**Лекція 7 Фізико-хімічні методи в біології**

***Рідинна та газова хроматографія. Гель-фільтрація***

***Теоретичні основи хроматографічного розділення***

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. 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

Важливу роль у досягненні хроматографічного розділення відіграє 22 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.

***Газова хроматографія***

Газова хроматографія (ГХ, gas chromatography ) є методом розподілу летких, термостабільних сполук (РФ – газ). Цим вимогам відповідає до 5% відомих органічних сполук, але саме вони складають 70-80% сполук, які використовує людина в сфері виробництва й побуту. РФ служить інертний газ (газ-носій), він протікає через НФ, яка має велику поверхню. Як РФ можна використовувати водень, гелій, аргон, вуглекислий газ, але найчастіше використовують азот. Газ-носій забезпечує перенесення у пароподібній формі зразка, що аналізується за хроматографічною колонкою, він не взаємодіє ні з поділюваними речовинами, ні з НФ. Розділення сумішей проводять у спеціальних приладах – *хроматографах*.

Розрізняють *газо-адсорбційну* і *газо-рідинну* хроматографію. У першому випадку НФ є твердий носій (силікагель, вугілля, оксид алюмінію), у другому – в'язка, нелетка рідина, нанесена на поверхню інертного носія.

*Газо-рідинна хроматографія* (gas-liquid chromatography) – розділення газової суміші внаслідок різної розчинності компонентів проби в рідині або різної стабільності комплексів, що утворюються. НФ служить рідина, нанесена на інертний носій, РФ – газ. Поділ ґрунтується на відмінності в летючості і розчинності (або адсорбованості) компонентів поділюваної суміші, в колонці відбувається процес розчинення газів або парів, що розділяються по всій масі тонкого шару рідини НФ і виділення їх. Цей метод можна використовувати для аналізу газоподібних, рідких і твердих речовин з молекулярною масою менше 400, які повинні відповідати певним вимогам, головні з яких – летючість, термостабільність, інертність, легкість отримання. Цим вимогам повною мірою відповідають, як правило, органічні речовини, тому газову хроматографію широко використовують як серійний метод аналізу органічних сполук.

*Газо-адсорбційна хроматографія* (gas-solid chromatography, газо-твердофазна хроматографія, ГАХ)*.* Особливість методу ГАХ полягає в тому, що як НФ застосовують адсорбенти з високою питомою поверхнею   
(10-1000 м2г-1), і розподіл речовин між НФ і РФ визначається процесом адсорбції. Це метод аналізу сумішей газів і легколетких речовин. Розділення речовин у ГАХ відбувається за рахунок численних актів адсорбції на твердій поверхні фази та десорбції з неї. Адсорбція молекул із газової фази може бути обумовлена неспецифічними (орієнтаційними, індукційними, дисперсійними) і специфічними взаємодіями (комплексоутворенням або утворенням водневого зв'язку), а також залежить від природи адсорбенту й сорбату.

За адсорбент беруть пористі носії, які мають хімічну, фізичну та термічну стабільність; однорідну поверхнею, рівномірний розподіл за розміром пор і відому адсорбційну активність Адсорбційна активність залежить від питомої поверхні (визначається геометричною структурою носія) і питомої поверхневої енергії (визначається хімічною структурою поверхні). Перевагами таких адсорбентів є здатність витримувати високі температури, відсутність фонового сигналу при роботі з іонізаційними детекторами та висока селективність.

Адсорбенти діляться на неорганічні, полімерні (органічні) та модифіковані. Серед неорганічних адсорбентів особливо важливі сорбенти на основі вуглецевих матеріалів (неполярні сорбенти). Широко використовуються полярні неорганічні сорбенти на основі двоокису кремнію (цеолітові молекулярні сита (M2/nO•Al2O3•xSiO2•yH2O)).

Метод ГАХ зазвичай використовують для оцінки вмісту в атмосферному повітрі O2, H2, CH4, CO2, CO, оксидів азоту, Cl2, SO2, H2S, CS2.

*Перевагами газової хроматографії є:*

– порівняно просте апаратурне оформлення;

– широкі межі застосування (можна визначати сполуки, для яких досягається тиск насиченої пари 0,001-1 мм рт.ст.);

– можливість визначення з високою точністю малих кількостей газів органічних сполук;

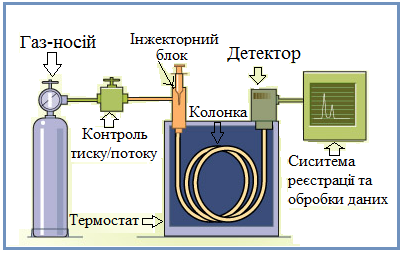
– швидкість аналізу та висока гнучкість зміни умов поділу;

– широкий вибір сорбентів і НФ;

– можливість здійснення хімічних реакцій у хроматографічній колонці або детекторі, що розширює коло аналізованих сполук (реакційна ГХ);

– підвищення інформативності при поєднанні з різними інструментальними методами (мас-спектрометрією, ІЧ(Фур’є)-спектрометрією та ін.).

***Апаратура****:* основними системами будь-якого газового хроматографа є колонка і детектор. Хроматографічна колонка розділяє, а детектор кількісно визначає компоненти газової суміші, які проходить через неї (рис.1).



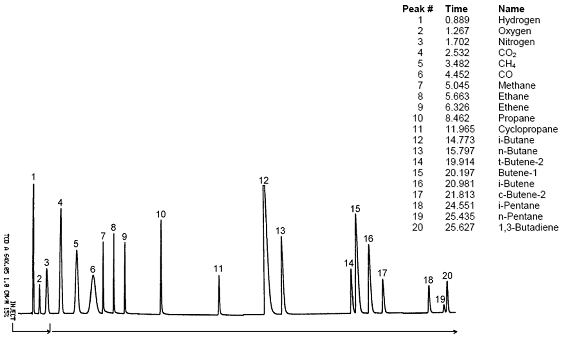
*Рис. 1. Схема газового хроматографу*

Газ-носій подається з балона під певним постійним тиском, який встановлюється за допомогою спеціальних клапанів (рис. 20). Швидкість потоку в залежності від розміру колонки, як правило, становить 20-50 мл•хв'1. Пробу перед введенням у колонку дозують, рідкі проби вводять спеціальними інжекційними шприцами (0,5-20 мкл) в потік газу-носія (у випарник) через мембрану із силіконової гуми, яка сама ущільнюється. Проба повинна випаровуватися практично миттєво, інакше піки на хроматограмі розширюються і точність аналізу знижується. Тому дозувальний пристрій хроматографа забезпечено нагрівачем, що дозволяє підтримувати температуру дозатора приблизно на 50°С вище, ніж температура колонки. При проходженні отриманої газової суміші вздовж сорбенту в колонці відбувається поділ.   
З колонки газовий потік, що несе в певній послідовності розділені компоненти, надходить у детектор. Електричний сигнал від детектора реєструєтьсяу вигляді хроматограми.

У газовій хроматографії використовують насадочні (набивні), капілярні та полікапілярні колонки. Використання капілярних колонок дозволяє істотно підвищити ефективність розділення, а полікапілярних – не тільки отримати високу ефективність, але й провести поділ за дуже короткий час.

У ГХ використовують детектори, які можна поділити на інтегральні та диференціальні. *Інтегральні* – реєструють зміну в часі сумарної кількості всіх компонентів, *диференціальні* – вимірюють миттєву концентрацію компонентів.

Метод газової хроматографії *не дозволяє автоматично ідентифікувати* піки на кривій елюювання. Крива, наведена на рис. 2, лише показує, що зразок, який аналізується, містить 20 компонентів. Ідентифікація компонентів проводиться за *часом утримування t*R – період від моменту введення проби до моменту елюювання речовини щодо її максимальної концентрації. Якщо час утримування компонента невідомий, то цей компонент збирають з колонки та ідентифікують за ІЧ-спектром. Іноді для ідентифікації речовину виводять із колонки безпосередньо в ІЧ-спектрометр або мас-спектрометр.

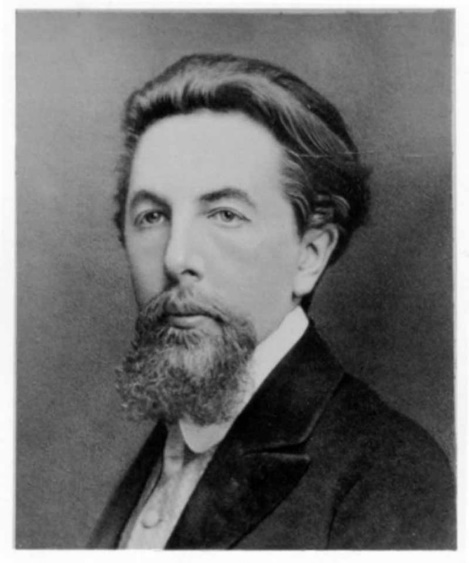


*Рис. 2. Приклад розділення суміші газів із використанням ГХ*

***Рідинна хроматографія***

Рідинна хроматографія (liquid chromatography, РХ) – вид хроматографії, в якій РФ (елюентом) служить рідина. В рідинній хроматографії нерухомою фазою є або тверда фаза (рідиннотвердофазна 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 М. С. Цветом, у 1903 році, на засіданні біологічного відділення Варшавського товариства природодослідників «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу») рис.3, і дотепер є найбільш універсальним та розповсюдженим видом хроматографії.

 Рис. 3.

**Михайло Семенович Цвет**

**1872-1919рр**

(26 червня  1919р помер від голоду, похоронений у Воронежі)

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 нерухомою 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.

Сучасним варіантом РХ є ***високоефективна РХ*** (high-performance liquid chromatography, HPLC, рідинна хроматографія високого тиску, ВЕРХ). Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску та дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, часто до 1,8 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко й повно (середній час аналізу   
від 3 до 30 хвилин). У ВЕРХ використовують колонки діаметром до 5 мм, щільно упаковані сорбентом; тиск для прокачування елюенту – до 3.107 Па. Варіанти ВЕРХ – *мікроколонкова хроматографія* на наповнених колонках малого діаметру і *капілярна хроматографія* на порожніх і наповнених сорбентом капілярних колонках. Після виходу з колонки потік надходить у детектор, де реєструється оптична густина або показник заломлення кожного компонента суміші.

До РХ зазвичай відносять також *гідродинамічну хроматографію*, де НФ відсутня. У цьому випадку використовують той факт, що швидкість потоку елюенту максимальна в центрі порожнього капіляра й мінімальна біля його стінок, а колективні компоненти розподіляються між рухомими з різною швидкістю шарами елюенту відповідно до своїх розмірів або під впливом накладеного в поперечному напрямку зовнішнього силового поля (відцентрового, електричного, магнітного).

*За* ***механізмом утримування***поділюваних речовин рідинна хроматографія ділиться на осадову, адсорбційну, розподільну, іонообмінну (в т.ч. іонну), лігандообмінну, ситову та афінну (біоспецифічну). За природою процесів, які відбуваються при розділенні компонентів, рідинна твердофазна хроматографія є адсорбційною, рідинно-рідинна хроматографія є розподільною, а рідинно-гелева хроматографія включає гельпроникаючу (ексклюзійну) і іонообмінну хроматографію. Наприклад, розділення хлорофілу – приклад адсорбційної рідинно-твердофазної хроматографії. Як правило, у хроматографії рідко здійснюється один механізм розділення – адсорбція, розподілення, іонний обмін або ексклюзія; часто розділення відбувається одночасно за декількома механізмами.

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 нерухомою 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.

***Осадова РХ*** заснована на різниці між розчинністю осадів, що утворюються при взаємодії компонентів аналізованої суміші з реагентом-осаджувачем. Переваги методу виявляються в тому, що отримувані вздовж сорбенту зони мають різні межі, містять осади тільки однієї речовини й часто розділені зонами чистого сорбенту.

***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 від процесів дифузії та масопередачі в обох фазах і визначається, як і в газовій хроматографії, висотою Н, еквівалентною теоретичній тарілці. Чим більше глибина пор у адсорбенту, тим більша висота Н 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 РХ залежно від полярності нерухомої та рухомої фаз виділяють ***нормально-фазову (НФХ) та оберненофазову (ОФХ) хроматографії***. Нерухомі фази в НФХ - полярний адсорбент (силікагель, Al2O3, 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.

В РХ ***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 нерухомою 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 РХ 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. Краще розділення досягається з використанням градієнтного елюювання.

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 см3 /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. Рідинна адсорбційна хроматографія широко застосовується в технології та аналізі органічних речовин, адсорбційна рідинно-твердофазна хроматографія - для розділення важкорозчинних у воді неполярних сполук, розчинних термічно нестійких органічних речовин, вітамінів, нуклеїнових кислот, пестицидів тощо.

***При рідинно-рідинній (розподільній) колонковій хроматографії*** (РРХ) нерухомою фазою є тонка плівка із рідини, що не змішується, 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. Для отримання колоночних розподільних хроматограм в колонку вносять інертну тверду речовину – «носій», потім просочують носій розчинником і таким чином закріплюють (іммобілізують) нерухому рідку фазу на носії. Іммобілізовані 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.). Використовують як нормально-фазову, так і обернено-фазову розподільну хроматографію. Потім в колонку вводять розчин, що містить речовини, які розділяють, у відповідному розчиннику. Компоненти, що розділяються, не повинні взаємодіяти з носієм. Та речовина, яка краще розчиняється в рухомому розчиннику, ніж в нерухомому, переміщується вниз колонки швидше порівняно з іншими речовинами. 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 нерухомою, включають третій компонент, який зменшує різницю в полярності рухомої і нерухомої фаз. Такі потрійні системи дозволяють отримати набір фаз, які не змішуються, з різною селективністю, і через це вони отримали широке застосування в рідинно-рідинній хроматографії. 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.

***В іонообмінній рідинній хроматографії*** поділ ґрунтується на різниці між здатністю поділюваних іонів до реакції іонного обміну з фіксуючими іонами сорбенту, що утворюються в результаті дисоціації іоногенних груп останнього. У залежності від знаку заряду фіксуючих іонів розрізняють катіоніти (закріплений аніон) і аніоніти (закріплений катіон). Поділ іонів регулюють підбором оптимальних значень рН елюенту та його іонної сили.

***Лігандообмінна рідинна хроматографія*** заснована на різній здатності поділюваних сполук утворювати комплекси з катіонами перехідних металів – Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II) тощо – і фіксованими групами (лігандами) нерухомої фази. Частина координаційної сфери іонів металу зайнята молекулами води або іншими слабкими лігандами, які можуть витіснятися молекулами поділюваних сполук.

Найбільш ефективна для поділу оптичних ізомерів – ***афінна рідинна хроматографія (***біоспецифічна), заснована на утворенні міцного зв'язку зі специфічними групами НФ (лігандами, афінантами). Взаємодія лігандів з речовинами, що розділяються, заснована на біологічній функції останніх. Зокрема, при поділі ферментів лігандами служать їх субстрати, інгібітори або коферменти, токсинів – рецептори, білків – антитіла і т. д. Цей вид хроматографії досить ефективний у біотехнології та біомедицині для виділення ферментів, білків, гормонів.

В ***ексклюзійній (ситовій, гель-проникаючій, гель-фільтраційній) рідинній хроматографії*** поділ ґрунтується на відмінностях у розмірах молекул; молекули малих розмірів проникають у порівняно тонкі пори сорбенту (молекулярні сита) і затримуються в них, великі молекули або не проникають в пори, або проникають лише в широкі пори і проходять колонку з незначним утримуванням. 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%.

Гелі, які використовують на практиці, зазвичай ділять на м’які, напівтверді і тверді. 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 фонова в’язкість елюента.

Сучасна модифікація методу – високоефективна рідинна хроматографія, дозволяє провести аналіз, ідентифікацію і поділ дуже малих кількостей речовин (~ 0.000001 р.) за дуже короткий час – 15-20 хвилин.

У залежності від методу РХ використовують різні модифікації ***хроматографів*** (прилади або установки для хроматографічного розділення і аналізу сумішей речовин, рис. 4). Основними частинами хроматографа є: система для введення досліджуваної суміші речовин (проби); хроматографічна колонка; детектувальний пристрій (детектор); системи реєстрації та термостатування; пристосування і приймачі для розділених компонентів. Сучасний прилад для ВЕРХ має модульний тип, який дозволяє швидко змінити конструкцію приладу для певних потреб.

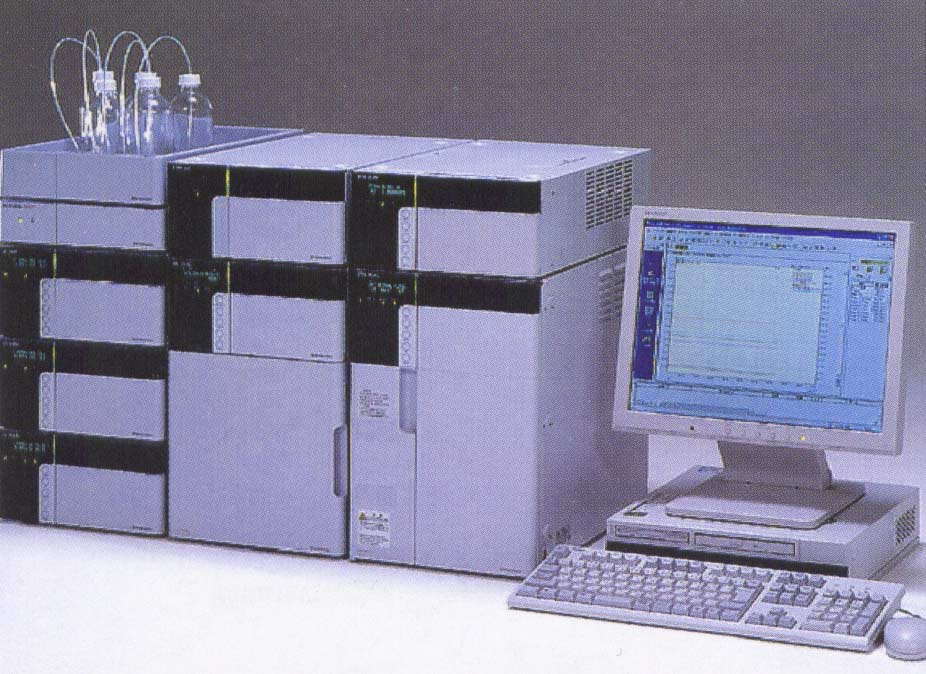


Рис. 4 –Хроматографи для ВРЕХ

Хроматографічні методи широко використовують для розділення речовин дуже близької будови, природних сполук, білків, нуклеїнових кислот, і навіть деяких біологічних об'єктів. Метод хроматографічного аналізу є одним із найбільш використовуваних у сучасних експертних лабораторіях, оскільки він дозволяє швидко та якісно розділити й проаналізувати суміші близьких за властивостями речовин. Рідинна хроматографія застосовується як аналітична і препаративна.

*Письмово в лекційному зошиті дати відповіді на наступні запитання:*

1. *Які основні відмінності сорбції компонентів в газовій та рідинній хроматографії?*
2. *Проведіть порівняльний аналіз методів рідинної хроматографії.*
3. *Проведіть порівняльний аналіз методів газової хроматографії.*

Рекомендована література:

Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз : підручник. Черкаси : Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с.

Федорченко С. В., Курта С. А. Хроматографічні методи аналізу : навч. посіб. / С. В. Федорченко,– Івано-Франківськ : Прикарп. нац. ун-т ім. В. Стефаника, 2012. – 146 с.

Цехмістрова Г. С. Основи наукових досліджень : навч. посіб. К. : Видавничий Дім «Слово», 2003. – 240 c.

Корнет М.М., Бражко О.А, Омельянчик Л.О. Фізичні методи в

біології: навчально-методичний посібник. Запоріжжя: ЗНУ,2015. 102 с

Луцик В. И., Соболев А. Е., Чурсанов Ю. В. Физико-химические методы анализа: учебное пособие. Тверь: ТГТУ, 2008. – 208 с.

Отто М. Современные методы аналитической химии. М.: Техносфера, 2008. 543 с.

Практическая газовая и жидкостная хроматография: учебное пособие / [Б. В. Столяров и др.]. – СПб.: С.-Петербург. ун-та, 1998. – 612 с.