

УДК 541.544

## ГРАДИЕНТ ИОННОЙ СИЛЫ ПРИ ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИИ В КАРБОКСИЛЬНЫХ КОЛОНКАХ

А.В. Иванов, Д.В. Курек, М.С. Вакштейн\*, А.П. Баюнов

(кафедра аналитической химии; e-mail: sandro@analyt.chem.msu.ru)

**Присутствие сильного электролита в подвижных фазах существенно влияет на профиль градиента рН, формируемого с помощью техники хроматофокусирования. Изучено изменение концентрации сильного электролита в системе для хроматофокусирования. Показано, что градиент ионной силы завершается значительно раньше градиента рН; “аномальные” участки на профиле градиента рН совпадают с изменением ионной силы в системе. Проведено сопоставление градиентов рН, полученных в одинаковых условиях на карбоксильных сорбентах MascoPrep 50 CM и MN; изучено влияние концентрации  $KNO_3$  в подвижных фазах на профили градиентов. Выбраны оптимальные системы для формирования наиболее плавных, линейных градиентов рН.**

В ионообменной хроматографии известны два варианта формирования градиентов рН. Наиболее распространен предколоночный способ, при котором градиент формируют до хроматографической колонки за счет смешивания двух или нескольких буферных растворов при разных значениях рН с помощью системы смесителей или программируемого градиентного насоса, регулируя скорость подачи подвижных фаз [1]. Сформированный таким образом градиент рН можно назвать внешним. Внешние градиенты редко линейны на протяжении более 2,0–2,5 ед. рН [2]. Второй вариант (назовем его внутриколоночным) основан на формировании градиентов рН внутри хроматографической колонки за счет буферных свойств элюента и буферизирующей способности ионогенных групп сорбента, предварительно приведенного в равновесие со стартовым раствором при ином значении рН [2, 3]. Такой способ позволяет формировать плавные, практически линейные градиенты в широком диапазоне рН (до 4–5 ед.) Внутриколоночные (или внутренние) градиенты рН используют в хроматофокусировании – методе разделения биологически важных биполярных соединений по их изоэлектрическим точкам [3]. Несмотря на простоту аппаратного оформления метода и накопленный экспериментальный материал по практическому применению, физико-химические модельные представления о формировании внутренних градиентов рН с помощью техники хроматофокусирования до недавнего времени находи-

лись в стадии разработки [4, 5]. На сегодняшний день существует несколько моделей формирования градиентов рН внутри анионообменных колонок, учитывающих ионный обмен и протолитические равновесия в гетерогенной динамической системе [4]. Однако представления о процессе формирования градиентов в катионообменной системе находятся на самых начальных стадиях, предложенных еще в 1981 г. [6].

Последние исследования показали перспективность создания градиентов рН в катионообменных системах: нисходящих градиентов – для концентрирования и разделения ионов металлов [7, 8], восходящих – для разделения белков и пептидов [9–11]. В связи с возросшим интересом к применению катионообменных сорбентов в хроматофокусировании актуальной становится разработка физико-химической модели формирования градиента в таких системах. Это позволило бы исследователям предварительно рассчитывать градиент рН, исходя из заданных условий, и тем самым сократить время, затрачиваемое на эксперимент.

При физико-химическом моделировании процессов параметры системы следует разделять на: 1) уже известные из литературных данных; 2) неизвестные ранее, но поддающиеся непосредственно экспериментальному определению (в первую очередь, это такие параметры сорбента, как ионообменная емкость, константа протонирования и т.д.); 3) неизвестные и непосредственно не определяемые из эксперимента [4, 12, 13]. Сюда следует отнести параметры, имеющие

\*Научно-исследовательский институт прикладной акустики, г. Дубна.

оценочный характер, т.е. эмпирические, а также параметры, сложным образом меняющиеся в ходе проведения эксперимента [12–14]. Так, например, для анионообменных систем было показано, что ионная сила стартового раствора и элюента сложным образом влияет на процесс формирования градиента pH: варьирование концентрации сильного электролита (например, NaCl) в обеих подвижных фазах позволяет получать практически линейные градиенты в широком диапазоне pH [4, 13]. Сложное влияние ионной силы подвижных фаз на профиль градиента pH наблюдали и в катионообменных системах [7]. С точки зрения моделирования было бы интересно узнать, как изменяется концентрация сильного электролита в процессе формирования внутреннего градиента pH. Вместе с тем несомненный интерес, особенно при разделении белков или других биполярных биологических веществ, может представлять сочетание градиента pH с градиентом ионной силы [11]. В данной работе рассмотрено изменение концентрации сильного электролита при создании градиента pH внутри слабокислотных катионообменных колонок.

### Экспериментальная часть

**Аппаратура.** Использовали хроматографическую систему, включающую насосы высокого давления “Milton-Roy A-802” (Франция) или “LC-10AT VP” (“Shimadzu”, Япония); инжектор “Rheodyne 7125”

(США) (объем петли 100 мкл-1 мл); катионообменную хроматографическую колонку; цифровой pH-метр “HM 20-S” (“TOA Electronics”, Япония), включающий комбинированный стеклянный электрод “GST-5211C” или милливольтметр-иономер “pH-121” (Россия) с ионселективными мембранными электродами “ЭМ-NO<sub>3</sub>-01” (на ион NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) или “ЭМ-K-01” (на ион K<sup>+</sup>) и хлоридсеребряным электродом сравнения, погруженными в проточную ячейку собственной конструкции. Сигналы pH-метра или иономера регистрировали на двухканальном самописце “LKB-2210” (“LKB-Bromma”, Швеция) и затем обрабатывали математически.

**Хроматографические колонки** (50×4,6 мм, выполненные из полимера РЕЕК), заполняли карбоксильными сорбентами MacroPrep 50 CM и MN. Характеристики сорбентов представлены в табл. 1.

**Реагенты и растворы.** Для создания градиентов pH с помощью техники хроматофокусирования в качестве стартового раствора использовали 10 мМ Трис-HCl при pH 7,3–7,6; в качестве элюента – 1:20 “Полибуфер-96” (“Polybuffer-96”, “Pharmacia”, Швеция) при pH 3,0. Необходимую кислотность растворов создавали добавлением конц. HCl. Для создания ионной силы в подвижные фазы добавляли рассчитанное количество 2 М раствора KNO<sub>3</sub>, приготовленного из сухого препарата квалификации “ч.д.а.” (“Reaxim”, Россия).

Таблица 1

Характеристики использованных сорбентов

Сорбент	MacroPrep 50 CM	MN
Производитель	“Biorad” (США)	“Purolite” (Великобритания)
Матрица	Полиметилметакрилат (ПММА)	Сверхсшитый полистирол (ССПС)
Функциональные группы	–CH <sub>2</sub> COOH	–COOH
Размер частиц (мкм)	50	5
pH-Диапазон гидролитической стабильности	3–13	1–14
Ионообменная емкость (по данным производителя)	0,21±0,04 ммоль/мл геля	менее 0,10 ммоль/г *

Примечания. \* Оценочная величина по данным кислотно-основного титрования [7, 8].

**Методика эксперимента.** Катионообменную колонку уравнивали стартовым раствором до значения pH стартового раствора (~7,5), что соответствовало начальной точке градиента. Затем пропускали через колонку буферный элюент при pH 3,0 и непрерывно контролировали в проточной ячейке pH эфлюента на выходе из колонки. Регистрировали сигнал pH-метра с помощью самописца и отмечали, за какое время достигается конечная точка градиента. После чего снова уравнивали колонку стартовым раствором, подключали милливольтметр-иономер с ионселективным электродом и непрерывно контролировали в проточной ячейке потенциал аниона ( $\text{NO}_3^-$ ) или катиона ( $\text{K}^+$ ) на выходе из колонки в течение того же времени, за которое выходил градиент pH. Содержание ионов рассчитывали через потенциал по градуировочным графикам. Объемная скорость подвижных фаз составляла 1 мл/мин, в отдельных случаях – 0,6 мл/мин. Все градиенты приводили к объему прошедшей через колонку подвижной фазы.

### Результаты и их обсуждение

**Выбор хроматографической системы.** Сорбент MacroPrep 50 CM, как обладающий достаточно высокой ионообменной емкостью (табл. 1), выбрали в качестве модельного для изучения основных зависимостей профиля градиента pH от ионной силы подвижных фаз. Кроме того, данный сорбент хорошо изучен с точки зрения формирования нисходящих и восходящих градиентов pH с помощью полиамфолитных и одно-двухкомпонентных элюентов [7, 11]. Для упрощения понимания процессов, происходящих в хроматографической системе, в качестве элюента выбрали раствор хорошо изученного полиамфолита “Полибуфер-96”, а в качестве стартового – раствор Трис-HCl, традиционно используемые в хроматофокусировании белков на анионо- и катионообменных сорбентах [3]. Хотя ранее влияние сильного электролита для анионообменных систем отмечали для хлорида натрия [13], в данной работе в качестве модельного электролита выбран нитрат калия (во избежание возможного влияния хлорид-иона на потенциал хлоридсеребряного электрода сравнения и тем самым на измеряемый сигнал).

Далее будут использованы следующие обозначения:  $I_{\text{cp}}$  – ионная сила стартового раствора, созданная добавлением  $\text{KNO}_3$ ,  $I_0$  – ионная сила элюента, нисходящий градиент – снижение ионной силы или концентрации иона, восходящий градиент – увеличение этих параметров.

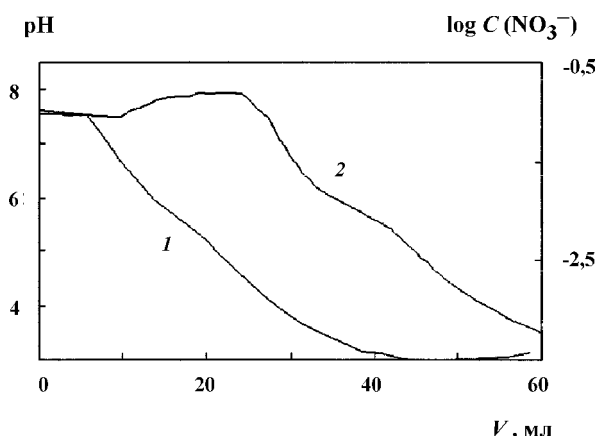


Рис. 1. Градиент pH при нисходящем градиенте ионной силы подвижных фаз: 1 –  $\log C(\text{NO}_3^-)$ , 2 – градиент pH. Сорбент: Macro Prep 50 CM (50×4,6 мм); стартовый раствор 10 мМ Трис-HCl,  $I_{\text{cp}} = 0,1$ ; элюент: 1:20 “Полибуфер 96” ( $I_0 \sim 0$ )

**Нисходящий градиент ионной силы.** Получены градиенты pH и концентрации нитрат-иона для хроматографической системы, где концентрация  $\text{KNO}_3$  в стартовом растворе составляет 0,1 М, а сильный электролит в элюент не добавляли ( $I_0 \sim 0$ ) (рис. 1). На градиенте pH зафиксирован так называемый “аномальный” участок (значение pH выше, чем у стартового раствора на 0,5 ед., протяженность ~20 мин) (табл. 2). Подобные участки с подъемом pH хорошо известны из предыдущих экспериментов для анионо- и катионообменных систем и объясняются изменением констант кислотности/основности привитых групп сорбента при изменении ионной силы подвижных фаз [4, 7, 13], что приводит к дополнительному протонированию ионообменника и тем самым – к увеличению концентрации оснований в эфлюенте.

В то же время снижение концентрации нитрат-иона происходит монотонно, без “аномальных” участков (рис. 1, кривая 1). В течение первых 7–8 мин изменения концентрации нитрат-иона не происходит, затем начинается практически линейное снижение ионной силы в системе: за 30 мин концентрация  $\text{NO}_3^-$  уменьшается до  $10^{-3}$  М и ниже. Похожие зависимости получены и при потенциометрическом контроле концентрации ионов  $\text{K}^+$ , однако, поскольку ионселективный электрод “ЭМ-К-01” работает в ограниченном диапазоне pH, в дальнейшем все измерения проводили для нитрат-ионов. Таким образом, вымывание нитрата калия из пор сорбента и межчастичного пространства элюентом, не содержащим сильный электролит, происходит постепенно. Заметим, что “аномальный” подъем на профиле градиента pH совпадает со сни-

Т а б л и ц а 2

**Зависимость параметров градиента рН от ионной силы подвижных фаз**

Сорбент	Стартовый раствор (рН, ионная сила)	Элюент (рН, ионная сила)	Подъем, ед. рН	Протяженность подъема, мл	Наклон градиента, $\Delta\text{pH}/\Delta V$
Macro Prep 50 CM	10 мМ Трис-НСl (рН 7,5, $I_{0,1}$ )	1:20 Полибуфер (рН 3,0, $I \sim 0$ )	0,45	18-20	0,13
	тот же ( $I_{0,1}$ )	тот же ( $I \sim 0,025$ )	0,32	17-18	0,19
	тот же ( $I \sim 0$ )	тот же ( $I \sim 0,1$ )	0,30*	10-11	0,10 (0,45)**
	тот же ( $I_{0,1}$ )	тот же ( $I_{0,1}$ )	0	–	0,12
	тот же (рН 7,1, $I_{0,05}$ )	тот же ( $I \sim 0$ )	0,30	9-10	0,18
	тот же ( $I_{0,05}$ )	тот же ( $I_{0,025}$ )	0,20	8-9	0,17
	тот же ( $I_{0,05}$ )	тот же ( $I_{0,05}$ )	0	–	0,21
MN	10 мМ Трис-НСl (рН 7,2, $I_{0,05}$ )	1:20 Полибуфер (рН 3,0, $I \sim 0$ )	0,40	4-5	0,58
	тот же ( $I_{0,05}$ )	тот же ( $I_{0,025}$ )	0,30	4	0,42
	тот же ( $I_{0,05}$ )	тот же ( $I_{0,05}$ )	0,15	2-2,5	0,48

Примечания. \* В области рН 6,7-6,4; \*\* в области рН 6,4-4,0 (в области рН 7,6-6,4).

жением ионной силы в системе на 1,5–2 порядка. Это подтверждает, что “аномальный” участок обусловлен изменением условных констант ионизации функциональных групп сорбента при изменении ионной силы подвижных фаз. Можно было бы ожидать появления плато или подъемов на концентрационном градиенте в случае присутствия двухзарядных катионов в системе и вторичной сорбции анионов на уже сорбированных катионах [4, 13].

Создание в элюенте ионной силы хотя бы 0,025 позволяет несколько уменьшить высоту и продолжительность подъема рН на начальном участке (табл. 2), но в целом такая система близка к случаю с отсутствием сильного электролита в элюенте. Если же ионная сила стартового раствора и элюента невысока и различается примерно в 2 раза (например,  $I_{cp} = 0,1$ ,  $I_3 = 0,05$  или  $I_{cp} = 0,05$ ;  $I_3 = 0,025$ ), то участок с подъемом рН продолжается не более 8–9 мин, а градиент рН в целом выходит за более короткое время. С практической точки зрения нисходящий градиент ионной силы вряд ли представляет интерес для хроматофокусирования.

**Восходящий градиент ионной силы.** В случае, когда в стартовом растворе сильный электролит отсутствует, а  $I_3 = 0,1$ , концентрационный градиент нитрат-иона выходит значительно быстрее, чем градиент

рН (рис. 2). Так, в течение первых 7 мин не происходит изменения ни рН, ни ионной силы. Затем ионная сила начинает повышаться, а рН при этом еще остается постоянным (примерно в течение 3–4 мин), после чего идет антибатное изменение концентрации нитрат-ионов и рН. Основное увеличение ионной силы (до 0,05) происходит за 8–9 мин (линейный участок на кривой 1), а дальнейшее насыщение до 0,1 и выход градиента на плато продолжается еще 6–7 мин. На этих участках идет обмен катионов калия из

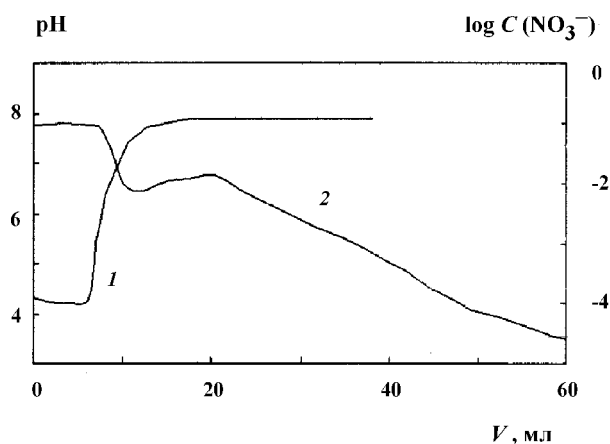
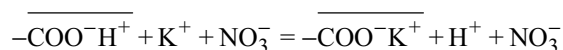


Рис. 2. Градиент рН и восходящий градиент ионной силы подвижных фаз: 1 –  $\log C(\text{NO}_3^-)$ , 2 – градиент рН (стартовый раствор  $I_{cp} \sim 0$ ; элюент  $I_3 = 0,1$ ; остальные условия см. в подписи к рис. 1)

элюента на протоны в фазе сорбента до достижения равновесия при данном рН:



вместе с этим свободный объем в колонке также заполняется подвижной фазой с ионной силой 0,1. При этом на градиенте образуется “аномальный” участок с незначительным повышением рН продолжительностью 11–12 мин (табл. 2). Новый участок градиента с плавным снижением рН примерно совпадает с выходом концентрации нитрат-иона на постоянное значение (рис. 2). В системе изменяются условные константы диссоциации, сорбент начинает проявлять полиэлектролитную природу [4, 13], что и приводит к более плавному изменению рН внутри колонки. Наклон градиента на этом участке существенно меньше, чем на начальном участке в области рН 7,6–6,4 (табл. 2).

Отметим, что восходящие градиенты ионной силы обычно применяют при элюировании с постоянным значением рН. Градиенты ионной силы в хроматофокусировании ранее не создавали. Сочетание восходящего градиента ионной силы с градиентом рН может представлять особый интерес для разделения макромолекул методом хроматофокусирования.

**Постоянная ионная сила.** Для системы, в которой ионная сила достаточно высока и одинакова в обеих подвижных фазах ( $I = 0,1$ ), получили наиболее плавный, линейный в широком диапазоне градиент рН без аномальных подъемов или ступеней (рис. 3). Измеренный потенциал для нитрат-иона на протяжении всего градиента оставался постоянным, что подтвер-

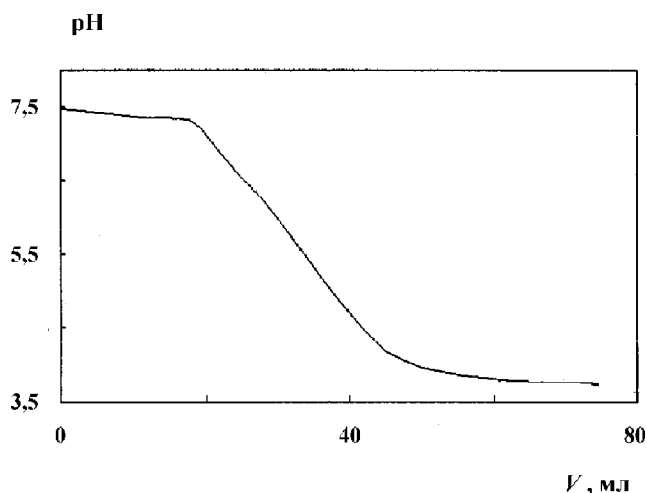
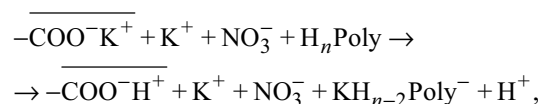


Рис. 3. Градиент рН без аномального участка при равной ионной силе подвижных фаз ( $I_{cp} = I_s = 0,1$ ) (остальные условия см. в подписи к рис. 1)

ждает отсутствие вторичной сорбции анионов. При уравнивании сорбента и при пропуске элюента в фазе сорбента протоны обмениваются на катионы сильного электролита, но уже в более равновесных условиях:



где  $\text{H}_n \text{Poly}$  обозначает многоосновную кислоту в составе “Полибуфера”. Поскольку сорбент насыщен катионами сильного электролита, то протонирование карбоксильных групп сорбента протекает постепенно, при этом часть протонов за счет частичной диссоциации “Полибуфера” выходит из колонки, понижая рН эфлюента. Аналогичный градиент наблюдали и при создании в обеих подвижных фазах ионной силы 0,05 (табл. 2).

Таким образом, наиболее плавные, практически линейные градиенты рН в слабокислотных катионообменных колонках, можно сформировать при создании равной ионной силы (0,05–0,1) в обеих подвижных фазах.

**Сравнение сорбентов.** Сорбент MN на основе сверхсшитого полистирола с привитыми карбоксильными группами, благодаря малому размеру частиц, более плотно заполняет хроматографическую колонку, уменьшая свободное межчастичное пространство. По нашим оценкам, ионообменная емкость MN в 3–4 раза ниже, чем MacroPrep 50 CM. Таким образом, эффекты, вызванные присутствием сильного электролита в подвижных фазах, должны проявиться еще более отчетливо. В данной серии экспериментов в подвижных фазах создавали ионную силу не выше 0,05. Для сравнения в аналогичных условиях получали градиенты рН и на сорбенте MacroPrep 50 CM.

В первом случае, когда в стартовом растворе присутствовал сильный электролит ( $\text{KNO}_3$ ) в концентрации 0,05, на градиенте для сорбента MN наблюдали остроконечный участок с повышением рН на 0,4 ед., продолжавшийся не более 5 мин (рис. 4, а; табл. 2). Продолжительность градиента составляет 19–20 мин, в то время как для MacroPrep 50 CM конечная точка градиента достигается более чем за 50 мин, что косвенно подтверждает различие в ионообменной емкости сорбентов. Кроме того, видно, что градиент в случае сорбента MN менее плавный, состоящий из нескольких линейных участков, что также может быть связано с меньшей ионообменной емкостью MN. Концентрационный градиент нитрат-иона для MN

аналогичен представленному на рис. 1, но выходит он за существенно меньшее время. Следует отметить, что одной из основных характеристик градиента pH служит наклон кривой зависимости  $\Delta pH$  от  $\Delta V$  [15]. Оптимальное значение  $\Delta pH/\Delta V$  лежит в диапазоне 0,17–0,25 (при этом градиент выходит за разумное время, но еще остается достаточно плавным). В табл. 2 представлены значения  $\Delta pH/\Delta V$  для изученных систем. Видно, что наклон градиента, полученного при  $I_{cp} = 0,05$  на сорбенте MacroPrep 50 CM, как раз попадает в оптимальный диапазон, тогда как для MN значение  $\Delta pH/\Delta V$  слишком высоко (0,58), что также обусловлено низкой ионообменной емкостью сорбента.

Для обоих сорбентов получены градиенты pH при минимальном различии в ионной силе подвижных фаз:  $I_{cp} = 0,05$  и  $I_3 = 0,025$  (рис. 4, б). В этом случае также наблюдали подъем pH на начальном участке градиента, более высокий и резкий на сорбенте MN (табл. 2). Время выхода градиента при таком соотношении в ионной силе подвижных фаз несколько увеличивается, особенно для сорбента MN. Профиль градиента pH становится более плавным, что особенно хорошо видно на примере сорбента MN: переходы между линейными участками градиента менее резкие, чем для градиента, представленного на рис. 4, а (кривая 2), значение  $\Delta pH/\Delta V$  понижается до 0,42. Для сорбента MacroPrep 50 CM наклон градиента остается практически без изменений (табл. 2).

При равенстве ионной силы в стартовом растворе и в элюенте ( $I_{cp} = I_3 = 0,05$ ) градиент, полученный для сорбента MN, еще содержит участок с незначительным подъемом pH (на 0,15 ед.), протяженностью не более 2,5 мин (рис. 4, в). Наклон градиента при этом незначительно повышается (табл. 2), однако на профиле градиента начинают возникать сглаженные ступени. На градиенте, полученном для MacroPrep 50 CM, нет аномального участка с повышением pH. Наклон градиента также увеличивается до 0,21, оставаясь при этом в оптимальном диапазоне значений  $\Delta pH/\Delta V$ . Линейное снижение pH при  $I_{cp} = 0,05$  на сорбенте MacroPrep 50 CM начинается через 18–20 мин после начала градиента, на MN – через 10–12 мин и практически не зависит от ионной силы элюента (рис. 4, а-в). При создании в стартовом растворе ионной силы 0,1 для сорбента MacroPrep 50 CM начало снижения pH сильно зависело от концентрации  $KNO_3$  в элюенте.

Таким образом, оптимальными с точки зрения образования аномальных подъемов pH и наклона градиента представляются системы:

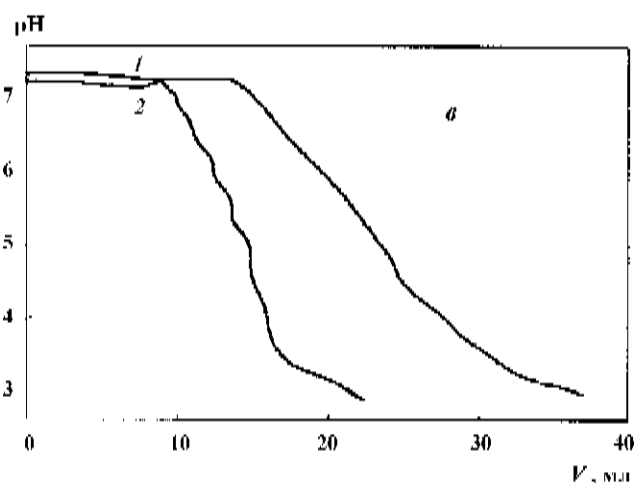
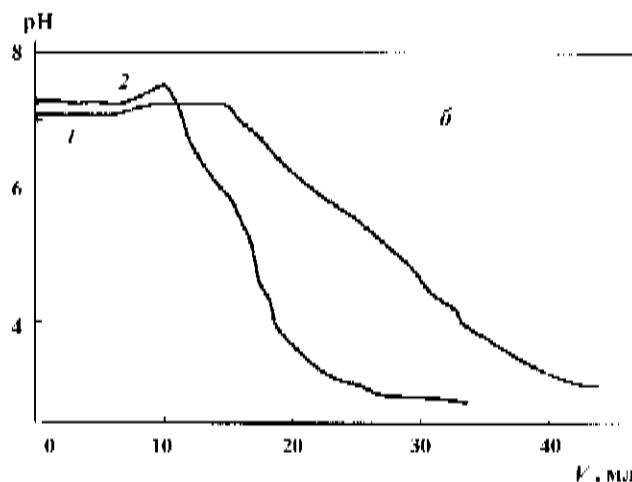
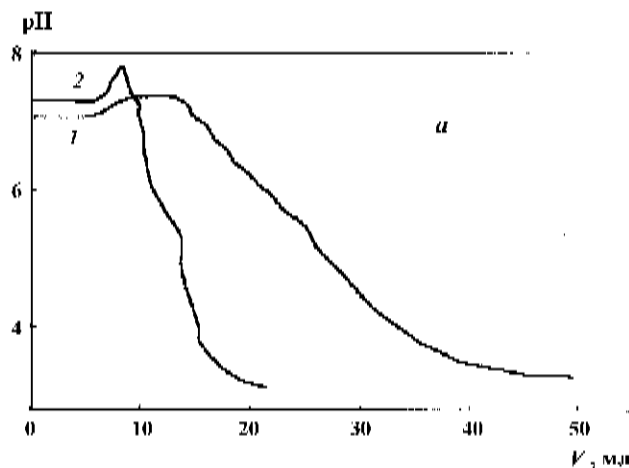


Рис. 4. Сравнение градиентов pH, полученных в колонках (50×4,6 мм) на сорбентах MacroPrep 50 CM (1) и MN (2). Стартовый раствор: 10 мМ Трис-НСl,  $I_{cp} = 0,05$ ; элюент: “Полибуфер 96” (1:20), ионная сила ( $I_3$ ): ~ 0 (а), 0,025 (б), 0,05 (в)

**сорбент MacroPrep 50 CM**

$I_{cp} = 0,05, I_3 = 0,05$  (0,025) или  $I_{cp} = I_3 = 0,1$ ;

**сорбент MN**

$I_{cp} = 0,05, I_3 = 0,025$ .

Несмотря на образование аномальных ступеней на профиле градиента pH, когда ионная сила элюента достаточно высока (0,1), а в стартовом растворе сильного электролита нет, система может оказаться пригодной для разделения биполярных биологических молекул, поскольку в этом случае внутри колонки

помимо градиента pH создается восходящий градиент ионной силы. Особый интерес могут представлять системы, в которых сильный электролит присутствует и в стартовом растворе, и в элюенте, но  $I_{cp} < I_s$ . Таким системам будет посвящено дальнейшее исследование.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 05-03-33096).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. К. Мацэка, З. Дейла, Я. Янака. Т. 1. М., 1978.
2. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖАХ. 1999. **54**. № 6. С. 566.
3. Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing: Principles and Methods. Uppsala, Amersham Biosciences, 2004. P. 129.
4. Иванов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2005. **46**. № 4. С. 203.
5. Kang X., Frey D.D. // Anal. Chem. 2002. **74**. P. 1038.
6. Shuyterman L.A.Ae, Wijdenes J. // J. Chromatogr. 1981. **206**. P. 429.
7. Vakstein M.S., Nesterenko P.N., Ivanov A.V., Tessman A.B. // J. Liquid Chromatogr. & Related Techn. 2006. **29**. N 4. P. 485.
8. Иванов А.В., Смирнова Н.Ю., Вакутейн М.С. // ЖФХ. 2007. **81**. № 3. С. 171.
9. Kang X., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2003. **991**. P. 117.
10. Frey D.D., Kang X. // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. **16**. P. 552.
11. Вакутейн М.С., Иванов А.В. // ЖАХ. 2007. **62**. (в печати)
12. Gu T. Mathematical modeling and scale-up of liquid chromatography. Berlin, 1995.
13. Гармаи А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. № 11. С. 2054.
14. Прудковский А.Г., Долгоносов А.М. // ЖАХ. 1999. **54**. № 2. С. 118.
15. Иванов А.В., Вакутейн М.С., Нестеренко П.Н., Хасанова Е.М. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2006. **6**. № 5. С. 675

Поступила в редакцию 10.10.06

## THE IONIC STRENGTH GRADIENT DURING THE CHROMATOFOCUSING WITHIN THE CARBOXYLIC COLUMNS

A.V. Ivanov, D.V. Kurek, M.S. Vakstein, A.P. Bayunov

(Division of Analytical Chemistry)

The strong electrolyte presence in the mobile phases influences essentially upon pH gradient profile in the chromatofocusing. The current change of the strong electrolyte concentration in the system for chromatofocusing was investigated. It was shown that the ionic strength gradient gets out more earlier than pH gradient; the "anomalous" segments on the pH gradient profile clash with the general change of ionic strength in the system. The pH gradients, formed under the identical conditions on the carboxylic sorbents MacroPrep 50 CM and MN were compared. The influence of  $KNO_3$  concentration in both mobile phases on the pH gradient profiles was studied. The optimal systems for formation of the smoother, linear pH gradients were selected.