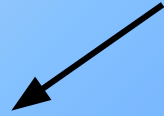


**Хроматофокусирование:  
НОВЫЕ ПОДХОДЫ  
В КОНЦЕНТРИРОВАНИИ  
И РАЗДЕЛЕНИИ**

**А.В.Иванов**

# Градиенты рН

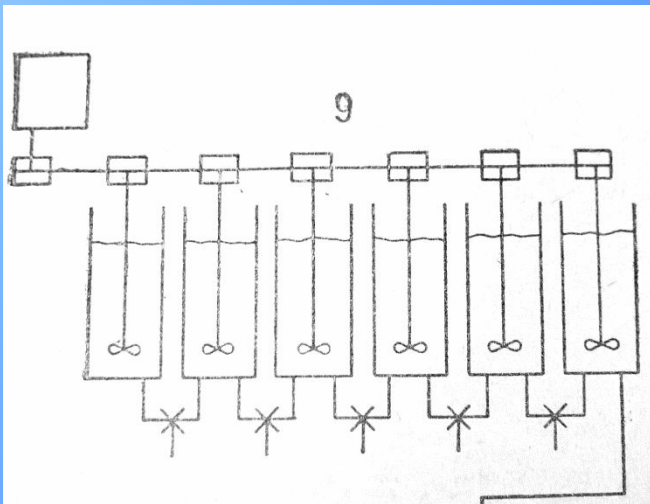


## Доколоночные (внешние)

- Только подвижные фазы
  - Необходимы смесители и т.д.
- [пример узла установки  
“Waters ALC-100”, 1978 г.]

## Внутриколоночные (внутренние)

- Подвижные **полибуферные** фазы + **сорбент**
- Оборудование для изократического элюирования



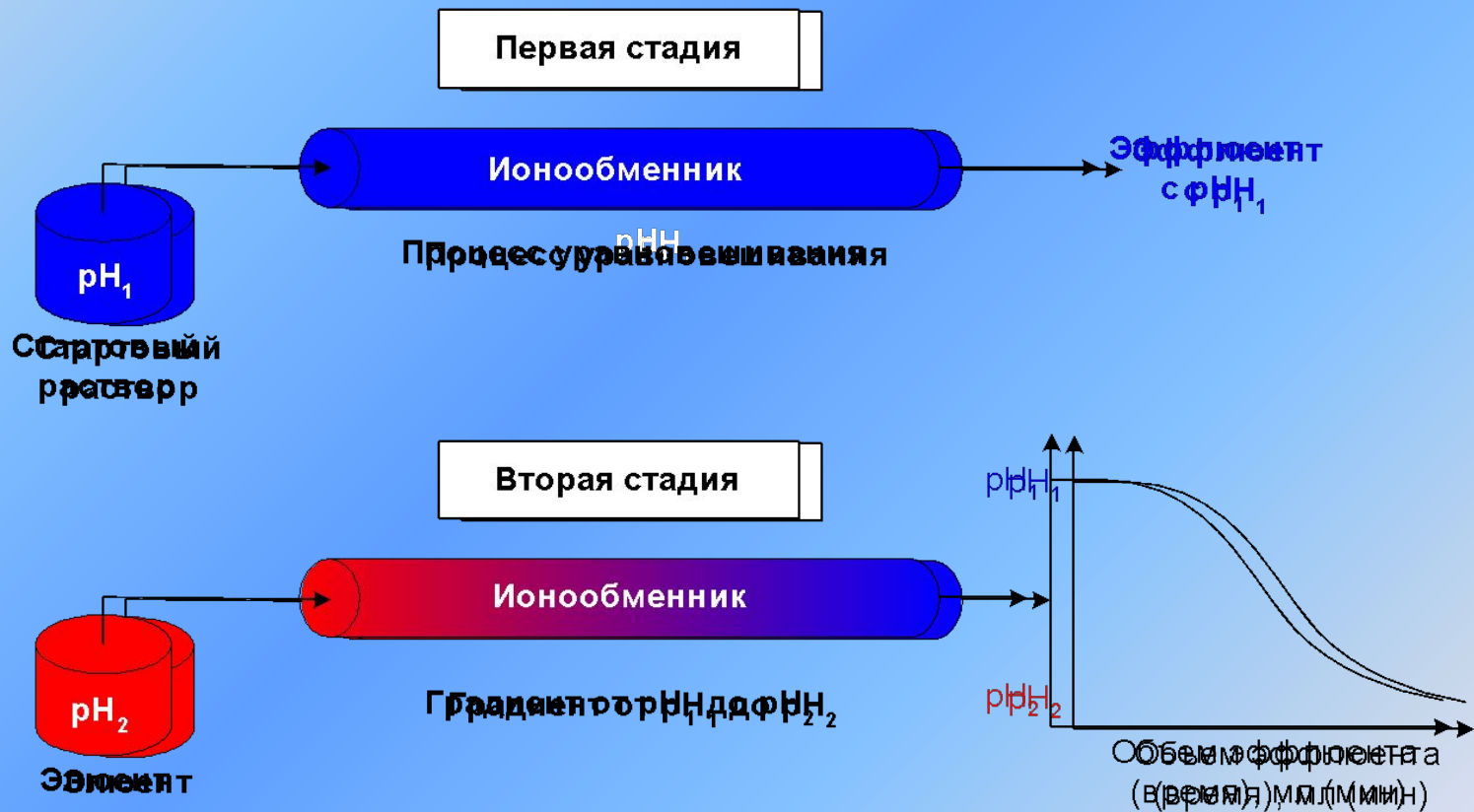
# Хроматофокусирование (ХФ)

- **Метод** ионообменной хроматографии, основанный на формировании линейного градиента pH внутри колонки (**L.Sluyterman**; Uppsala, 1979-81)

**объекты:** биологические биполярные соединения (белки, ферменты, и т.д.)

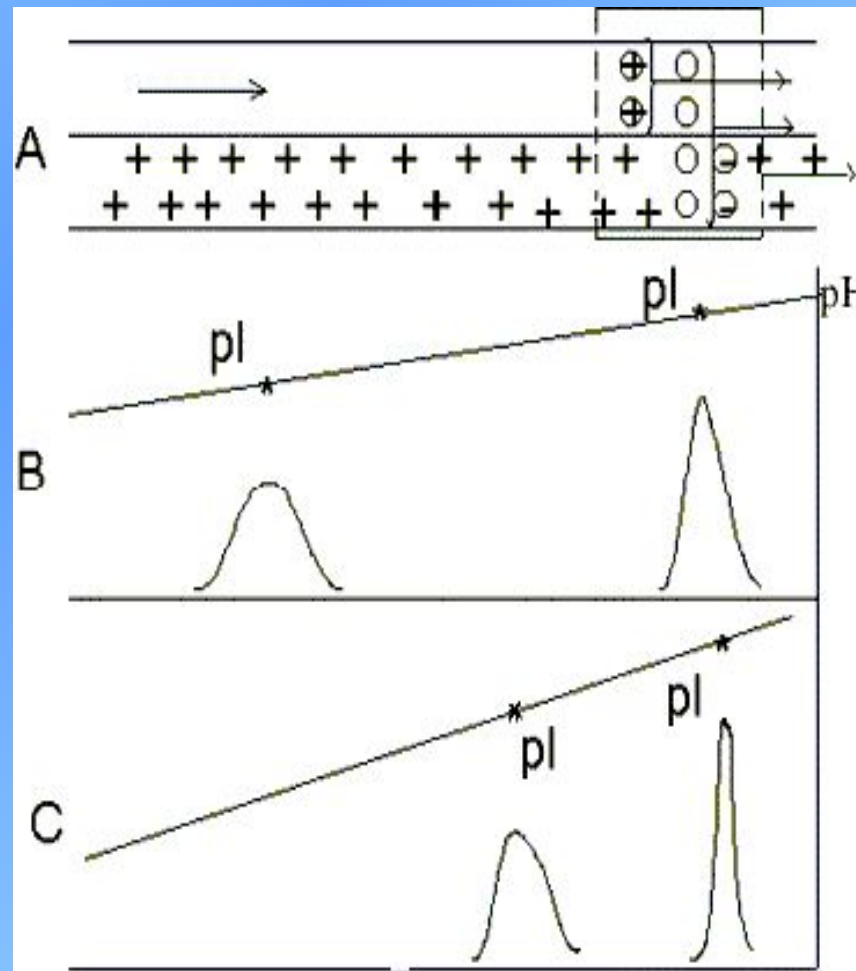
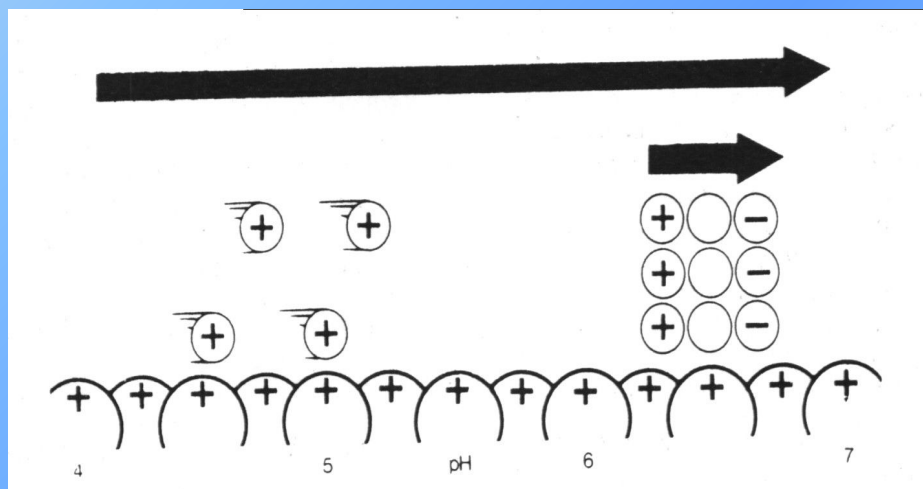
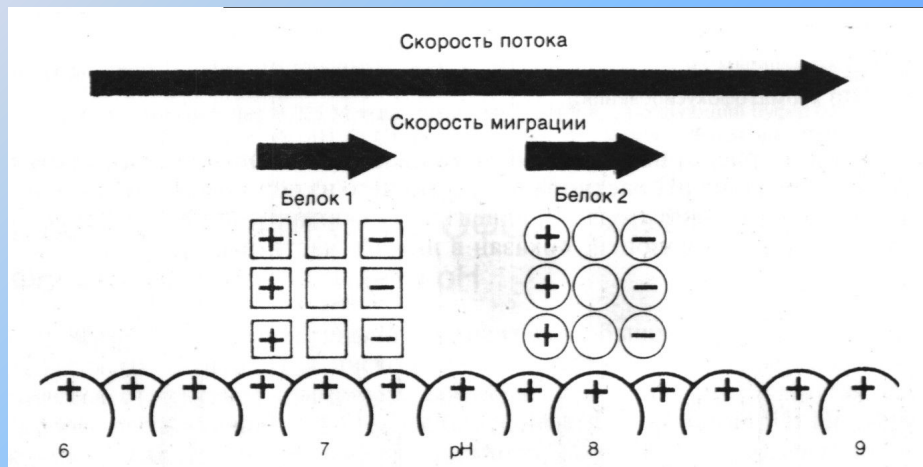
- **Техника** получения градиента pH в уравновешенной стартовым раствором **СР** колонке ( $\text{pH}_1$ ) при пропускании буферного элюента **Э** ( $\text{pH}_2$ )
- Слабоосновный **анионообменник** ( $-\text{NR}_2$ ) – **нисходящий** градиент;  
Слабокислотный **катионообменник** ( $-\text{COOH}$ )- **восходящий** градиент

# Техника хроматофокусирования (ХФ)



# Фокусирующий эффект при разделении биполярных соединений

(из книги "Хроматофокусирование полибуфером на ПБИ", Stockholm-Uppsala, 1982)



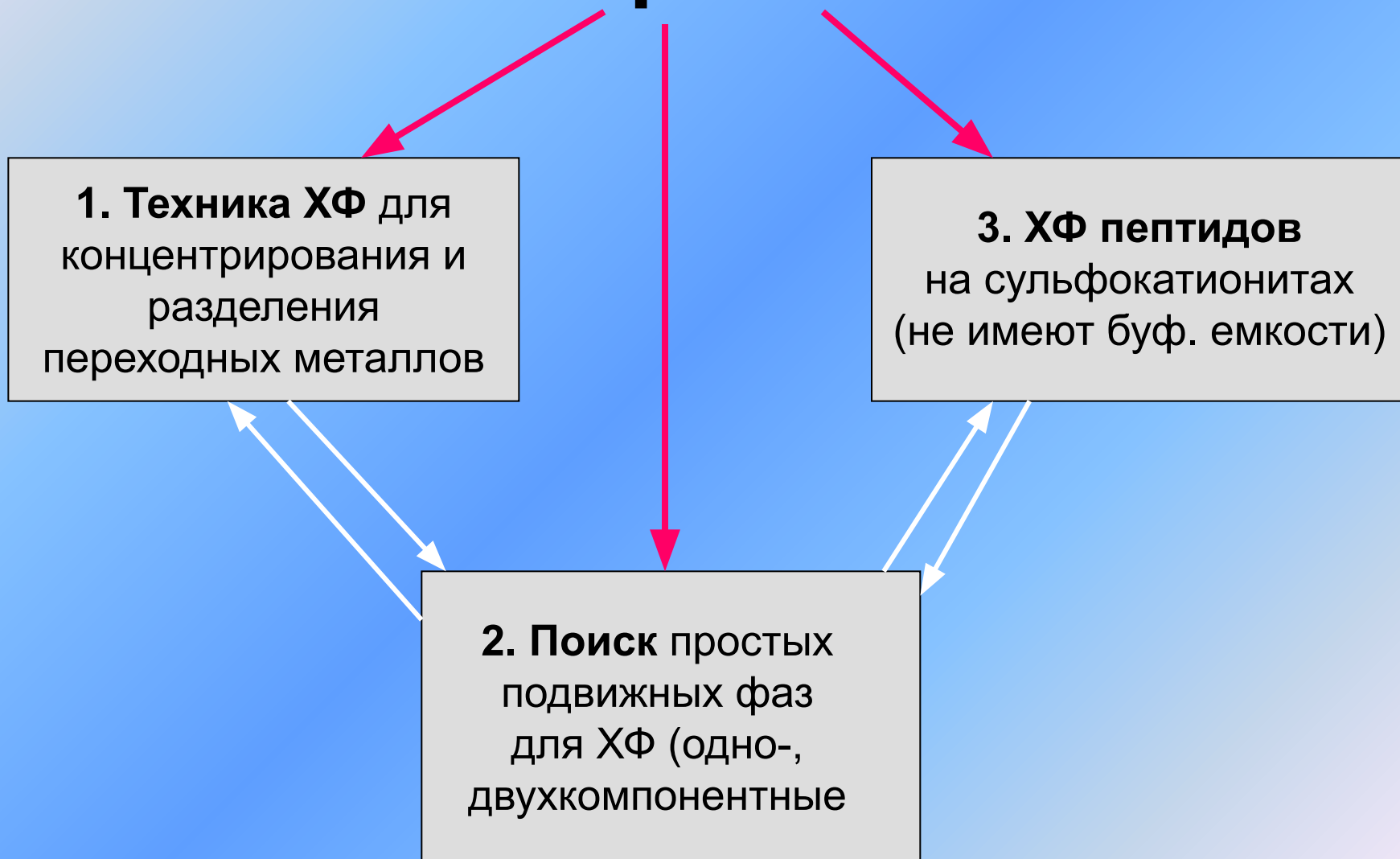
# Преимущества хроматофокусирования

- **не требуется** дополнительное оборудование (градиентный насос, система смесителей);
- **высокая** нагрузочная **емкость** колонок, **концентрирование** и **разделение** на одной колонке;
- высокая **воспроизводимость** градиентов ( $s_r \leq 0,02$ ), **широкий** рабочий **интервал pH** (до 4-5 ед.);
- **фокусирующий** эффект (для биполярных соединений)

**НО:**

**основное ограничение** – полиамфолитные элюенты

# Новые направления ХФ



# 1. Хроматофокусирование ионов переходных металлов

- **Анионообменные** сорбенты: PBE-94 (Pharmacia); кремнеземы (Силохром, Силасорб) с привитыми олигоэтиленаминами – En-, Dien-, Tetren-; AP- (аминопропил-)
- **Катионообменные** сорбенты: полимеры (МГЦ, ССПС и ПММА) с привитыми карбоксильными группами -COOH, -CH<sub>2</sub>COOH
- **Удерживание** ионов металлов за счет комплексообразования при более высоких pH и элюирование при плавном снижении pH в слое сорбента (концентрирование и разделение)



# Комплексообразующие сорбенты

для ХФ ионов металлов

(впервые – нисходящие градиенты рН  
на карбоксильных сорбентах)

[12 сорбентов]

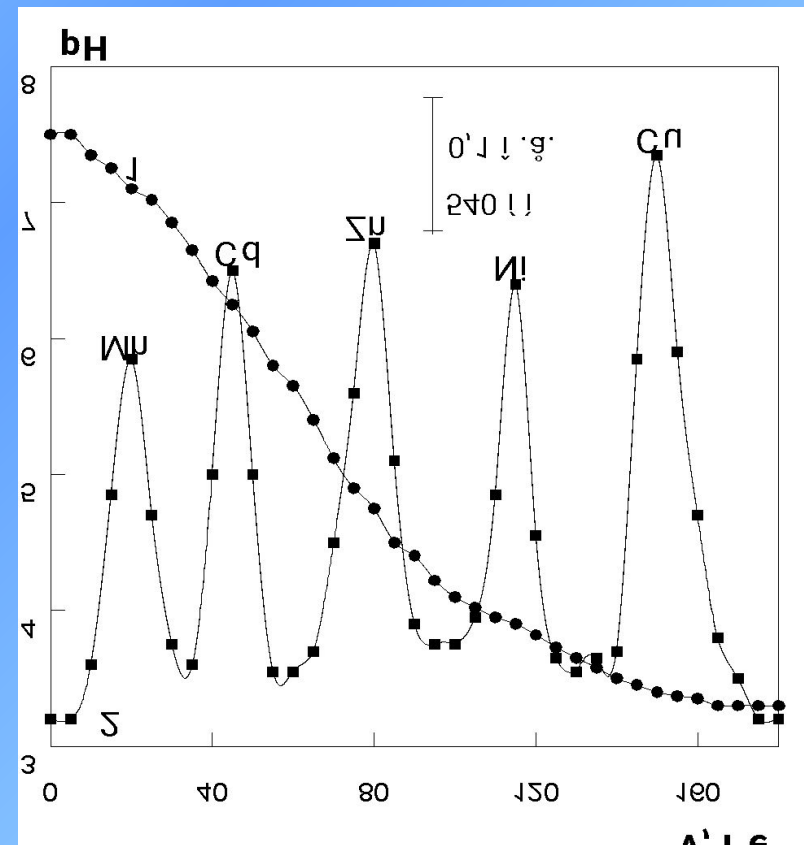
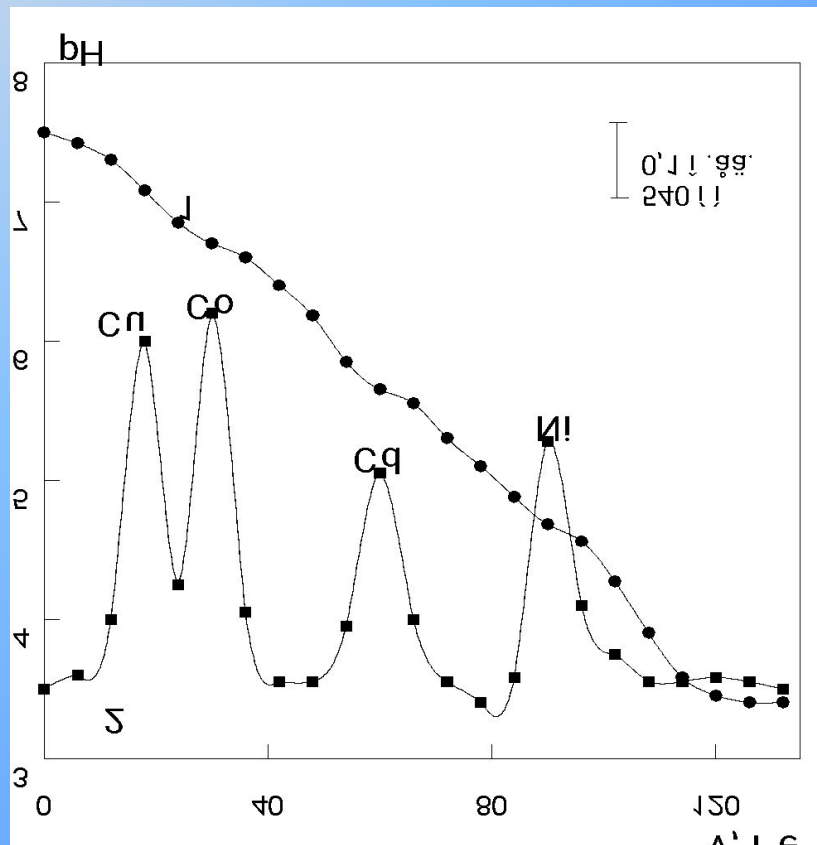
Сорбент	Матрица	Функц. группы	Размер частиц (мкм)	рН-диапазон гидрол. стаб-ти	Ионообм. емкость
<b>РВЕ-94 (Pharmacia)</b>	полисахарид	-NR <sub>2</sub> (не указаны)	100-200	2 - 12	0,32 ммоль/мл геля
<b>Tetren-SiO<sub>2</sub></b>	Силохром С-120	тетраэтиленпентамин	100-160	1 - 8	0,35 ммоль/г
<b>MacroPrep 50 CM (*) (Biorad)</b>	ПММА	-CH <sub>2</sub> COOH	50	3 - 13	0,21 ± 0,04 ммоль/мл геля

# Хроматофокусирование (ХФ) ионов металлов на анионообменных сорбентах

сорбент - а) РВЕ-94; б) Tetren-SiO<sub>2</sub> (колонка 300x9 мм)

СР - 25 мМ Трис-НСI (рН 7,5), Э - 1:8 Полибуфер-74 (рН 3,3), 1 мл/мин

Детектирование - по реакции с ПАР (540 нм)



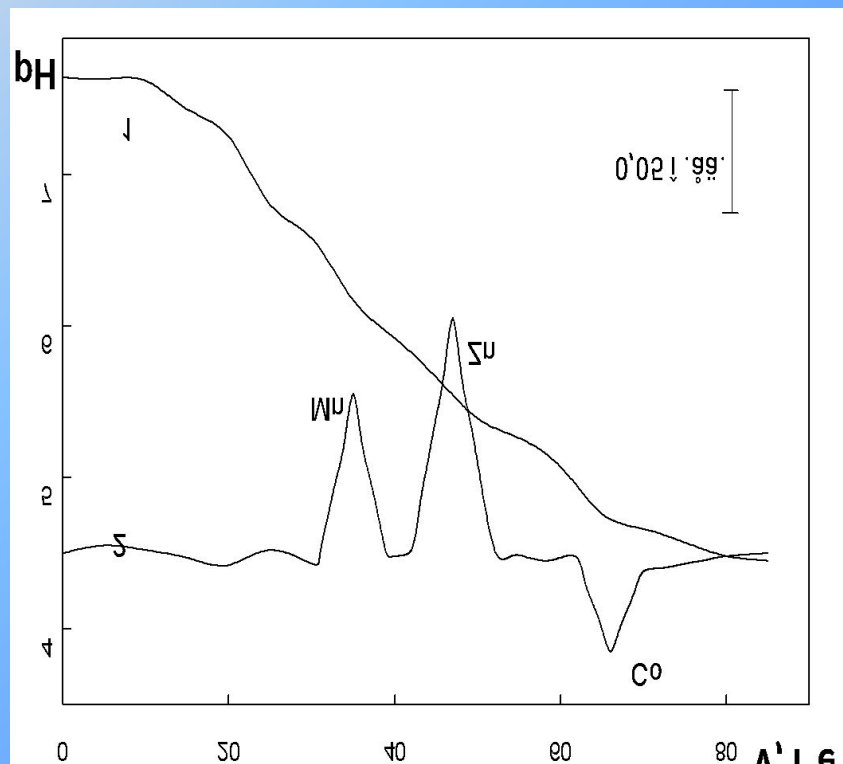
# Разделение и концентрирование ионов металлов

сорбент MacroPrep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 10 мМ Трис-НСI (рН 7,5),  $I_{СР}$ : 0,1 (NaCl)

Э: 0,5 мМ лимонная к-та (рН 3,4),  $I_{Э}$ : 0,1 (NaCl); 1 мл/мин

Детектирование: УФ (254 нм)



сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

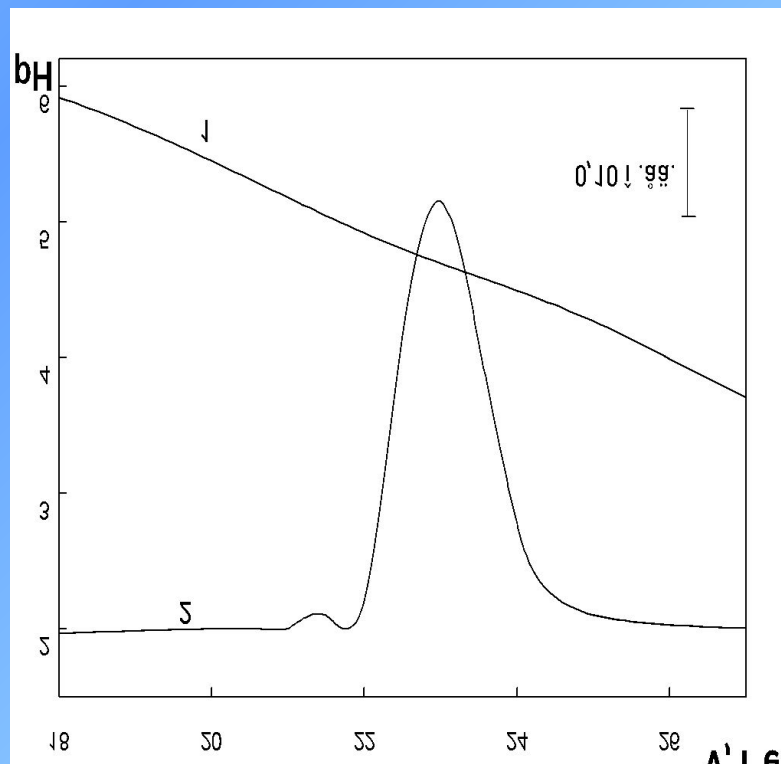
СР: 10 мМ Трис-НСI (рН 7,1),  $I_{СР}$ : 0,05

Э: 1 мМ лимонная к-та (рН 3,3),  $I_{Э}$ : 0,05;

1 мл/мин

Проба:  $2 \times 10^{-5}$  М  $\text{Cu}^{2+}$ , 30 мл

Детектирование: УФ (254 нм)



# Концентрирование ионов переходных металлов

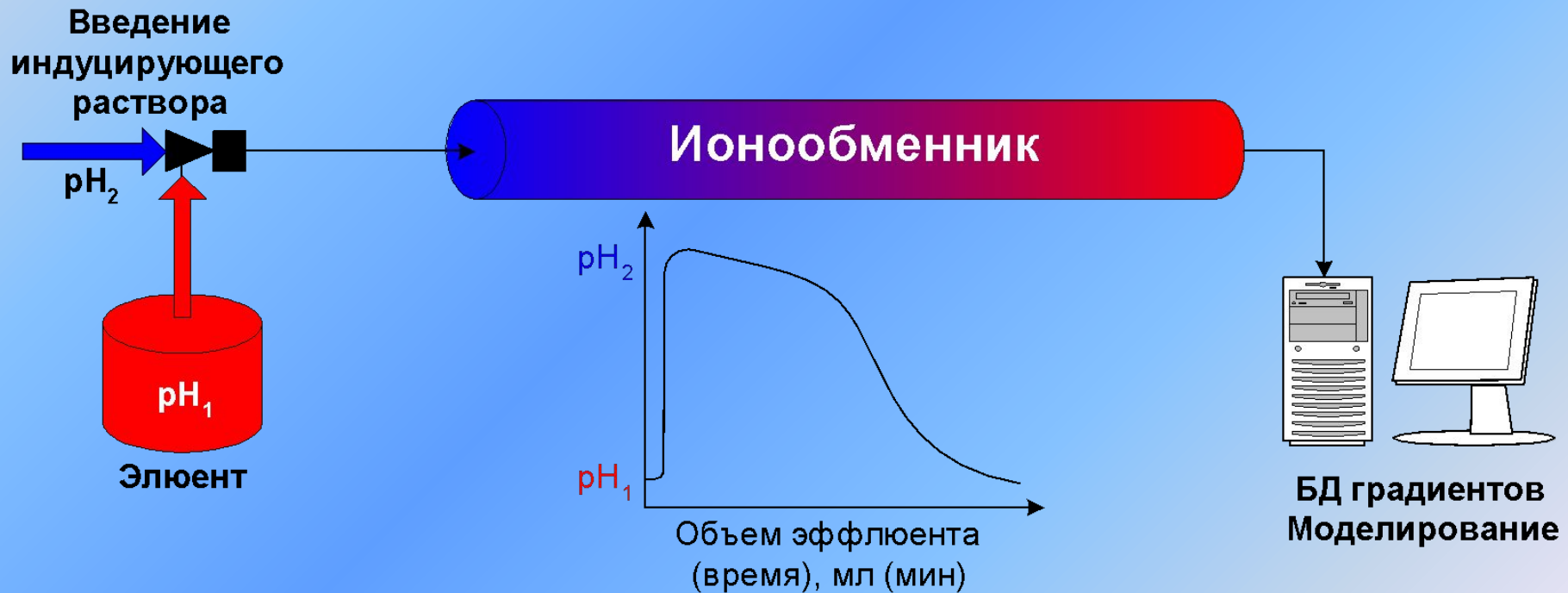
$$K = \frac{m_{\text{сорб.в-ва}} V_{\text{ПФ}}}{m_{\text{несорб.в-ва}} m_{\text{НФ}}}$$

Сорбент	Co <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
<b>РВЕ-94</b>	127	121	113	105	93	63	47	--
<b>СМ-52</b>	150	84	>500	70	98	83	80	>600

# Техника индуцирования:

введение конц. индуцирующего раствора ИР ( $\text{pH}_2$ )  
в поток разбавленного буферного элюента Э ( $\text{pH}_1$ )  
(K.Slais; Brno, 1992-94; А.Иванов, 1994-95)

→ сокращение времени в 3-4 раза



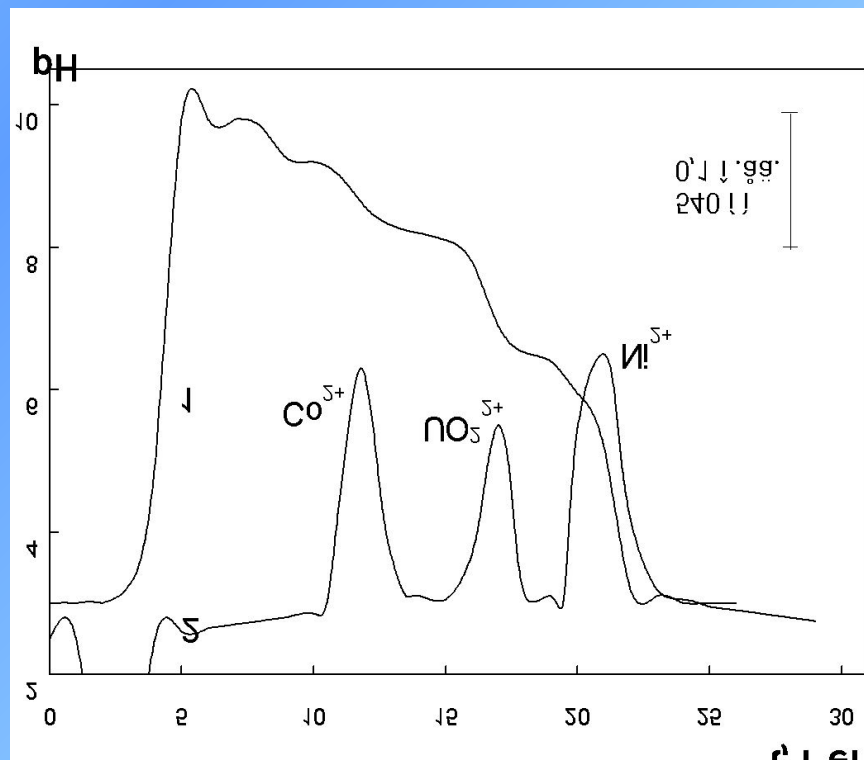
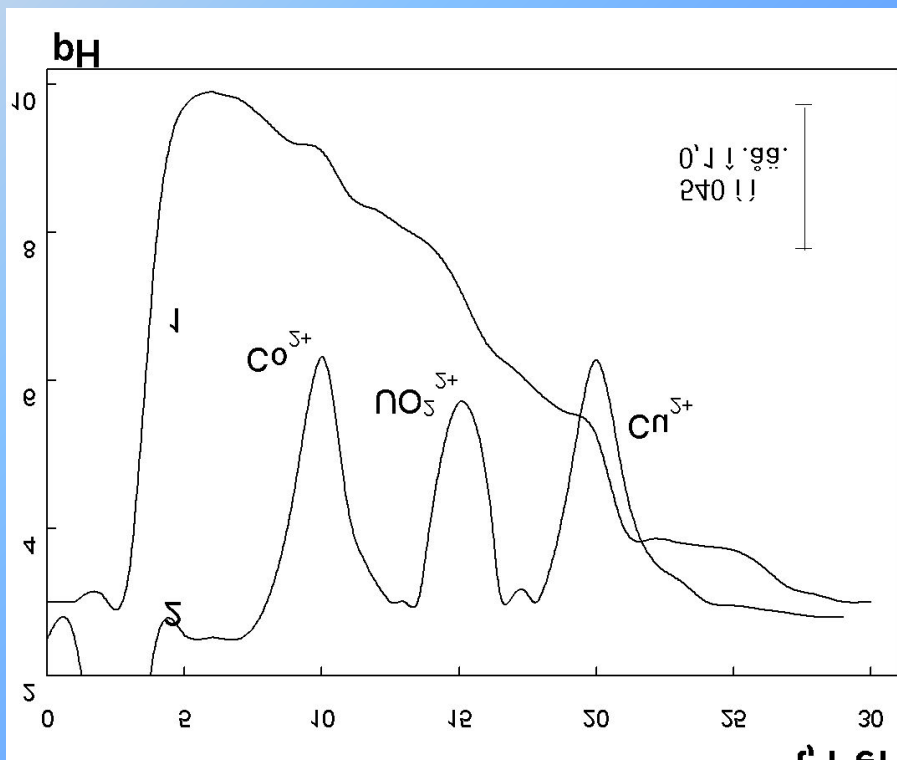
# Разделение ионов металлов с индуцированным градиентом pH

сорбент - а) Dien-SiO<sub>2</sub> (100-120 мкм, 150x2 мм); б) Tetren-SiO<sub>2</sub>

ИР – 1 мл 100 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>,

Э – а) 10 мМ (6-аминогексановая к-та + гистидин); 0,2 мл/мин; б) 20 мМ,

Детектирование - по реакции с ПАР (540 нм)



## 2. Новые простые подвижные фазы для хроматофокусирования

Традиционно – полиамфолитные элюенты  
 (“полибуферы”)

Преимущества: постоянная буферная емкость в широком диапазоне pH → широкий рабочий интервал pH

Но:

**сложный** синтез, **высокая** стоимость, **низкая** устойчивость к биодеградации; **трудно** отделять от белков и пептидов; **высокий** УФ-сигнал

## Подходы к поиску подвижных фаз – стартовых растворов и элюентов

- эмпирический - экспериментальная проверка смесей кислот, оснований и амфолитов – до **20 - 25** компонентов (Hutchens, 1985-86)
- на основе моделирования (учет свойств сорбентов, активных компонентов подвижных фаз, **наличие сильного электролита**):  
**сорбент** – полифункциональный, полиэлектролитный  
**СР** – слабое основание + электролит (NaCl)  
**Э** – слабая кислота + основание + электролит (NaCl)



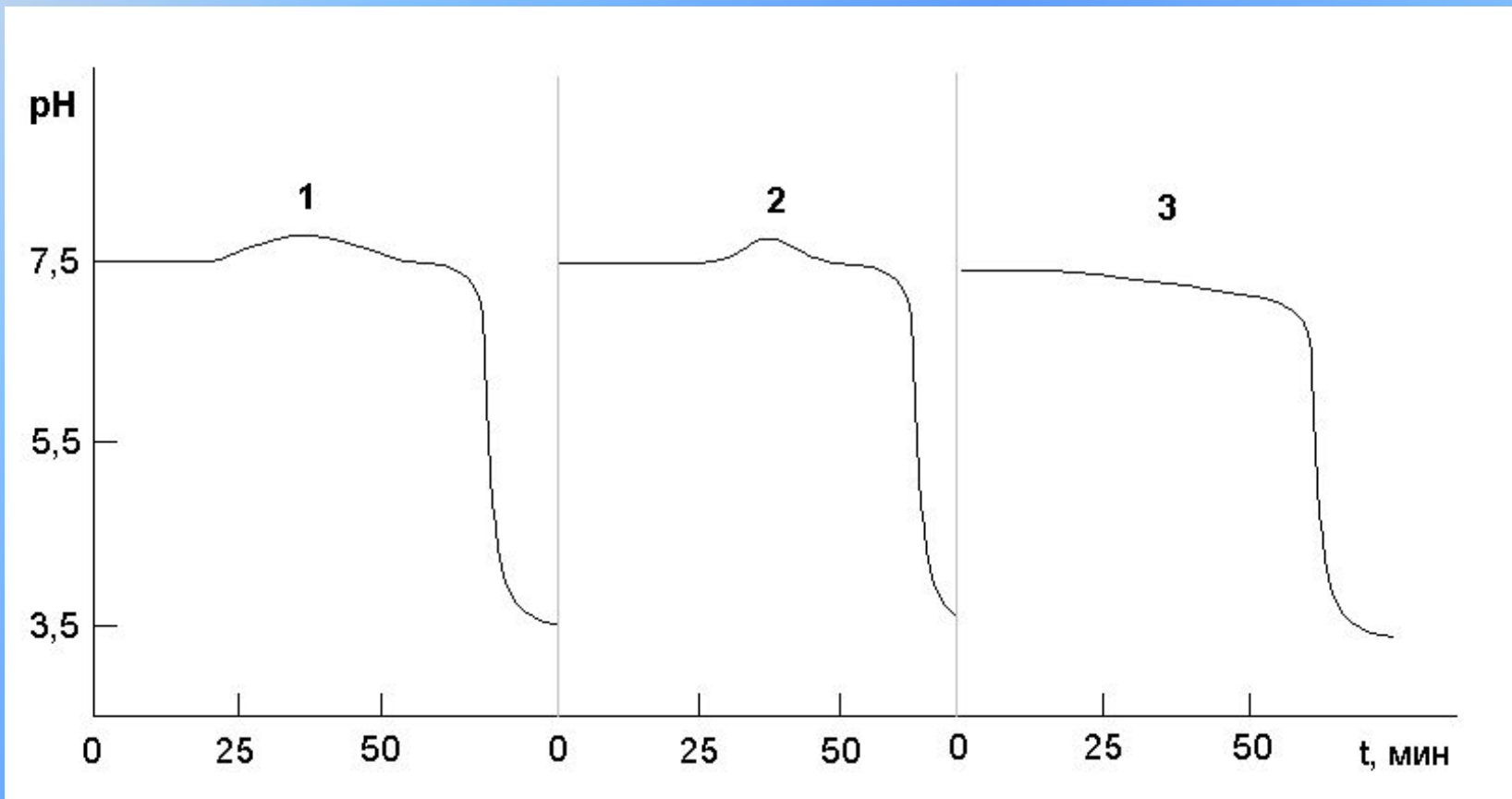
## 2.1. Как избавиться от подъема pH на нисходящем градиенте?

$$I_{\text{Э}} < I_{\text{СР}}$$

сорбент Tetren-SiO<sub>2</sub> (7,5 мкм, 1 мМ/г, 250x4,6 мм)

СР: 25 мМ Трис-10 мМ H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (pH 7,5), I<sub>СР</sub>: 1 - ~0; 2 - 0,1; 3 - 1

Э: 20 мМ H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-22 мМ Трис (pH 3,5), I<sub>Э</sub>: ~0,05



## Нисходящие градиенты pH в анионообменных колонках

- полифункциональные сорбенты с полиэлектролитными свойствами;
- элюенты с минимальным содержанием слабых оснований;
- $I_{\text{э}} < I_{\text{ср}}$   
для формирования **плавного** градиента ионную силу элюента следует **понижать**,  
для более **резкого** градиента - **повышать**

# Разделение изоформ плазминогенов

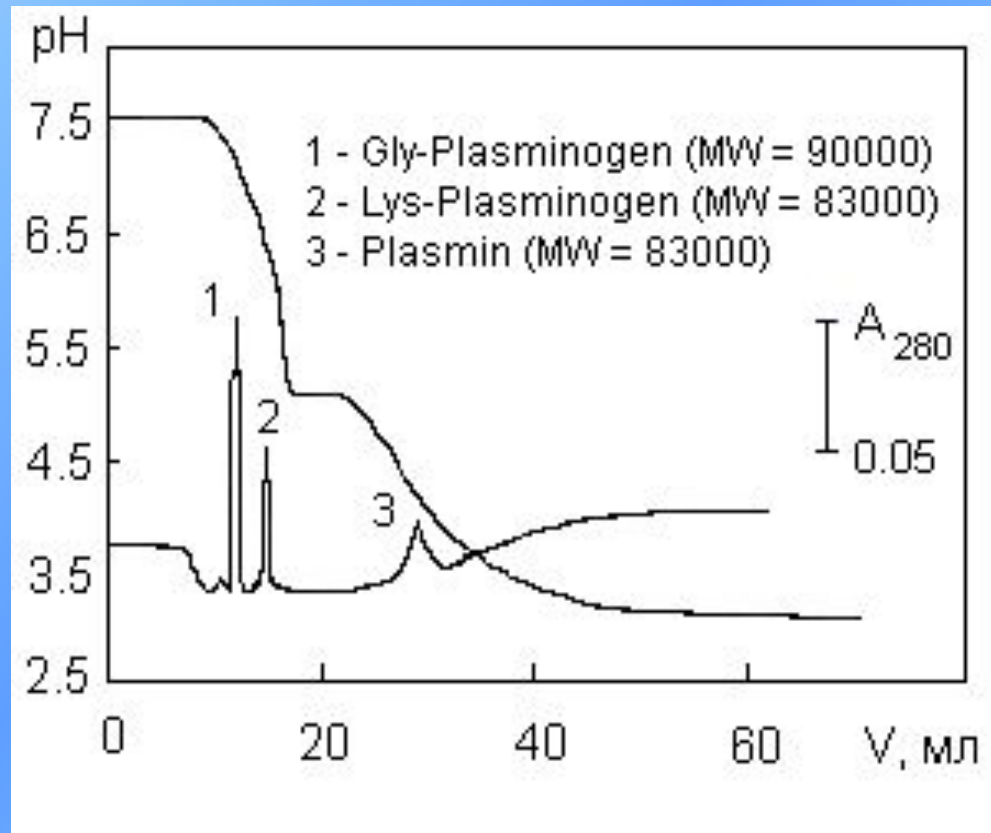
сорбент Tetren-SiO<sub>2</sub> (7,5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 25 мМ Трис-НСl (рН 7,5), I<sub>ср</sub>: 0,02

Э: 2 мМ Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> (рН 2,9), I<sub>э</sub>: ~0; 1 мл/мин

Проба: 20 мкл лиофилизов. смеси **Glu-** и **Lys-**плазминогенов (рI 5,82 и 5,66), активность 1 мг/мл

Детектирование - УФ (280 нм)



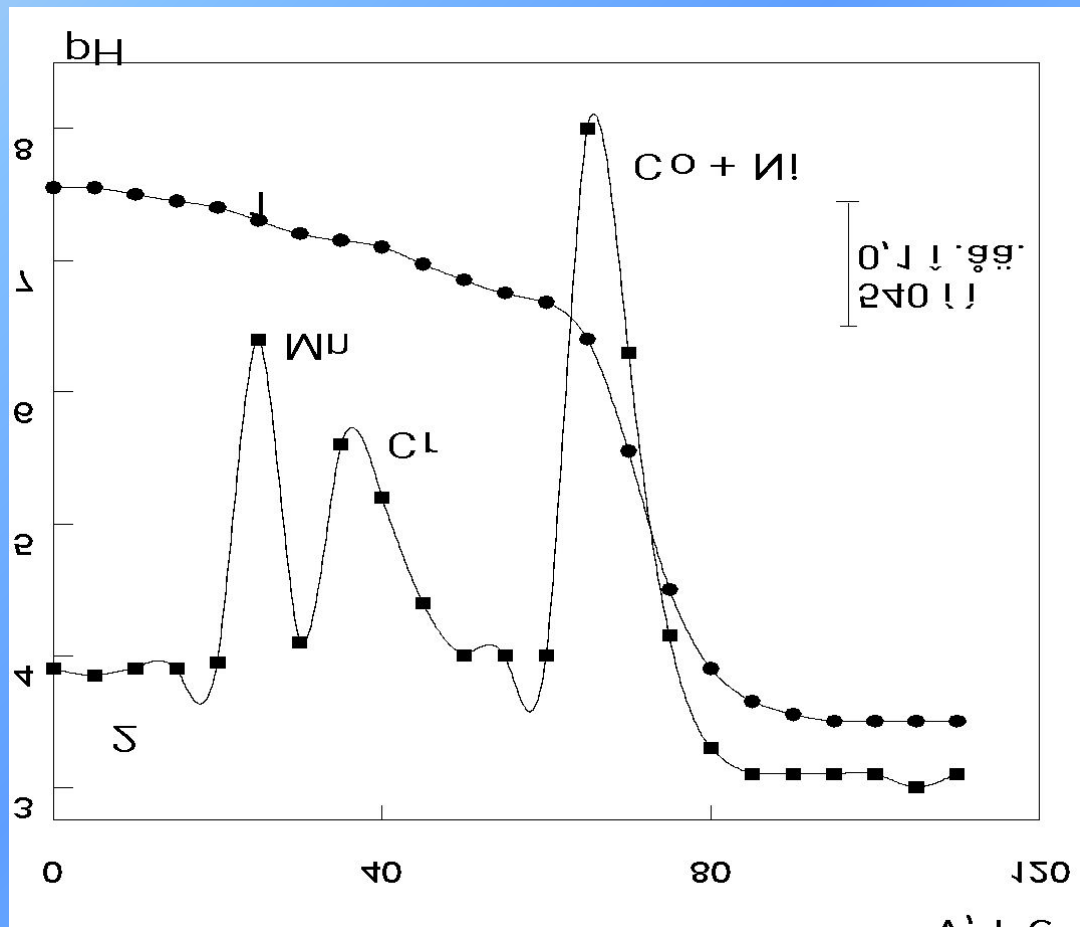
# Разделение смеси металлов

сорбент РВЕ-94 (>100 мкм, 300x9 мм)

СР: 25 мМ Трис-НСI (рН 7,5),  $I_{\text{СР}}$ : 0,05

Э: 20 мМ глутаминовая к-та (рН 3,3), 1 мл/мин

Детектирование - по реакции с ПАР (540 нм)

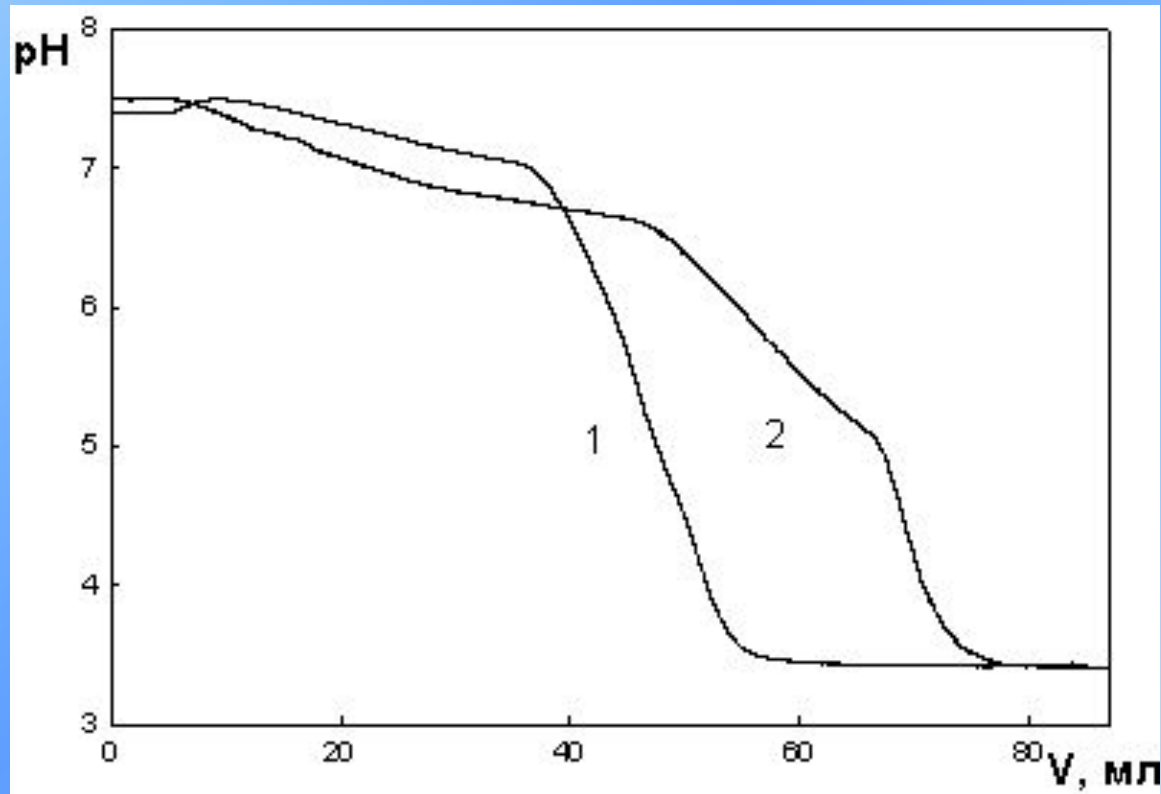


# Эффект ионной силы подвижных фаз для карбоксильных колонок

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 10 mM Трис-НСI (рН 7,5),

Э: 1 mM (1) и 0,5 mM (2) лимонная кислота (рН 3,3 - 3,5); 1 мл/мин,  
ионная сила подвижных фаз: 1 - 0,01; 2 - 0,1



## Квази-линейные нисходящие градиенты pH в катионообменных колонках

- сорбенты с полиэлектролитными свойствами;
- слабое основание в элюенте не влияет на профиль градиента, а лишь на конечное значение pH;
- $I_{\text{Э}} \approx I_{\text{СР}} (\sim 0,05 - 0,2)$

для получения плавного градиента можно использовать однокомпонентные Э с высокой ионной силой (как в СР)

## 2.2. Восходящие градиенты pH

- Мало изучены для применения в ХФ
- Подвижные фазы - полиамфолиты
- Эффект ионной силы не исследован
- Перспективны для разделения белков, пептидов и др. биполярных макромолекул

# Выбор элюента для восходящих градиентов pH

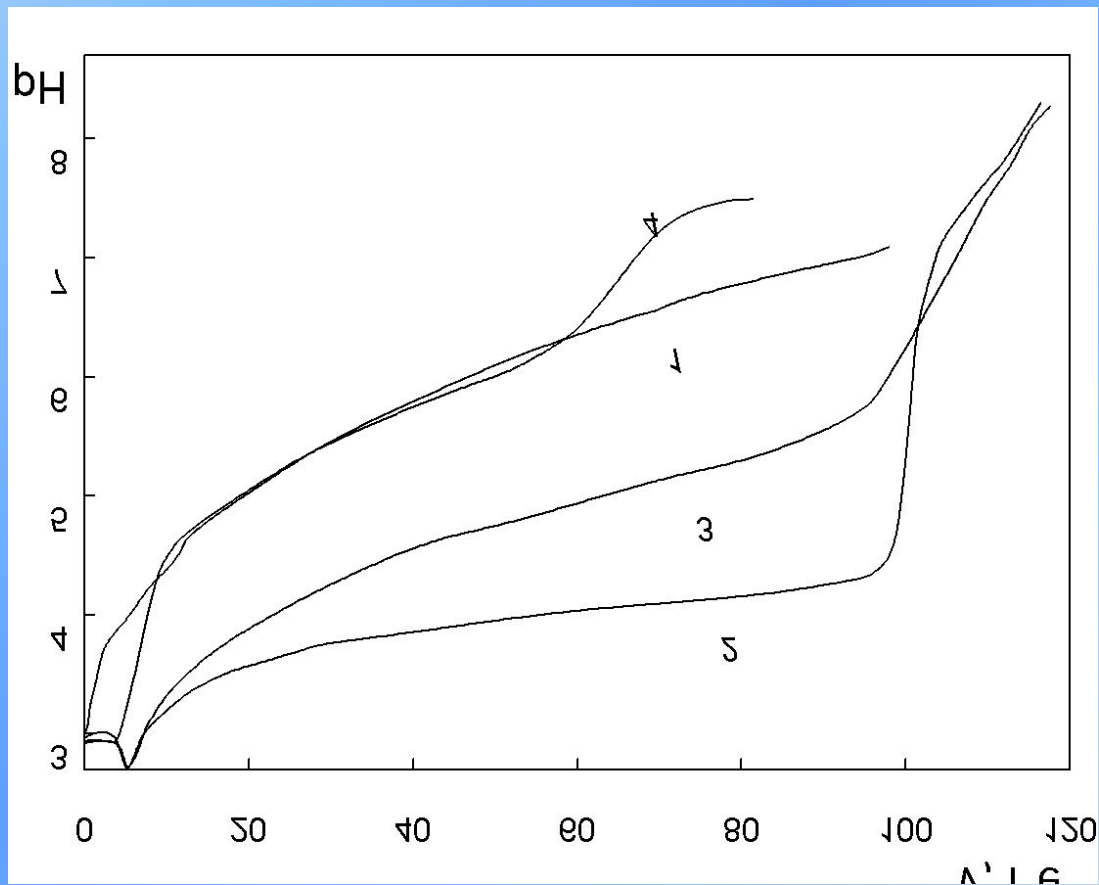
сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 2 мМ лимонная к-та (pH 3,3),

Э (pH 7,5): 1:25 "Полибуфер" (1); 12,5 мМ Трис-HCl (2);

12,5 мМ Трис-HCl + 1 мМ лимонная к-та (3);

12,5 мМ Трис-HCl + 6 мМ лимонная к-та (4); 1 мл/мин





# ХФ альбуминов с восходящим градиентом

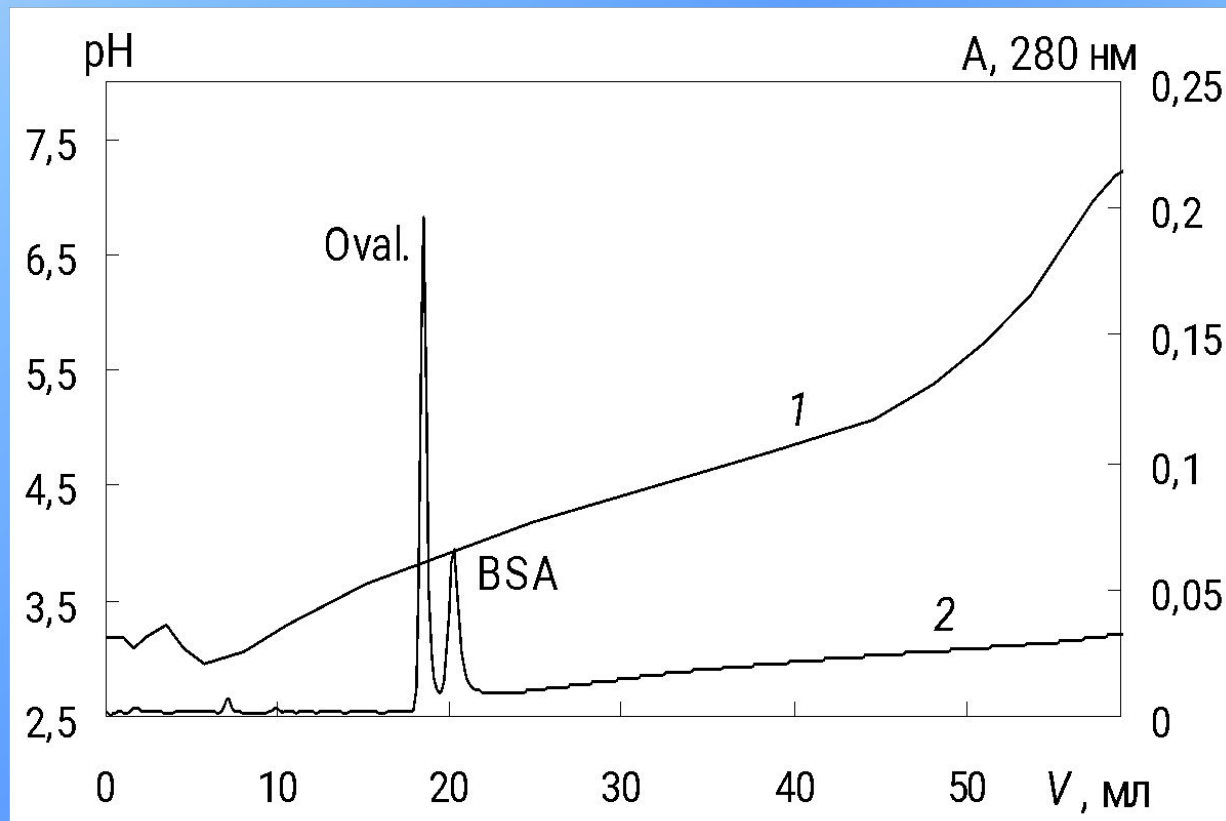
сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 2 мМ лимонная к-та + 1,5 мМ Трис (рН 3,3),  $I_{CP}$ : ~0

Э: 20 мМ Трис-НСl + 5 мМ лимонная к-та (рН 7,6); 1 мл/мин;  $I_3$ : 0,5

Проба: овальбумин (Oval.) и бычий альбумин (BSA), 0,5 мг/мл

Детектирование: УФ (280 нм)



# ХФ образца формиатдегидрогеназы на сорбенте низкой емкости

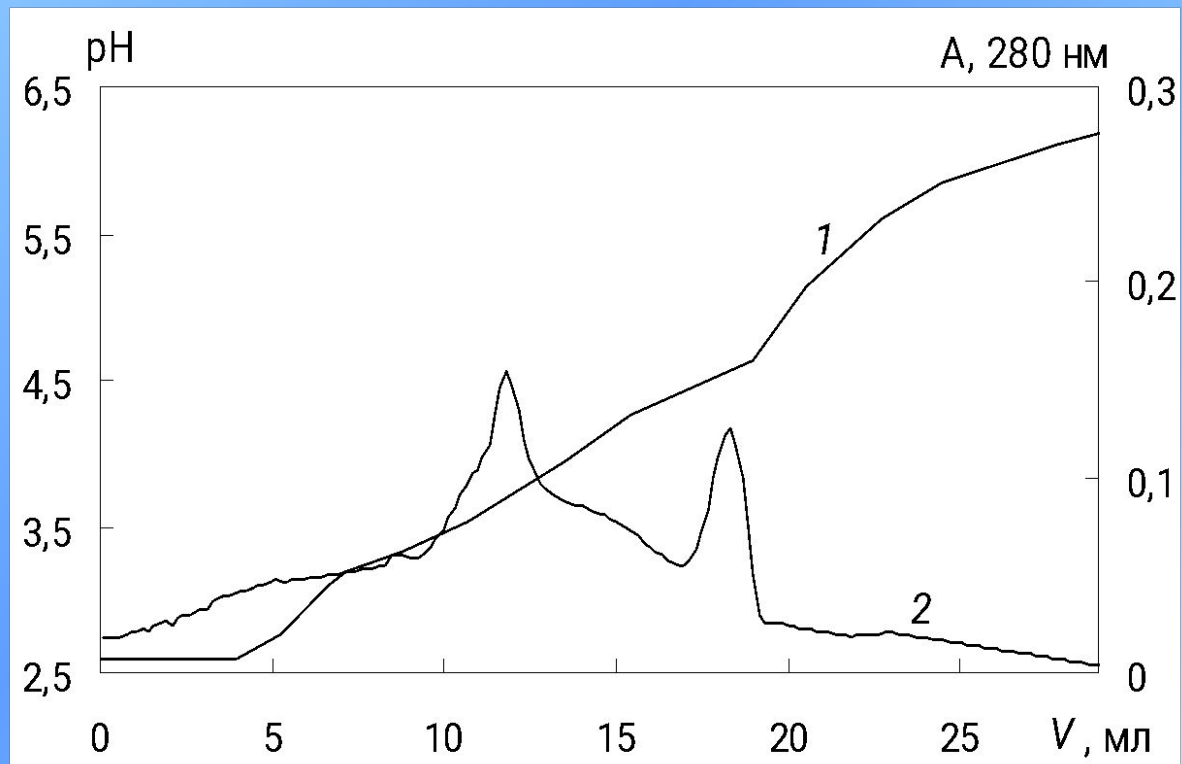
сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 2 мМ лимонная к-та (рН 3,0),  $I_{\text{СР}}$ : 0,05 (NaCl)

Э: 10 мМ Трис-лимонная к-та (рН 7,5); 1 мл/мин;  $I_{\text{Э}}$ : ~0

Проба: ФДГ из клеточного лизата с активностью 1 мг/мл

Детектирование: УФ (280 нм)



# Квази-линейные восходящие градиенты pH в карбоксильных колонках

## 1. сорбенты с высокой емкостью:

- **слабое основание** в стартовом растворе **влияет** на начальный участок градиента pH;
- $I_{\text{э}} > I_{\text{ср}}$  (от 0,1)

## 2. сорбенты с низкой емкостью:

- **слабое основание** в стартовом растворе **не влияет** на начальный участок градиента pH;
- $I_{\text{э}} < I_{\text{ср}}$  либо  $I_{\text{э}} \approx I_{\text{ср}}$  (~0,05)

# 3. Хроматофокусирование пептидов на сульфокатионитах

**Возможность** разделения пептидов

**Проблема:** полиамфолитные элюенты осложняют детектирование ( $\lambda < 220$  нм) – только “ароматика”

- Отсутствие буферной емкости сорбента
- Исключительная роль элюента
- Сильно- и слабоудерживаемые пептиды

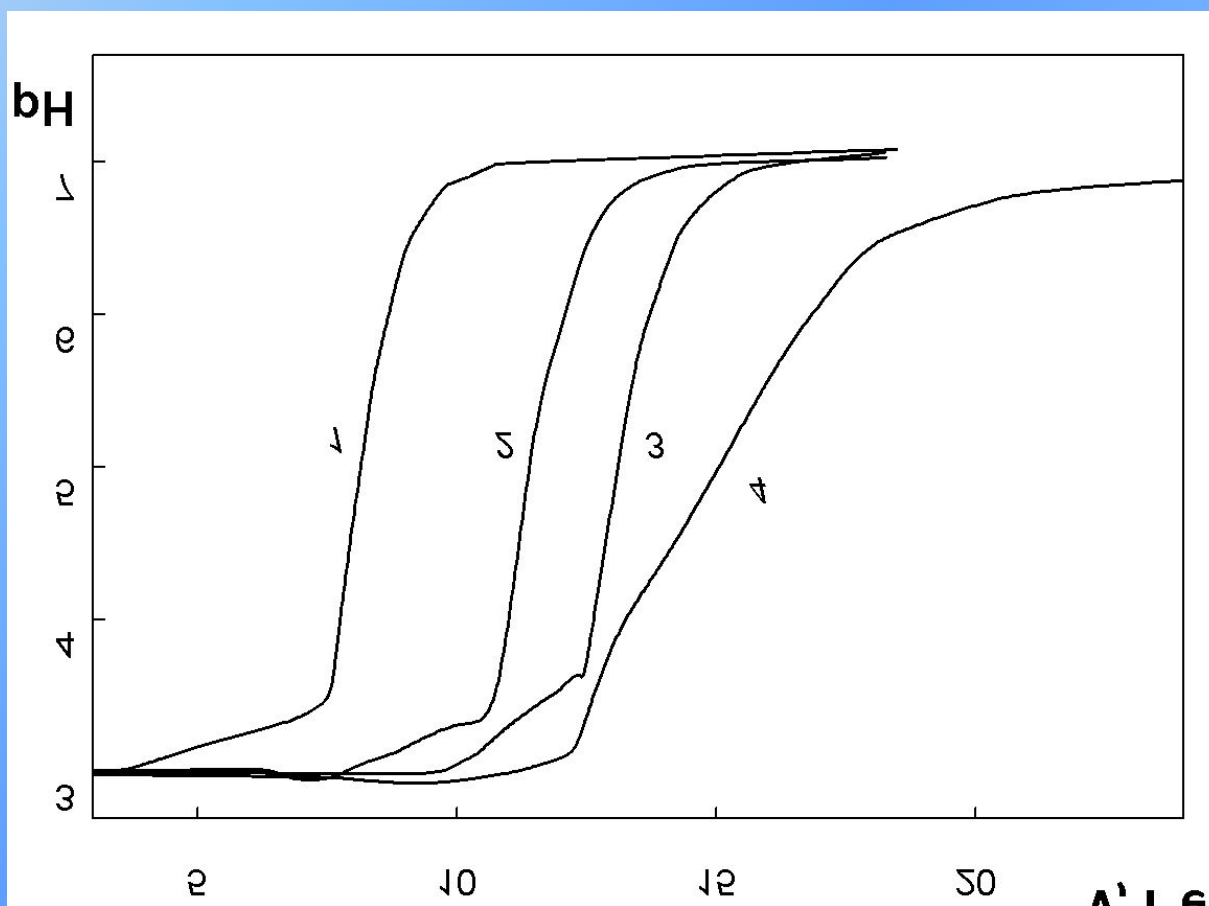
Сорбент	Матрица	Размер частиц	Функц. группы	pH-диапазон стаб-ти	Буферная емкость
Hamilton PRP-X200	ПММА	10 мкм	$-\text{SO}_3^-$	1 - 13	нет

# Подвижные фазы для ХФ на сильно-кислотном сорбенте

сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

СР: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 3,0),  $I_{\text{СР}}$ : ~0 (1 и 2), 0,1 (3), 0,5 (4)

Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис (рН 7,0),  $I_{\text{Э}}$ : ~0 (1 и 4), 0,3 (2 и 3);  
1 мл/мин



# ХФ трипсинового гидролизата альбумина

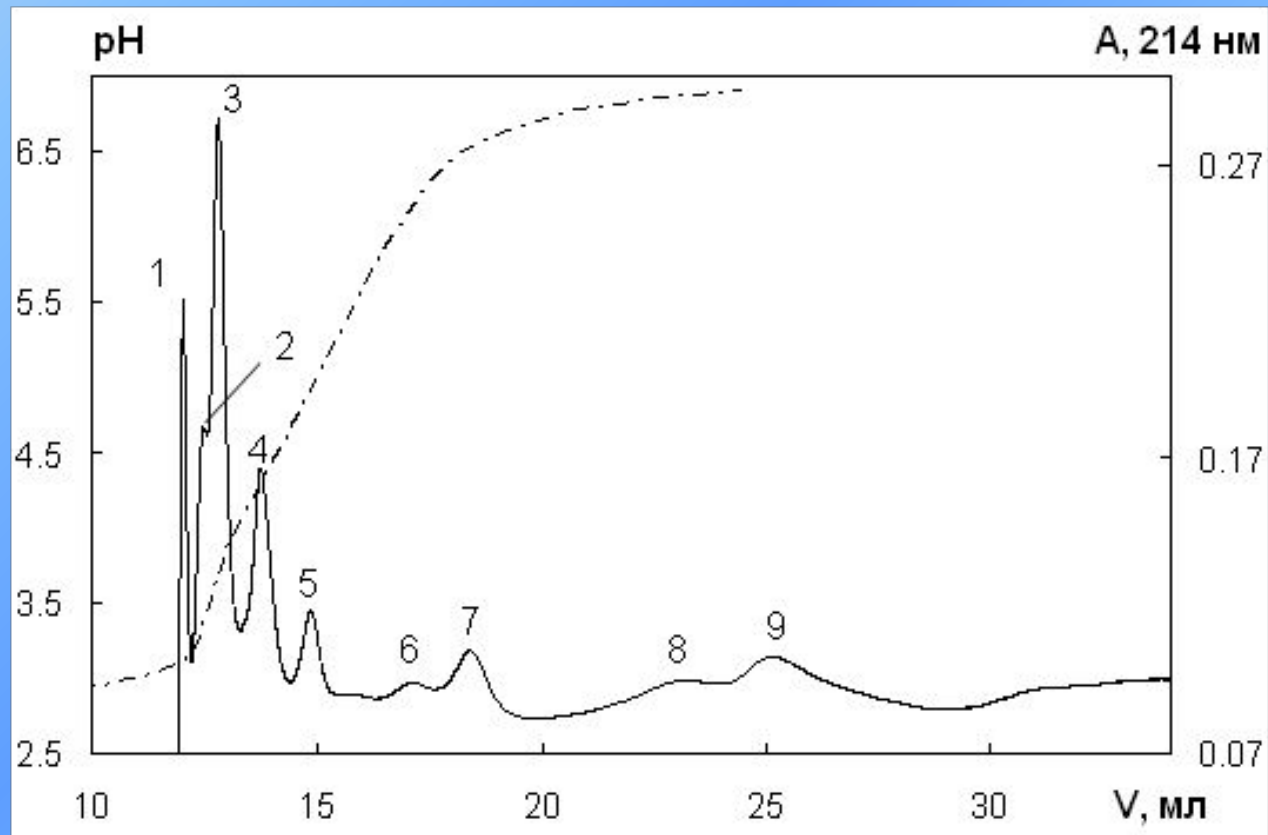
сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

СР: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 3,0),  $I_{\text{СР}}$ : 0,5 (NaCl)

Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис (рН 7,0), 1 мл/мин,  $I_{\text{Э}}$ : ~0

Проба: гидролизат человеческого альбумина (0,1 мг)

Детектирование: УФ (214 нм)



# ХФ гидролизата альбумина при одновременном градиенте ионной силы

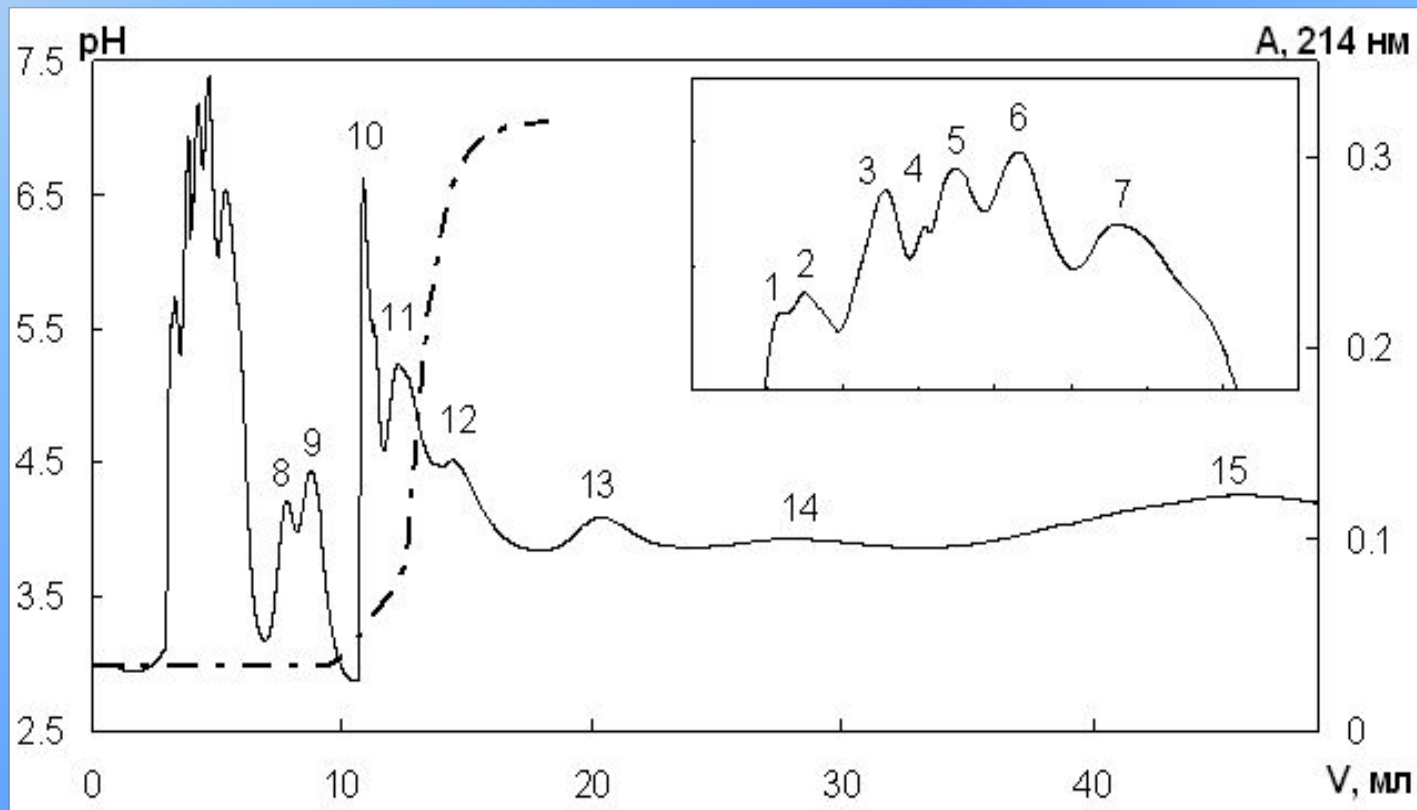
сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

СР: 3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (pH 3,0),  $I_{\text{CP}}$ : 0,1 (NaCl)

Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (pH 7,0), 1 мл/мин,

$I_3$ : 0,3 (NaCl)

Детектирование: УФ (214 нм)



# Линейные восходящие градиенты pH в СИЛЬНО-КИСЛОТНЫХ колонках

- активные компоненты стартового раствора и элюента – одной природы;
- добавки  $\text{CH}_3\text{CN}$  (~10%) в обе фазы
- $I_{\text{ср}} (\sim 0,1) < I_{\text{э}} (\sim 0,3)$  (сочетание градиента pH с градиентом ионной силы)



# Выводы

“Устоявшийся” метод **хроматофокусирования** может развиваться в следующих направлениях:

1. Предложено использовать технику **хроматофокусирования** и **индуцирования** для концентрирования и **pH-градиентного разделения** ионов металлов на комплексообразующих анионитах и катионитах.
2. Коммерческие “Полибуферы” можно заменить **простыми одно-двухкомпонентными элюентами** при создании высокой **ионной силы** в одной или обеих подвижных фазах. Возможности **простых элюентов** показаны на примере разделения **металлов; аминокислот; белков; ферментов**. Фокусирующий эффект для биполярных молекул усиливается за счет градиента ионной силы.
3. Технику **хроматофокусирования** можно использовать в сочетании с **градиентом ионной силы** для разделения смесей **пептидов** на **сульфокатионитах**.

# Публикации

**Опубликовано 80 статей, из них по теме работы - 57:**

- **2 обзора** (ЖАХ, 1999; Вестник МГУ, 2005)
- **55 статей:** ЖАХ – 9  
ЖФХ – 14  
Вестник МГУ – 24  
Сорбционные процессы – 3

Fresenius J., Mendeleev Comm., J. Liquid Chrom., J.Chromatogr., Известия ВУЗов, Молекулярные технологии

- **Тезисы докладов – 50:**

XVI, XVII, XVIII Менделеевские съезды; IICS-92, 93, 94, 2000, 2004; ICAS-97, 2006; SBS-03; Всеросс. симп. по хроматографии 1998-2008; “Разделение и концентрирование в аналитической химии”; “Ломоносовские чтения-2005”; “Аналитика России-2007” и др.

- **Диссертации:**

А.В. Иванов “Хроматофокусирование переходных металлов” (1997),  
А.Б. Тессман “Формирование внутренних градиентов pH в ионообменной хроматографии: моделирование и экспериментальная проверка” (2000),  
М.С. Вакштейн “Новые подвижные фазы для хроматофокусирования в катионообменных системах” (2006).

# Благодарность

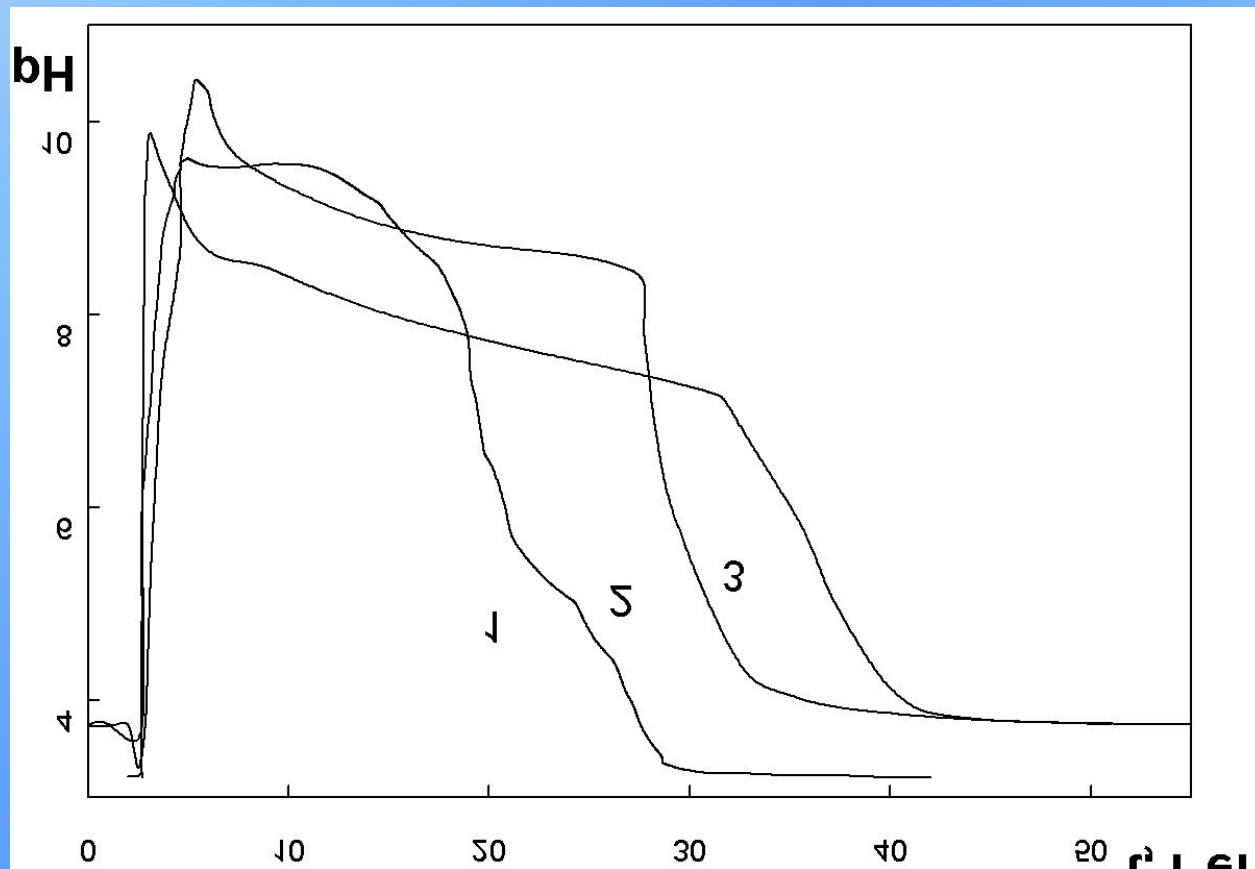
- докт. хим. наук **П.Н.Нестеренко, О.А.Шпигуну;**  
канд. хим. наук **А.В. Гармашу;** аспирантам **А.Б. Тессману, М. С. Вакштейну, С.С. Кубышеву,** дипл. **Н.Ю. Смирновой;**  
проф. **К. Шлайсу** и дипл. **Т. Рейтару** (Чехия)  
за плодотворное сотрудничество
- **РФФИ** – за финансовую поддержку исследования (проекты № **02-03-33007** и **05-03-33096**)

# Индукцированные градиенты в карбоксильных колонках

сорбент Macro-Prep 50 CM (50x4,6 мм)

Э: 8 мМ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 3,6), ионная сила: 1 и 3 - 0,1; 2 - ~0

ИР: 1 мл 3,25 М  $\text{NH}_3$  (pH 11), ионная сила: 1 - 1; 2 и 3 - ~0

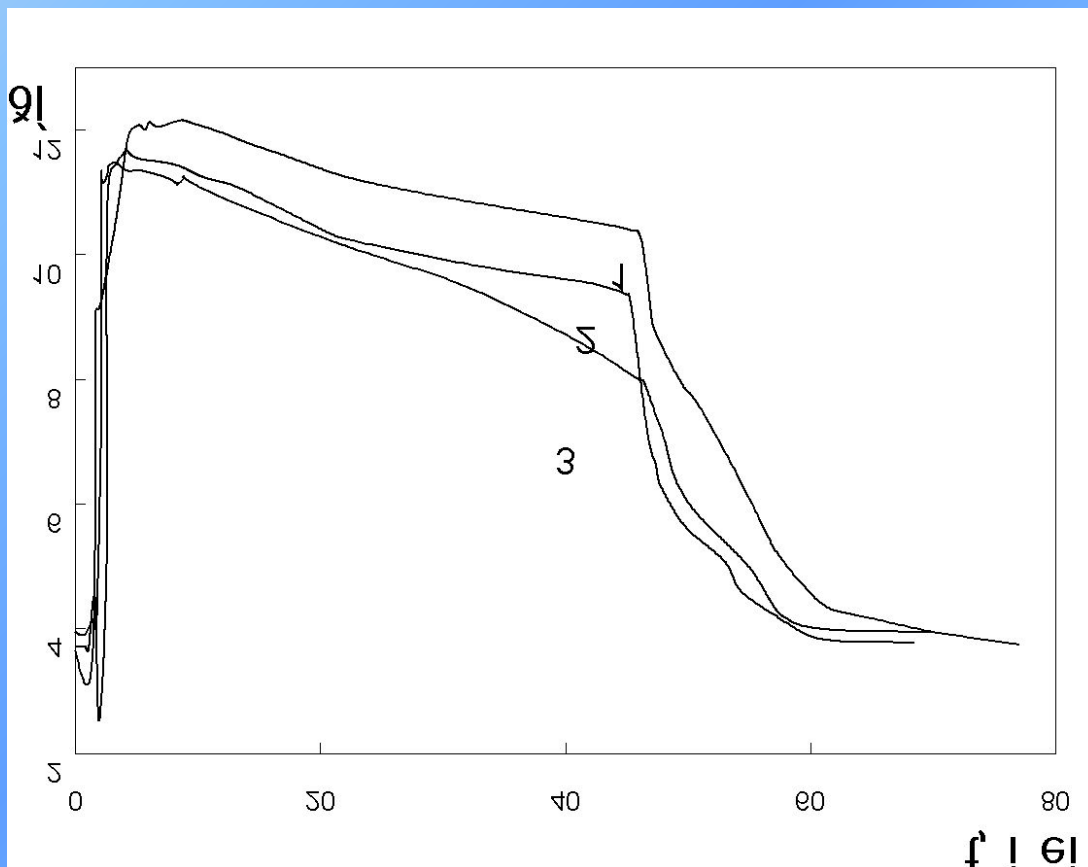


# Индукцированные градиенты в карбоксильных колонках

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

ИР: 1 мл [4 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  + 1 М  $\text{NaCl}$  (1, 3)] (pH 11,9)

Э: 5 мМ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH 3,6), ионная сила ( $\text{NaCl}$ ): 1, 2 – 0, 3 – 0,1 М;  
1 мл/мин



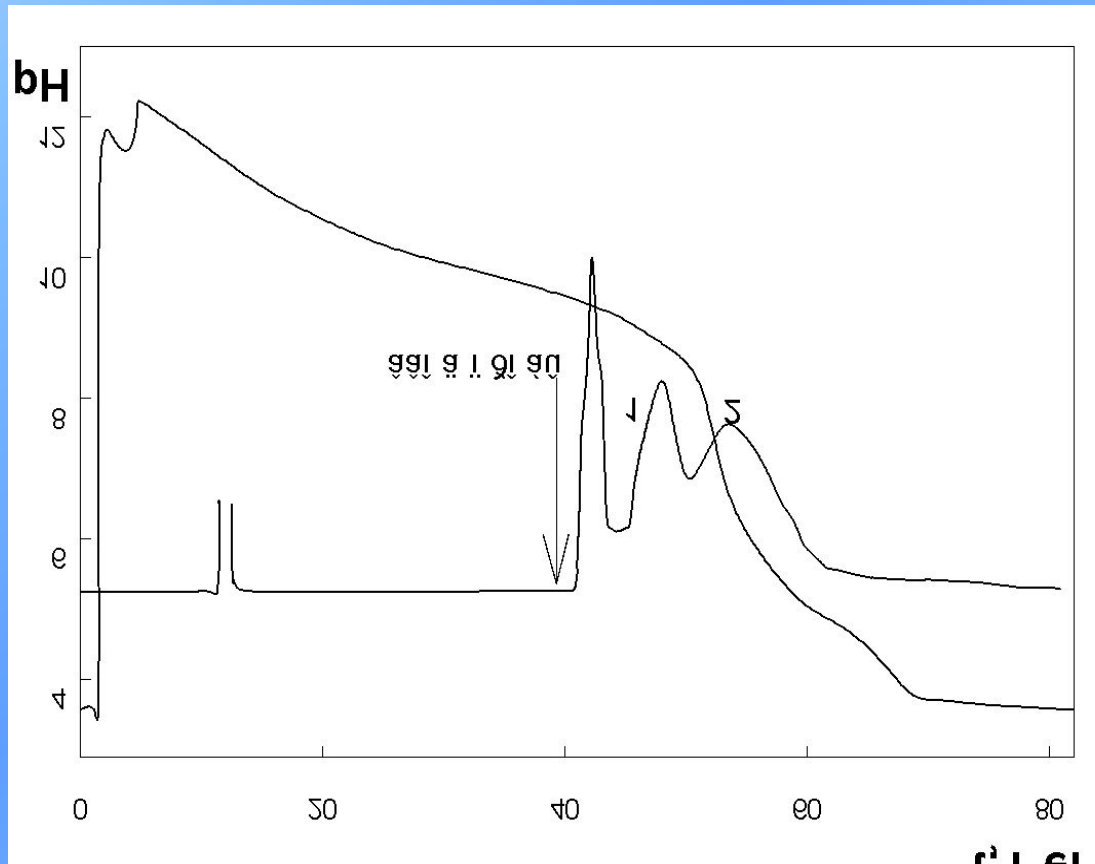
# Разделение ионов металлов с индуцированным градиентом pH

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

ИР: 1 мл (4 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$  + 1 М  $\text{NaCl}$ ) (pH 11,9)

Э: 5 мМ  $\text{CH}_3\text{COOH}$  + 0,1 М  $\text{NaCl}$  (pH 3,6), 1 мл/мин

Детектирование - УФ (254 нм): 1 -  $\text{Pb}^{2+}$ , 2 -  $\text{Co}^{2+}$



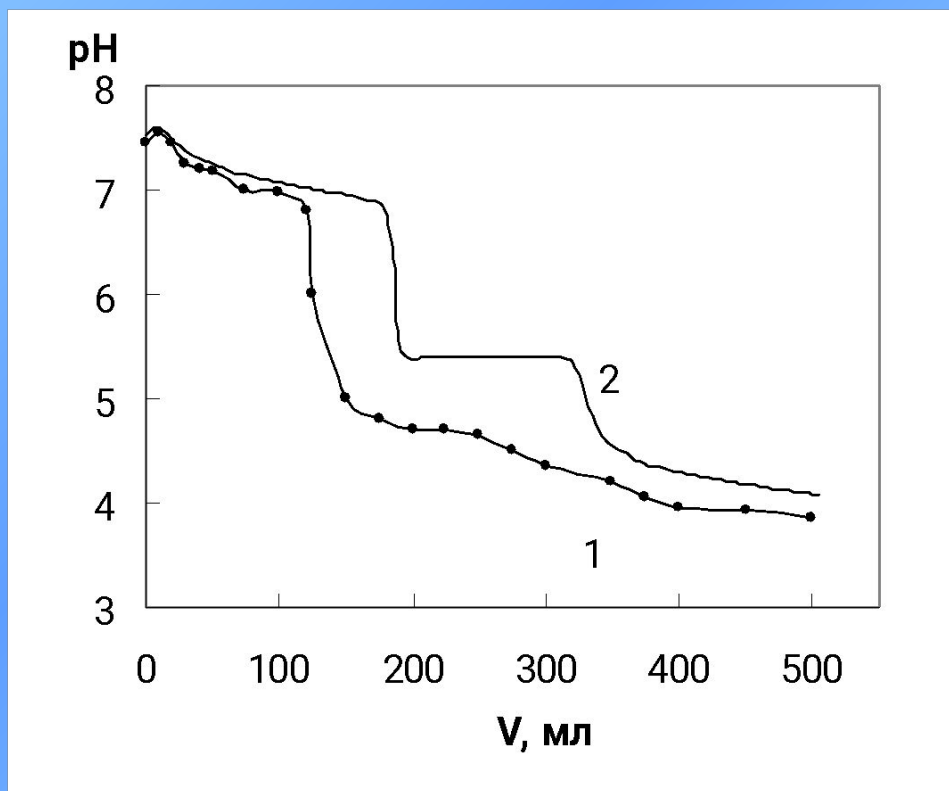
# Эксперимент и модель: различие в ионной силе стартового раствора и элюента (анионообменная система)

$$I_{\text{Э}} > I_{\text{СР}}$$

1 - сорбент Dien-SiO<sub>2</sub> (100-160 мкм, 0,35 мМ/г)

2 - модель Tetren-SiO<sub>2</sub>

СР - 25 мМ Трис-НСl (рН 7,5), Э - 5 мМ CH<sub>3</sub>COOH + NaCl (рН 3,5)



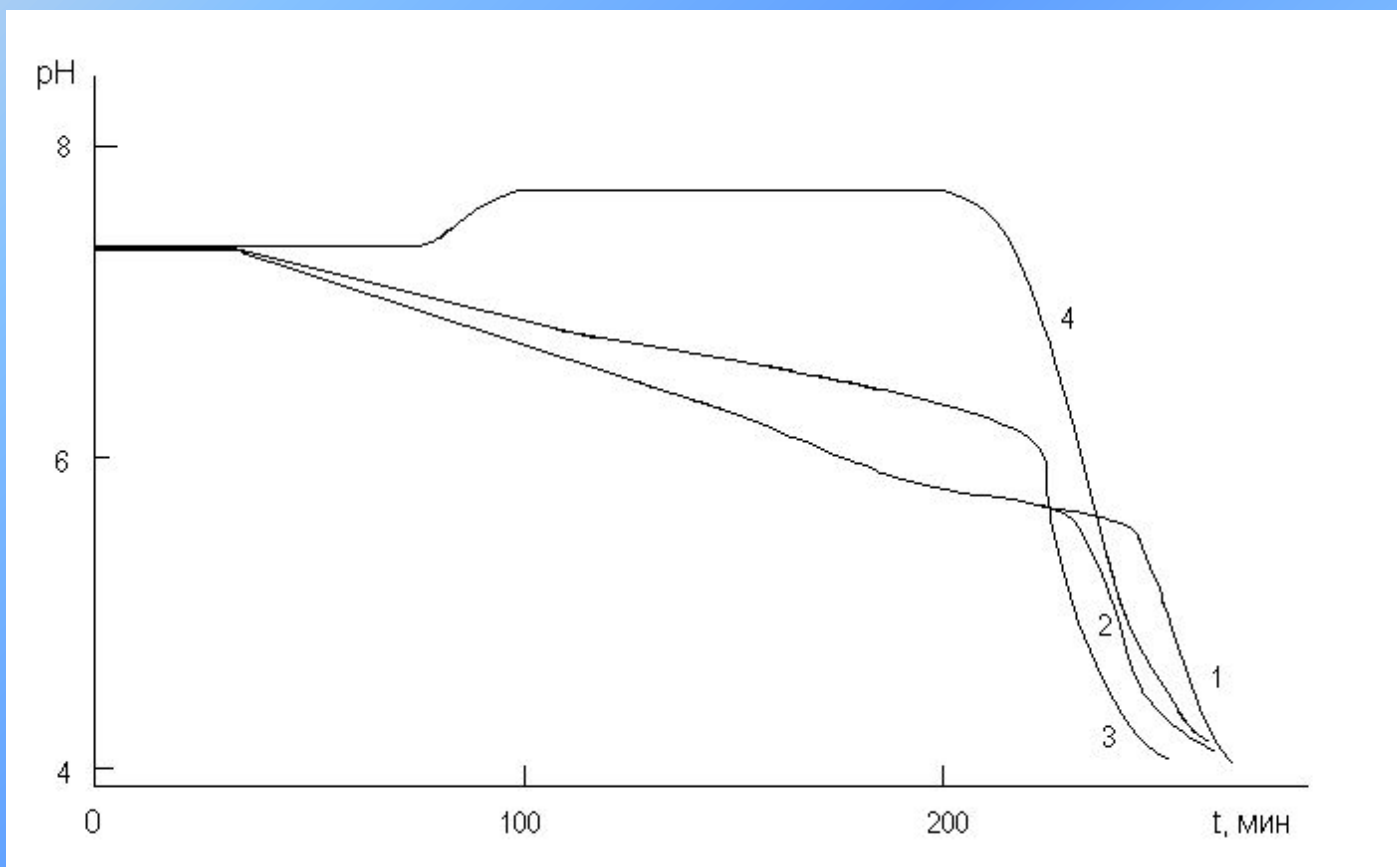
# Различие в ионной силе стартового раствора и элюента

$$I_{\text{Э}} < I_{\text{СР}}$$

сорбент Tetren-SiO<sub>2</sub> (7,5 мкм, 1 мМ/г, 250x4,6 мм)

СР: 25 мМ Трис-НСl (рН 7,5),  $I_{\text{СР}}$ : 1 - ~0,03; 2 - 0,1; 3 - 1; 4 - 0,02

Э: 2 мМ Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> (рН 2,9),  $I_{\text{Э}}$ : 1, 2 и 3 - ~0; 4 - 0,5





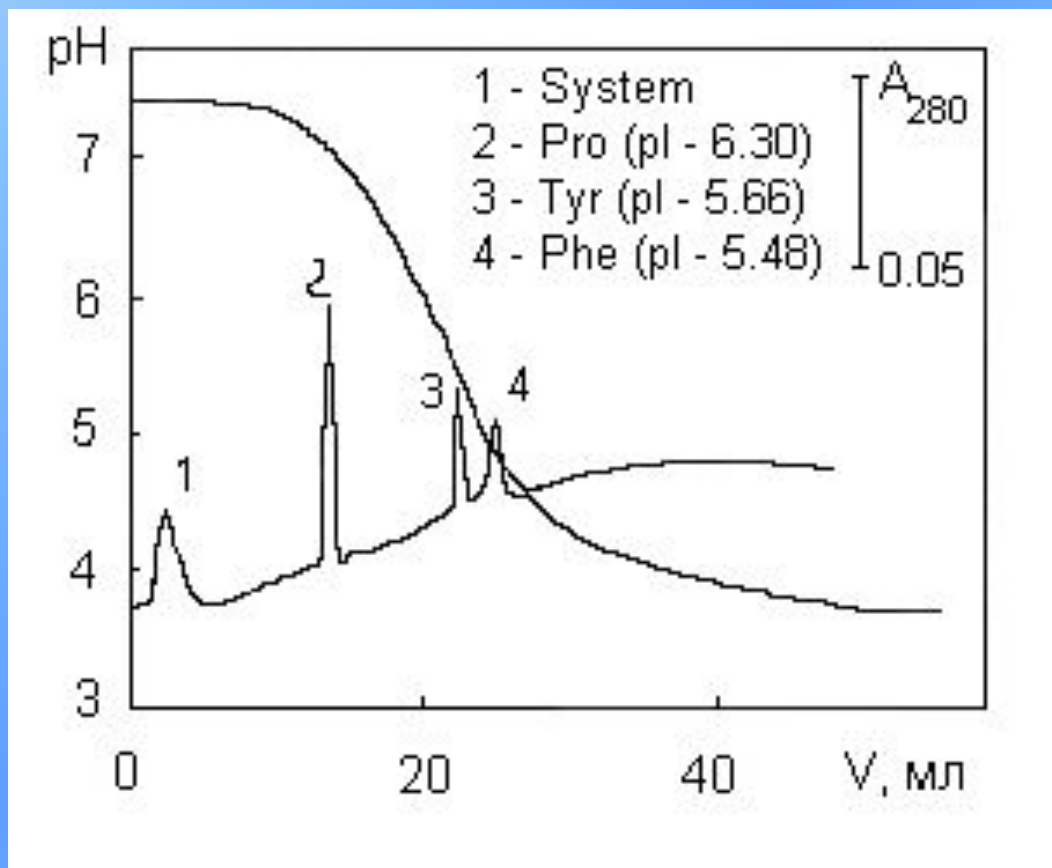
# Модельная смесь аминокислот

сорбент Tetren-SiO<sub>2</sub> (7,5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 25 мМ Трис-НСl (рН 7,5), I<sub>ср</sub>: 0,02

Э: 2 мМ Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> (рН 2,9), I<sub>э</sub>: ~0; 1 мл/мин

Детектирование - УФ (280 нм)

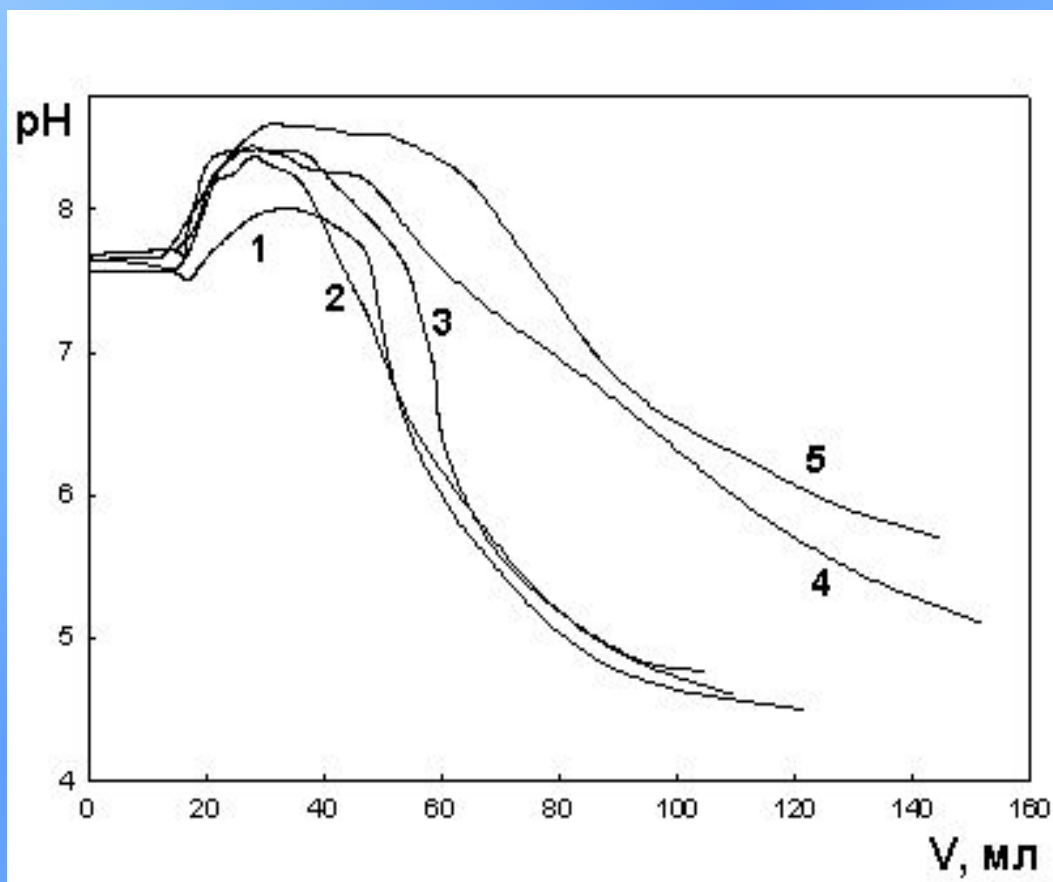


# Формирование градиента pH однокомпонентными элюентами в катионообменной системе

сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 10 мМ Трис-НСI (pH 7,5)

Э: 1 мМ кислоты - 1 – щавелевая, 2 - винная, 3 – лимонная, 4 – глутаминовая, 5 – уксусная; 1 мл/мин

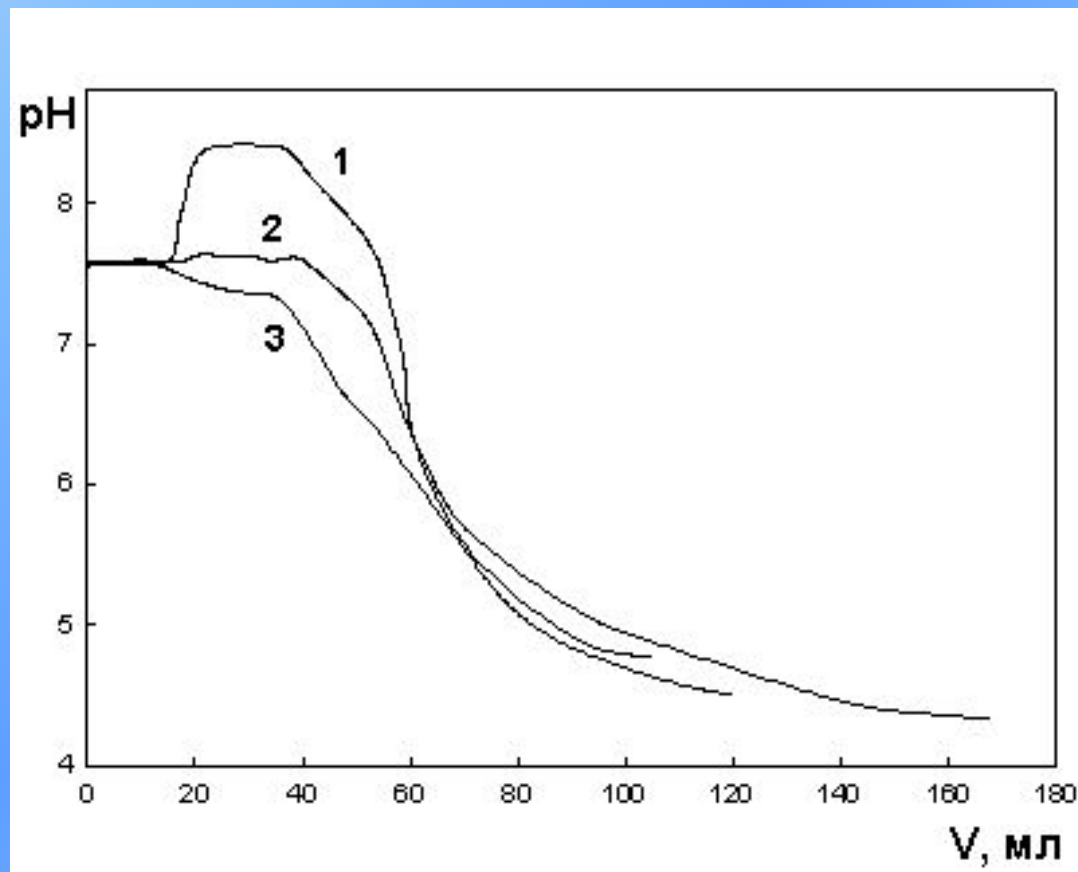


# Как избавиться от подъема рН?

сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 10 мМ Трис-НСI (рН 7,5)

Э: 0,2 мМ лимонная кислота (рН 3,7-3,9); 1 мл/мин,  
ионная сила подвижных фаз: 1 - ~0; 2 - 0,01, 3 - 0,1 (NaCl)



# Анионообменные сорбенты (для ХФ ионов металлов)

Сорбент	PBE-94 (Pharmacia)	En-SiO <sub>2</sub>	Dien-SiO <sub>2</sub>	Tetren-SiO <sub>2</sub>	Tetren-SiO <sub>2</sub>	AP-SiO <sub>2</sub>
Матрица	полисахарид	Силохром C-120	Силохром C-120	Силохром C-120	Silasorb Si 600	Lichro-s orb
Функц. группы	-NR <sub>2</sub> (не указаны)	этилен- диамин	диэтилен- триамин	тетраэтилен- пентамин	тетраэтилен- пентамин	пропил- амин
Размер частиц (мкм)	100-200	100-160	100-160	100-160	7,5	100-120
рН- диапазон гидрол. стаб-ти	2 - 12	1 - 8	1 - 8	1 - 8	1 - 8	1 - 8
Ионообм. емкость	0,32 ммоль/мл геля	0,10 ммоль/г	0,12 ммоль/г	0,35 ммоль/г	~1,0 ммоль/г	0,10 ммоль/г

# Карбоксильные сорбенты (для ХФ ионов металлов)

**Впервые – нисходящие градиенты рН**

Сорбент	СМ-52	Ольвагель- СООН	MN	MacroPrep 50 СМ
Производитель	Whatman (UK)	НИИ химии (СССР)	Purolite (UK)	Biorad (USA)
Матрица	Микрогрануллир. целлюлоза	ПММА	ССПС	ПММА
Функц. группы	-CH <sub>2</sub> COOH	-COOH	-COOH	-CH <sub>2</sub> COOH
Размер частиц (мкм)	100-200	> 30	5	50
рН-диапазон стаб-ти	3 - 10	3 - 13	1 - 14	3 - 13
Ионообменная емкость	0,95 - 1,15 ммоль/г (сухого сорбента)	0,30 ммоль/мл геля	не выше 0,10 ммоль/г	0,21 ± 0,04 ммоль/мл геля

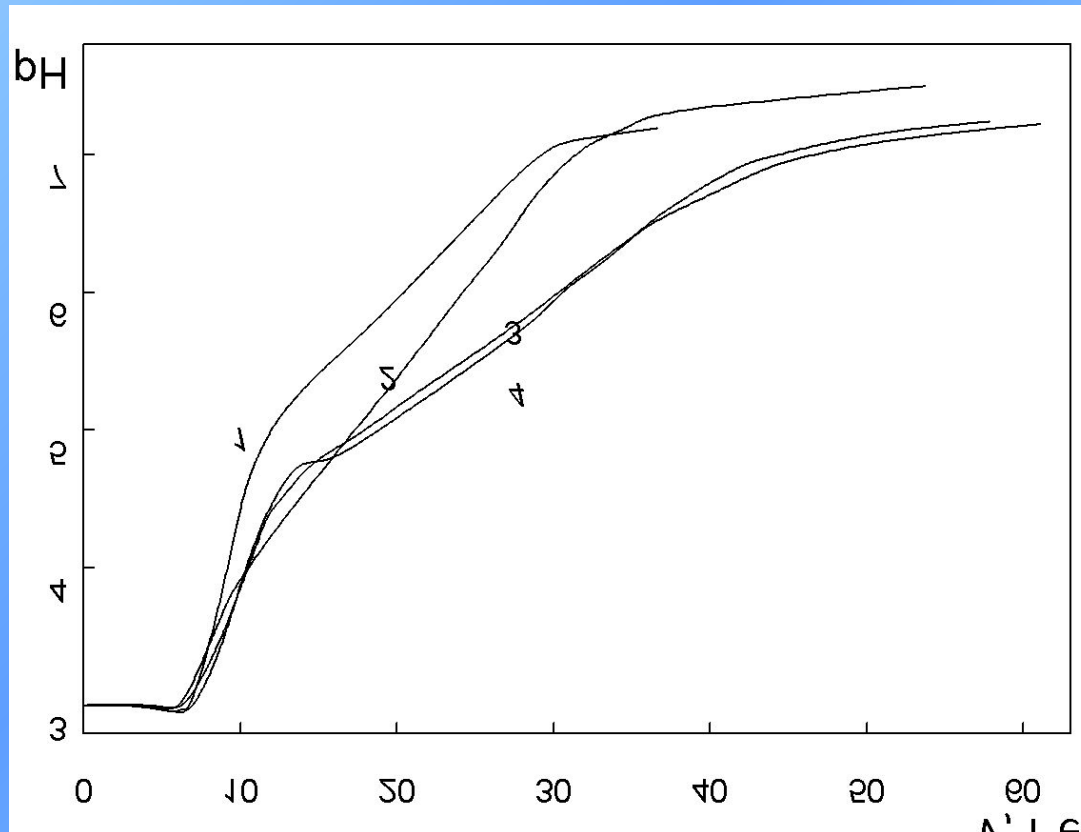
# Квази-линейные градиенты pH на сорбенте с низкой емкостью

сорбент MN (5 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 2 мМ лимонная к-та (pH 3,0),  $I_{CP}$ : ~0 (1 и 2), 0,05 (3 и 4)

Э: 10 мМ Трис-лимонная к-та (pH 7,0),  $I_Э$ : ~0 (1 и 3), 0,05 (2 и 4);

1 мл/мин



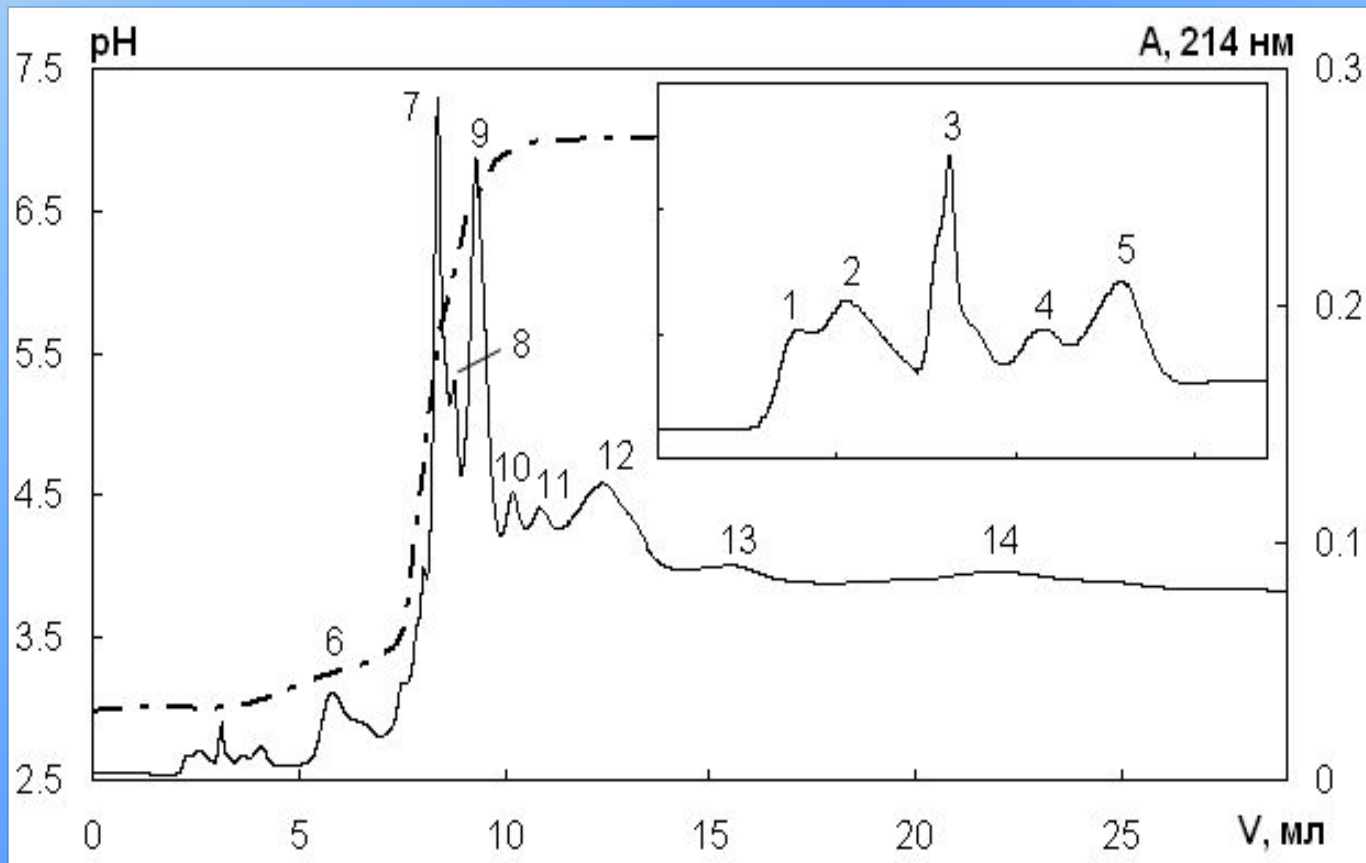
# Влияние добавок ацетонитрила в условиях градиента рН

сорбент PRP-X200 (10 мкм, 200x4,6 мм)

СР: 5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 3,0)

Э: 10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 6 мМ Трис + 20%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (рН 7,0), 1 мл/мин

Детектирование: УФ (214 нм)



# Влияние ионной силы

## в карбоксильной колонке

сорбент Macro-Prep 50 CM (50 мкм, 50x4,6 мм)

СР: 2 мМ лимонная к-та + 1,5 мМ Трис (рН 3,3),

Э (рН 7,6): 20 мМ Трис-НСl + 5 мМ лимонная к-та; 1 мл/мин;

ионная сила: 0 (1), 0,01 (2), 0,5 (3)

