

# Iontově Výměnná Chromatografie (Ion exchange chromatography, IEC)

## Měníče iontů (ionexy, z angl. ion exchanger)

- ve vodě nerozpustné látky
- ve styku s vodnou fází uvolňují elektrostatickou disociací ionty, které mohou být nahrazeny ionty z roztoku s větší afinitou k měniči

## Proces iontové výměny

- zvratný děj
- průběh závisí na afinitě iontů k měniči a na koncentraci iontů

## Princip IEC

- kolonu naplníme ionexem s vázanými ionty A
- nadávkujeme směs iontů B a C s větší afinitou k ionexu než ionty A
- v ionexu dojde k výměně iontů A za ionty B a C = zadržení iontů B a C
- ionty B a C vytěsníme z ionexu roztokem iontů A o vysoké koncentraci, který kontinuálně přivádíme na začátek kolony
- ionty B a C se pohybují různými rychlostmi kolonou a dochází k jejich dělení

# KLASIFIKACE IONEXŮ

## a) podle chemického složení a původu

- anorganické, organické
- přírodní a syntetické

## b) podle skupenství a tvaru

### Pevné ionexy

- nerozpustné látky anorganické nebo organické povahy, které při styku s vodou bobtnají a vytvářejí pružný gel
- různé tvary (nepravidelné částice mletého materiálu, pravidelné kuličky o velikosti 1-100  $\mu\text{m}$ , ionexové membrány, trubičky, kapiláry, vlákna či tkaniny)

### Kapalné ionexy

- nízkomolekulární látky obsahující iontové funkční skupiny a nepolární části, které umožňují rozpustnost v organických rozpouštědlech
- pracujeme s nimi jako při extrakci kapalinou

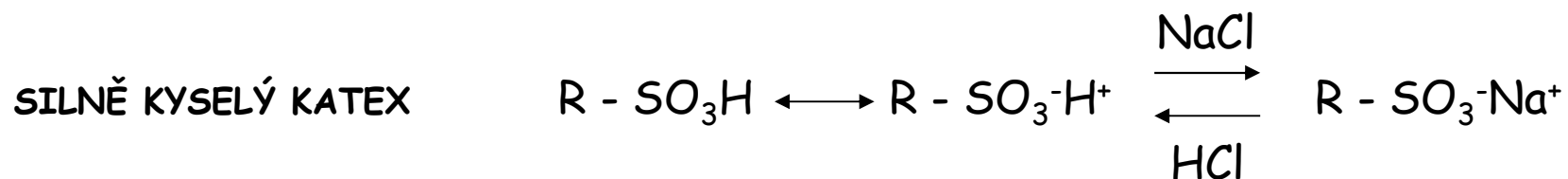
### Pelikulární ionexy

- tenká vrstva ionexu je nanášena na povrchu inertní částice

## c) podle ionogenních skupin

### Katexy (cation exchanger)

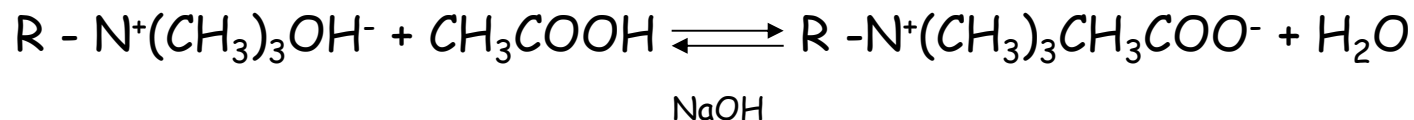
- nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny, uvolňující a vyměňující kationty
- **silně kyselé**: obsahují sulfoskupinu  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3^-$  (SB, SP)
- **slabě kyselé**: obsahují karboxy(methyl) skupinu  $-\text{COO}^-$  a  $-\text{CH}_2\text{COO}^-$



### Anexy (anion exchanger)

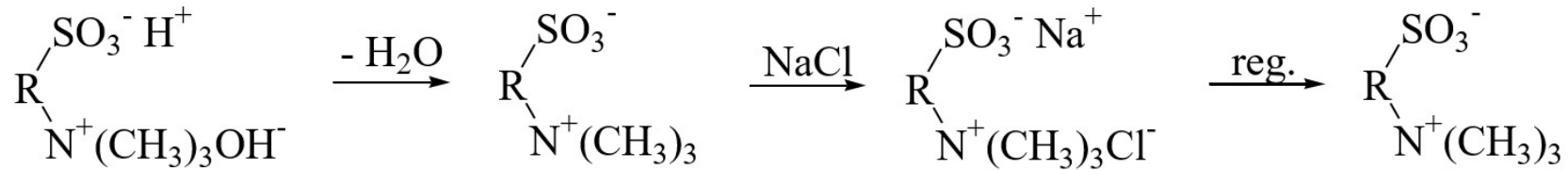
- nerozpustné polymerní polyvalentní báze, uvolňující a vyměňující anionty
- **silně bazické**: obsahují kvartérní aminy  $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ;  $-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
- **slabě bazické**: obsahují aminoskupinu  $-\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  DEA;  $-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  DEAE,  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$  DMAEtoH

### SILNĚ BAZICKÝ ANEX



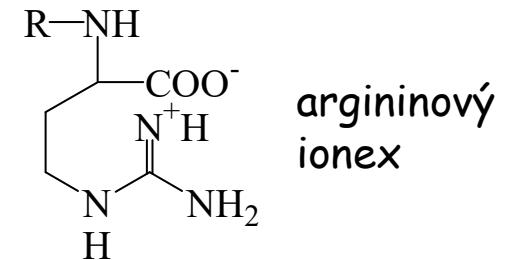
## Amfoterní ionexy

- obsahují katexové i anexové funkční skupiny; vytvářejí vnitřní soli, regenerace promýváním vodou



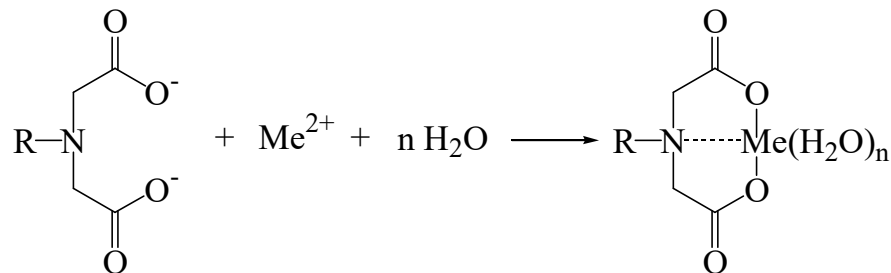
## Dipolární ionexy

- podskupina amfoterních ionexů
- na polydextranové nebo agarosové matrici navázány aminokyseliny, které ve vodném prostředí vytvářejí intramolekulární dipóly



## Chelatovorné (chelatační) ionexy

- vytváří komplexní vazby s kovy ( $\text{Me}^{2+}$ ), především těžkými kovy a kovy alkalických zemin



## Základní typy iontoměničů

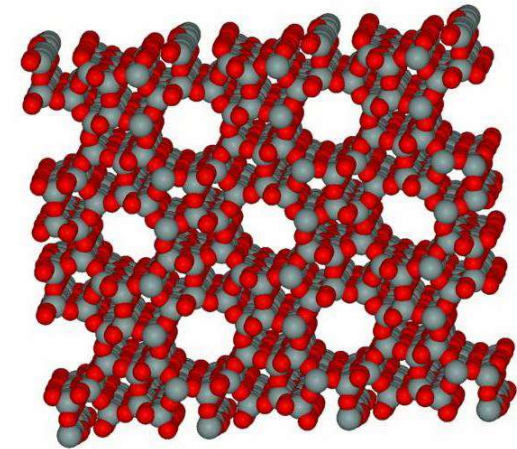
- anorganické ionexy (hlinitokřemičitany, silikagel)
- ionexové pryskyřice (polyakryláty, styrenové kopolymery)
- ionexové deriváty celulosy
- ionexové deriváty dextransu a agarosy

## ANORGANICKÉ IONEXY

- nevýhody: nízká kapacita pro vzorek a omezená mechanická odolnost
- výhody: stálost vůči radiaci a vysokým teplotám

### Hlinitokřemičitany

- dnes syntetické materiály s přesně definovaným složením a strukturou
- základem tetraedry  $\text{SiO}_4$  a  $\text{AlO}_4$
- hlinitokřemičitany alkalických kovů-**zeolity** váží vyměňované kationty ve svých pórech
- nahrazovány ionexy na bázi syntetických pryskyřic



### Silikagel

- porézní forma  $\text{SiO}_2$ , slabě kyselý měnič kationtů

### Dihydrogenfosforečnan zirkoničitý

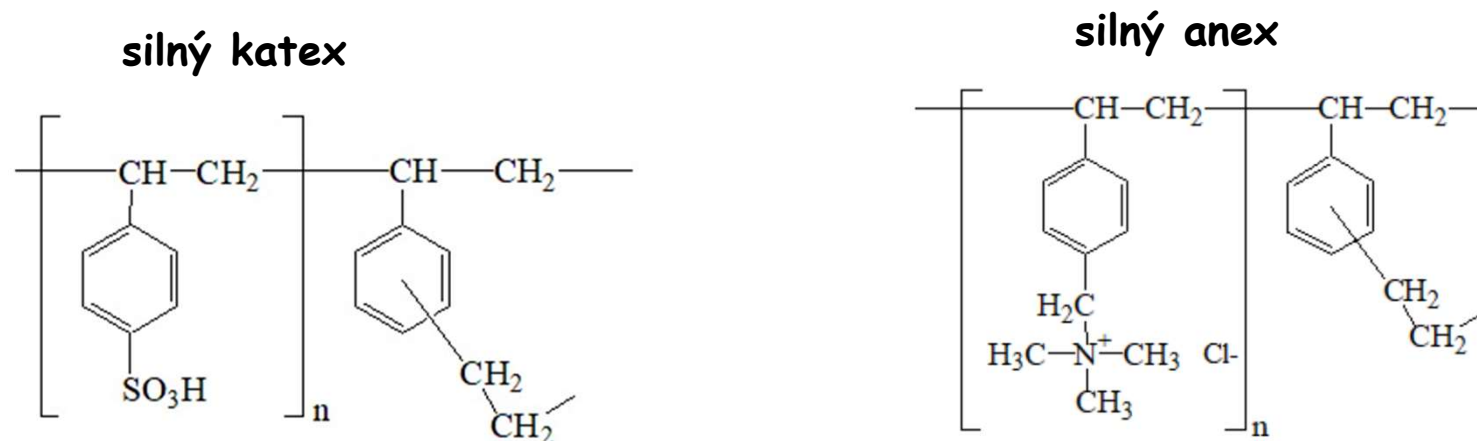
- moderní anorganický katex (silný)
- struktura a vlastnosti silně závisí na podmínkách přípravy

# IONEXOVÉ PRYSKYŘICE

- dříve na bázi fenolformaldehydu
- dnes pryskyřice na bázi derivátů **polystyrenu a polyakrylátu**
- lze je snadno připravit v požadovaném tvaru, velikosti, porositě a chemickém složení a s různými funkčními skupinami
- použitelné v širokém rozsahu pH a do 100 °C

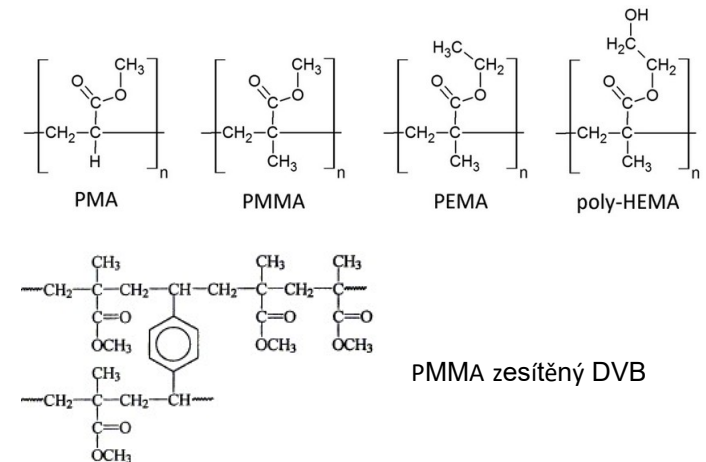
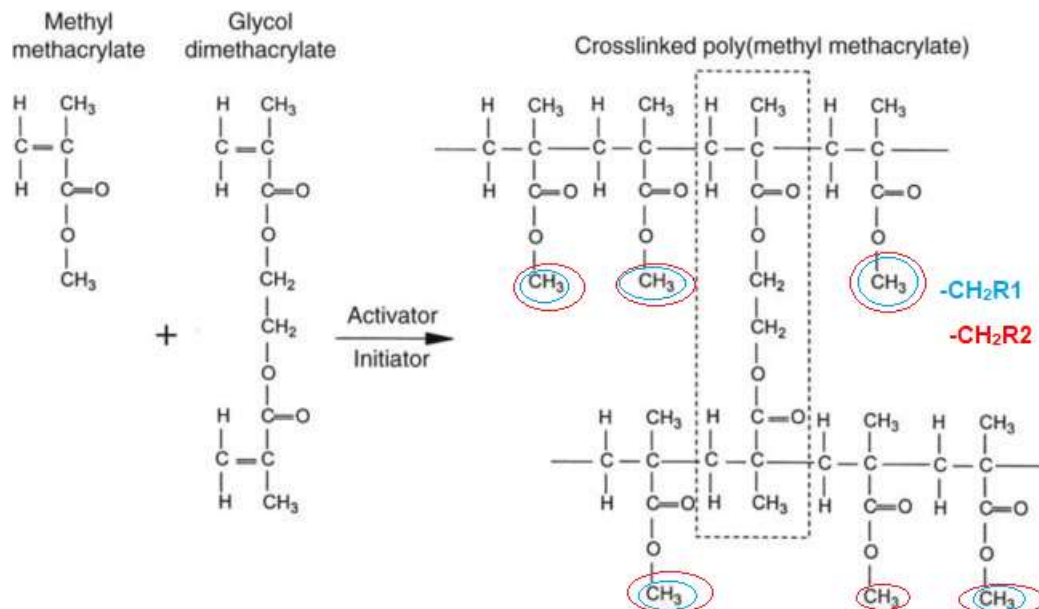
## Styrenové ionexy

- (poly)styren zesítěný divinylbenzenem
- s rostoucím stupněm zesíťení roste tvrdost a mechanická pevnost ionexu, klesá jeho bobtnavost
- lze navázat na uhlíkový skelet různé funkční skupiny



## Akrylátové ionexy

- estery kyseliny methakrylové zesítěné divinylbenzenem nebo ethylendimethakrylátem
- pryskyřice na bázi hydroxyalkylmethakrylátů mají vynikající chemickou stabilitu, používají se k HPLC separaci biopolymerů, aniž by docházelo k denaturaci biopolymerů
- HEMA gely - hydroxyethylmethakryláty, český vynález (měkké kontaktní čočky, prof. Wichterle), separace biopolymerů, hydrofilní materiály, hodně bobtnají



Akrylátový slabě kyselý katex  
R1 =  $-\text{COO}^- \text{Na}^+$

Akrylátový slabě bazický anex  
R2 =  $-\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2 \text{Cl}^-$



## IONEXOVÉ CELULOSY

**Celulosa:** *lineární* polysacharid, glukosové jednotky spojené glykosidickou vazbou  $\beta$ -1,4

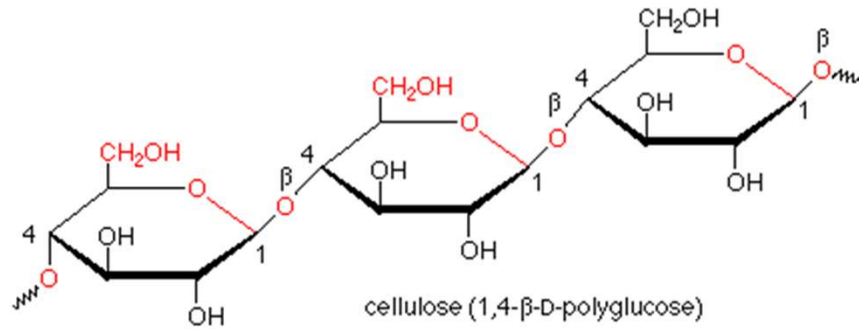
- mají strukturu s velkými póry přístupnými i pro biopolymery o  $M_r$  řádově  $10^5$
- vysoce hydrofilní struktura, silně bobtnají
- používají se slabě kyselá katexy (-COONa) a slabě bazické anexy (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-diethylamin)

## DERIVÁTY DEXTRANU A AGAROSY

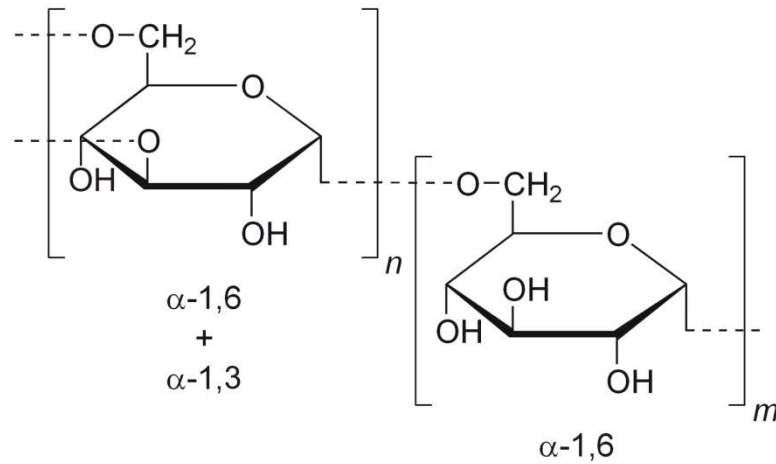
**Dextran:** *větvený* polysacharid složený z glukosových jednotek, glykosidická vazba  $\alpha$ -1,6; větvení  $\alpha$ -1,2/1,3/1,4

**Agarosa:** tvořena zbytky D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy, je neutrální a *lineární*, obsahuje glykosidickou vazbu  $\alpha$ -1,3 a  $\beta$ -1,4

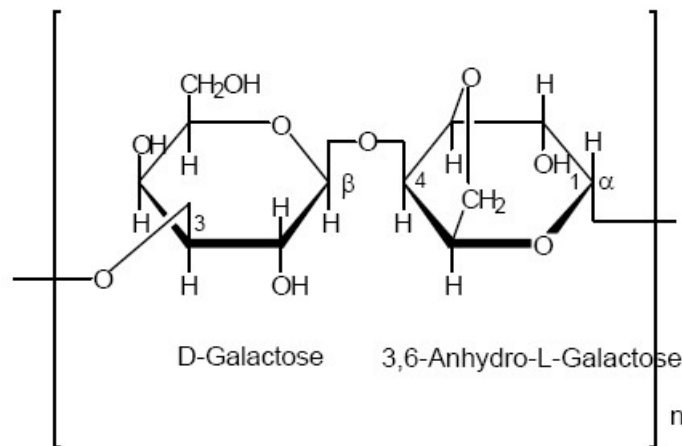
- strukturou se podobají pryskyřičným ionexům
- velké póry a značně hydrofilní struktura umožňují práci s biopolymery
- jejich porozita vzniká bobtnáním
- vznikly úpravou gelů vyvinutých pro vylučovací chromatografii



Celulosa



Dextran



Agarosa

# PARAMETRY IONEXŮ



## 1. Kapacita

- vyjadřujeme v  $\text{mmol g}^{-1}$
- **celková kapacita** ionexu: látkové množství funkčních skupin ionexu, přepočítané na jednomocné ionty (maximální možné množství iontů, které mohou být ionexem vyměněny)
- **průniková (užitková) kapacita** ionexu: látkové množství iontů (vyjadřujeme jako jednomocné ionty), které ionex zachytí do jejich průchodu

## 2. Porozita

- **porozita ionexu ovlivňuje jeho kapacitu**
- ionexy gelové (mikroporézní): porozita vzniká bobtnáním
- ionexy makroporézní: porézní již v suchém stavu, velký průměr pórů

## 3. Bobtnavost

- vyjadřuje míru bobtnání
- představuje nárůst objemu ionexu po namočení ve vodě, udává se v %

# PARAMETRY IONEXŮ

## 4. Procento zesíťování

- udáváme jako procentuální podíl divinylbenzenu
- určuje odolnost a mechanickou pevnost ionexu, ovlivňuje bobtnavost a porozitu

## 5. Zrnění

- udává podíl zrn určité velikosti
- pro chromatografické účely je nutná jednotná zrnitost materiálu

## 6. Stabilita ionexu

- odolnost vůči oxidačním činidlům
- mechanická a teplotní odolnost (anex II degraduje při 50-80 °C)
- chemická odolnost - doporučený pracovní rozsah pH

## 7. Selektivita ionexu

- ionex pro záchyt všech iontů
- selektivní ionex pro určitý iont, např. odstraňování dusičnanů

# PRÁCE S IONEXY

## 1. Výběr správného ionexu

- **podle účelu:** pro chromatografii (chromatographic grade CG, analytical grade AG), pro obecné analytické využití (commercial grade), pro práci s radioaktivními ionty (reactor grade RG)
- **podle povahy dělených látek:**
  - a) anorganické látky: ionexové pryskyřice nebo anorganické ionexy
  - b) nízkomolekulární ionogenní organické látky: ionexové pryskyřice
  - c) biopolymery: ionexové celulosy a agarosy
  - d) HPLC biopolymerů: ionexové deriváty porézních skel a ionexové pryskyřice na bázi hydroxyalkylmethakrylátu (Spherony, HEMA)
  - e) **bazické látky:** na katexech (přednostně silně kyselých) ve formě kationtů
  - f) **kyselé látky:** na anexech (přednostně silně bazických) ve formě aniontů
- **podle stupně zesítení:**
  - **s rostoucí velikostí dělených látek používáme ionexy s klesajícím stupněm zesítení**
  - stupeň zesítení ovlivňuje bobtnání a tím i porozitu, póry musí umožnit dobré pronikání analytů do ionexu (malé póry brání přístupu k vnitřním funkčním skupinám, velké póry snižují účinnost dělení)

### 2. Bobtnání ionexu

- před použitím ionex zbavíme nečistot a necháme nabobtnat (voda, pufr)
- rychlost bobtnání závisí na stupni zesítnění a na velikosti protiiontu funkční skupiny (lze urychlit zahřátím)
- nabobtnalý ionex naplníme do kolony
- ionexy někdy dodávány v nabobtnalém stavu, komerční naplněné kolony

### 3. Pracovní cykly ionexu

- převedení ionexu z formy jednoho protiiontu do formy druhého protiiontu, např. katex z  $H^+$  do  $Na^+$  cyklu, anex z  $OH^-$  do  $Cl^-$  cyklu

### 4. Regenerace a skladování ionexu

- použité (nabobtnalé) ionexy neskladujeme v kolonách příliš dlouho
- před uložením ionex regenerujeme, tzn. převedeme do  $Na^+$  nebo  $Cl^-$  cyklu promýváním  $2\text{ mol dm}^{-3}$  roztokem  $NaCl$ , odsajeme na fritě a dosušíme na vzduchu (nepoužívat zvýšenou teplotu, porušuje strukturu zrn!)
- **Celulosové a agarosové ionexy**
- lze krátce skladovat ve vlhkém stavu s přídavkem konzervačního činidla
- pro delší skladování promyjeme ionex roztoky 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 (B) i původních (A) iontů mezi obě fáze



- rovnováha je popsána **termodynamickou rovnovážnou konstantou**

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

- **koncentrační rovnovážná konstanta** závisí na iontové síle elektrolytu a stupni výměny iontů

Iontová výměna je složitý proces a zahrnuje následující kroky:

- difúze iontu B z roztoku k povrchu ionexové částice
- difúze iontu B ionexovou částicí k funkční skupině
- **vlastní iontově výměnná reakce**
- difúze vyměněného iontu A ionexovou částicí k povrchu
- difúze iontu A od povrchu ionexové částice do roztoku

## Výměna iontů

**Selektivita ionexu** (schopnost ionexů vázat určitý druh iontů a síla této vazby) závisí na:

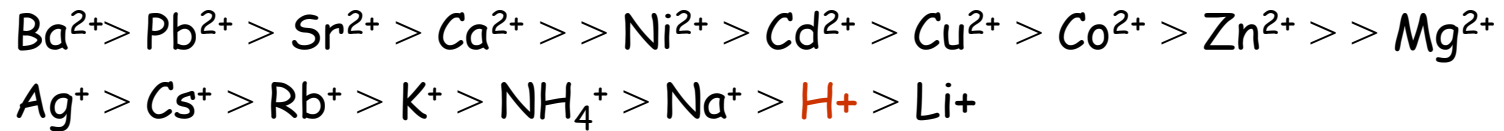
- velikosti pórů ionexu
- charakteru protiiontu funkční skupiny ionexu
- náboji iontu (s rostoucím nábojem roste afinita)
- poloměru iontu v jeho hydratovaném stavu (s klesajícím poloměrem roste afinita)
- polarizovatelnosti iontu (s polarizovatelností roste afinita)
- schopnosti tvořit komplexy (asociáty) s ionty na ionexu (afinita roste) nebo s ionty v roztoku (afinita klesá)
- selektivita závisí na typu ionexu a experimentálních podmínkách (pH a iontové síle pracovního roztoku)
- **selektivní řady** pro daný typ ionexu
  - kationty nebo anionty jsou seřazeny podle afinity k ionexu
  - jsou to empirická pravidla při práci s ionexy
  - základem je tzv. Hofmeisterova řada iontů



## 1. výměna anorganických iontů

- lépe se vyměňují málo objemné ionty (v hydratovaném stavu) a ionty s vyšším mocenstvím
- selektivní řady, liší se podle síly ionexu
  - zde podle klesající afinity iontů - ochoty se vyměňovat

silný katex  $\text{SO}_3\text{H}$ :



slabý katex  $\text{COOH}$ :  $\text{H}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$



silný anex:  $\text{SO}_4^{2-} > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{OH}^- > \text{HCO}_3^- > \text{F}^-$

## 2. výměna organických iontů

- při výměně na ionexových pryskyřicích se uplatňují i disperzní síly mezi neionizovanými zbytky molekul a organickou maticí ionexu, tzn. uplatňuje se i fyzikální adsorpce

### 3. výměna amfoterních iontů

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

**Izoelektrický bod** amfoterního iontu je hodnota pH, při které má iont stejný počet kladných a záporných nábojů a je rovna aritmetickému průměru  $pK$  kyselé a bazické funkční skupiny  $pI = (pK_a + pK_b)/2$

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

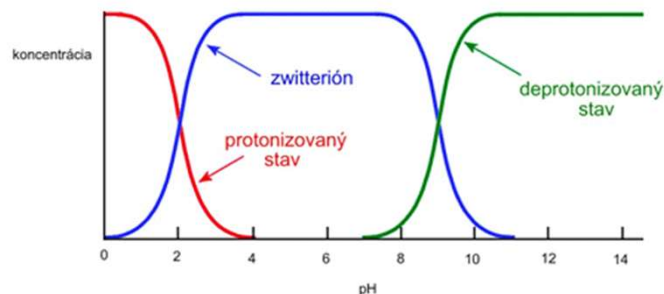


aminokyselina ( $NH_2, COOH$ )

$pH < pK_a \rightarrow NH_3^+, COOH$

$pI \rightarrow NH_3^+, COO^-$

$pH > pK_b \rightarrow NH_2, COO^-$



#### 4. výměna bílkovin

- odlišné chování bílkovin v IEC ve srovnání s aminokyselinami a peptidy
- účinná sorpce bílkovin probíhá při pH o jednotku nižším (jako kationt) nebo o jednotku vyšším (jako aniont) než  $pI$ , při  $pH=pI$  se bílkoviny nezachytávají na iontoměniči
- k dělení bílkovin používáme gradientovou eluci pH nebo gradientovou eluci iontové síly

# INSTRUMENTACE IEC

## 1. Kolony

- skleněné (sloupcové kolony plněné v laboratoři)
- nerezové (komerční HPLC kolony, není kontrola naplnění)
- důležité parametry: délka, průměr, kvalita naplnění, kapacita, maximální zatížení kolony vzorkem

sloupcové kolony s pryskyřičnou náplní: poměr průměr/délka 1:5 až 1:10

HPLC kolony s pryskyřičnou náplní: poměr průměr/délka 1:20 až 1:50

- kapacita kolony: využíváme jen část kapacity kolony
  - 1 % při analytické chromatografii
  - 5-10 % při eluční preparativní chromatografii
  - 10-20 % při chromatografii bílkovin na celulosách a polydextranech
  - 25 % při vytěšňovací chromatografii

## 2. Plnění kolon

- rovnoměrné naplnění ionexu bez přítomnosti vzduchových bublin, dokonalý kontakt ionexu s elučním rozpouštědlem
- pro analytickou chromatografii využíváme komerční kolony

## INSTRUMENTACE

### 3. Nanášení vzorku

- při úplné sorpci vzorku můžeme dávkovat zředěné a objemné vzorky, jinak nanášíme koncentrované vzorky v co nejužší zóně
- dávkování ruční ve sloupcové chromatografii
- dávkovací ventily se smyčkami v HPLC

### 4. Eluce

- průtoková rychlost elučního činidla je ovlivňována jeho viskozitou (vliv teploty) a zrnitostí ionexu
- eluční činidlo protéká gravitací x čerpadlo v HPLC
- **mobilní fáze**: vodné roztoky pufků; možný přídavek malého množství organického rozpouštědla mísitelného s vodou
  - vliv náboje a velikosti iontů pufku, vliv koncentrace pufku (protiiontu), vliv pH, teploty a iontové síly (koncentrace pufku, případně další soli)
- **izokratická eluce**: používáme eluční činidlo o stále stejném složení
- **gradientová eluce**: eluční síla (koncentrace, pH, iontová síla) činidla se mění během analýzy

## 5. Jímání frakcí a detekce

- při diskontinuálním vyhodnocování eluátu jímáme frakce nejčastěji automatickým jímačem frakcí (frakce dostatečně malé!)
- najímané frakce vyhodnocujeme vhodnou analytickou metodou
- při kontinuálním vyhodnocování, tj. při analytické IEC, používáme detektory obdobné jako u HPLC (UV, refraktometrické, vodivostní a elektrochemické)

# POUŽITÍ IONEXŮ

- zachycení a nakoncentrování iontů
- oddělení kationtů, které mohou interferovat se stanovením aniontů a naopak
- separace a stanovení (kvantifikace) iontů na koloně s ionexem
- nepřímé stanovení iontů ( $\text{Na}^+ \rightarrow \text{H}^+$ )
- odstraňování iontů z vody (příprava deionizované vody)
  
- změkčování vody (např. kotle elektráren)
- demineralizace vody
- příprava ultračisté vody (např. pro elektrotechnický průmysl)
- odstraňování dusičnanů z pitné vody
- odstraňování těžkých kovů z pitných a odpadních vod

# IEC SEPARACE ANIONTŮ

kolona: 250/4 Nucleosil Anion II

eluent: 2mmol dm<sup>-3</sup> hydrogenftalát draselný, pH 5,7

průtok eluentu 2 ml min<sup>-1</sup>

detekce: UV spektrofometrická při 280 nm

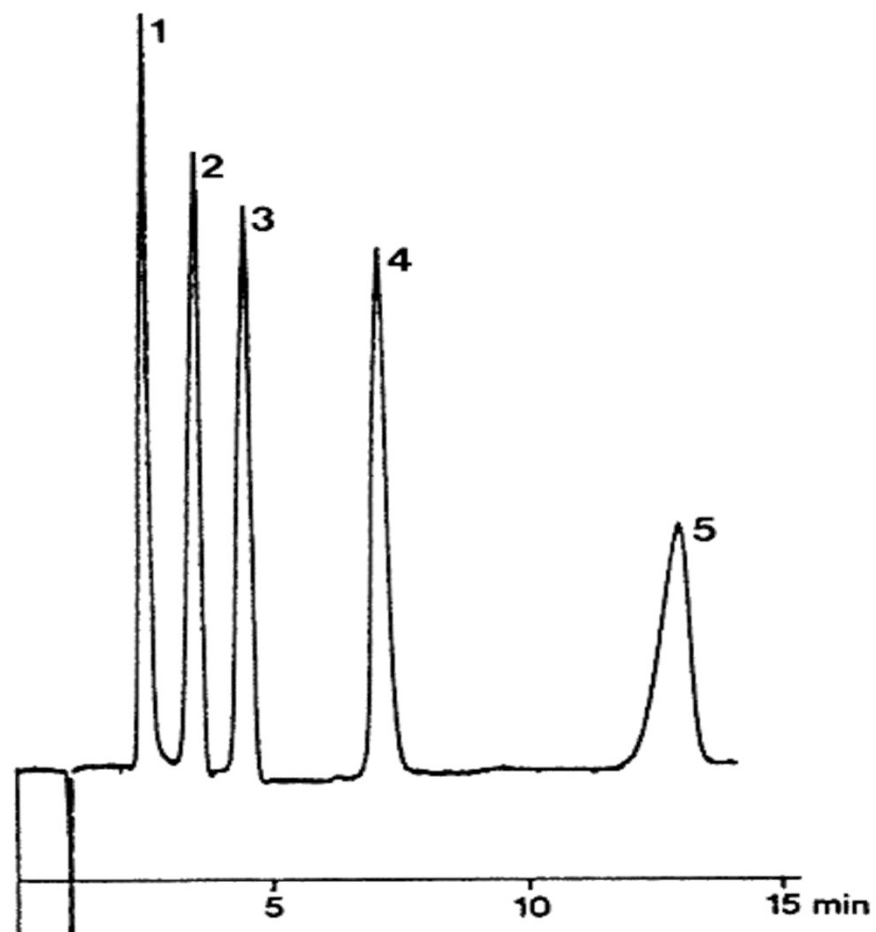
identifikace píků: 1. H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>

2. Cl<sup>-</sup>

3. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

4. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

5. SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>





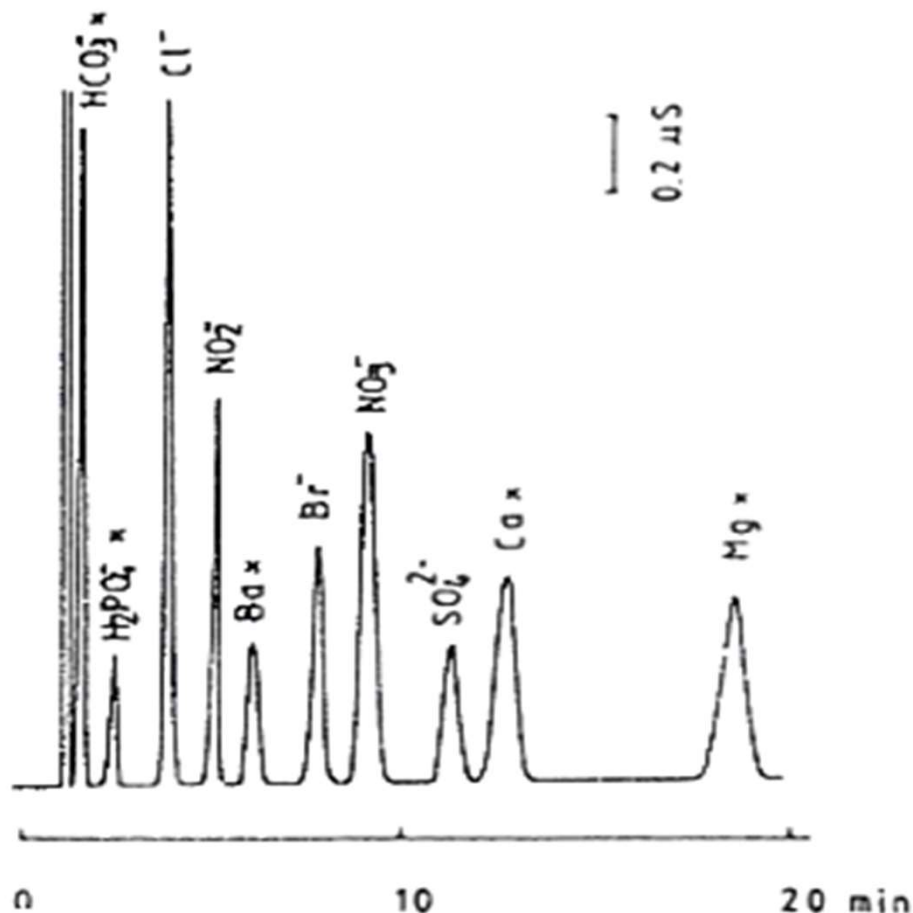
# IEC KATIONTŮ A ANIONTŮ ZA PŘÍTOMNOSTI KOMPLEXONU

kolona: Nucleosil 100-10SB (anex) 250 x 4 mm ID

eluent: 1mmol dm<sup>-3</sup> DCTA (kyselina diamincyklohexantetraoctová), pH 7  
průtok eluentu 2 ml min<sup>-1</sup>

detekce: vodivostní

chelát kationtů s  
komplexonem



# IEC PROTEINOVÝCH STANDARDŮ

stacionární fáze: Nucleogel SCX 1000-8 (50 x 4,6 mm)

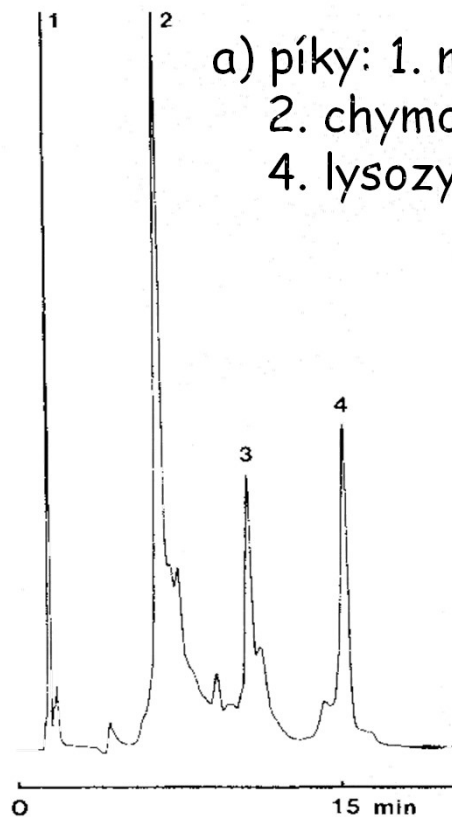
eluent :

a) MF A:  $0,02 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  pH 6,0; MF B: A +  $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$  pH 6,0

b) MF A:  $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Tris HCl}$  pH 8,0; MF B: A +  $0,35 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$  pH 8,0

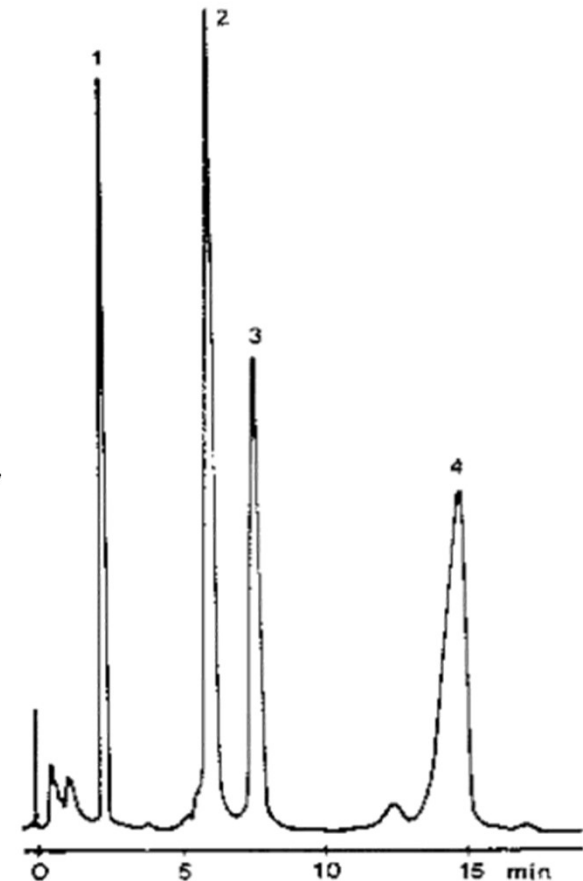
lineární gradient 0 - 100% B za 20 min; průtok eluentu:  $1 \text{ ml min}^{-1}$

detekce: UV spektrofotometrická @ 280 nm



a) píky: 1. myoglobin,  
2. chymotrypsinogen A, 3. cytochrom c,  
4. lysozym

b) píky: 1. myoglobin,  
2. conalbumin, 3. ovalbumin,  
4. sojový trypsininhibitor



# IEC ŠTĚPŮ NUKLEOVÝCH KYSELIN

kolona: 50/4,6 Nucleogel SAX 1000-8

eluent:

eluent A:  $0,02 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  pH 2,6 eluent B:  $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,5

lineární gradient 0 - 100 % B za 20 min; průtok eluentu  $1 \text{ ml min}^{-1}$

detekce: UV spektrofotometrická @ 260 nm

identifikace píků:

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

