



# ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Авторы: Я. И. Яшин

**ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**, метод разделения, идентификации, количественного определения и физико-химич. исследования веществ; вид *хроматографии*, в которой в качестве подвижной фазы (элюента) используется жидкость.

## Историческая справка

Хроматография открыта М. С. *Цветом* в 1903 в виде колоночного жидкостно-адсорбционного метода. Более полувека практич. применение метода было ограничено препаративным выделением веществ в чистом виде ионообменными процессами разделения редкоземельных и трансурановых элементов. Для аналитич. целей метод не использовался в связи с длительностью (до нескольких часов) эксперимента, которая была обусловлена несколькими факторами (применением адсорбентов с размером зёрен более 50–100 мкм, прохождением элюента через колонку под действием только силы тяжести, отсутствием проточных детекторов). Экспрессная аналитич. Ж. х. создана в 1960–70-х гг., причём ускорение массообмена между подвижной и неподвижной фазами – увеличение скорости разделения – было достигнуто за счёт уменьшения диаметра зёрен адсорбентов. Использование мелких (5–10 мкм) зёрен потребовало, из-за возникшего большого входного давления, применения насосов высокого давления и привело к разработке Ж. х. высокого давления. Эффективность колонок при переходе к мелким фракциям адсорбента существенно возросла (в расчёте на единицу длины в неск. сотен раз превысила эффективность колонок в газовой хроматографии), поэтому совр. экспрессную аналитич. Ж. х. с использованием жёстких адсорбентов мелкого зёрнения, насосов высокого (св. 20 МПа) давления и проточных детекторов называют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). По временам разделения ВЭЖХ не уступает *газовой хроматографии*, по областям применения значительно её превосходит.

## Основные методы

Предложено неск. десятков методов и вариантов Ж. х., которые позволяют разделять смеси соединений с молекулярными массами от 50 до нескольких млн., включая изомеры (в т. ч. оптические), макромолекулы синтетических и биополимеров, ионы, стабильные радикалы, вирусы и др. микрочастицы.

По механизму разделения выделяют следующие осн. методы Ж. х.: адсорбционный – разделение происходит за счёт разл. адсорбируемости компонентов смеси на поверхности твёрдого тела (адсорбента); распределительный – разделение за счёт разл. растворимости в плёнке жидкой фазы, нанесённой на поверхность твёрдого носителя; ионообменный (ионный, ион-парный) – за счёт разл. способности разделяемых ионов в растворе к ионному обмену с ионитом – неподвижной фазой (см. в ст. *Ионообменная хроматография*); эксклюзионный (молекулярно-ситовый, гель-фильтрационный, гель-проникающий) – разделение макромолекул полимеров, а также малых молекул и ионов за счёт разл. размеров или формы и способности проникать в поры

неионогенного геля – неподвижной фазы (см. в ст. [Эксклюзионная хроматография](#)); аффинный (биоспецифический) – разделение биологически активных соединений за счёт биоспецифич. взаимодействий с комплементарными сорбционными центрами неподвижной фазы (см. в ст. [Аффинная хроматография](#)); лигандообменный – разделение за счёт разл. способности разделяемых соединений к комплексообразованию с катионами металлов или функциональными группами неподвижной фазы; хиральный (энантиоселективный) – разделение энантиомеров за счёт взаимодействия с хиральными группами неподвижной или подвижной фазы, а также ряд др. методов. К совр. методам относятся противоточная, мембранная, высокотемпературная, циркуляционная, многомерная и др. варианты жидкостной хроматографии.

## Основные параметры

Измеряемые величины, характеризующие Ж. х., следующие: параметры удерживания (время удерживания  $t_{\text{R}}$ , объём удерживания  $V_{\text{R}}$  и фактор удерживания), эффективность колонки (число теоретич. тарелок  $N$  или высота, эквивалентная одной теоретич. тарелке,  $H$ ), селективность разделения (коэф. селективности  $\alpha$  – отношение времени удерживания двух соседних пиков на хроматограмме), степень разделения (отношение разности удерживания двух соседних пиков к сумме полуширин этих пиков,  $R$ ).

На разделение влияет темп-ра, расход и природа подвижной фазы. В зависимости от природы подвижной фазы меняется её элюирующая способность. В Ж. х. применяют изократический режим элюирования (подвижной фазой с постоянной элюирующей способностью) и градиентный (подвижной фазой с увеличивающейся во времени элюирующей способностью).

Селективность разделения связана с природой межмолекулярных взаимодействий сорбат – сорбент, сорбат – элюент, элюент – сорбент. В совр. вариантах Ж. х. учитывается влияние на характер этих взаимодействий геометрич. структуры (напр., при использовании сорбентов на основе циклодекстринов, жидких кристаллов, краун-эфиров), биологич. и химич. активности молекул, а также возможность разделения (в частности, полимеров) в критич. условиях; осуществляется компьютерная оптимизация.

## Проведение процесса

Жидкостные хроматографы состоят из ёмкости для элюента, насоса высокого давления (10–40 МПа), крана-дозатора, защитной и аналитич. колонок, детектора, электронного блока детектора (блока питания, усилителя, аналого-цифрового преобразователя), термостатов колонки и ячейки детектора; для обработки информации используются компьютеры.

В ВЭЖХ применяется более 20 типов детектирующих систем; самые распространённые – спектрофотометрические, в т. ч. программируемые, с диодной матрицей (диапазон длин волн 200–900 нм), флуоресцентные, электрохимические, масс-спектрометрические, рефрактометрические, по светорассеянию. В медицине, биологии, фармацевтике (при расшифровке действующих начал экстрактов лекарственных растений) и в др. областях широко используются гибридные методы, сочетающие Ж. х. и масс-спектрометрию (с системой ввода пробы в спектрометр методом электрораспыления – электроспрей), ЯМР- или ИК-спектроскопию.

Пределы обнаружения достигают  $10^{-15}$ – $10^{-9}$  г.

Для разделения компонентов используют аналитич. насадочные (внутр. диаметр 2,0–4,6 мм), микронасадочные

(диаметр 0,5–1,0 мм), капиллярные (диаметр менее 0,05 мм; сорбционный слой иммобилизован на внутр. стенках капилляра), а также препаративные колонки (диаметр более 10 мм). Длина насадочных колонок 5, 10, 15, 25 см. Размер зёрен сорбента 1–10 мкм (чаще всего сферич. частицы диаметром 5 мкм).

В зависимости от природы разделяемых соединений используют обращённо-фазовую хроматографию (ОФХ) или нормально-фазовую хроматографию (НФХ). В ОФХ сорбент (неподвижная фаза) менее полярна, чем подвижная фаза (элюент), в НФХ – более полярна. В первом случае удерживание возрастает с ростом гидрофобности молекул разделяемой смеси, во втором – с ростом полярности молекул. В ОФХ в качестве сорбентов используют силикагель с химически привитыми к поверхности алкильными цепями  $C_1$ – $C_{30}$  (чаще всего  $C_8$  или  $C_{18}$ ), в качестве элюентов – смеси метанол – вода, ацетонитрил – вода и др. с разным соотношением компонентов. В НФХ в качестве сорбентов применяют пористый силикагель, силикагель с привитыми нитрильными и аминогруппами. В ОФХ и в НФХ применяют также полимерные и углеродные сорбенты. Исходные пористые сорбенты обычно имеют удельную поверхность в пределах 100–400 м<sup>2</sup>/г, средний диаметр пор 8, 10, 20, 30 нм. При выборе сорбента оценивают эффективность, параметры удерживания, гидрофобность, стерическую селективность, способность образовывать водородные связи, ионообменную ёмкость и др. факторы.

Разработаны технологии получения новых сорбентов и колонок для ВЭЖХ, в частности сорбентов для перфузионной хроматографии, монолитных колонок, пористых полимеров с порами молекулярных размеров, макропористых углеродных сорбентов. В перфузионных колонках микропотoki элюента проходят через открытые макропоры сорбента, что приводит к уменьшению размывания хроматографич. пиков по сравнению с обычными насадочными колонками. В монолитных колонках сплошной сорбционный слой создаётся непосредственно в колонке, напр. в виде жёсткого пористого полимерного блока.

## Области применения

ВЭЖХ используется в биологии и биотехнологии (в т. ч. при расшифровке генома человека, решении задач протеомики, пептидомики, метаболомики), в медицине (напр., для ранней диагностики заболеваний с использованием биохимич. маркеров), в фармацевтике при создании новых лекарств и анализе их чистоты (в т. ч. энантиомерной), в судебно-мед. экспертизах, в контроле окружающей среды и пром. выбросов, технологич. процессов и качества продукции в химич., нефтехимич., пищевой, микробиологич. пром-сти. Препаративную Ж. х. используют для выделения и очистки мн. природных и синтетич. веществ, в т. ч. биологически активных соединений, вирусов (гриппа, энцефалита и др.), белков и полипептидов; в пром-сти – фуллеренов, инсулина, сапонинов, интерлейкина-2 человека, гистонов, плазмид ДНК, антибиотиков, оптич. изомеров и др.

## Литература

Лит.: Цвет М. С. О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу // Труды Варшавского общества естествоиспытателей. Отд. биологии. 1903. Т. 14; Киселев А. В., Яшин Я. И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М., 1979; Snyder L. R., Kirkland J. J. Introduction to modern liquid chromatography. 2nd ed. N. Y., 1979; Стыскин Е. Л., Ицксон Л. Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М., 1986; Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Мальцев В. Г. Капиллярная жидкостная хроматография. Л., 1987; Даванков В. А., Навратил Дж., Уолтон Х. Лигандообменная

хроматография. М., 1989; Даванков В. А., Яшин Я. И. Сто лет хроматографии // Вестник РАН. 2003. Т. 73. № 7;  
Яшин Я. И., Яшин А. Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Российский химический журнал. 2003. Т. 47. № 1.

Processing math: 0%