

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАФЕДРА ГИГИЕНЫ И МЕДИЦИНСКОЙ ЭКОЛОГИИ

Т.В. Башун, С.Ф. Фурс, Л.Л. Бельшева

**Применение высокоэффективной
жидкостной хроматографии в
лабораторной практике центров гигиены и
эпидемиологии**

Учебно-методическое пособие

Минск БелМАПО
2012

УДК 543.544:613/614(075.9)

ББК 24.5+51.2я 73

Б 33

Рекомендовано в качестве учебного пособия
УМС Белорусской медицинской академии последипломного образования
протокол № 7 от 12.12. 2012г.

Авторы:

Т.В. Башун, С.Ф. Фурс, Л.Л. Бельшева

Рецензенты:

Кафедра общей гигиены ГУО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Заведующий лабораторией химии пищевых продуктов ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» кандидат химических наук О.В. Шуляковская

Башун Т.В.

Б 33

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в лабораторной практике центров гигиены и эпидемиологии: учеб.-метод. пособие /Т.В. Башун, С.Ф. Фурс, Л.Л.Бельшева. – Минск.: БелМАПО, 2012. – 36с.

ISBN 978-985-499-626-4

В учебно-методическом пособии дана характеристика метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, который широко используется в практике лабораторного контроля среды обитания и продуктов питания. Описаны принципы жидкостной хроматографии, критерии механизма разделения для наиболее успешного выбора решения конкретной задачи анализа сложной смеси.

УДК 543.544:613/614(075.9)

ББК 24.5+51.2я 73

ISBN 978-985-499-626-4

© Башун Т.В., Фурс С.Ф.,
Бельшева Л.Л. 2012г.

© Оформление БелМАПО, 2012г.

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) представляет собой метод разделения при комнатной температуре, в котором для увеличения скорости и эффективности разделения применяют плотноупакованные сорбенты с малым диаметром частиц (3 - 50 мкм), узкие колонки с внутренним диаметром 2 - 6 мм, давлением элюента на входе в колонку 0,5 - 40 МПа. Достоинством ВЭЖХ является возможность реализовать все механизмы разделения в зависимости от применяемого сорбента. Но независимо от механизма разделения в ВЭЖХ ПФ - жидкая (элюент), НФ - твёрдая или жидкая плёнка на поверхности зёрен твёрдого носителя.

1.1. Основные хроматографические величины и их определение.

Результатом хроматографического разделения является хроматограмма (рис. 1) - кривая зависимости сигнала детектора от времени или объёма элюента, прошедшего через колонку.

Важной хроматографической характеристикой системы является время удерживания или пропорциональный ему удерживаемый объем.

Из хроматограммы (рис. 1) определяют времена удерживания несорбирующегося вещества - мёртвое время (t_M) и разделённых компонентов - время между внесением пробы в колонку и выходом из неё конкретного компонента (t_{R1} , t_{R2} и др.).

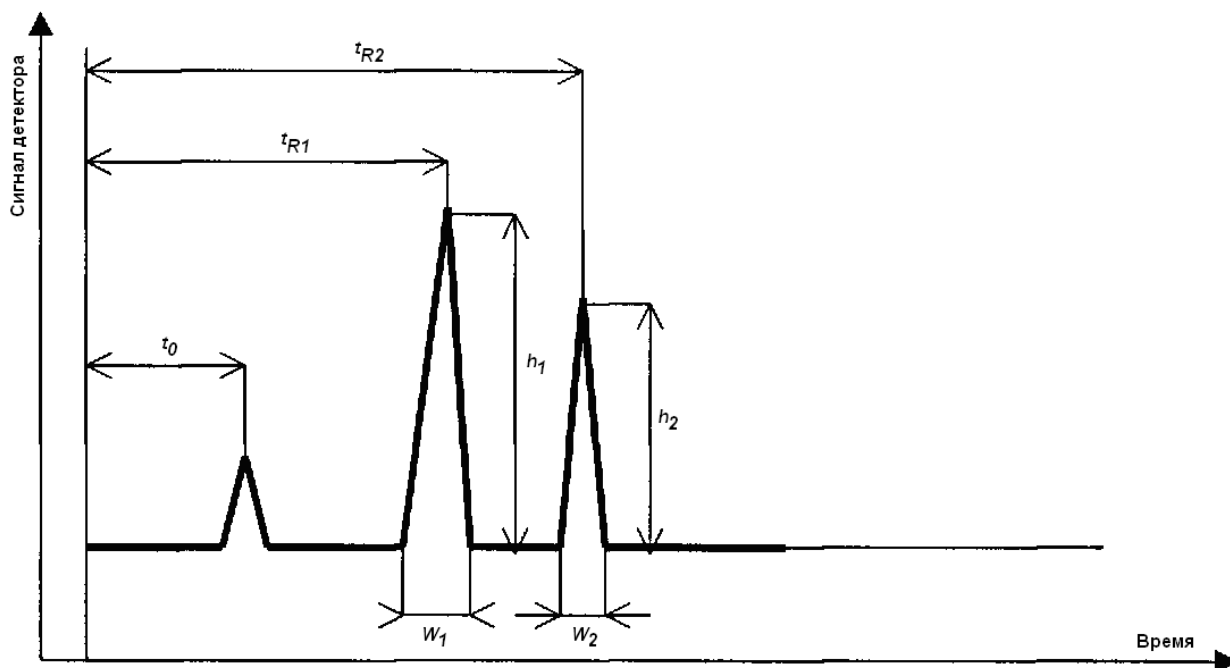


Рис. 1. - Хроматограмма

Зная объемную скорость элюента F , определяют:

- удерживаемый объем V_R , который пропорционален времени удерживания t_R :

$$V_R = t_R F, \quad (1.1)$$

- мертвый объем колонки V_M , который характеризует удерживаемый объем несорбирующегося элюента :

$$V_M = t_M F, \quad (1.2)$$

- исправленное время удерживания t'_R :

$$t'_R = t_R - t_M, \quad (1.3)$$

- исправленный удерживаемый объем V'_R :

$$V'_R = (t_R - t_M) F = t'_R F \quad (1.4)$$

Величина V_M не зависит от геометрических параметров колонки и может быть использована для качественной характеристики системы адсорбент - жидкость. Однако на эту величину заметное влияние оказывают случайные

факторы. В значительно меньшей степени они влияют на относительный удерживаемый объем, равный отношению абсолютного удерживаемого объема исследуемого вещества $V_{M,I}$ к соответствующему объему вещества, принятого за стандарт $V_{M,cm}$:

$$V_{отн} = \frac{V_{M,i}}{V_{M,cm}} \quad (1.5)$$

Значения относительных удерживаемых объемов приводятся в справочных таблицах.

Коэффициент ёмкости колонки по отношению к данному компоненту K определяется по формуле:

$$K = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (1.6)$$

Чтобы сделать заключение о возможности хроматографического разделения смеси на вещества, надо сопоставить их хроматографические параметры: коэффициент селективности α и разрешение R_s .

Коэффициент селективности α является мерой относительного удерживания или относительной подвижности разделяемых веществ:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{V_{R2}}{V_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1.7)$$

Если $\alpha = 1$, разделение компонентов невозможно, они дают один пик. Повысить селективность разделения можно, увеличив объём НФ, т. е. увеличив длину колонки и объём содержащегося в ней сорбента или НЖФ на носителе.

Разделение двух соседних пиков характеризуется разрешением R_s :

$$R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{\omega + \omega_2} \quad (1.8)$$

При полном разрешении пиков $R_s = 1$.

1.2. Размывание пиков.

Чтобы получить симметричные пики, обычно работают с малыми количествами пробы. Однако в процессе хроматографирования наблюдается размывание пиков. Причины этого рассматриваются в теории теоретических тарелок и кинетической теории.

В теории теоретических тарелок Мартина и Синджа хроматографическая колонка мысленно делится на ряд элементарных участков - «тарелок» и предполагается, что на каждой тарелке очень быстро устанавливается равновесие между сорбентом и подвижной фазой. Каждая новая порция жидкости вызывает смещение этого равновесия, вследствие чего часть вещества переносится на следующую тарелку, на которой, в свою очередь, устанавливается новое равновесное распределение и происходит перенос вещества на последующую тарелку. Длина элементарного участка (в см), на котором достигается мгновенное состояние равновесия между концентрациями вещества в подвижной и неподвижной фазе, называется высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ). ВЭТТ (H) определяется по формуле:

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.9)$$

где: L – длина колонки, N – число эффективных теоретических тарелок.

В результате этих процессов хроматографируемое вещество распределяется на нескольких тарелках, причем на средних тарелках его концентрация оказывается максимальной по сравнению с соседними тарелками. Элюированная полоса имеет форму и ширину нормального распределения Гаусса:

$$C = C_{\max} e^{-\frac{\beta - N}{2N}} \quad (1.10)$$

где: β - относительный объём ПФ, прошедшей через колонку, соответствующий появлению концентрации C компонента; N - число теоретических тарелок; $C_{\max}$ - концентрация компонента в максимуме кривой.

Эффективность колонки тем выше, чем меньше высота, эквивалентная теоретической тарелке, и больше число теоретических тарелок.

Хроматографический пик характеризуется высотой, шириной и площадью. Высотой пика считают величину h (см. рисунок 1) .

Шириной пика называют расстояние между точками контура на половине его высоты или на какой-то другой отметке по высоте, либо расстояние между точками перегиба или между точками пересечения нулевой линии с касательными к кривой в точках перегиба (W):

$$\omega = 4\sigma \quad (1.11)$$

где: σ - величина стандартного отклонения, которая определяет ширину гауссовой кривой.

Величина σ , полученная по хроматограмме, является мерой размывания хроматографического пика. Чем меньше σ , тем меньше размывание и тем больше пиков разделяемых веществ может быть размещено на хроматограмме в определённый интервал времени.

Количественной мерой эффективности хроматографической колонки является ВЭТТ и число теоретических тарелок.

ВЭТТ может быть определена как дисперсия на единицу длины колонки:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (1.12)$$

$$\text{Так как } N = \frac{L}{H}, \text{ то } N = \frac{L}{\sigma^2}$$

Число теоретических тарелок можно рассчитать непосредственно из хроматограммы, используя экспериментальное значение ширины пика W в качестве величины σ и времени удерживания t_R компонента в качестве длины колонки:

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{t_R^2}{\omega^2/16} = 16\left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad (1.13)$$

Хроматографическая колонка считается высокоэффективной, когда размытие полос небольшое, пики узкие и $H = 0,3-1,0$ мм. Было установлено, что H и глубина пор сорбента d связаны следующим образом: чем больше d , тем больше H и, следовательно, меньше эффективность колонки. В идеальном случае $H = d_p$, где d_p - диаметр частиц сорбента.

Однако, теория тарелок, основанная на допущении ступенчатого характера хроматографического процесса, по существу формальна, так как реальный процесс протекает непрерывно. Значение высоты, эквивалентной теоретической тарелке, и число тарелок являются характеристиками размытости зон. Эти величины сохраняют свое значение и в кинетической теории хроматографии, учитывающей скорость миграции вещества, диффузию и другие факторы.

Кинетическая теория хроматографии основное внимание уделяет кинетике процесса, связывая высоту, эквивалентную теоретической тарелке, с процессами диффузии, медленным установлением равновесия и неравномерностью процесса. Высота, эквивалентная теоретической тарелке, связана со скоростью потока уравнением Ван-Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{U} + CU \quad (1.14)$$

где: A , B и C - константы; U - скорость подвижной фазы.

Константа A связана с действием вихревой диффузии, которая обуславливает неоднородность потока в колонке и зависит от размера частиц и плотно-

сти заполнения колонки. Её влияние минимально, если колонка равномерно заполнена частицами малого диаметра.

Константа В связана с коэффициентом диффузии молекул в подвижной фазе, это слагаемое учитывает действие продольной диффузии. Влияние этого вида диффузии в жидкостной хроматографии относительно невелико, т.к. коэффициенты диффузии жидкостей невелики.

Константа С характеризует сопротивление массопереносу молекул, перемещающихся из одной фазы в другую.

Константы А, В, С могут быть представлены как:

$$A = 2\lambda d_p \quad B = 2\lambda D_m \quad C = \beta \frac{d_s^2}{D_s} \quad (1.15)$$

где: d_p - средний диаметр частиц сорбента; λ - коэффициент гомогенности упаковки колонки; γ - коэффициент извилистости; D_m - коэффициент диффузии в подвижной фазе; β - геометрический фактор; d_s - толщина неподвижной фазы; D_s - коэффициент диффузии вещества в неподвижной фазе.

1.3. Классификация

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов ВЭЖХ: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную.

Метод адсорбционного хроматографического (АХ) разделения основан на различной способности адсорбироваться или десорбироваться на поверхности адсорбента. При движении разделяемой смеси сквозь слой сорбента в хроматографической колонке элементарные акты сорбции и десорбции многократно повторяются. В верхней части колонки будет сосредоточен наиболее сорбируемый компонент, а в нижней части колонки наименее сорбируемый. Однако резкой границы между этими зонами не будет.

Изотермы адсорбции веществ имеют линейную, выпуклую или вогнутую форму. При линейной изотерме пик вещества симметричен и время удерживания не зависит от размера пробы. Чаще всего они нелинейные, что приводит к ассиметрии пика с образованием хвоста. Адсорбционное равновесие между раствором и адсорбентом подчиняется уравнению изотермы адсорбции Лэнгмюра:

$$n = n_{\infty} \frac{bc}{1 + bc} \quad (1.16)$$

где: n - количество адсорбированного вещества при равновесии; n_{∞} - максимальное количество вещества, которое может быть адсорбировано на данном адсорбенте; b - постоянная; c - концентрация.

А в области разбавленных растворов изотерма линейна:

$$n = n_{\infty} bc = \Gamma c \quad (1.17)$$

где Γ - коэффициент Генри.

АХ в зависимости от полярности сорбента и элюента подразделяют на нормально-фазную (полярный сорбент, неполярный элюент) и обращённо-фазную (неполярный сорбент, полярный элюент).

В распределительной ВЭЖХ разделение происходит за счёт разной растворимости разделяемых веществ в НФ, как правило, привитой к поверхности неподвижного носителя, и в ПФ - растворителе. Недостатком является быстрое смывание фазы с носителя. Выходом стала прививка за счёт образования химических связей жидкой фазы к носителю, т. е. образование привито-фазного сорбента. Прививаются группы C_8H_7 , $C_{18}H_{37}$ или C_6H_5 , γ -аминопропильные, нитрильные, гидроксильные и др. группы.

В ионообменной ВЭЖХ молекулы смеси, диссоциировавшие на катионы и анионы в растворе, разделяются при движении через сорбент (ионообмен-

ники), на поверхности которого привиты катионные и анионные центры, способные к обмену с противоионами анализируемых веществ.

В эксклюзионной ВЭЖХ молекулы веществ разделяются за счёт их разной способности проникать в поры носителя. В отличие от других вариантов ВЭЖХ, где разделение идёт за счёт различного взаимодействия компонентов с поверхностью сорбента, роль твёрдого носителя в ЭХ заключается только в формировании пор определённого размера, а НФ-й является растворитель, заполняющий эти поры. При этом первыми из колонки выходят наиболее крупные молекулы, последними - вещества с малым размером.

Рассмотренные разновидности ВЭЖХ не являются гарантией того, что на практике разделение протекает исключительно по тому или иному механизму. Зачастую разделение протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно, обеспечивающим большее или меньшее удерживание компонентов.

1.4. Выбор подвижной фазы.

Эффективность хроматографического метода определяется различной сорбируемостью веществ и скоростью передвижения зон при промывании колонки растворителем. Поэтому особое внимание необходимо обращать на выбор подходящих сорбентов и растворителей для каждого случая

К растворителям, применяемым в ВЭЖХ, предъявляются следующие требования:

- чистота;
- химическая инертность по отношению к растворённым веществам, адсорбенту и кислороду воздуха;
- совместимость с детектором;
- достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам;

- необходимый уровень селективности;
- низкая вязкость (0,5-0,7 Мпа·с при температуре разделения);
- безопасность, которая определяется воспламеняемостью и токсичностью растворителя;
- доступность.

Для элюирования смеси обычно применяют не индивидуальные растворители, а раствор одного или нескольких веществ в растворителе, который сам адсорбируется слабо, введенные же вещества адсорбируются сильнее нескольких, а возможно и всех компонентов анализируемой смеси. Состав подвижной фазы можно изменять так, что ее вытесняющая способность будет непрерывно возрастать. Это *градиентная* хроматография.

В нормально-фазной хроматографии в качестве растворителей используют углеводороды (гексан, гептан, изооктан, циклогексан) с добавлением небольших количеств CHCl_3 и др.; в обращённо-фазной хроматографии - смесь воды с CH_3CN , CH_3OH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и др.

1.5. Выбор неподвижной фазы.

К адсорбентам в современной жидкостной хроматографии предъявляются требования не только селективности и эффективности, но и высокой скорости хроматографирования, что определяется, главным образом, структурой поверхности. Отличными структурными свойствами обладают поверхностно-пористые адсорбенты (ППА), у которых большая механическая прочность и отсутствуют глубокие поры. В качестве активного слоя на поверхность стеклянных шариков в ППА наносят тонкий слой адсорбента с высокой пористостью толщиной примерно 1 мкм, например, силикагель $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (силикагели получают конденсацией кремниевых кислот, образующихся при действии минеральных кислот на растворимые силикаты), оксид алюминия или некоторые полимеры.

Наибольшее применение находят адсорбенты из силикагеля с разным объёмом пор, поверхностью, диаметром. При этом он применяется и как таковой, и как носитель химически привитых фаз. В ВЭЖХ используются силикагели с удельной поверхностью $\approx 300 \text{ м}^2/\text{г}$, средним диаметром пор 100 нм и удельным объёмом пор $\approx 1 \text{ мл/г}$.

Применяют также объемно-пористые мелкозернистые адсорбенты на основе силикагеля, алюмогеля и других веществ, значительно реже – Al_2O_3 из-за его более высокой каталитической активности, что приводит к искажению результатов.

1.6. Аппаратурное оснащение.

В ВЭЖХ основными узлами хроматографической установки являются дозатор, колонка, блок контроля температуры и детектор.

Колонки и дозаторы. Используются колонки длиной от 15 - 20 см до 1,5 - 2,0 м и не более 10 м с внутренним диаметром 1 - 6 мм и не более 12 мм. Так как разделение происходит при повышенном давлении, то из соображений безопасности стенки трубки должны иметь определённую толщину ($\approx 0,9 \text{ мм}$). Изготавливаются колонки из толстостенного стекла или нержавеющей стали и плотно и равномерно заполняются адсорбентом. При плотном заполнении создаются условия для более постоянной скорости потока жидкости.

Системы для ввода пробы для жидкостной хроматографии можно разделить на ручные и автоматические. Среди ручных наиболее распространен кран-дозатор, в состав которого входят сменные петли из химически стойкого материала (легированной стали) с определенными объемами. Для аналитической жидкостной хроматографии объем петли соответствует 10-100 мкл. Такой метод ввода пробы обеспечивает хорошую воспроизводимость анализа и недорог. Конструкции некоторых кранов позволяют работать с переменными объемами вводимых проб без замены петли. Это бесспорное удобство, однако,

наличие «мертвого объема» не всегда обеспечивает надежные результаты анализа.

Автоматические дозаторы обычно бывают трех типов: петлевого с пневматическим или электромеханическим приводом, шприцевые с дозированием с помощью калиброванного микрошприца с остановкой или без остановки оттока. Причем, могут быть использованы как основной, так и дополнительный насос, например, в препаративной жидкостной хроматографии.

Но чаще всего ввод проб в колонку производится с помощью шприца через самоуплотняющуюся резиновую прокладку и с помощью кранов. С помощью шприца объем пробы легко регулируется и проба может быть подана непосредственно на насадку, однако, при высоких давлениях метод становится непригодным из-за неплотностей в поршне шприца. Система с кранами позволяет работать при высоких давлениях и может быть автоматизирована.

Блок контроля температуры. Большинство разделений в ВЭЖХ осуществляется при температуре окружающей среды. Использование повышенных температур в изотермическом режиме анализа изменяет селективность разделения, способствует снижению вязкости растворителя, позволяет увеличить эффективность колонки. Для реализации режима контроля температуры возможно несколько подходов: термостатирование с циркуляцией и без циркуляции воздуха; жидкостное термостатирование колонки с циркуляцией теплоносителя от термостатируемого источника; пассивное термостатирование металлического блока или специального термостата, в котором расположены хроматографические колонки, непосредственный нагрев элюента. В современных жидкостных хроматографах температурный контроль полностью автоматизирован и осуществляется с помощью микропроцессора. Обычный диапазон температур в жидкостных хроматографах составляет от 35 до 99 °С.

Детекторы. Детектор - устройство, предназначенное для преобразования состава ПФ, выходящей из колонки, в изменение выходного сигнала. При этом на выходе из хроматографической колонки можно или последовательно

отбирать отдельные пробы и затем их анализировать, или проводить непрерывный анализ. Методика непрерывного анализа с автоматической записью концентраций имеет бесспорные достоинства. Создание чувствительных детекторов непрерывного действия в значительной степени обусловило современный уровень хроматографии и ее успехи в разделении сложных многокомпонентных смесей.

Общие требования, предъявляемые к детекторам:

- чувствительность, достаточная для решения конкретной задачи;
- малая инерционность;
- слабая зависимость сигнала от условий опыта;
- линейная связь между показаниями и концентрацией в широком интервале её изменения;
- простота и дешевизна изготовления.

Практическое применение в ВЭЖХ нашли дифференциальный рефрактометр, УФ-детекторы, флуориметрические и кондуктометрические детекторы.

В ЖАХ идентификация веществ производится по характеристикам удерживания, а количественный анализ основан на измерении высоты или площади хроматографического пика. Используется также анализ фракций раствора после хроматографической колонки различными химическими или физико-химическими методами.

1.7. Качественный хроматографический анализ.

Качественный хроматографический анализ основан на измерении удерживаемого объема и времени удерживания, которые являются качественными характеристиками хроматографируемых веществ при определенных условиях разделения. Для детальной идентификации компонентов сложных

смесей часто недостаточно разделения их на одной колонке, а приходится прибегать к сложной схеме анализа, представляющей собой целый комплекс методов.

В зависимости от состава анализируемой смеси, а также аппаратуры и имеющихся эталонных веществ, можно использовать различные методы идентификации.

Методы идентификации на одной колонке:

а) Применение индивидуальных эталонных веществ или их смесей.

Один из вариантов этого метода состоит в последовательном разделении анализируемой смеси и эталонной смеси в одинаковых условиях. Равенство времен удерживания соответствующих компонентов обеих смесей может служить основанием для идентификации. Если расход элюента неодинаков, то вместо времен удерживания используют исправленные удерживаемые объемы или исправленные времена удерживания. Данный вариант использовался при разработке методики определения красителей в безалкогольных напитках.

Второй вариант заключается в том, что в исследуемую смесь вводится эталонный компонент, наличие которого в анализируемой смеси предполагается. Увеличение высоты соответствующего пика без его расширения по сравнению с высотой этого пика на хроматограмме, полученной до введения эталона может служить указанием на присутствие искомого соединения в анализируемой смеси.

б) Использование табличных данных о характеристиках удерживания.

В настоящее время опубликовано большое количество таблиц относительных удерживаемых объемов для самых разных веществ. Эти таблицы можно использовать при отсутствии эталонных веществ. Анализируемую смесь разделяют при условиях, указанных в соответствующей таблице, причем в анализируемую смесь предварительно вводят небольшое количество эталонного вещества (стандарта).

Для идентификации выделенных веществ сравнивают полученные величины относительных удерживаемых объемов с табличными данными. Так как внутри одного класса соединений графическая зависимость логарифмов относительных удерживаемых объемов от числа атомов обычно прямолинейна, то, построив калибровочный график зависимости логарифмов относительных удерживаемых объемов от числа атомов и определив относительные удерживаемые объемы выделенных веществ, их можно идентифицировать.

Наряду с относительными удерживаемыми объемами для идентификации компонентов смеси можно использовать *индексы удерживания Ковача*. Суть этого метода идентификации заключается в использовании линейной зависимости между логарифмами объемов удерживания и числом углеродных атомов нормальных алканов как шкалы индексов I . В этой шкале индексы удерживания нормальных алканов $I = 100 n$ (n - число C-атомов).

в) Использование графических или аналитических зависимостей между относительными удерживаемыми объемами и другими физико-химическими свойствами веществ

Если между логарифмами относительных удерживаемых объемов веществ одного гомологического ряда и другими физико-химическими характеристиками этих веществ, например температурами кипения, молекулярными рефракциями, объемами и др., существует линейная зависимость, то для идентификации компонентов могут быть использованы соответствующие графические зависимости.

Методы идентификации компонентов смеси на нескольких колонках:

а) Анализ на параллельных колонках с сорбентом разной полярности

Для однозначной идентификации компонентов сложных смесей разработан метод, основанный на определении удерживаемых объемов веществ на двух сорбентах разной полярности.

Модификаций этого метода много. Например, чтобы определить принадлежность идентифицируемого вещества к тому или иному гомологическому

ряду можно воспользоваться графиком зависимости объема удерживания на колонке с полярной подвижной жидкой фазой от объема удерживания на колонке с такой же неподвижной жидкой фазой. При одинаковом масштабе объемов удерживания на обеих осях для гомологических рядов хроматографируемых веществ получают прямые, проходящие через начало координат. Наклон прямых является характеристикой гомологического ряда.

Разработан метод идентификации, в котором использована прямолинейная зависимость между удерживаемыми объемами или их логарифмами и безразмерным коэффициентом Z - отношением температуры кипения вещества к рабочей температуре колонки.

б) Анализ на последовательно соединенных колонках с сорбентами изменяющейся полярности

При рассмотрении 2-3 хроматограмм одной смеси, полученных на колонках с различными сорбентами часто невозможно установить, какой пик одной хроматограммы соответствует определенному пику другой. Поэтому иногда смеси разделяют на последовательно соединенных колонках с полярными и неполярными сорбентами, а также на составленных колонках, состоящих из секций различной длины с сорбентами разной природы.

По хроматограммам, полученным таким методом можно проследить путь каждого компонента при переходе от неполярной неподвижной жидкой фазы к полярной и идентифицировать соответствующие соединения.

Сочетание хроматографии с другими методами исследования.

Используются следующие методы: определение функциональных групп, методики удаления, реакционная газовая хроматография, ИК - спектроскопия и масс-спектрометрия, использование повышенной чувствительности детектора к некоторым классам соединений и другие.

Особенно широкое развитие получила комбинация – хроматограф-масс-спектрометр, причем масс-спектрометрический детектор для анализа фракций используется как в газо-жидкостной, так и в высокоэффективной жидкостной

хроматографии. Действие данного детектора основано на разделении ионов по массе и заряду при их прохождении через магнитное или электрическое поле. Ионы образуются при распаде молекул органических веществ под воздействием электронного излучения. Масс-спектрометрия использует основное физическое свойство вещества - величину молекулярной или атомной массы, поэтому позволяет определить состав вещества или частей (фрагментов) его молекулы.

1.8.Количественный хроматографический анализ.

Точность количественного хроматографического анализа в значительной степени определяется выбором наиболее рационального метода расчета концентрации веществ. Основными методами получения количественных результатов являются метод абсолютной калибровки, метод простой нормировки, метод внутренней нормировки и метод внутреннего стандарта. При разработке методики использовался метод абсолютной калибровки, поэтому мы более подробно остановимся на этом методе.

а) Метод абсолютной калибровки. Чувствительность детектора к различным веществам, входящим в анализируемые смеси, неодинакова. Поэтому, чтобы количественные определения были точными, для каждого компонента смеси необходимо построить калибровочные кривые. Это делают, проводя хроматографические определения известных количеств вещества. По этим определениям строят калибровочный график зависимости площади пика S от количества введенного в колонку вещества q .

Эта зависимость как правило прямолинейная. Угловой коэффициент калибровочной кривой i -того компонента, называют калибровочным коэффициентом

$K_i = q_i / S_i$, г/см². Содержание i -того компонента в пробе X_i :

$$X_i = (q_i / Q) 100 = (K_i S_i / Q) 100 \quad (1.18)$$

где: Q - масса пробы, г; q_i - масса i -того компонента; K_i - калибровочный коэффициент; S_i - площадь пика i -того компонента.

Метод абсолютной калибровки достаточно прост, но точность его в значительной мере зависит от постоянства режима и тщательности приготовления и анализа эталонной смеси. Кроме того, приходится строить калибровочные графики для каждого индивидуального вещества, входящего в анализируемую смесь (длительное время, необходимы эталонные вещества).

б) *Метод внутреннего стандарта (метод метки).* Этот метод основан на сравнении высот или площадей пиков известного вещества (метки) и определяемого компонента. В качестве метки стараются подбирать вещество, которое не реагирует с компонентами анализируемой смеси, не сильно сорбируется и появляется на хроматограмме отдельно от других компонентов. Кроме того, вещество метки не должно быть компонентом анализируемой смеси. К анализируемой пробе добавляют точно измеренное количество вещества метки. Его количество подбирают так, чтобы площадь его пика была соизмерима с площадью пиков компонентов смеси, подлежащих количественному определению.

Метод метки удобен тем, что на результаты анализа колебания параметров хроматографического опыта сказываются слабо.

в) *Метод простой нормировки.* Этот метод основан на предположении, что все вещества, независимо от их строения, взятые в равном количестве дают равные по площади пики. Это приближение выполняется, если вещества имеют близкое химическое строение, а в жидкостной хроматографии используют жидкость-носитель, теплопроводность которой приблизительно на порядок отличается от теплопроводности анализируемых веществ.

Метод простой нормировки не дает точных результатов в случае различной чувствительности применяемых детекторов по отношению к различным компонентам анализируемой смеси.

2) *Метод внутренней нормировки с калибровочными коэффициентами.* Этот метод учитывает различия в чувствительности детектора по отношению к компонентам анализируемой смеси, поэтому он более надежен, чем метод простой нормировки.

Достоинство метода внутренней нормировки состоит в том, что искажения, имеющиеся в одинаковой степени у всех пиков, в конечном итоге не сказываются на точности результатов. Ошибки этого метода связаны с возможными изменениями в режиме проведения анализа.

2 Аналитический обзор применения ВЭЖХ при контроле качества пищевых продуктов

Метод ВЭЖХ находит широкое применение в таких областях, как химия, биология, медицина, анализ пищевых продуктов и др.

ВЭЖХ позволяет определить вещества разной природы (органические и неорганические) с любой температурой кипения и даже самые нестойкие, которые не могут быть обнаружены другими методами с такой высокой точностью.

Жидкостная хроматография применяется для разделения более широкого круга веществ, чем газовая хроматография. Это связано с тем, что большинство веществ не обладает летучестью. Многие из них неустойчивы при высоких температурах.

В жидкостной хроматографии разделение чаще всего происходит при комнатной температуре. Особенности всех видов жидкостной хроматографии обусловлены тем, что подвижной фазой в ней является жидкость, а сорбция компонентов из газообразного или жидкого элюента происходит по-разному. Если в газовой хроматографии газ-носитель выполняет практически только транспортную функцию и неподвижной фазой не сорбируется, то жидкая подвижная фаза жидкостной хроматографии является активным элюентом. Мо-

лекулы его могут сорбироваться на поверхности неподвижной фазы. При прохождении через колонку, находящиеся в элюенте молекулы компонентов анализируемой смеси должны вытеснить молекулы элюента с поверхности сорбента, что приводит к уменьшению энергии взаимодействия молекул анализируемого вещества с поверхностью сорбента. Поэтому величины удерживаемых объемов, пропорциональные изменению свободной энергии системы, в жидкостной хроматографии ниже, чем в газовой хроматографии, а диапазон линейности изотермы сорбции в жидкостной хроматографии больше. Применяя различные системы элюентов, можно изменить параметры удерживания и селективность хроматографической системы. Селективность в жидкостной хроматографии определяется, в отличие от газовой хроматографии, не одним, а двумя факторами, т.е. природой и подвижной фазы, и неподвижной фазы. Жидкая подвижная фаза обладает большей плотностью и вязкостью, чем газообразная.

Поэтому в жидкостной хроматографии замедлен массообмен по сравнению с газовой и член B в уравнении Ван-Деемтера роли не играет.

Методы ВЭЖХ широко используются в химии белков, пептидов и аминокислот в целях выделения и очистки этих соединений и для определения их биохимических характеристик. ВЭЖХ является наиболее современным методом исследований, применяемым при биохимических анализах и позволяет проводить работы на принципиально новом уровне. Чувствительность этого метода исследований достигает 10^{-13} моль, а скорость проведения анализов составляет 20 - 40 мин. Дополнительным преимуществом метода ВЭЖХ является возможность использования жидкостного хроматографа для определения разных классов веществ (кофеин, антибиотики, витамины, консерванты и т.п.). Использование ВЭЖХ для определения аминокислот позволяет абсолютно точно определять содержание белка в продуктах и отказаться от метода Кьельдаля.

Разрабатываются новые методы ВЭЖХ для изучения липидов. Разработана методика определения окисленных производных холестерина в пищевых продуктах, основанная на использовании метода ВЭЖХ в сочетании с УФ-поглощением и выпаривающим лазерным светорассеивающим детектированием. С использованием УФ-детектора при длине волны 205, 234 и 280 нм возможно определение 10-ти окисленных производных холестерина. Предел обнаружения этих веществ лежит в диапазоне 100 - 500 нг/пробы в зависимости от природы исследуемого соединения.

Известно, что стильбены предотвращают развитие онкологических заболеваний и защищают липопротеины от окисления. В связи с этим большую важность приобретает разработка методов их быстрого и точного определения. Предложен метод прямого определения стильбенов, включающий применение ВЭЖХ с УФ-детектором, с помощью которого установлено, что наибольшее количество стильбенов содержится в красных винах.

Разработана методика одновременного разделения и определения 10-ти жирорастворимых витаминов, включая различные формы витаминов А, Д, К и Е (α -токоферол) в молоке, основанная на использовании метода обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 250 нм.

На основании анализов, проведенных исследователями, сделан вывод, что лучшим методом количественного определения витамина С, включая его восстановленную (L-аскорбиновая кислота) и окисленную (L-дегидроаскорбиновая кислота) формы, в безалкогольных соках из плодов цитрусовых, винах и др. напитках является ВЭЖХ.

Для определения витамина В₃ (ниацина) в зерне, мясе, рыбе, дрожжах, орехах, арахисовом масле и других обогащённых им пищевых продуктах также используется ВЭЖХ. ПРО = 0,5 мг/100 г продукта.

В настоящее время имеется методика определения углеводов в апельсиновом и яблочном соке методом ВЭЖХ с детектированием на основе рассеяния света при испарении.

Разработана и аттестована методика определения сульфадиазина в лососе с помощью ВЭЖХ, получения его производного с флуорескаминном и флуориметрического детектирования. ПРО = 0,2 нг сульфадиазина.

Хроматографический анализ используется для определения гидразида малеиновой кислота - регулятора роста растений в картофеле и луке. Анализ проводят методом ВЭЖХ на колонке LUNA C₁₈ (4,6 x 150 мм) при элюировании 0,15 М раствором Н₃РО₄ в 3%-ном водном растворе MeCN и спектрофлуориметрическом детектировании (305/400 нм).

Объектом хроматографического анализа являются также микотоксины. Методика определения алколоидного микотоксина слафрамина в молоке с помощью ВЭЖХ позволяет определить 0,05-0,2 мкг/мл микотоксина.

Известна экспрессная и точная методика хроматографического определения микотоксина зеараленона (I) в зерне. Пробу зерна экстрагируют смесью (90 : 10) MeCN-вода в течение 2 мин., элюируют MeOH (1,5 мл). В элюате определяют I методом ВЭЖХ на колонке Supelcosil LC – 1,8 (4,6 x 150 мм) при элюировании смесью MeCN-вода-MeOH (46:46:8) и спектрофлуориметрическом детектировании (240/440 нм).

Российскими учёными приведен способ определения карбонильных соединений (КС) в водке, пиве, настойках и др. спиртных напитках по которому КС выделяют в виде 2,4-динитрофенилгидразинов (2,4-ДНФГ) с последующей экстракцией гексаном. Анализ выделенных 2,4-ДНФГ проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-6A, колонка (1,5 x 0,46 см) ODS Zorbax, УФ-детектор с рабочей длиной волны 254 нм, элюенты - метанол: вода (70 : 30) и озопропанол: вода (70 : 30).

Методика определения содержания фенолов в оливках, оливковом масле первого прессования на основании методов ВЭЖХ предполагает экстракцию фенолов смесью метанол/вода (80:20) с последующей твердофазной очисткой этих веществ на патроне Extra-Clean C₁₈, их разделением на аналитической колонке (4,6 x 150 мм) с ODS-3 и детектированием с помощью УФ-детектора.

Для определения лекарственных веществ также используется ВЭЖХ. В кормах, яйцах, мышечной ткани определяли никарбазин на колонке (4,6 x 150 мм) с APEX ODS (5мкм) при элюировании (1 мл/мин) смесью MeCN-вода (55 : 45) с УФ спектрофотометрическим детектированием. Нижняя граница определения содержания составляет 0,4 мкг/г.

Также разработана методика определения антибиотика спектиномицина в гомогенатах тканей домашних животных с использованием ВЭЖХ с переключением 2-х колонок.

Степень окисления традиционных рыбных продуктов измеряли путём определения малонодиальдегида (I) с помощью ВЭЖХ. Процедура окисления продуктов заключалась в выдерживании при 40°C в течение 3 дней. Образцы перегоняли, и I определяли в дистилляте с помощью ВЭЖХ на колонке μ -Bondapak C₁₈, применяя в качестве ПФ смесь 1%-ный раствор уксусной кислоты – ацетонитрил (85:15).

Метод ВЭЖХ всё чаще используют для контроля содержания ионов тяжёлых металлов в различных пищевых объектах. Разработан быстрый метод определения химической формы свинца в объектах вин с помощью сочетания техники эксклюзионной ВЭЖХ и масс-спектрометрии с индукционной плазмой

Предложен метод одновременного определения тригонелина, никотиновой кислоты и кофеина в пробах зелёного и обжаренного кофе, основанный на использовании метода ВЭЖХ с фотодиодным матричным детектором. Разделение извлечённых веществ осуществляли на колонке (25 x 0,46 см) с Spherlsorb 09S2 при использовании в качестве ПФ раствора метанола в 0,01 моль/л фосфатном буферном растворе. Измерения проводили при длине волны 265 нм.

Другой областью, в которой жидкостная хроматография вытесняет газовую, является разделение пестицидов. Объясняется это реакционной способностью разделяемых материалов в очень горячих газовых колонках (высокие

температуры необходимы для того, чтобы длительность разделения была приемлемой).

Таким образом, у ЖХ нет конкурентов с точки зрения широты охвата классов исследуемых соединений, относительной мягкости условий разделения (особенно температуры) и надёжности аппаратного оформления.

На сегодняшний день для анализа пищевых продуктов методом ВЭЖХ существует ряд ГОСТов и МВИ, согласованных с Госстандартом и действующих на территории Республики:

МВИ. МН 806-98 Методика определения концентраций сорбиновой и бензойной кислот в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ISO 9231 Молоко и молочные продукты. Определение содержания бензойной и сорбиновой кислот.

ГОСТ 30711-2001 Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В₁ и М₁.

Инструкция по применению № 108-1006 от 05.01.2006г. «Методика определения синтетических красителей в кондитерских и хлебобулочных изделиях, молочных продуктах, соках, биологически активных и пищевых добавках с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии».

МВИ. МН 3287-2009 Определение содержания меламина в молоке, детском питании на молочной основе, молочных и соевых продуктах. Методика выполнения измерений.

ГОСТ 28038-89 Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина.

МВИ МН 1037-99 Методика определения концентраций кофеина в кофе растворимом, молотом, зернах и чае методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

DIN EN 12856 Определение содержания ацесульфамата К, аспартама и сахараина. Метод жидкостной хроматографии высокого разрешения.

ГОСТ 30059-93 Напитки безалкогольные. Методы определения аспартама, сахараина, кофеина и бензоата натрия.

Инструкция 4.1.10-15-61-2005 «Обнаружение, идентификация и определение содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах».

Инструкция 4.1.10-15-62-2005 «Обнаружение, идентификация и определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах».

МУ по обнаружению, идентификации и определению содержания афлатоксинов в продовольственном сырье с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии № 4082-86.

СТБ ГОСТ Р 51650-2001 Продукты пищевые. Методы определения массовой доли бенз(а)пирена.

СТБ 1982-2009 Винодельческая продукция и винодельческое сырье. Метод определения содержания органических кислот с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

СТБ 1907-2008 Спирты кобьячные, коньяки, вина, виноматериалы, ликеры и настойки. Метод определения содержания углеводов и глицерина с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

МВИ МН 2769-2007 Определение содержания органических кислот в виноградных винах и виноматериалах.

МВИ МН 2398-2005 Методика определения синтетического красителя азорубина в алкогольных и безалкогольных напитках с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

МВИ МН 2399-2005 Методика определения синтетических красителей алкогольных и безалкогольных напитков с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

МВИ.МН 2665-2007 «Определение содержания фенольных и фурановых соединений в коньячных спиртах, коньяках и коньячной продукции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

МВИ МН 1363-2000 Метод по определению аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

EN 14176:2003 Пищевые продукты. Определение домоевой кислоты в моллюсках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

СТБ 1982-2009 Винодельческая продукция и винодельческое сырье. Метод определения содержания органических кислот с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

МВИ, МН 3287-2009 Определение содержания меламина в молоке, детском питании на молочной основе, молочных и соевых продуктах.

МВИ. МН 4138-2011 Определение содержания оксиметилфурфурола в плодоовощной продукции, напитках меде и БАД.

МВИ. МН 3927-2011 Определение витамина В₂ (рибофлабина) в пищевых продуктах.

3. Заключение

Как научный метод познания окружающего нас мира хроматография постоянно развивается и совершенствуется. Сегодня она применяется столь часто и столь широко в научных исследованиях, медицине, молекулярной биологии, биохимии, технике и народном хозяйстве, что очень трудно найти область знаний, в которой бы хроматография не использовалась.

Хроматография как метод исследования с ее исключительными возможностями является мощным фактором познания и преобразования усложняющегося мира в интересах создания приемлемых условий обитания человека на нашей планете.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айвазов Б.В. Введение в хроматографию. - М: Высш.шк., 1983 - 246с.
2. Винарский, В.А. Хроматография: Курс лекций/ В.А. Винарский. - Минск: БГУ, 2002. -192 с.
3. ВЭЖХ - метод определения фолиевой кислоты в обогащенных хлебобулочных изделиях /Л.Л. Белышева, О.В. Шуляковская, О.С. Воронцова, Е.И. Полянских, Т.А. Гуринович // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / М - во здравоохранения Респ. Беларусь, ГУ «Респ.. науч.-практ. центр гигиены»; редкол.: СМ. Соколов (гл. ред.) [и др.]. -Барановичи, 2005. - Вып. 6. - С. 447 - 451.
4. Кожанова, Л.А. Определение водо- и жирорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.А. Кожанова, Г.А. Федорова, Г.И. Барам // Журн. аналит. химии. - 2002. - Т .57, № 1. - С. 49-54.
5. Мониторинг органических загрязнений природной среды. 500 методик: практическое руководство. – 2-е изд., перераб. и доп.-Другов Ю.С., Родин А. А. -2009.- 893с.
6. Мочалова, В.С. Высокоэффективная жидкостная хроматография водорастворимых витаминов на модифицированных сорбентах / В.С. Мочалова, Г.Л. Брыкина, О.А. Шпигун // Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия. - 2006. - Т. 47, № 3. - С. 206-209.
7. Определение витамина В₆ в обогащенных продуктах питания методом ВЭЖХ / Е.И. Полянских, О.В. Шуляковская, Л.Л. Белышева, О.С. Воронцова, Т.А. Гуринович // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / М – во здравоохранения Респ. Беларусь, ГУ «Респ. науч.-практ. центр гигие-

- ны»; редкол.: СМ. Соколов (гл. ред.) [и др.]. - Барановичи, 2005. - Вып. 6. - С. 645- 649.
8. Определение фолиевой кислоты в обогащенных молочных продуктах методом ВЭЖХ / Л.Л. Бельшева, О.В. Шуляковская, О.С. Воронцова, Е.И. Полянских, Ю.И. Жданов, Т.В. Башун // Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. / М - во здравоохранения Респ. Беларусь, ГУ «Респ. науч. - практ. центр гигиены»; редкол. : СМ. Соколов (гл. ред.) [и др.]. - Барановичи, 2004.-Вып. 3.-С. 33 - 37.
9. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. - М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрав России, 2004. – 240с.
- 10.Рыбакова, Е.В. Высокоэффективная ионная и жидкостная хроматография для анализа продуктов питания для детей / Е.В. Рыбакова // Пищевая промышленность. - 2005. - № 3. - С. 24-26.
- 11.Сакодынский К.И., Орехов Б.И. Хроматография в науке и технике.- М.:Знание, 1982.- 286с.
- 12.Сохранность фолиевой кислоты в обогащенных молочных продуктах (молоко, кефир) в зависимости от технологических приемов / Л.Л. Бельшева, О.В. Шуляковская, Е.И. Полянских, А.В. Ключенко, Е.М. Валявкина// Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / М - во здравоохранения Респ.Беларусь, ГУ «Респ. науч.-практ. центр гигиены»; редкол.: СМ. Соколов (гл.ред.) [и др.]. - Барановичи, 2004. - Вып. 3. - С 37 - 42.
13. Справочник по физико-химическим методам исследования объектов окружающей среды/Г.И.Аранович, Ю.Н. Коршунов, Ю.С. Ляшков.Л.: судостроение, 1979.-648с.
- 14.14.Хроматографический анализ окружающей среды. / Под ред. Р.Гроба. М.: Мир, 1979. - 606 с.
- 15.15. Rapid analysis of oxidized cholesterol derivatives by high-performance liquid chromatography combined with diode-array ultraviolet and evaporative

- ebsel light- scattering detection / Osada K., Ravandi A., Kuksis A. // J. Amer. Oil Chem. Soc.- 1999.-76, №7.-C.863-871.
- 16.16. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines / Ribeiro de Lima Maria T., Waffo-Teguo Pierre, 17. Teissedre Pierre L., Pujolas Agnes, Vercauteren Josepf, Cabanis Jean C, Merillon Jean M. // J. Agr. and Food Chem.- 1999.- 47, №7.- C.2666-2670.
- 17.18. Simultaneous separation and detection of ten common fat-soluble vitamins in milk/Gong G., Ho J.M. // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Tehnol.- 1997.- 20, №15,- C. 2389-2397.
- 18.19. Measurement of total vitamin C activity in citrus products by HPLC: A review /LeeH. S, Coates G. A. // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Tehnol.- 1999.- 22, №15,- C. 2367-2387.
- 19.20. The determination of niacin in cereals, meat and selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography / Ward C. M., Craige Trenerry V. // Food Chem.- 1997.- 60, №4.- C.667-674.
- 20.21. Carbohydrate profiles in orange juice and apple juice by HPLC and evaporative light scattering detection / Chudy M., Young D. A. // Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc, Orlando, Fla., March 7-12, 1999: PITTCON' 99: Book Abstr.- [Orlando (Fla.)], 1999.- C.1825 P.
- 21.22. Validation of a procedure for liquid chromatographic determination of sulfadiazine in salmon with postcolumn derivatization and fluorescence detection / Mccomish M., Marenchic I., Erntholt D. // Pittsburgh Conf. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc, Orlando, Fla., March 7-12, 1999: PITTCON' 99: Book Abstr.- [Orlando (Fla.)], 1999.- C.431.
- 22.23. Determination of maleic hydrazide in potatoes and onions by fluorescence high performance liquid chromatography / Kubilius D. T., Buchway R. J. // J. Liq. Chromatogr. An Relat. Tehnol.- 1999.- 22, №4,- C. 593-601.

- 23.15. New, sensitive high performance liquid chromatography method for the determination of slaframine in plasma and milk / Imerman P. M. // J. Chromatogr. A.- 1998.- 815, №1,- C. 141-145.
- 24.24. Determination of searalenone in corn by means of means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / Wisconti A., Pascale M. // J. Chromatogr. A.- 1998.- 815, №1,- C. 133-140.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	3
1.1. Основные хроматографические величины и их определение.....	3
1.2.Размывание пиков.....	6
1.3.Классификация.....	9
1.4.Выбор подвижной фазы.....	11
1.5.Выбор неподвижной фазы.....	12
1.6.Аппаратурное оснащение.....	13
1.7. Качественный хроматографический анализ.....	15
1.8.Количественный хроматографический анализ.....	19
2. Аналитический обзор применения ВЭЖХ при контроле качества пищевых продуктов.....	21
3. Заключение.....	29
Литература.....	30

Учебное издание

Башун Татьяна Васильевна
Фурс Сергей Федорович
Бельшева Людмила Леонидовна

**Применение высокоэффективной
жидкостной хроматографии в
лабораторной практике центров гигиены и эпидемиологии**
Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Т.В. Башун

Подписано в печать 12.12. 2012. Формат 60х84/16. Бумага потребительская.
Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».
Печ. л. 2,03. Уч.- изд. л. 1,55. Тираж 100 экз. Заказ 283.
Издатель и полиграфическое исполнение –
Белорусская медицинская академия последипломного образования.
ЛВ № 23 от 27.01.2004. 220013, г. Минск, ул.П. Бровки, 3.

