лекція №4-5

### ХРОМАТОГРАФІЯ ЯК МЕТОД АНАЛІЗУ

#### Питання:

1. Принцип хроматографічного розділення
2. Ефективність і селективність хроматографічної колонки
3. Класифікації методів хроматографічного аналізу
4. Хроматографічна система та представлення результатів хроматографії

#### 1. Принцип хроматографічного розділення

Розділення речовини зустрічається при кожному хімічному синтезі. Якщо окремі компоненти суміші перебувають у різних фазах, то їх розділення проводиться досить легко – методами фільтрації, осадження, центрифугування тощо. Навпаки, якщо декілька речовин перебувають в одній фазі, тобто мало відрізняються за властивостями (наприклад, розчинністю, адсорбцією або розміром молекул), то в цьому випадку розділення можна досягти шляхом багаторазового повторення елементарного акту розподілу: видаленням молекул, які виходять з нерухомої фази, що здійснюється завдяки постійному руху рухомої фази.

Цільове призначення хроматографії – кількісне розділення та ідентифікація компонентів складної суміші.

Характерною особливістю хроматографічних методів є розподіл розділювальних речовин між двома фазами, які не змішуються, що призводить до розділення компонентів суміші. При цьому одна фаза може бути твердою, а інша – газоподібною або рідкою; обидві фази можуть бути рідкими і поміщені на який-небудь носій. Речовини, що містяться в суміші, під час хроматографічного розподілу переходять з однієї фази в іншу.

Процес хроматографічного розділення суміші речовин полягає в різному розподілі кожного компоненту даної суміші між двома фазами, з наступним повним розділенням суміші шляхом застосування операції вимивання або витиснення компонента, що виділяється. Причиною такого розділення є відмінності у взаємодії кожного з компонентів даної суміші речовин, що перебувають у першій фазі (розчинник), із другою фазою – сорбентом (твердим або рідким), поміщеним на носії.

Для пояснення явищ, що відбуваються під час хроматографії, розрахунків довжини колонок, положення і форми піків, вибору оптимальних умов процесів існує два підходи – теорія теоретичних тарілок (ТТТ) і кінетична теорія. Згідно ТТТ, хроматографічну колонку можна уявити у вигляді ряду вузьких дотичних шарів, що називаються теоретичними тарілками. Мартін і Сіндж показали, що висота, еквівалентна теоретичній тарілці, заповненої колонки може досягати 0,002 см. Таким чином, колонка довжиною 10 см може вміщувати порядку 5000 тарілок. Високої ефективності розподілу можна чекати навіть від порівняно коротких колонок. Припускають, що в кожній такій тарілці встановлюється

рівновага між рухомою і нерухомою фазами. Чим більше таких рівноваг, тим ефективніше розділення. Для оцінки ефективності колонки використовують поняття висоти теоретичної тарілки.

Кінетична теорія уникає допущення встановлення миттєвої рівноваги. Основна увага в даній теорії зосереджена на швидкості, з якою може встановитися рівновага в реальних умовах хроматографування. До того ж вона позбавляється і від інших недоліків концепції теоретичних тарілок: відсутність таких важливих параметрів як швидкість руху рухомої фази, розміри зерен адсорбента, відсутність дифузії при русі компонентів вздовж колонки (повздовжньої дифузії).

Молекули речовини проходячи через колонку внаслідок хаотичного руху багато разів випадково стикаються між собою, тому одні молекули можуть просуватися швидше, ніж інші. На просування молекул через колонку впливає ряд факторів, що визначають ефективність хроматографічної колонки:

- 1) структура нерухомої фази (розміри гранул, їх однорідність, щільність і рівномірність заповнення колонки);
- 2) швидкість встановлення рівноваги сорбція-десорбція (масообмін);
- 3) дифузія молекул із зони з більшою концентрацією у зону з меншою концентрацією.

## **2. Ефективність і селективність хроматографічної колонки**

Хроматографія – це метод розподілення компонентів суміші, оснований на відмінності їх розподілу між двома фазами, що не змішуються, одна з яких нерухома, а друга – рухома. Компоненти зразка рухаються по колонці, якщо перебувають у рухомій фазі, і залишаються на місці, якщо знаходяться у нерухомій фазі. Чим більша спорідненість компоненту до нерухомої фази і чим менше – до рухомої, тим повільніше він рухається по колонці й тим довше в ній утримується.

За рахунок відмінності у спорідненості компонентів суміші до нерухомої та рухомої фаз досягається основна мета хроматографії – розділення суміші за певний проміжок часу на окремі смуги (піки) компонентів у міру їх просування по колонці з рухомою фазою.

Отже, хроматографічний розподіл можливий лише за умови, якщо компоненти зразка в колонці, по-перше, будуть розчинні в рухомій фазі та, по-друге, будуть взаємодіяти (утримуватися) з нерухомою фазою. Якщо при введенні проби компонент суміші не розчиняється, то буде відфільтрований і не братиме участі у хроматографічному процесі. Компоненти суміші, що не взаємодіють з нерухомою фазою, також пройдуть через колонку не розділяючись на окремі фракції.

Кількість теоретичних тарілок характеризує кількість щаблів встановлення рівноваги між рухомою і нерухомою фазами. Якщо ефективність колонки вимірюється числом теоретичних тарілок, то чим воно більше, тим вища ефективність.

Важливу роль у досягненні хроматографічного розділення відіграє

селективність колонки, характеристика якої залежить від багатьох факторів: хімічної природи обраного сорбенту, складу розчинника, його модифікаторів з урахуванням хімічної структури і властивостей розділювальних компонентів. Іноді помітний вплив на селективність виявляє зміна температури колонки, що змінює коефіцієнти розподілу речовин між рухомою та нерухомою фазами.

При розгляді розділення двох компонентів на хроматограмі і його оцінці важливим параметром є роздільна здатність колонки, яка пов'язує час виходу і ширину піків обох розділювальних компонентів. Роздільна здатність колонки як параметр, що характеризує поділ піків, збільшується в міру зростання селективності й росту ефективності, через зменшення ширини піків.

Розмивання в колонці зменшиться, а ефективність колонки підвищиться, якщо використати більш дрібний сорбент, більш рівномірний за складом (вузька фракція), більш щільно і рівномірно упакований в колонку, при використанні більш тонких шарів прищепленої фази, менш в'язких розчинників і оптимальних швидкостей потоку.

Отже, високої ефективності розділення можна досягти лише завдяки частим фазовим переходам, тому нерухома й рухома фази повинні мати більшу поверхню зіткнення, а зовнішні умови обрані так, щоб молекули розділювальних речовин були здатні до швидкого обміну між двома фазами. Оскільки ефективність розділення знижується внаслідок дифузійних явищ, то обидві фази повинні мати невелику товщину шару, а потік рухомої фази повинен бути ламінарним.

Ці вимоги задовольняються, наприклад, якщо рухома фаза протікає під дією перепаду тиску в хроматографічній колонці, наповненій тонко подрібненим сорбентом у якості нерухомої фази.

Суміш, що підлягає розділенню, подається в рухому фазу і разом з нею надходить у колонку, де кожен з компонентів розподіляється між рухомою фазою і сорбентом у певному співвідношенні. Дійсна рівновага між двома фазами буде тим меншою, чим більша швидкість рухомої фази. Так як компоненти суміші, поглинуті в цей момент сорбентом, не беруть участі у русі рухомої фази, то кожному з них для проходження колонки потрібно більше часу, ніж для кожної з молекул рухомої фази. Розділення суміші досягається, якщо її компоненти мають різні коефіцієнти розподілу між обома фазами, тобто якщо нерухома фаза різним чином перешкоджає їх проходженню через колонку.

Хроматографія застосовується з багатьма методичними змінами, які мають одну загальну основу: розділення відбувається внаслідок частого переходу молекул окремих компонентів суміші між двома фазами, з яких одна є нерухомою з розвинутою поверхнею, а друга фаза (рухома) переміщується щодо неї. Завдяки різному розподілу розділювальних речовин між нерухомою та рухомою фазами вони мають різний час утримання в колонці.

Рухома й нерухома фази можуть бути утворені різними речовинами. Залежно від їх властивостей і виду впливу на компоненти суміші розрізняють різні види хроматографії. Рухома фаза повинна утворюватися тільки речовинами малої в'язкості – газами або рідинами з малою в'язкістю.

Хроматографія з газоподібною або рідкою рухомою фазами має зовсім різне експериментальне оформлення й відрізняється за елементарними процесами. У зв'язку з цією обставиною Десті (1957 р.) запропонував класифікацію хроматографії лише на основі агрегатного стану обох фаз. Чітко розмежувати окремі види хроматографії неможливо.

### 3. Класифікації методів хроматографічного аналізу

Хроматографічні методи різноманітні, єдиної класифікації для них немає. Найбільш відомі три класифікації методів хроматографічного аналізу:

1. За типом контактуючих фаз, або, точніше, за агрегатним станом рухомої фази.
2. За природою процесів, що відбуваються при розділенні, або за механізмом розділення.
3. За технікою проведення процесу розділення.

За типом контактуючих фаз розрізняють наступні методи хроматографії:

1. Газова хроматографія, в якій рухомою фазою є газ. Якщо нерухомою фазою є тверда фаза, то маємо газо-твердофазну хроматографію (ГТХ), а якщо нерухомою фазою є рідка фаза, то маємо газо-рідинну хроматографію (ГРХ).
2. Рідинна хроматографія, в якій нерухомою фазою є рідина. В рідинній хроматографії нерухомою фазою може бути тверда фаза (рідинно-твердофазна хроматографія РТХ) або рідина (рідинно-рідинна хроматографія – РРХ).

Класифікація методів хроматографічного аналізу за природою процесів, що відбуваються при розділенні речовин, наведена в таблиці.

*Таблиця 1*

**Класифікація методів хроматографічного аналізу  
за природою процесів, що відбуваються при розділенні речовин**

Процес, що відбувається при розділенні речовин	Тип хроматографії
Адсорбція	Адсорбційна
Абсорбція (процес поглинання газів, парів всією масою поглинача)	Розподільна
Іонний обмін	Іоннообмінна
Утворення осадів	Осадова
Окисно-відновний процес	Окисно-відновна
Процес комплексоутворення	Адсорбційно-комплексоутворювальна
Процес проникнення молекул через структуру гелю. При цьому молекули диференціюються за розміром та масою	Гель-проникаюча

За технікою проведення процесу розділення розрізняють:

- колонкову хроматографію;
- площинну (паперову та тонкошарову) хроматографію;

– капілярну хроматографію.

Класифікувати види хроматографічного аналізу можна також за методикою виконання хроматографічного розділення, виходячи з властивостей рухомої фази (елюента).

За методикою виконання хроматографічного розділення розрізняють фронтальну, елюентну і витискувальну хроматографію. При фронтальному аналізі рухомою фазою є сама проба, що аналізується. Під час фронтального аналізу досліджувану суміш (рідину або газ) безперервно подають у хроматографічний шар до появи проскоку суміші, що розділяють.

У даному методі повне розділення речовин на окремі компоненти не досягається, тому фронтальний аналіз не використовується для препаративного розділення і кількісного визначення речовин. Фронтальний аналіз застосовується для очистки речовин від домішок, якщо ці домішки сорбуються краще, ніж речовина, що очищується.

В елюентній (проявній) хроматографії розчинник компонентів суміші, яку розділяють, повинен слабше утримуватись адсорбентом (нерухома тверда фаза), ніж компоненти, що розділяються. Проходячи через колонку, розчинник тягне за собою слабше сорбовані речовини. Таким чином, в елюентній хроматографії рухома фаза виконує тільки транспортну функцію по відношенню до розчиненої речовини.

Під час ступінчастого елюювання застосовують послідовно кілька елюентів. Кожний наступний елюент є більш ефективним до речовини, що елююється. Така методика дозволяє прискорити елюювання компонентів, що міцно утримуються сорбентом.

Суттєвою перевагою елюентної хроматографії є можливість здійснення повного розділення усіх компонентів суміші, так як між кожним із компонентів, що вимиваються, утворюється зона чистого розчинника. Можна розділити на окремі компоненти навіть найбільш складні суміші. Завдяки високій ефективності розділення, елюентний метод є найбільш розповсюдженим методом хроматографічного аналізу. Недолік методу полягає в тому, що внаслідок значного розведення розчинником концентрація компонентів після розділення стає у багато разів меншою, ніж початкова.

Під час витискувального аналізу застосовують елюенти, які мають більшу спорідненість до нерухомої фази, ніж розчинена речовина.

#### **4. Хроматографічна система та представлення результатів хроматографії**

Хроматографічна система складається із хроматографа, детектора, пристрою, що реєструє піки окремих компонентів.

Деякі види хроматографічного аналізу здійснюються за допомогою приладів, які називаються хроматографами. Хроматографи використовують для аналізу та препаративного розділення суміші речовин.

Основним конструктивним елементом хроматографа є колонка, заповнена нерухомою фазою (сорбентом), через яку при відповідній температурі



прокачується рухома фаза (елюент), змішана з досліджуваною сумішшю.

В хроматографічній колонці проходить розділення первинної багатокомпонентної суміші на ряд бінарних сумішей, які складаються з газу-носія (в газовій хроматографії) або рідини-носія (в рідинній хроматографії) та одного з компонентів суміші.

Прийнято вважати, що найбільша ефективність колонки досягається в тому випадку, коли швидкість проходження рухомої фази через шар сорбенту приблизно дорівнює швидкості молекулярної дифузії в пори часток сорбенту. Коефіцієнт дифузії розчиненої речовини в рухомій фазі залежить від типу сорбенту та властивостей розчинника. Дифузія в колонці тим більша, чим менша в'язкість розчинника і чим менший розмір молекул розчиненої речовини.

Для газової хроматографії використовуються U-подібні або закручені в спіраль трубки, виготовлені із нержавіючої сталі, міді, іноді фторопласту. Внутрішній діаметр колонки газового хроматографа може бути від 2 до 15 мм, а довжина 1-50 м. Колонку наповнюють нерухомою фазою (сорбентом) і за допомогою спеціальних термостатів підтримують задану температуру до 50 °С (з точністю до 0,05 – 1°С) протягом усього процесу хроматографії. Нерухома фаза (сорбент) виконує функцію поділу суміші на індивідуальні компоненти, рухома фаза рухається всередині колонки за рахунок перепаду тиску.

Селективність (здатність до розділення) колонки залежить від характеру взаємодії окремих компонентів суміші з нерухомою фазою. Така взаємодія може бути неполярною (за рахунок сил Ван-дер-Ваальса) або специфічною полярною.

Сили Ван-дер-Ваальса – це сили електростатичної взаємодії молекулярних оболонок. Вони відповідають за міжмолекулярну взаємодію між всіма видами молекул і виникають у результаті фундаментального розподілу між позитивними зарядами ядра атома (протонами) та негативними зарядами (електронами), що розподілені по всьому простору, який займає молекула. Енергія таких сил досить незначна – від 0,419 до 4,19 кДж/моль.

При аналізі розділені в колонці хроматографа речовини разом з елюентом потрапляють через різні проміжки часу у встановлений на виході із хроматографічної колонки детектор – пристрій, що реєструє концентрацію і час виходу окремих компонентів з колонки.

Детектор – це обладнання, призначене для виявлення в потоці елюату, що виходить з колонки, індивідуальних компонентів за якими-небудь фізико-хімічними властивостями. Зміну властивостей речовини детектор перетворює в електричний сигнал. Сигнал таких детекторів пропорційний миттєвій зміні значення якої-небудь властивості газового потоку, а його аналоговий запис має вигляд піка. Хроматограма представляє собою ряд піків, причому кількість кожного компонента пропорційно площі відповідного піка.

В рідинній хроматографії використовують оптичні детектори: абсорбційні 190 – 380 нм, 380 – 800 нм, інфрачервоні 800 – 5000 нм, рефрактометричні, емісійні, флуориметричні, хемолюмінісцентні.

Ультрафіолетовий детектор визначає залежність ступеня поглинання

світла від концентрації проби в проточній кюветі. Інфрачервоний – для ідентифікації природи органічних сполук, тому що більшість груп органічних речовин мають характеристичні спектри поглинання. Принцип дії рефрактометричного детектора оснований на диференціальній зміні показника заломлення чистого розчинника та аналізованого розчину.

Принцип дії флуориметричного детектора полягає на випромінюванні поглинання світла у вигляді флуоресценції. Поглинання звичайно проводять в УФ-області при довжині хвилі максимального поглинання для даної групи речовин.

Отриману в результаті реєстрації детектором вихідну криву називають хроматограмою. Для якісного хроматографічного аналізу визначають час від моменту введення проби до часу виходу кожного компонента з елюенту. Кількісний аналіз базується на визначенні висоти та площі хроматографічних піків з урахуванням коефіцієнтів чутливості детектора до аналізованих речовин.

Відповідно до агрегатного стану рухомої фази розрізняють газові і рідинні хроматографи.

Основними системами будь-якого газового хроматографа є колонка і детектор. Хроматографічна колонка розділяє, а детектор кількісно визначає компоненти газової суміші, що проходять через неї.

Детектори поділяють на диференційні й інтегральні. Диференційні детектори реєструють зміни теплопровідності газу, інтегральні – підсумовують зміни за певний час.

Термокондуктометричні детектори, які вимірюють теплопровідність називаються катарометрами. У катарометрі чутливим елементом є вольфрамова нитка, що нагрівається постійним струмом. Газ-носіє, безперервно протікаючи над нею, відводить тепло з постійною швидкістю. Якщо в газовій суміші над нагрітою ниткою з'являються молекули аналізованої речовини, то швидкість відводу тепла, температура та електричний опір нитки змінюються. Зміна електричного опору нитки пропорційна концентрації компонента в газовій суміші. Різниця в показах до і після проходження якого-небудь компонента реєструється електричною схемою. Цей детектор практично універсальний та дозволяє визначити концентрацію речовини в межах 0,1 – 0,01%. Принцип роботи детектора по теплопровідності або катарометра оснований на процесі передачі тепла від нагрітого чутливого елемента до більш холодного корпусу детектора за рахунок теплопровідності газового потоку. Зі зміною складу газового потоку змінюється його теплопровідність, тобто кількість тепла, що поступає на чутливий елемент. Це, у свою чергу, призводить до зміни температури, а, отже, і електричного опору чутливого елемента.

Головною частиною іонізаційних детекторів є іонізаційна камера, де відбувається іонізація молекул, що потрапляють у неї з потоком газу-носія із хроматографічної колонки. Іонізацію досліджуваних речовин здійснюють у полум'ї водню, атомами аргону або гелію, повільними електронами. Іони під впливом напруги переміщуються в іонізаційній камері, що призводить до виникнення електричного струму.

Детектор електронного захоплення є селективним детектором, що найчастіше використовується в газовій хроматографії та з метою визначення сполук, які володіють більшою спорідненістю до електронів.

В основі полум'яно-іонізаційних детекторів лежить залежність електричної провідності іонізованого газу від його складу. Сигналом детектора є зміна іонного потоку, спричинена введенням у детектор аналізованої речовини. Газ-носіє у суміші з аналізованими компонентами та воднем подається у форсунку пальника, де відбувається іонізація. Детектор являє собою камеру, у якій підтримується полум'я, що є джерелом іонізації. У камеру вводяться необхідні для підтримки полум'я водень і повітря.

Інфрачервоні детектори. Інфрачервона спектроскопія широко застосовується в хімічному аналізі у комбінації з газовою хроматографією. Отриманий інфрачервоний спектр поглинання можна розглядати як індивідуальну характеристику тої чи іншої сполуки й використовувати для її ідентифікації.

Мас-селективний детектор. Мас-спектрометр розглядається як відмінний детектор для газової хроматографії. Отримані з його допомогою спектри надають інформацію про якісний склад проби. При бомбардуванні електронами молекул речовини у газоподібному стані зв'язки в молекулах розриваються й утворюються іони. Вид і кількість фрагментів, що утворюються, характерні для даної молекули. При накладанні магнітного поля рух позитивно заряджених часток прискорюється й відбувається по вигнутих траєкторіях, радіус кривизни яких пропорційний кореню квадратному маси іона. В магнітному полі з постійною напругою потік іонів, що містить іони з ідентичним співвідношенням маса/заряд, потрапляє на колектор. Тут при розряді іонів виникає струм, пропорційний відносній кількості іонів з відповідною масою. Зміни магнітного поля поступово переводять на колектор потоки іонів з іншим співвідношенням маса/заряд.

Детектор по щільності. Робота цього детектора основана на вимірюванні тиску у вертикальній трубці, заповненій газом, що виходить із хроматографічної колонки, при потраплянні в неї разом з газом-носієм аналізованого компоненту. Зміна тиску в цьому каналі пропорційна зміні щільності газового потоку.

Точність і швидкість при аналізі суміші в хроматографі в значній мірі залежать від правильного вибору робочого режиму детектора та умов експерименту (тип сорбенту, температура, швидкість газу-носія, довжина хроматографічної колонки).

Джерело газу-носія – це балон із стислим або зрідженим газом, що перебуває під тиском до 120 атм. Найчастіше при хроматографії використовують гелій, азот, водень та інші гази.

У рідинному хроматографі суміш, що аналізується в розчині, за допомогою газового шприца, мікрошприца або мікродозатора вводиться в верхню частину хроматографічної колонки. За допомогою насоса суміш прокачується елюентом через хроматографічну колонку, в якій проходить розділення суміші на окремі компоненти. Елюат, що витікає з колонки, містить

окремі компоненти суміші, які подаються на детектор. Покази детектора реєструються регістратором. У якості детектора у рідинному хроматографі використовується проточний рефрактометр, що включається за диференціальною схемою, або детектор поглинання в ультрафіолетовій області. Подачу рухомої фази розчинника здійснюють при використанні систем, що створюють тиск до  $50 \text{ Мн/м}^2$ . Проба вводиться за допомогою мікрошприца або крана. Хроматографічна колонка у рідинному хроматографі має довжину не більше 1 м. Порівняно з детекторами газових хроматографів детектори рідинних хроматографів мають суттєво меншу чутливість (приблизно на 2 порядки).

Щоб точно виміряти концентрацію компоненту, детектори калібрують сумішами відомого складу. Для градування приладу готують штучну суміш метанолу та етилового спирту.

В результаті процесів, що проходять в детекторі, фіксується якісна та кількісна характеристика компонентів, які розділилися в колонці. Перетворені в електричний сигнал ці процеси записуються у вигляді кривої, яка називається хроматограмою. Залежність концентрації компонентів розділюваної суміші на виході з колонки від часу, що пройшов з початку розділення, виражається графічно хроматограмою, а концентраційні профілі компонентів на ній називають хроматографічними піками.

Профіль хроматографічної зони (форма піків) описується за допомогою математичної функції  $y=f(x)$  розподілення Гауса, яка має вигляд колоколоподібної кривої, схожої на симетричну хроматографічну зону.

З позицій кінетичної теорії припускається факт збігу форми хроматографічного піка з гаусовою кривою.

Якщо розділення у колонці відбулося, то кожному піку на хроматограмі відповідає одна індивідуальна речовина з суміші. Площа, обмежена піком і базовою лінією, є кількісним результатом вмісту даного компонента в суміші.

Кожному піку на хроматограмі відповідає час, що пройшов від моменту початку розділення, до вершини піка, тобто до досягнення максимальної концентрації компонента на виході із колонки.

Для одержання кількісних характеристик розділення, хроматограму обробляють, тобто проводять ряд вимірів і розрахунків.

## Лекція №6-7

### РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

#### Питання:

1. Сутність методу рідинної хроматографії
2. Рідинна колонкова хроматографія
3. Високоєфективна рідинна хроматографія
4. Гель-хроматографія
5. Площинні варіанти рідинної хроматографії

#### 1. Сутність методу рідинної хроматографії

Рідинна хроматографія (РХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухомою фазою є рідина. В рідинній хроматографії нерухою фазою є або тверда фаза (рідинно-твердофазна хроматографія, РТХ), або рідина (рідинно-рідинна хроматографія, РРХ), або гель (рідинно-гелева хроматографія).

Рідинна хроматографія, як хроматографічний метод розділення сумішей, що використовує рідинну рухому фазу, історично виникла першою (була запропонована ще першовідкривачем хроматографії М. С. Цветом) і дотепер є найбільш універсальним та розповсюдженим видом хроматографії.

За природою процесів, які відбуваються при розділенні компонентів, рідинна твердофазна хроматографія є адсорбційною, рідинно-рідинна хроматографія є розподільною, а рідинно-гелева хроматографія включає гель-проникаючу (ексклюзійну) і іонообмінну хроматографію. Наприклад, розділення хлорофілу – приклад адсорбційної рідинно-твердофазної хроматографії. Як правило, у хроматографії рідко здійснюється який-небудь один механізм розділення – адсорбція, розподілення, іонний обмін або ексклюзія; часто розділення відбувається одночасно за декількома механізмами.

В рідинній хроматографії для розділення використовують колонку та техніку площинної хроматографії (паперової і тонко-шарової хроматографії).

В класичному колонковому варіанті рухома фаза проходить через колонку з нерухою фазою тільки під дією сили тяжіння і процес розділення речовин займає багато часу.

Класичний колонковий варіант до цих пір застосовують у лабораторній практиці для препаративних цілей і демонстраційних експериментів, оскільки він не потребує дорогого обладнання.

У високоєфективній рідинній хроматографії (ВЕРХ) завдяки використанню сорбентів з малим розміром зерен 10–30 мкм, нагнітальних насосів і чутливих детекторів процес проходить швидко та ефективно. Високоєфективна рідинна хроматографія отримала дуже широке застосування для розділення та виявлення молекул (адсорбційна та розподільна хроматографія), для розділення та виявлення іонів в іонній хроматографії, для розділення макромолекул (ексклюзійна хроматографія).

Сорбція компонентів з рухомої фази в газовій та в рідинній хроматографії відбувається по-різному. На відміну від газу, який виконує лише транспортну функцію і не сорбується нерухою фазою, рідинна рухома фаза є активним елюентом, молекули якої можуть сорбуватися на поверхні. Під час проходження через колонку молекули компонентів, що аналізують, повинні витіснити елюент з поверхні сорбенту, що призводить до зменшення енергії взаємодії молекул аналізованих речовин з поверхнею сорбенту.

Методами рідинної хроматографії можна аналізувати відносно великі проби незалежно від леткості та термічної стабільності. До недоліків рідинної хроматографії можна віднести обмежене коло детектуючих систем.

## 2. Рідинна колонкова хроматографія

*Рідинно-твердофазна (адсорбційна) колонкова хроматографія.*

Рідинна адсорбційна хроматографія базується на теорії адсорбції з розчину.

Селективність адсорбції залежить від природи сил взаємодії між речовиною, що адсорбується, і адсорбентом.

Ефективність хроматографічної колонки залежить, головним чином, від процесів дифузії та масопередачі в обох фазах і визначається, як і в газовій хроматографії, висотою  $H$ , еквівалентною теоретичній тарілці. Чим більше глибина пор у адсорбенту, тим більша  $H$  а, отже, менша ефективність колонки. Велика глибина пор у адсорбентів класичної рідинної адсорбційної хроматографії була однією з основних причин її низької ефективності.

В адсорбційному варіанті рідинної хроматографії залежно від полярності нерухомої та рухомої фаз виділяють нормально-фазову (НФХ) та обернено-фазову (ОФХ) хроматографії.

Нерухомі фази. В НФХ використовують полярний адсорбент (силікагель,  $Al_2O_3$ , оксиди металів) і неполярні рухомі фази (органічні розчинники бензен, толуен, тетрахлорометан або суміші розчинників).

Нормально-фазову хроматографію частіше за все застосовують для розділення органічних речовин. Недолік полярних адсорбентів – висока чутливість до вмісту води у розчинниках.

В ОФХ використовують неполярний адсорбент (графітована сажа, кизельгур, гідрофобізований силікагель) та полярні рухомі фази (вода, метанол, ацетонітрил).

Окрім зазначених сорбентів використовують поверхнево-пористі носії. Це можуть бути жорсткі непористі носії (наприклад, скляні кульки), покриті тонким пористим шаром активного полярного або неполярного сорбенту. Такі сорбенти чинять малий опір потоку, за рахунок чого збільшується швидкість аналізу.

Рухомі фази. В рідинній хроматографії природа рухомих фаз має суттєво більше значення, ніж в газовій.

Рухома фаза в рідинній хроматографії виконує подвійну роль: 1) забезпечує перенос десорбованих молекул уздовж колонки (подібно до рухомої

фази в газовій хроматографії); 2) регулює константи рівноваги, і, відповідно, й селективність колонки в результаті взаємодії з нерухою фазою (сорбуючись на поверхні) і з молекулами речовин, що розділяються, під час розчинення проби. Ця особливість рідинної адсорбційної хроматографії дуже важлива, адже дозволяє регулювати хроматографічний процес для створення оптимальних умов розділення. Тому вибір рухомої фази в рідинній хроматографії часто буває важливішим, ніж вибір нерухомої.

Елюювальна здатність рухомої фази (елюююча сила розчинника) може бути охарактеризована різними параметрами. Найчастіше використовують відносну енергію взаємодії молекул рухомої фази з поверхнею адсорбенту, яка показує, у скільки разів енергія сорбції даного елюента більша, ніж енергія сорбції елюента, обраного як стандарт (шкала Гільдебранда). Розташування індивідуальних розчинників в порядку зростання їх елююючої сили називають елюотропним рядом. За розташуванням розчинників (елюентів) в елюотропному ряді їх ділять на сильні і слабкі.

Для елюювання зазвичай застосовують не індивідуальні розчинники, а їх суміш, наприклад 30% метанолу та 70% води. Під час застосування ізократичного методу елюювання працюють з елюентом постійного складу. Краще розділення досягається з використанням градієнтного елюювання. При цьому склад елюента змінюється за певною програмою. Наприклад, у водно-метанольному елюенті частка метанолу збільшується до 70%.

В результаті комбінації обмеженого числа сорбентів та необмеженого числа різних за складом рухомих фаз можливо вирішити надзвичайно велику кількість задач, що зустрічаються на практиці.

Колонки. Матеріал, з якого виготовляють колонки, визначається властивостями суміші, яку аналізують, та рухомої фази. Частіше за все застосовують скляні колонки. Вони являють собою різного розміру скляні трубки з пористою опорою для сорбенту.

Дуже велике значення має правильний вибір розмірів колонки. Довгі колонки збільшують час розділення, на коротких може не відбутися розділення суміші. Важливе і співвідношення між довжиною і діаметром колонки. Оптимальними відношеннями висоти колонки до діаметру вважаються 10 : 1 – 20 : 1. Зазвичай діаметр колонок складає ~ 1 см. Колонка повинна бути встановлена вертикально і жорстко фіксована в штативі. Елюент через колонку пропускають зі швидкістю приблизно 1 см<sup>3</sup>/хв. До цих пір значну кількість розчинів, отриманих в результаті розподілу методами рідинної хроматографії, детектують окремими порціями. Фракції елюату збирають вручну або за допомогою автоматичного колектора фракцій і визначають в них вміст речовин спектрофотометричним, титриметричним або іншим методом. Часто для елюювання кожного компонента зразка потрібно не менше 25 см<sup>3</sup> елюату, тобто виділення одного компонента зразка триває приблизно півгодини.

Рідинна адсорбційна хроматографія широко застосовується в технології та аналізі органічних речовин. Цим методом вивчають склад нафти, гасу, вуглеводнів, ефективно розділяють цис- і транс-ізомери, алкалоїди тощо.

Адсорбційну рідинно-твердофазну хроматографію використовують для

розділення важкорозчинних у воді неполярних сполук, розчинних термічно нестійких органічних речовин, вітамінів, нуклеїнових кислот, пестицидів тощо.

На сьогодні метод колонкової хроматографії швидко розвивається. Було запропоновано чимало удосконалень, що стосуються насадки (наповнювача) для колонок, пристосувань для створення постійного тиску та постійної швидкості потоку рідинної фази, а також автоматизації методів детектування компонентів сумішей, що розділяють.

Адсорбційну рідинно-твердофазну хроматографію можна проводити не лише в колонці, але і в тонкому шарі (тонкошарова хроматографія).

*Рідинно-рідинна (розподільна) колонкова хроматографія.*

Рідинно-рідинна хроматографія (РРХ) заснована Мартіном у 1942 року. Нерухомою фазою є тонка плівка із рідини, що не змішується, яка нанесена на тверду фазу (носій), як в газо-рідинній хроматографії. За механізмом розділення РРХ є розподільною (абсорбційною) хроматографією. Розділення обумовлене різними коефіцієнтами розподілу (D) компонентів, що розділяються, між двома рідинами, що не змішуються, подібно до того, як це відбувається в протитечній (багатократній, ступінчатій) екстракції.

Рідинно-рідинна хроматографія може проводитись в колонці (колонковий варіант) і на папері (паперова хроматографія або хроматографія на папері).

Для отримання колоночних розподільних хроматограм в колонку вносять інертну тверду речовину – «носій», потім просочують носій розчинником і таким чином закріплюють (імобілізують) нерухому рідку фазу на носії. Імобілізовані рідини утримуються на носії за рахунок фізичної адсорбції. Якщо носій – гідрофільна речовина (силікагель), то на ньому закріплюють полярну рідину (воду або триетиленгліколь), тоді рухомою фазою буде менш полярний або неполярний органічний розчинник (гексан, хлороформ, бутиловий спирт та ін.).

Хроматографія, в якій використовується полярна нерухома фаза і менш полярна рухома фаза, називається нормально-фазовою розподільною хроматографією. Якщо ж носій – гідрофобна речовина, то нерухома фаза – неполярна органічна речовина (наприклад, вуглеводні), рухомою фазою буде полярна органічна речовина (метиловий спирт, або вода чи інші розчинники). Такий варіант хроматографії називається обернено-фазовою розподільною хроматографією.

Потім в колонку вводять розчин, що містить речовини, які розділяють, у відповідному розчиннику. Компоненти, що розділяються, не повинні взаємодіяти з носієм. Розділення проводиться шляхом неперервних процесів розподілу речовин, що аналізують, між двома розчинниками (рухомою і нерухомою фазою). Та речовина, яка краще розчиняється в рухомому розчиннику, ніж в нерухомому, переміщується вниз колонки швидше порівняно з іншими речовинами. В решті решт отримується хроматограма, що містить просторово розділені зони компонентів суміші, які аналізують.

Зазвичай розчинність компонентів проби в рухомій і нерухомій рідких фазах, які володіють різною полярністю, сильно відрізняється. Якщо розчинність проби вища в нерухомій фазі, то значно зростає час утримування



компонентів, якщо розчинність вища в рухомій фазі, то час утримування може бути близьким до часу утримування компонента, що не сорбується (мертвому часу). Щоб отримати хороше розділення, в рухому фазу, насичену нерухоною, включають третій компонент, який зменшує різницю в полярності рухомої і нерухомої фаз. Наприклад, до суміші із полярного (вода) і неполярного (гексан) розчинників додають етанол. Такі потрійні системи дозволяють отримати набір фаз, які не змішуються, з різною селективністю, і через це вони отримали широке застосування в рідинно-рідинній хроматографії.

Щоб попередити процеси взаємного розчинення рідин рухомої та нерухомої фаз під час хроматографування, рухому фазу попередньо насичують нерухоною. Навіть при такій обережності в рідинно-рідинній хроматографії не можна використовувати градієнтне елюювання.

Більш важливим з практичної точки зору є модифікування носія за допомогою хімічної реакції; при цьому отримують хімічно (ковалентно) закріплені рідкі фази.

Носії з закріпленими на їх поверхні рідкими фазами випускаються промисловістю. Носії з твердими інертними ядрами, які вкриті оболонкою рідкої фази, мають більшу перевагу при хроматографуванні, оскільки хроматографічний розподіл відбувається тільки в поверхневому шарі частинки (товщиною до 1 мкм), що перешкоджає захопленню рухомої фази порами зерен носія.

### **3. Високоєфективна рідинна хроматографія**

Збільшити швидкість розділення і підвищити ефективність методу колонкової рідинної хроматографії можна проводячи хроматографічне розділення в довгих вузьких колонках (діаметр 2–6 мм, довжина 0,5–1,0 м) під високим тиском (від 2 до 40 МПа), застосовуючи неперервне детектування. Цей метод, який отримав назву рідинна хроматографія високого тиску (швидкісна рідинна хроматографія або високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)), почав розвиватись на початку 70-х років. У даному методі можуть бути реалізовані майже всі механізми розділення, що використовуються у хроматографії: адсорбція, розподіл, іонний обмін, ексклюзія. Сучасні рідинні хроматографи забезпечують достатньо високу швидкість аналізу, високу ефективність колонки, можливість розділяти будь-які речовини, крім газів. Нижня межа виявлення речовини складає  $10^{-9} - 10^{-10}$  г.

Насос високого тиску створює регульований потік елюенту крізь колонку. Шприцем в потік елюенту вводиться проба, яку аналізують. Поток елюенту проба переноситься в колонку, де розділяється на компоненти. Колонку виготовляють із скла, нержавіючої сталі, алюмінію, тефлону або інших матеріалів. Вибір розміру колонки залежить від конкретних завдань хроматографічного розділення. Її діаметр може складати 1–6 мм, довжина – від декількох сантиметрів до декількох метрів.

Після виходу з колонки потік надходить у детектор, де реєструється оптична густина або показник заломлення кожного компонента суміші.

Хроматографічні піки записуються електронним автоматичним пристроєм.

Детектори, що застосовуються в рідинній хроматографії, призначені для безперервного визначення концентрації розчиненої речовини в рухомій фазі на виході її з колонки. Вони бувають трьох типів: 1. Детектори, що вимірюють на виході з колонки зміну яких-небудь фізичних властивостей розчинника, зумовлених присутністю в ньому сторонньої речовини. До цього типу відносяться рефрактометричний детектор, детектор за електричною провідністю, діелектричною проникністю тощо. 2. Детектори, чутливі до таких фізичних властивостей розчиненої речовини, яких немає у рухомій фазі. Це спектрофотометричний, полярографічний детектор тощо. 3. В детекторах транспортного типу розчин після хроматографічної колонки потрапляє на транспортну стрічку, яка рухається неперервно і подається в піч, де відбувається випаровування елюенту. Залишок на стрічці переносять в реактор, де він перетворюється в летку сполуку, яка далі аналізується методом газової хроматографії, наприклад, використовуючи іонізацію в полум'ї.

#### 4. Гель-хроматографія

Рідинно-гелева хроматографія (РГХ) – процес і метод розділення сумішей, що ґрунтується на розподілі речовини між двома фазами, в якому рухомою фазою є рідина, а нерухомою фазою є гель. Рідинно-гелева хроматографія включає гель-проникаючу (ексклюзійну) хроматографію і іонообмінну хроматографію.

Гель-проникаюча хроматографія – розділення, засноване головним чином на ефектах проникнення молекул через структуру набряклого гелю. При цьому молекули диференціюються за розміром та масою. Гель-проникаючу хроматографію називають ще молекулярно-ситовою хроматографією або просто гель-хроматографією.

Гель-хроматографія – особливий різновид рідинної хроматографії, в якій розділення компонентів засновано на розподілі молекул в залежності від їх розміру (а також частково в залежності від їх форми і полярності) між розчинником, що знаходиться в порах сорбенту, і розчинником, який протікає між його частинками. На відміну від всіх методів рідинної хроматографії, розглянутих раніше, гель-хроматографія не заснована ні на якій фізичній або хімічній взаємодії з нерухомою фазою.

У процесі розділення молекули з діаметром більшим, ніж середній діаметр пор сорбенту, не можуть проникнути в пори сорбенту і вимиваються з колонки рухомою фазою першими.

Молекули з діаметром меншим, ніж пори сорбенту, проникають в нього і залишаються в нерухомій фазі деякий час, тому елюються останніми. Молекули середнього діаметру проникають в пори сорбенту в залежності від розміру і, частково, форми молекул. Вони елюються з різним часом утримування між піками двох крайніх випадків. Тому гель-хроматографію називають молекулярно-ситовою.

Гель-хроматографія може бути виконана не тільки в колонковому

варіанті, але і у тонкому шарі.

Гелі, які використовують на практиці, зазвичай ділять на м'які, напівтверді і тверді.

М'якими гелями є високомолекулярні органічні сполуки з незначним числом поперечних зв'язків. При набряканні в воді вони значно збільшують власний об'єм. Вони використовуються для розділення сумішей низькомолекулярних речовин, часто в тонкошаровому варіанті. Хроматографування на м'яких гелях, які набрякають у воді, називається гель-фільтрацією.

Напівтверді гелі отримують шляхом полімеризації. Оскільки дані матеріали є гідрофобними, їх можна використовувати тільки в комбінації з неполярними рухомими фазами. Такі гелі, що набрякають в органічному розчиннику, нестійкі до тиску. У даний час доступні також гідрофільні гелі.

До твердих гелів відносять силікагелі і пористе скло. Ці матеріали стійкі при високих температурах і тиску. Недолік таких матеріалів – висока адсорбційна активність, тому їх поверхню зазвичай інактивують силанізацією.

Вибір рухомої фази залежить від типу нерухомої фази, що використовується. Якщо сорбенти гідрофільні, то використовуються водні елюенти, які містять, як правило, буферний розчин для підтримки рН. Якщо сорбенти гідрофобні, то використовуються неполярні органічні розчинники.

Рухома фаза в гель-хроматографії повинна розчиняти усі компоненти суміші, змочувати поверхню гелю і не адсорбуватися на ній.

Детектування в гель-хроматографії можна проводити за допомогою детекторів з відгуком, пропорційним концентрації.

Для високомолекулярних речовин як спеціальний детектор зазвичай використовують проточний віскозиметр. При цьому вимірюється фонові в'язкість елюента. При проходженні через детектор високомолекулярної сполуки, що визначається, в'язкість збільшується і результируючий сигнал реєструється у вигляді піка.

Гель-хроматографію широко використовують при дослідженні полімерів, визначенні їх молекулярних мас, а також в біології і медицині для аналізу білків, крові і інших об'єктів. Даний метод можна використовувати і в неорганічному аналізі.

Змінюючи склад розчинника, а, отже, і здатність гелю до набрякання, можна проводити більш «тонкі» розділення. Оскільки проба, як правило, не вступає у фізичні і хімічні взаємодії з нерухою фазою, її компоненти елюються без втрат. Отже, даний метод придатний і для препаративного розділення.

Однак, даним методом не можуть бути розділені речовини з близькими розмірами молекул, наприклад ізомери. Вважається, що розділення може бути успішним при розходженні молекулярних мас як мінімум на 10%.

Таким чином, ексклюзія (утримування речовин порами набряклого гелю) використовується для розділення речовин як в класичному варіанті, так і в високоефективній рідинній хроматографії (ВЕРХ).

## 5. Площинні варіанти рідинної хроматографії

Площинна хроматографія – хроматографічне розділення, яке проводять на спеціальному папері (паперова хроматографія) або в тонкому шарі сорбенту, що наноситься на якусь основу, наприклад, на скляну або алюмінієву пластинку (тонкошарова хроматографія).

Хроматографічне розділення в площинних варіантах хроматографії обумовлено, як і в колонці, перенесенням компонентів рухомої фази вздовж шару нерухомої фази з різними швидкостями у відповідності з коефіцієнтами розподілу компонентів, які розділяють.

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) є рідинно-твердофазною адсорбційною хроматографією, в якій сорбент знаходиться у вигляді тонкого шару на пластинці, тобто тонкошарова хроматографія є модифікованою формою рідинно-твердофазної хроматографії.

Носієм нерухомої фази в паперовій хроматографії є смужки фільтрувального паперу, який не містить мінеральних речовин (хроматографічний папір). Розділення речовин відбувається внаслідок розподілу їх між водною фазою, що міститься в целюлозі, і рухомою фазою. У нерухомій фазі речовина може утримуватися не тільки через розчинення в адсорбованій папером воді, але і адсорбуватися папером.

Метод хроматографії на папері в експериментальному відношенні (і, до певної міри, теоретичному) близький до методу ТШХ. На смужку хроматографічного паперу наносять краплю водного розчину, що містить речовини, які розділяють. Папір підвішують в закритій камері, при цьому її край опускають в посудину з розчинником. Через деякий час папір висушують та «проявляють» реагентом, що для нього підходить, щоб отримати різні забарвлені сполуки.

Папір для хроматографії, що випускається промисловістю, складається з пучків волокон целюлози, молекули якої поєднані між собою водневими зв'язками. В волокнах целюлози міститься незначна кількість зв'язаної води, а в проміжках між волокнами знаходиться значно більша кількість води.

Хроматографія на папері, в якій розчинник рухається знизу вгору під дією капілярних сил, називається висхідною. У висхідній хроматографії розчинник, поглинаючись папером, піднімається вгору. Кожен з компонентів суміші, що розділяється, розподіляється між нерухомою та рухомою фазами по різному, тому і швидкості руху речовин, що розділяються, в напрямі руху розчинника будуть різні.

При низхідній хроматографії рухома фаза, що міститься у верхній частині камери, під дією гравітаційних сил рухається донизу по паперу.

Радіальну хроматографію виконують в камері, що складається з двох основ чашок Петрі рівного діаметра, між якими поміщають паперовий диск трохи більшого діаметру. У нижню частину камери наливають розчинник.

При хроматографуванні з «хвостиком» вирізають по радіусу паперового диску смугу шириною 2–3 мм, загинають її перпендикулярно диску і опускають у розчинник.

Для отримання хроматограми з «гнотиком» пришивають одним-двома стібками до центру диска паперовий джгутик з смуги паперу шириною 4–5 мм.

Крапля розчину, що аналізується, наноситься в центр паперового диску.

Компоненти, що розділяються, розташовуються навколо центру диска кільцями різного діаметру, які мають форму еліпсів, так як швидкість всмоктування розчинника залежить від напрямку волокон паперу. При проявленні хроматограми проводять капілярами з відповідними реагентами від центру диска по радіусу. Можна розрізати диск на сектори і обробити кожний сектор окремим реагентом.

Елюент в паперовій хроматографії вибирають виходячи з механізму розділення і, в першу чергу, в залежності від природи нерухомої фази. При використанні чистого (неімпрегнованого) паперу елюентом може бути будь-яка рідина, в якій розчиняється суміш, що аналізується, і яка здатна до переміщення по паперу. Найчастіше за все використовують суміш води і органічних розчинників.

Іноді одним розчинником не вдається розділити всі речовини в суміші, тоді розділення проводять не одномірною, а двовимірною хроматографією. Для цього папір, на який нанесена крапля розчину (що містить суміш речовин), спочатку опускають однією стороною в один розчинник і проводять розділення; потім після висушування повертають папір на  $90^\circ$  і опускають іншою стороною в інший розчинник. Цей спосіб дозволяє розділяти близькі за властивостями суміші. Двовимірну хроматографію використовують також і в ТШХ.

## Лекція №8

### ТОНКОШАРОВА ТА ЕЛЕКТРОХРОМАТОГРАФІЯ

#### Питання:

1. Тонкошарова хроматографія
2. Електрохроматографія

#### 1. Тонкошарова хроматографія

Тонкошарова хроматографія (ТШХ) є рідинно-твердофазною адсорбційною хроматографією, в якій сорбент знаходиться у вигляді тонкого шару на пластинці, тобто тонкошарова хроматографія є модифікованою формою рідинно-твердофазної хроматографії.

Метод ТШХ розроблений ряданськими вченими М. А. Ізмайловим і М. С. Шрайбер у 1938 р. в Українському інституті експериментальної фармації м. Харків.

Для вирішення ряду задач тонкошарове розділення проводять, спираючись не тільки на адсорбцію, а й на розподіл (нормально-фазовий або обернено-фазовий), іонний обмін, ексклюзію.

У методі тонкошарової хроматографії нерухома тверда фаза наноситься тонким шаром (100–300 мкм) на скляну, полімерну пластинку-підкладку або металеву пластинку із фольги. У ТШХ розрізняють методи висхідної, низхідної і горизонтальної хроматографії, що залежать від напрямку розчинника, який надходить на пластинку. У методі висхідної хроматографії розчинник поступає на пластинку вгору під дією капілярних сил. У методі низхідної хроматографії розчинник поступає на пластинку зверху вниз під дією гравітаційних сил. Горизонтальний проточний метод ТШХ оснований на безперервному надходженні свіжого розчинника на пластинку. Після проходження всього шару сорбенту розчинник стікає з пластинки або випаровується.

Одною з основних переваг ТШХ є простота і низька вартість обладнання. Єдиним пристосуванням є камера для розділення, яка містить всі елементи хроматографічної системи: елюент, пристрій для введення проби, пристрій для розділення проби (пластинку з шаром сорбенту). У висхідному методі елюент поміщають на дно камери для розділення. Досліджувану речовину наносять на пластинку мікропіпеткою, відступивши від краю не менше 25 мм (стартова лінія). Діаметр плями не повинен перевищувати 2–3 мм. Після нанесення проби на пластинці паралельно стартовій лінії і на відстані близько 10 см від неї гостро відточеним олівцем проводять канавку для того, щоб елюент не дійшов до краю пластинки. Нижній кінець пластинки занурюють в елюент не більше ніж на 5 мм.

Нерухомі та рухомі фази. В тонкошаровій хроматографії використовують ті ж адсорбенти і елюенти, що і в колонковій рідинній хроматографії. До цих пір не існує надійних правил для вибору адсорбенту. Найчастіше застосовують силікагель, алюміній оксид, поліамідні смоли. Силікагель є найбільш універсальним адсорбентом, який можна використовувати для розділення

більшості речовин. Алюміній оксид, який володіє сильними адсорбційними властивостями, використовують зазвичай для розділення неполярних речовин. На поліамідних смолах можна успішно розділяти речовини, у яких гідроксигрупа зв'язана з ароматичним кільцем, наприклад, феноли.

Як рухоми фази використовують різні розчинники або їх суміші, органічні та неорганічні кислоти.

Отримання та аналіз площинних хроматограм. Якісний і кількісний аналіз. Хроматографування продовжують до тих пір, поки розчинник від лінії старту пройде  $\approx 10$  см. Після цього хроматограму виймають з камери і підсушують на повітрі. Якщо утворюються невидимі зони, хроматограми проявляють відповідними реагентами. За характерним забарвленням кольорових зон судять про склад проби, яку аналізують.

Кількісне детектування в ТШХ проводять або безпосередньо на пластинці, або після видалення з пластинки досліджуваної речовини. Перший спосіб переважно використовують при аналізі великої кількості сполук.

Детектування на пластинці можна проводити вимірюванням площі плями (наприклад, за допомогою міліметрової кальки). За допомогою заздалегідь побудованого градуувального графіка знаходять кількість речовини. Застосовують також пряме спектрофотометричне визначення (фотоденсітометрія), де також будують градуувальний графік, використовуючи значення оптичної густини в центрі плями. Метод відбиття заснований на тому ж принципі, тільки вимірюють не поглинання світла, а відбивання. Можна використовувати й інші методи: флуориметрію, рентгенофлуоресцентний або радіометричний метод.

Компоненти суміші після розділення можна видалити з пластинки, екстрагувати і проаналізувати будь-яким аналітичним методом.

Застосування методу ТШХ. Сучасний стан та перспективи. Метод ТШХ широко використовують для якісного та кількісного експресного контролю промислових процесів органічного синтезу, при наукових дослідженнях у хімії природних сполук, фармацевтичному та хіміко-токсикологічному аналізі, клінічній діагностиці тощо. Виробництво пластинок з міцним і однорідним сорбуючим покриттям дозволило отримувати відтворювані результати розділення. Термічна стабільність сполук, які аналізують, також як і в рідинній хроматографії, не відіграє великої ролі, оскільки аналізи проводять, як правило, при кімнатній температурі.

В даний час ТШХ інтенсивно розвивається. Істотно прискорюється процес розділення в радіальній ТШХ, де розчинник з регульованою швидкістю (аналогічно колонковій рідинній хроматографії) подається до центру пластинки, змушуючи зони переміщатися від центру до периферії.

Створений експресний ультрачутливий варіант ТШХ, названий мікротонкошаровою хроматографією. Його основні переваги – мінімальне розмивання плям, зменшення часу аналізу, максимальна чутливість – обумовлені використанням сорбентів з меншими розмірами зерен (2–5 мкм), зниженням пробігу елюента до 5 см, використанням пластинок з товщиною шару 150–200 мкм.

Цим методом можна визначати слідові кількості токсичних елементів, тому він з успіхом використовується при аналізі об'єктів навколишнього середовища.

Створений ТШХ-аналізатор, що дозволяє після розділення автоматично отримувати компоненти прямо із шару сорбенту для подальшого визначення. Цей прилад випускається промисловістю для масових аналізів.

За чутливістю та можливістю визначення речовин у складних сумішах та в малих кількостях ТШХ є одним з найчутливіших методів.

## 2. Електрохроматографія

Електрохроматографія — хроматографічний процес, при якому рух заряджених часток здійснюється під дією прикладеної напруги. Це фізичний метод, в основі якого лежить різниця у швидкостях пересування біомолекул в електричному полі. Швидкість руху часток визначається їх масою та зарядом. Метод застосовується в аналітичних дослідженнях при роботі з відносно невеликими кількостями речовин.

Біомолекули звичайно несуть сумарний позитивний або негативний заряд, обумовлений наявністю на їх поверхні позитивно або негативно заряджених груп амінокислот. Якщо білкові молекули помістити в електричне поле, вони починають переміщатися зі швидкістю, яка визначається їх сумарним зарядом, а також формою та розмірами.

Електрокінетичне явище переміщення часток дисперсної фази (колоїдних або білкових розчинів) у рідкому або газоподібному середовищі під дією зовнішнього електричного поля називається електрофорезом (відкритий професорами Московського університету П. І. Страховим і Ф. Ф. Рейссом в 1809 році).

Практичне застосування електрофорезу почалося після створення лауреатом Нобелівської премії шведським ученим А. Тиселіусом в 1937 р. спеціального апарату для фронтального (або вільного) електрофорезу білків у розчині. Метод заснований на відмінності у швидкості руху білків в електричному полі, яка визначається величиною сумарного заряду молекули білку при певних значеннях рН, іонною силою розчину та формою і розмірами молекул.

Розроблено модифікований метод електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН або SDS). При використанні даного методу білки мігрують в інертному матриксі (поліакриламідний гель з високим вмістом поперечних зв'язок). Звичайно гель готують полімеризацією мономерів безпосередньо перед використанням. Розміри пор гелю можуть бути підібрані для того, щоб гель міг сповільнити або прискорити міграцію молекул. При цьому білки перебувають у розчині, що містить потужний, негативно заряджений детергент – додецилсульфат натрію. Зв'язуючись із гідрофобними ділянками білкової молекули, цей детергент викликає розгортання білкових молекул у довгі витягнуті ланцюги. Кожна молекула білка зв'язує велику кількість молекул детергенту, здобуваючи сумарний негативний заряд. Тому



білок, після того як буде прикладена напруга, починає рухатися в напрямку позитивного електрода.

Білки одного розміру поводяться подібно, оскільки, по-перше, їх природна структура повністю зруйнована ДСН так, що їх форма ідентична, по-друге, вони зв'язують однакову кількість ДСН і здобувають однаковий негативний заряд. Великі білки, що володіють більшим зарядом, зазнають дії значних електричних сил і рухаються повільніше. У звичайних розчинах ці ефекти, як правило, взаємно погашаються, але в порах поліакриламідного гелю, що діє як молекулярне сито, більші молекули гальмуються значно сильніше, ніж менші, тому виявляються ближче до стартової лінії. Суміш молекул ділиться на ряд смуг, розташованих відповідно до їхньої молекулярної маси.

Для виявлення білків при електрофорезі в гелях їх обробляють одним з наступних барвників: бромфеноловим синім, амідочорним, кислотним синім, кумасі брильянтовим блакитним та ін. Інтенсивність фарбування та відповідно вміст кожної білкової фракції звичайно визначають денситометричними методами шляхом прямого сканування на денситометрі.

Гель-електрофорез має високу роздільну здатність. Якщо при електрофорезі білків сироватки крові людини на папері можна розділити всього 6 фракцій, то при електрофорезі в крохмальному гелі – 10, а в поліакриламідному гелі – до 18 різних білкових фракцій.

В останні роки стали застосовувати методи електрофорезу білків із градієнтом концентрації гелю, що значно підвищує роздільну здатність, особливо при фракціонуванні білків з високою молекулярною масою, що перевищує 50000–100000. Одним з найпоширеніших методів фракціонування білків та оцінки їх гомогенності є диск-електрофорез у поліакриламідному гелі, в якому використовують пари буферних розчинів з різними значеннями рН і різним ступенем пористості гелів.

Досить перспективними методами розділення білків виявилися різні варіанти методу ізоелектричного фокусування: ізотахофорез, засновані на проведенні електрофорезу в підтримуючих середовищах (на колонці або в тонкому шарі) із градієнтом рН. Точне місце розташування на колонці кожного білка із суміші визначається значенням його ізоелектричної точки, тобто таким значенням рН, при якому сумарний електричний заряд молекул даного білку дорівнює нулю. При використанні методу ізоелектричного фокусування застосовують суміші синтетичних поліамінополікарбонічних кислот (амфоліни) для створення градієнта рН у діапазоні від 3,0 до 10,0.

Для фракціонування білків використовують різні комбінації ізоелектрофокусування та диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі: методи двомірного електрофорезу, який дозволяє аналізувати сотні й навіть тисячі білкових фракцій. Результати при цьому одержують у вигляді «двовимірної» білкової карти. Цим методом можна розділити дисоційовані поліпептидні ланцюги.

Останнім часом широкого поширення набули методи зонального електрофорезу білків на різних носіях, зокрема, на твердих підтримуючих середовищах: гелях крохмалю та поліакриламіді, целюлозі.

Капілярний електрофорез – це метод аналізу складних сумішей, що використовує електрокінетичне явище міграції іонів та інших заряджених часток та електроосмос для розділення та ідентифікації компонентів.

Ці явища виникають у розчинах, розміщених в електричному полі високої напруги. Якщо розчин перебуває у тонкому кварцовому капілярі, то електричне поле, накладене уздовж капіляра, викликає в ньому рух заряджених часток і пасивний потік рідини, у результаті чого проба розділяється на індивідуальні компоненти, тому що параметри електроміграції специфічні для кожного виду заряджених молекул. Фактори протидії (дифузія, сорбція, конвекція та ін.) у капілярі суттєво ослаблені, завдяки чому досягається рекордна ефективність розділення.

Для багатьох сумішей капілярний електрофорез дозволяє одержати краще розділення порівняно з іншими стандартними методами.

Капілярний електрофорез має цілий ряд переваг:

- висока роздільна здатність;
- висока швидкість аналізу до 15 хв;
- можливість аналізу будь-яких речовин, незалежно від молекулярної маси, гідрофобності та заряду;
- мінімальний об'єм аналізованої проби.

Капілярний електрофорез завдяки гнучкості методу і широким можливостям знайшов широке застосування. Метод незамінний для контролю якості лікарських засобів і продуктів харчування (визначення домішок та харчових добавок), при допінг-контролі, для поділу енантіомерів (це єдиний спосіб, що має велику роздільну здатність і економічність).

**СПИСОК ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Важинський С. Е. Методика та організація наукових досліджень : навч. посіб. / С. Е. Важинський, Т. І. Щербак. – Суми : СумДПУ імені А. С. Макаренка, 2016. – 260 с.
2. Волошина О. С. Методи досліджень в біотехнології : конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / О. С. Волошина, М. М. Антонюк – К. : НУХТ, 2012. – 157 с.
3. Гуськова В. П. Хроматографические методы разделения и анализа : учеб. пособие / В. П. Гуськова, Л. С. Сизова ; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет). – 2-е изд., испр. и доп. – Кемерово, 2015. – 158 с.
4. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології : лаборат. практик. / О. І. Мартиненко ; наук. ред. Д. М. Говорун. – Київ : Академперіодика, 2010. – 231 с.
5. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз : підручник для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Мінаєва. – Черкаси : Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с.
6. Ушакова Г. О. Вивчення методів наукових досліджень у фізіології, біохімії та мікробіології : навч. посіб. / Г. О. Ушакова, А. О. Тихомиров, В. С. Недзвецкий. – Дніпропетровськ : РВВ ДНУ, 2010. – 68 с.
7. Федорченко С. В. Хроматографічні методи аналізу : навч. посіб. / С. В. Федорченко, С. А. Курта. – Івано-Франківськ : Прикарп. нац. ун-т ім. В. Стефаника, 2012. – 146 с.
8. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу біологічних макромолекул : метод. вказівки до викон. лаборатор. робіт з курсу «Методи аналізу в біотехнології» для студ. спец. 8.091607 «Біотехнологія» / уклад. : В. Ю. Черненко, Ж. М. Івахненко. – К. : ІВЦ «Видавництво «Політехніка», 2005. – 48 с.
9. Цехмістрова Г. С. Основи наукових досліджень : навч. посіб. / Г. С. Цехмістрова. – К. : Видавничий Дім «Слово», 2003. – 240 с.

Навчальне видання

**Баркаръ Євген Володимирович**

# **Методи біотехнологічних досліджень**

*курс лекцій*

Відповідальний за випуск: С. І. Луговий

Технічний редактор: Є. В. Баркаръ

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 3,0.

Тираж 25 прим. Зам. № \_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного аграрного університету  
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.