



## IONEXOVÉ PRYSKYŘICE

- dříve na bázi fenolformaldehydu

- dnes pryskyřice na bázi derivátů **polystyrenu** a **polyakrylamidu**. Lze je snadno připravit v požadovaném tvaru, velikosti, porozitě a chemickém složení.

**Výhody:** lze je připravit s různými funkčními skupinami a jsou použitelné v širokém rozsahu pH a do 100 °C

**Styrenové ionexy:** polystyren zesítěný divinylbenzenem (Dowex 50, Zerolit 225).

S rostoucím stupněm zesílení roste tvrdost a mechanická pevnost ionexu, klesá jeho bobtnavost.

**Akrylátové ionexy:** methakrylátové estery zesítěné divinylbenzenem nebo ethyldimethakrylátem (Zeokarb 226, Amberlite IRC).

Ionexy na bázi hydroxyalkylmethakrylátových gelů (**Spherony**) mají vynikající chemickou stabilitu, používají se k HPLC separaci biopolymerů, aniž by docházelo k jejich denaturaci.

## IONEXOVÉ CELULÓZY

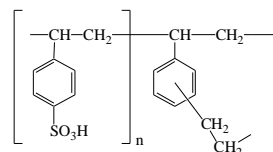
- mají strukturu s velkými póry přístupnými i pro biopolymery o Mr řádově  $10^5$ .
- oproti pryskyřičným ionexům mají vysoce hydrofilní strukturu
- používají se slabě kyselé katexy (R-COONa) a slabě bazické anexy (R-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-diethylamin)

## DERIVÁTY POLYDEXTRANU A AGARÓZY

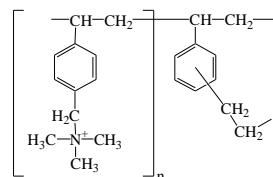
**Dextran:** větvený polysacharid složený z glukózových jednotek, který vzniká z kvašením sacharózy působením některých mikroorganismů.

**Agaróza:** tvořena zbytky D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy, je neutrální a lineární.

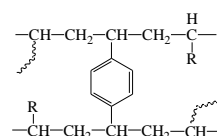
- strukturou se podobají pryskyřičným ionexům, jejichž porozita vzniká bobtnáním
- velké póry a značně hydrofilní struktura umožňují práci s biopolymery
- vznikly úpravou gelů vyvinutých pro GPC



Polystyrénový  
silně kyselé katex



Polystyrénový  
silně bazický anex

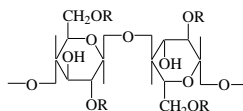


Akrylátový slabě bazický  
katex

R = COO<sup>-</sup>

Akrylátový slabě bazický  
anex

R = CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>



Ionexový derivát celulózy  
R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>

## CHARAKTERISTIKY IONEXŮ

### 1. KAPACITA

- látkové množství aktivních funkčních skupin připadajících na 1 g suchého ionexu (mmol/g) nebo na 1 ml nabobtnalého ionexu.

**Celková kapacita ionexu:** obsah všech skupin schopných výměny.

U ionexů v kolonách se určuje **průniková** (užitková)

**kapacita** ionexové kolony: množství iontů, které kolona přijme aniž by došlo k jejich průchodu při dávkování.

### 2. HUSTOTA A BOBTVAVOST

Hustota se udává v suchém nebo nabobtnalém stavu.

Bobtnavost ionexu se nejčastěji udává jako **hmotnostní**

**bobtnavost:** množství vody (g) v plně nabobtnalé pryskyřici na 1 g sušiny.

### 3. VELIKOST A TVAR ZRN

Podíl zm určité velikosti se určuje síťovou analýzou za mokra.

Pro chromatografické účely je nutná jednotná zrnitost materiálu.

## PRÁCE S IONEXY

### 1. VÝBĚR IONEXU

- pro chromatografické účely (CG-chromatographic grade, AC-analytical grade), pro obecné analytické využití (commercial grade), pro práci s radioaktivními ionty (RG-reactor grade)

Výběr druhu ionexu **závisí na povaze dělených látek:**

- anorganické látky: ionexové pryskyřice nebo anorganické ionexy
- nízkomolekulární inorganické látky: ionexové pryskyřice
- biopolymery: ionexové celulózy a agarózy
- HPLC biopolymerů: ionexové deriváty porézních skel a gely na bázi hydroxyalkylmethakrylátu (Spherony)
- bazické látky:** na katexech (přednostně silně kyselých) ve formě kationtů.
- kyselé látky:** na anexech (přednostně silně bazických) ve formě aniontů.

Důležitým faktorem při výběru ionexu je jeho **stupeň zesílení**. Póry musí umožnit dobré pronikání látky do ionexu. Malé póry brání přístupu k vnitřním funkčním skupinám, velké póry snižují účinnost dělení. **S rostoucí velikostí dělených látek používáme ionexy s klesajícím stupněm zesílení.**

### 2. BOBTVAVOST IONEXU

Ionex je třeba před prvním použitím zbavit nečistot a nechat nabobtnat (voda, pufr).

Rychlost bobtnání závisí na stupni zesílení, lze ji urychlit zahřátím.

Dnes jsou ionexy dodávány již v nabobtnalém stavu

### 3. CYKLOVÁNÍ IONEXU

- převedení ionexu z formy jednoho protiontu do formy druhého protiontu, např. katex z H<sup>+</sup> do Na<sup>+</sup> cyklu, anex z OH<sup>-</sup> do Cl<sup>-</sup> cyklu

Před prvním použitím by měl být ionex cyklován, vždy podle údajů výrobce

#### 4. REGENERACE A SKLADOVÁNÍ IONEXU

Použité ionexy nelze skladovat v kolonách příliš dlouho.

Před uložením ionex regenerujeme, tzn. převedeme ho např. do  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{Cl}^-$  cyklu promýváním 2M roztokem NaCl, následuje odsátí na fritě a dosušení na vzduchu (nepoužívat zvýšenou teplotu, protože porušuje strukturu zrn!).

**Celulózové a agarózové ionexy** lze kratší dobu skladovat ve vlhkém stavu s přidavkem konzervačního činidla; pro delší skladování je vysušíme promýváním řadou roztoků alkoholu s klesajícím obsahem vody a zbytky alkoholu odstraníme sušením na vzduchu.

#### VÝMĚNA IONTŮ

Nabobtnalý ionex je v rovnováze s prostředím. Přidáním elektrolytu dojde k rozdělení nových i původních iontů mezi obě fáze.



Rovnováha je popsána termodynamickou rovnovážnou konstantou:

$$K_D = \frac{[\text{B}_{\text{ionex}}][\text{A}_{\text{roztok}}]}{[\text{A}_{\text{ionex}}][\text{B}_{\text{roztok}}]} \cdot \frac{\gamma_{\text{B ionex}} \gamma_{\text{A roztok}}}{\gamma_{\text{A ionex}} \gamma_{\text{B roztok}}}$$

Koncentrační rovnovážná konstanta: závisí na iontové síle elektrolytu a stupni výměny iontů.

#### 1. ANORGANICKÉ IONTY

- lépe se vyměňují málo objemné ionty (v hydratovaném stavu) a ionty s vyšším mocenstvím

Selektivita silně kyselého katexu klesá v řadě:  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ....  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$

Selektivita anexu klesá v řadě: citronan, šťavelan, I,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , mravenčan, F, octan

#### 2. ORGANICKÉ IONTY

Při výměně na organických ionexech se uplatňují i jiné interakce, disperzní síly, mezi neionizovanými zbytky molekul a organickou maticí ionexu, tzn. uplatňuje se i **fyzikální adsorpce**.

Doplňkové interakce lze využít pro přípravu ionexů „šitých na míru“.

#### 3. AMFOTERNÍ IONTY

Aminokyseliny, peptidy a jiné amfoterní látky se ve vodných roztocích vyskytují ve formě **obojetných iontů, tzv. zwitteriontů**, jejich náboj závisí na pH okolního prostředí.

**Izoelektrický bod** amfoterního iontu: hodnota pH, při které má iont stejný počet kladných a záporných nábojů

$$pI = \frac{pK_a + pK_b}{2}$$

Vazba amfoterního iontu na katex v kyselém prostředí je určena hodnotou  $pK_a$ , na anex v bazickém prostředí hodnotou  $pK_b$ .

#### 4. BÍLKOVINY

- odlišné chování bílkovin v IEC ve srovnání s aminokyselinami a peptidy

V závislosti na pH roztoku se bílkoviny zcela sorbují nebo vůbec nesorbují (při pI).

Účinná sorpce probíhá při pH o jednotku nižším (kationt) nebo vyšším (aniont) než pI.

K dělení sorbovaných bílkovin se používá **pH gradientová eluce**.

Pro separaci ve zvolené oblasti pH stačí plynule měnit iontovou sílu elučního činidla.

#### INSTRUMENTACE

##### 1. KOLONY

- skleněné

**Důležité parametry:** délka, průměr, kvalita naplnění, kapacita, maximální zatížení kolony vzorkem

Nechromatografické kolony s pryskyřičnou náplní: poměr průměru a délky 1:5 až 1:10

Polydextranové a celulózové kolony: 20 cm a 5 až 15 cm dlouhé bez ohledu na šířku

Chromatografické kolony s pryskyřičnou náplní: poměr průměru a délky 1:20 až 1:50

**Kapacita kolony:** využívá se jen část (1 % při analytické, 5-10 % při eluční preparativní, 10-20 % při chromatogr. bílkovin na celulózách a polydextranech, 25 % při vytěšňovací chrom.)

##### 2. PLNĚNÍ KOLON

Musí být zaručen dokonalý kontakt ionexu s elučním rozpouštědlem, tzn. rovnoměrné naplnění bez přítomnosti bublin.

- analytická chromatografie: komerční kolony

##### 3. NANÁŠENÍ VZORKU

Při úplné sorpci vzorku lze dávkovat vzorek ve zředěných a objemných roztocích, jinak vzorek nanášíme v koncentrovaných roztocích, tj. v co nejužší zóně.

- dávkovací ventily se smyčkami

##### 4. ELUCE

**Izokratiká eluce:** používá se jedno eluční činidlo

**Gradientová eluce:** eluční síla (koncentrace) činidla se plynule mění během analýzy

Rychlost eluce je ovlivňována viskozitou roztoku, a ta jeho teplotou, a zrnitostí ionexu.

**Celková rychlost toku  $V_M$ :** ml roztoku za jednotku času bez ohledy na rozměry kolony

**Lineární rychlost toku  $u$ :** vztažena na průřez ionexového sloupce [cm/min, cm/s]

**Objemová rychlost toku  $F_m$ :** vztažena na objem ionexového sloupce [ml/s]

## 5. JÍMÁNÍ FRAKCI A DETEKCE

Při diskontinuálním vyhodnocování eluátu jímáme frakce nejčastěji automatickým jímačem frakcí.

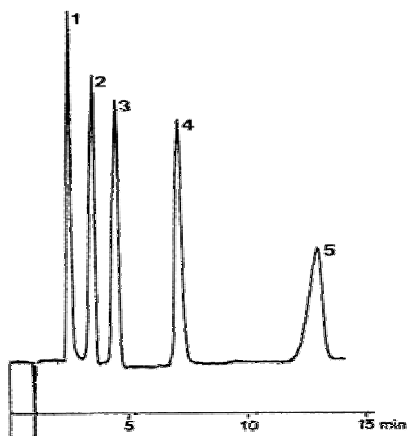
Najímané frakce vyhodnocujeme vhodnou analytickou metodou.

Při kontinuálním vyhodnocování, tj. při analytické IEC, používáme detektory obdobné jako u HPLC (UV, refraktometrické, vodivostní a elektrochemické).

### IEC SEPARACE ANIONTŮ

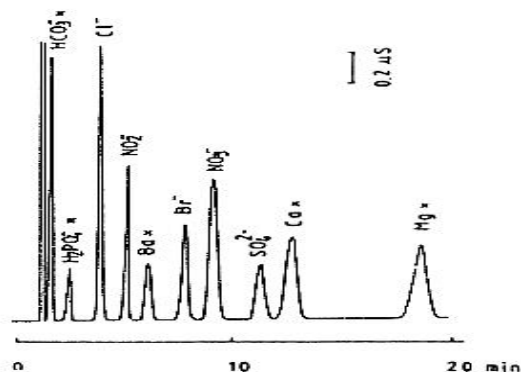
kolona: 250/4 Nucleosil Anion II  
eluent: 2mM hydrogenftalát draselný pH 5,7  
průtok eluentu 2ml/min  
detekce: UV spektrofotometrická při 280 nm

- píky: 1.  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$   
2.  $\text{Cl}^-$   
3.  $\text{NO}_2^-$   
4.  $\text{NO}_3^-$   
5.  $\text{SO}_4^{2-}$



### IEC KATIONTŮ A ANIONTŮ ZA PŘÍTOMNOSTI KOMPLEXONŮ

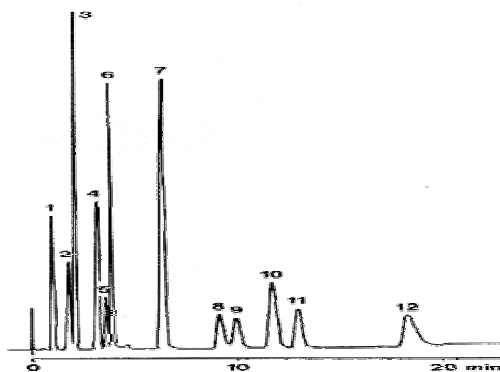
kolona: Nucleosil 100-10SB (anex) 250 x 4 mm ID  
eluent: 1mmol/l DCTA (diaminyklohexantetraoctová kyselina), pH 7; průtok eluentu 2ml/min  
detekce: vodivostní



### IEC ŠTĚPŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

kolona: 50/4,6 Nucleogel SAX 1000-8  
eluent: eluent A: 0,02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 2,6; eluent B: 0,5M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5; lineární gradient 0 - 100% B za 20 min; průtok eluentu 1ml/min  
detekce: UV spektrofotometrická při 260 nm

- píky: 1. CMP, 2. AMP, 3. UMP, 4. GMP, 5. CDP, 6. ADP, 7. UDP, 8. CTP, 9. GDP, 10. ATP, 11. UTP, 12. GTP.



### IEC PROTEINOVÝCH STANDARDŮ

stacionární fáze : Nucleogel SCX 1000-8 (50 x 4,6 mm)  
eluent : a) eluent A: 0,02M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,0; eluent B: A + 0,5M NaCl pH 6,0; b) eluent A: 0,01M Tris HCl pH 8,0; eluent B: A + 0,35M NaCl pH 8,0; lineární gradient 0 - 100% B za 20min; průtok eluentu 1ml/min

detekce : UV spektrofotometrická při 280 nm

- a) IEC kationtů, píky: 1. myoglobin, 2. chymotrypsinogen A, 3. cytochrom c, 4. lysozyme.  
b) IEC aniontů, píky: 1. myoglobin, 2. conalbumin, 3. ovalbumin, 4. sojový trypsininhibitor

