



مراقبت عمومی از ستون HPLC

استفاده صحیح از ستون HPLC در طول عمر آن نقش زیادی دارد، در این مقاله به شما برخی از نکات و دستورالعمل‌های استفاده، تمیز کردن و نگهداری از ستون HPLC را آموزش خواهیم داد. این دستورالعمل‌ها از سویی به ماهیت فاز ساکن (سیلیکا، پلیمر و انواع دیگر فاز ساکن) و از سوی دیگر به شیمی سطح فاز ساکن مرتبط است.

ستون‌های مبتنی بر پایه سیلیکا (Silica)

❖ دستورالعمل عمومی

سیلیکا یک تکیه گاه (Support) مناسب برای ستون‌های HPLC محسوب می‌شود. پایداری مکانیکی بالا، خواص فیزیکوشیمیایی سطح عالی، طیف وسیع اتصالات (Bond) و سازگاری با انواع حلال‌های آلی از نقاط قوت آن به شمار می‌رود. نکات ذیل در استفاده از ستون‌های Silica اهمیت فراوان دارد.

❖ پایداری pH

به طور کلی ستون‌های HPLC در محدوده pH ۲ الی ۸ پایداری دارند. اندازه گیری pH باید قبل از مخلوط کردن ماده شوینده (Eluent) با حلال‌های آلی انجام شود. ستون‌های پیشرفته تر HPLC را می‌توان حتی خارج از محدوده مذکور نیز استفاده کرد. پیوندهای شیمیایی جدید در برخی موارد امکان استفاده از ستون را حتی در pH زیر ۱ نیز فراهم می‌کند. با این حال قبل از استفاده از ستون Silica خارج از محدوده pH مجاز، حتما دستورالعمل کمپانی سازنده را مطالعه کنید. بیشترین طول عمر ستون با رعایت محدوده pH بین ۲ تا ۶/۸ حاصل می‌گردد. فازهای ساکن مبتنی بر سیلیکا ژل فوق العاده خالص را بسته به ماهیت شیمیایی اصلاح کننده‌های (Modifier) استفاده شده در ساختار فاز سیال می‌تواند حتی تا pH حدود ۱۱ هم مورد استفاده قرار گیرد. مبادی بزرگ (Larg base) مانند پیرولیدین، توانایی حمله به سطح سیلیکا را ندارند، لذا می‌توان در pH بالاتر مورد استفاده قرار گیرند. در صورتی که در pH حدود ۸ و در مبادی کوچک به عنوان اصلاح کننده (مانند آمونیاک) کار می‌کنید پیشنهاد می‌شود که از فاز ساکن بر پایه پلیمرها و یا زیرکونیا دی اکساید استفاده کنید.

❖ پایداری مکانیکی

فازهای ساکن بر پایه سیلیس از نظر مکانیکی بسیار پایدار هستند و هیچ محدودیت فشاری از خود نشان نمی‌دهند به گونه ای که می‌توان بدون هیچ مشکلی در فشارهای بالای 40 Mpa (6,000 Psi) از آنها استفاده کرد. با این حال باید از هرگونه شوک فشاری در ستون اجتناب شود، به نحوی که فشار سیستم به ناگهان افزایش پیدا نکند. شوک فشاری باعث ایجاد کانال‌هایی در داخل ستون خواهد شد که نتیجه آن شکافت (دو یا چند شاخگی) در نوک پیک کروماتوگرام خواهد بود.

❖ فاز متحرک یا شوینده (Eluent)



فازهای ساکن بر پایه سیلیکا با تمام حلال‌های آلی در pH های ذکر شده سازگاری دارد. اما باید از محلول‌هایی با بهترین کیفیت و خلوص (HPLC grade) استفاده شود و نیز قبل از استفاده در سیستم از فیلتر $0.5 \mu m$ عبور داده شود. همیشه در نظر داشته باشید قوی ترین فیلتر ستون شماست!!

استفاده از حلال‌های ناخالص باعث جذب برگشت ناپذیر ناخالصی‌ها در سر ستون و انسداد مسیرهای جذب در طول ستون خواهد شد که می‌تواند دلیل تغییر ماهیت ستون در بازدارندگی شود. تغییر در بازدارندگی نیز دلیل شکافتگی (Splitting) در نوک پیک کروماتوگرام خواهد بود. این ناخالصی‌ها دلیل اصلی پیدایش پیک غیر واقعی (Ghost peak) در شستشوی گرادیان (gradient elution) نیز هستند. این نوع پیک همیشه در یک نقطه از کروماتوگرام ظاهر می‌شوند و دلیل وجود آنها آنالیت نیست بلکه ناخالصی‌های حاصل از حلال و یا افزودنی‌های دیگر باعث شکل‌گیری آنها شده‌اند. بنابراین در شستشوی گرادیان توصیه می‌شود قبل از هرگونه تزریق ابتدا پیک‌های غیر واقعی را مشخص کنید. برای جلوگیری از هرگونه جذب برگشت ناپذیر ناخالصی در ابتدای ستون باید همیشه از پیش ستون متناسب با ستون اصلی استفاده کنید. استفاده از پیش ستون باعث افزایش چشمگیر عمر ستون خواهد شد. برای اطمینان بیشتر میتوان از فیلترهای مسیر (in-line filter) نیز استفاده کرد. این فیلترها مستقیماً به ستون متصل شده و انواع ذرات جامد شوینده را جذب می‌کنند اما قادر به جذب ناخالصی‌های آلی نیستند!

❖ نگهداری ستون بلا استفاده

- برای کوتاه مدت مثلاً یک شب، می‌توان ستون را با آخرین شوینده استفاده شده شستشو و نگهداری کرد.
- برای زمان متوسط مثلاً دو روز آخر هفته، ستون باید حتماً با آب خالص جهت ممانعت از رشت میکروارگانیسم شستشو داده شود.
- برای نگهداری طولانی ستون‌های مبتنی بر پایه سیلیکا باید در حلال آپروتیک (Aprotic solvent) نگهداری شوند. مقدار آب نیز نباید بیش از ۵۰ درصد باشد. بهترین حلال آپروتیک استونیتریل است.

احتیاط !!!

قبل از شستشو با استونیتریل از شسته شدن کامل بافرها اطمینان حاصل شود زیرا نمک‌های بافر معمولاً در استونیتریل محلول نیستند و می‌توانند باعث انسداد ستون و لوله‌های مویین سیستم شوند.

❖ زمان تعادل ستون

زمان تعادل یک ستون به ابعاد آن بستگی دارد و بطور کلی یک ستون بعد از شستشو با حجمی برابر با ۲۰ برابر حجم خود با شوینده به تعادل می‌رسد. زمان تعادل برای برخی از ستون‌های پر کاربرد به شرح جدول زیر خواهد بود:



Column dimension	Column volume [ml]*	Flow rate [ml/min]	Equilibration time [min]
250 x 4.6 mm	2,91	1,00	58
150 x 4.6 mm	1,74	1,00	35
100 x 4.6 mm	1,16	1,00	23
50 x 4.6 mm	0,58	1,00	12
250 x 4.0 mm	2,20	1,00	44
125 x 4.0 mm	1,10	1,00	22
250 x 2.0 mm	0,55	0,25	44
150 x 2.0 mm	0,33	0,25	26
50 x 2.0 mm	0,11	0,25	9

* $T = 0,7$

در صورت افزایش سرعت جریان شوینده می توان به زمان تعادل کوتاهتر دست یافت اما با این حال ۱۰۰ درصد تعادل زمانی اتفاق خواهد افتاد که ستون با ۲۰ برابر حجم خود شستشو شده باشد.

❖ بازسازی ستون (Regeneration)

ناخالصی های برگشت ناپذیر حاصل از ماتریکس باعث ایجاد شکافنگی در نوک پیک کروماتوگرام می شود و اما در برخی موارد می توان از طریق پروتوکول های ذیل نسبت به بازسازی ستون های آلوده تا حدی اقدام کرد:

بازسازی ستون های فاز معکوس (RP)

ستون های فاز معلوس شامل فاز ساکن C18, C8, C4, C1, C30, CN و Phenyl هستند

- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط آب.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط استونیتریل.
- ✓ شستشو با ۵ برابر حجم ستون توسط ایزوپروپانول.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط هپتان.
- ✓ شستشو با ۵ برابر حجم ستون توسط ایزوپروپانول.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط استونیتریل.



❖ بازسازی ستون‌های فاز نرمال (NP)

ستون‌های NP شامل فاز ساکن سیلیکا، دیول، نیترو و آمینو هستند.

- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط هپتان.
- ✓ شستشو با ۵ برابر حجم ستون توسط ایزوپروپان.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط استونیتریل.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط آب.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط استونیتریل.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط ایزوپروپانول.
- ✓ شستشو با ۲۰ برابر حجم ستون توسط هپتان.

❖ بازسازی ستون‌های تبادل یونی (Ion Exchange)

ستون‌های تبادل یونی مبدل‌های آنیونی و کاتیونی هستند (WCX, SCX, WAX and SAX).

- ✓ شستشو با ۲۰ بار حجم ستون توسط شوینده قبل به همراه بافر با غلظت ۲ برابر.
- ✓ تکرار مراحل شستشوی ستون‌های RP (به سطرهای بالا مراجعه کنید).
- ✓ شستشو با ۲۰ بار حجم ستون توسط آب.
- ✓ ستون را در حالت اولیه به تعادل برسانید.

ستون‌های بر پایه پلیمر

ستون‌های بر پایه پلیمر سازگاری بیشتری در برابر pH از خود نشان می‌دهند اما پایداری مکانیکی کمتری در مقایسه با ستون‌های پایه سیلیکونی دارند. همچنین این ستون‌ها با همه حلال‌های آلی سازگار نیستند و در برخی از حلال‌های آلی متورم و در برخی دیگر منقبض می‌شوند. متأسفانه پایداری فشاری و سازگاری با حلال با توجه به ماهیت پلیمر و کارخانه تولیدکننده متفاوت است. از این رو قانون عمومی برای نگهداری ستون‌های مبتنی بر پلیمر وجود ندارد و تنها باید به دستورالعمل و بروشور پیشنهادی کمپانی سازنده مراجعه کرد.

نویسنده: علی اکبر سلیمانی

شرکت فاطر شیمی نگار فناوری

References:

[1] General column care Bischoff

[2] Waters selection guide

تهران، خیابان آیت الله کاشانی، ابتدای بلوار فردوس شرق، پلاک ۶۸، طبقه ۵، واحد ۱۸، کد پستی: ۱۴۸۱۷۷۳۸۶۳

تلفن: ۴۴۰۲۰۱۱۸ - ۴۴۰۵۷۷۱۸ - ۴۴۰۵۷۷۲۶ تلفکس: ۴۴۰۵۷۷۶۴

www.fatershimi.com

info@fatershimi.com



فاطرشیمی نگار فناور

[3] Agilent column selection

تهران، خیابان آیت الله کاشانی، ابتدای بلوار فردوس شرق، پلاک ۶۸، طبقه ۵، واحد ۱۸، کد پستی: ۱۴۸۱۷۷۳۸۶۳

تلفن: ۴۴۰۲۰۱۱۸ - ۴۴۰۵۷۷۱۸ - ۴۴۰۵۷۷۲۶ تلفکس: ۴۴۰۵۷۷۶۴

www.fatershimi.com

info@fatershimi.com