

## چگونه یک ستون موئین را انتخاب کنیم

یک جداسازی کروماتوگرافی بهینه شده، با انتخاب ستون آغاز می‌گردد. انتخاب درست یک ستون موئین برای هر نوع کاربردی به چهار عامل مهم بستگی دارد که عبارتند از: فاز ساکن<sup>۱</sup>، قطر داخلی ستون<sup>۲</sup>، ضخامت لایه نازک<sup>۳</sup> و طول ستون<sup>۴</sup>. اثرات کاربردی این فاکتورها بر روی کارایی<sup>۵</sup> ستون بطور خلاصه به ترتیب اهمیت آنها مورد بررسی قرار می‌گیرند. توجه داشته باشید که این اطلاعات کلی هستند، به عبارت دیگر این دستور عمل‌ها در شرایط ویژه ممکن است نقض گردند.

### مرحله ۱- فاز ساکن

مهمترین مرحله در انتخاب یک ستون، انتخاب فاز ساکن است. فاز ساکن یک لایه نازکی است که بر روی دیواره داخلی یک ستون موئین پوشانده می‌شود و بر اساس کاربرد مورد نیاز انتخاب می‌شود. اختلاف شیمیایی و فیزیکی ترکیبات الی تزیق شده با یکدیگر و اثر متقابل<sup>۶</sup> آنها با فاز ساکن، اساس جداسازی است. وقتی که اختلاف شدت اثر متقابل آنالیت - فاز<sup>۷</sup> برای دو ترکیب بسیار زیاد باشد، یکی از آنها بیش از دیگری در ستون نگهداری می‌شود. مدت باقی ماندن ترکیبات در ستون (زمان نگهداری<sup>۸</sup>)، نشان دهنده میزان اثر متقابل آنالیت - فاز آنها است.

تغییر دادن خصوصیات شیمیایی فاز ساکن، باعث تغییر در خصوصیات فیزیکی آن نیز می‌گردد. دو ترکیبی که در یک فاز ساکن بخصوص از یک دیگر جدا نمی‌شوند، ممکن است در فاز ساکن دیگری که از نظر شیمیایی با فاز قبلی تفاوت دارد، از یکدیگر جدا شوند. به همین دلیل تنوع ستون‌های موئین از نظر فاز ساکن بسیار زیاد است.

**کاربردهای متداول:** کروماتوگرافی گازی، که در دهه ۱۹۵۰ اختراع گردید، یک متد تجزیه‌ای جا افتاده با تعداد کاربردهای متداول است. بنابراین در مقالات منتشر شده در مجلات مختلف، برای هر کاربرد مشخص بر یک فاز ساکن خاص تاکید می‌گردد. علاوه بر آن شرکت‌های سازنده ستون، بطور معمول "نمودار انتخاب فاز"<sup>۹</sup> را چاپ و در اختیار مشتریان قرار می‌دهند که عمدتاً از طریق وبسایت آنها قابل دسترسی است. همچنین نسخه‌ای از این راهنما از طریق سایت شرکت کهر با شیمی قسمت دانلود جهت بررسی و مطالعه قرار داده شده است.

**کاربردهای جدید:** برای کاربردهای جدید، مرجعی برای راهنمایی وجود ندارد. برای "توسعه متد"<sup>۱۰</sup> مشخص، بایستی اطلاعات شیمیایی ترکیبات مورد آنالیز را داشته باشید. انتخاب فاز بر اساس یک اصل کلی شیمی که "همانند همانند را حل می‌نماید"<sup>۱۱</sup> استوار است. یک ستون غیرقطبی نقطه شروعی برای آنالیز ترکیبات غیرقطبی است. همچنین ستون‌های قطبی برای جداسازی ترکیبات قطبی پیشنهاد می‌شوند. "قطبیت فاز"<sup>۱۲</sup> که در قسمت بعد توضیح داده شده است، چندین پیشنهاد جهت انتخاب فازها برای هر گروه از ترکیبات قطبی ارائه می‌نماید.

### قطبیت فاز

قطبیت فاز مهم‌ترین خصوصیت در انتخاب ستون موئین است زیرا این خصوصیت، انتخابگری یا قابلیت ستون برای جداسازی ترکیبات یک نمونه را نشان می‌دهد.



ستونهای موئین غیرقطبی، ترکیبات هیدروکربن را براحتی از یکدیگر جدا می نمایند. اثر متقابل بین ترکیبات غیرقطبی و فاز ساکن تابع قانون واندروالس<sup>۱۳</sup> می باشد. این نوع اثر متقابل از نوع کشش بین مولکولی است که با اندازه ترکیب افزایش می یابد. از این رو ترکیبات بزرگتر با نقطه جوش بالاتر، دارای زمان نگهداری طولانی تری می باشند. ترتیب شستشو<sup>۱۴</sup> از نقطه جوش ترکیبات تبعیت می نماید.

ترکیباتی که در ساختار مولکولی خود دارای اتم های کربن، هیدروژن به همراه یک یا چند اتم برم، کلر، فلور، ازت، اکسیژن، فسفر یا سولفور هستند، عمدتاً خصوصیات و رفتارهای ترکیبات قطبی و نیمه قطبی را نشان می دهند. الکل ها، آمین ها، کربوکسیلیک اسیدها، دی اولها<sup>۱۵</sup>، استرها، اترها، کتون ها و تیول ها<sup>۱۶</sup> ترکیباتی قطبی هستند که بوسیله ستون های موئین قطبی و نیمه قطبی مورد آنالیز قرار می گیرند. اثر متقابل بین ترکیبات قطبی و فاز نه تنها از نوع واندروالسی است، بلکه سایر اثرات متقابل از قبیل اثر متقابل دو قطبی<sup>۱۷</sup>، n-pn و یا اسید - باز نیز در این برهم کنش ها و تاثیرات دخالت دارند. اختلاف حاصل کل اثرات متقابل ذکر شده در بالا باعث جداسازی می شوند.

ترکیباتی که از اتم های کربن و هیدروژن ساخته شده اند ولی دارای یک یا چند پیوند دوگانه و یا سه گانه اند، ترکیباتی هستند قابلیت قطبی شدن<sup>۱۸</sup> را دارند. الکن ها، الکین ها و هیدروکربن های آروماتیک (شامل حلقه بنزن) از این نوع ترکیبات هستند. ستون های فوق قطبی می توانند این نوع ترکیبات را نیز جداسازی نمایند.

### قطبیت فاز براساس قطبیت ترکیب

فاز پیشنهادی	مثال	قطبیت ترکیب
غیر قطبی		
EL-1, EL-5, EL-5MS, EL-PETROL	الکان ها	فقط اتم های C و H پیوند C-C
قطبی		
ELM-1301, EL-20, EL-1701, EL-35, EL-WAX, EL-PAG	الکل ها، آمین ها، کربوکسیلیک اسیدها، دیول ها، استرها، اترها، کتون ها و تیول ها	اتم های اولیه C و H و همچنین شامل Cl, Br, F, N, O, P, S
قابلیت قطبی شدن		
ELR-CN100	الکن ها، الکین ها و هیدروکربن های آروماتیک	فقط اتم های C و H پیوند C=C یا C≡C

### فازهای متصل / غیر متصل

فاز متصل<sup>۱۹</sup> بصورت بی حرکت<sup>۲۰</sup> و عمدتاً با اتصال شیمیایی<sup>۲۱</sup> در داخل لوله موئین تثبیت شده اند. در صورتی که فازهای غیر متصل<sup>۲۲</sup> بصورت پوشش<sup>۲۳</sup> بروی دیواره قرار می گیرند. بطور کلی ستون هایی با فاز متصل جهت آنالیز و جداسازی ترجیح داده می شوند، زیرا در موقع استفاده سیگنال زمینه<sup>۲۴</sup> کمتری نشان داده و در درجه حرارت بالاتری می توانند مورد استفاده قرار گیرند. همچنین در صورت لزوم، برای خارج کردن مواد غیر فرار می توان آن ها را بوسیله حلال ها شستشو داد. وقتی باتوجه به نوع ترکیبات مورد آنالیز امکان انتخاب ستونی با فاز متصل وجود نداشته باشد، مثلاً برای فازهای بسیار قطبی، بایستی دنبال ستون هایی با فاز تثبیت شده<sup>۲۵</sup> گشت. این فازها مانند فازهای متصل دائمی نیستند (نمی توان بوسیله حلال ها این ستون ها را شستشو داد) اما پایداری حرارتی آن ها بیشتر از فازهای غیر متصل است. برای برخی از کاربردها، ستون هایی با فاز غیر متصل تنها انتخاب موجود برای آنالیز می باشند.

### مرحله ۲ - قطر داخلی (I.D) ستون

قطر داخلی ستون های موئین موجود در بازار قادر است دو فاکتور کارایی<sup>۲۶</sup> (تعداد صفحات تئوری) و ظرفیت نمونه<sup>۲۷</sup> (مقدار هر جزء یک نمونه که به ستون وارد می شود بدون اینکه سبب شود پیک تیز مورد نظر بصورت Overload درآید) را متعادل سازد. بهینه سازی یک فاکتور گاهاً مستلزم قربانی کردن فاکتور دیگر است. قطر داخلی ایده ال به الزامات تجزیه ای و جداسازی مورد انتظار وابسته است.

جدول ۱ اثرات قطر داخلی ستون بر روی کارایی و ظرفیت نمونه را نشان می دهد. همان طوریکه مشاهده می شود، ستون هایی با قطر داخلی 0.25 mm بیشترین کارایی و ظرفیت نمونه کافی برای بیشترین کاربرد را نشان می دهند. به همین دلیل رایج ترین ستون های موئین GC دارای قطر داخلی 0.25 mm هستند. ستون هایی با قطر کوچکتر یا بزرگتر به کاربر این اجازه را می دهد که کارایی و ظرفیت نمونه را برای کاربرد خود بهینه نماید.

جدول ۱. اثرات قطر داخلی ستون

قطر داخلی mm	کارآیی N/m	کارآیی N	ظرفیت نمونه ng
0.53	1300	39000	1000-2000
0.32	2300	69000	400-500
0.25	2925	87750	50-100
0.20	3650	109500	50>
0.18	4050	121500	50>
0.10	7300	219000	10>

**کارآیی بالا:** پیک‌های باریک و کاملاً از هم جدا شده، از مشخصات کروماتوگرافی است. کارآیی ستون موئین، که بوسیله تعداد صفحات (N) یا تعداد صفحات بر متر (N/m) اندازه‌گیری می‌شود، با کاهش قطر داخلی ستون افزایش می‌یابد. حال اگر نمونه مورد تجزیه شامل آنالیت‌هایی است که هم زمان و یا با فاصله زمانی بسیار اندکی از ستون خارج می‌شوند، بایستی از ستون‌های موئین با کمترین قطر داخلی استفاده نمود. باید توجه داشته باشید که برای بکارگیری ستون‌هایی با قطر داخلی کوچک مانند 0.1mm یا 0.18 mm به ابزارهای ویژه‌ای مانند گازکروماتوگراف با رگلاتور فشار، که فشار بالایی را بر ابتدای ستون وارد نماید نیاز است.

**ظرفیت نمونه:** با افزایش قطر داخلی، افزایش می‌یابد. ستون‌های موئین با قطر داخلی بزرگ نسبت به ستون‌هایی با قطر داخلی کوچکتر، می‌توانند جرم بیشتری از هر یک از آنالیت‌ها را در خود جای دهند. افزایش ظرفیت نمونه باعث نامتقارن شدن پیک‌ها و در نتیجه کاهش تفکیک پذیری<sup>۲۸</sup> می‌شوند. بنابراین اگر نمونه مورد تجزیه شامل ترکیباتی با غلظت بالا باشند یا وسعت محدوده غلظت این ترکیبات زیاد باشد، ستون‌هایی با قطر داخلی بالا بایستی مورد بررسی قرار گیرند. انتخاب صحیح قطر داخلی یک ستون باعث می‌شود بدون اینکه ترکیبات اصلی باعث Overload شدن ستون گردند، ترکیبات جزئی سیستم مورد تجزیه حساسیت<sup>۲۹</sup> کافی داشته باشند. کارشناس آزمایشگاه بایستی تصمیم بگیرد که انتخاب ستون موئین با قطر داخلی بزرگتر که باعث کاهش کارآیی ستون می‌گردد، برای کاربردش مسئله ساز میشود یا خیر؟ بایستی توجه داشته باشید که ماهیت ترکیبات نمونه و قطبیت فاز بر روی ظرفیت نمونه اثر گذارند. فازهای غیرقطبی دارای ظرفیت بیشتری برای آنالیت‌های غیرقطبی و فازهای قطبی دارای ظرفیت بیشتری برای آنالیت‌های قطبی هستند.

### مرحله ۳ - ضخامت لایه نازک

ضخامت لایه نازک بیشترین ستون‌ها با قطر داخلی 0.25mm بین 0.25 – 0.50 μm است. ضخامت لایه نازک موثر برحسب نوع کاربرد می‌تواند متفاوت باشد.

**کاهش ضخامت لایه نازک:** پیک‌های تیز (که ممکن است تفکیک پذیری افزایش یابد) و کاهش سیگنال زمینه ستون<sup>۳۰</sup>، که هر دو باعث افزایش نسبت سیگنال به نویز می‌گردند، از مزایای کاهش ضخامت لایه نازک هستند. همچنین بیشترین درجه حرارت قابل کاربرد<sup>۳۱</sup> ستون نیز افزایش می‌یابد. افزایش اثر متقابل بین آنالیت با دیواره لوله (فاز ساکن)، و کاهش ظرفیت نمونه از معایب کاهش ضخامت لایه نازک است. کاهش ضخامت لایه نازک به آنالیت این اجازه را می‌دهد که در زمان بازداری کوتاه‌تر و در درجه حرارت پایین‌تر از ستون خارج گردد که برحسب نوع کاربرد می‌تواند مفید یا غیر مفید باشد. ضخامت لایه نازک باریکتر برای آنالیت‌هایی با نقطه جوش بالا (>300°C) بکار می‌رود (از قبیل حشره کش‌ها<sup>۳۲</sup>، فیل‌های پلی کلرینه<sup>۳۳</sup>، اسیدهای چرب متیل استرها<sup>۳۴</sup> (FAMES)، استرهای فتالات<sup>۳۵</sup> و دیگر ترکیبات نیمه فرار) یا برای آنالیز مقادیر کم<sup>۳۶</sup>.

**افزایش ضخامت لایه نازک:** مزایای آن کاهش اثر متقابل بین آنالیت و ستون و افزایش ظرفیت نمونه است. پهن شدن عرض پیک‌ها (که تفکیک پذیری را ممکن است کاهش دهد)، افزایش سیگنال زمینه ستون و کاهش ماکزیمم درجه حرارت قابل کاربرد ستون از معایب افزایش ضخامت لایه نازک می‌باشند. همچنین افزایش ضخامت لایه نازک، بازداری آنالیت (تفکیک پذیری ممکن است افزایش یابد مخصوصاً برای ترکیباتی که مقدار k کوچکی دارند) و درجه حرارت شستشو را افزایش می‌دهد. اثرات ذکر شده ممکن است مفید یا غیر مفید باشند. ستون‌هایی با لایه نازک ضخیم‌تر برای آنالیت‌هایی با نقطه جوش کم مناسبند (مانند ترکیبات آلی فرار و گازها). زمان سپری کردن این آنالیت‌ها در ستون طولانی‌تر است و این امر نیاز به آون برای ایجاد شرایط پایین‌تر از دمای محیط<sup>۳۷</sup> را حذف می‌نماید. لایه نازک ضخیم‌تر، ظرفیت نمونه را افزایش می‌دهد. از این رو، این نوع ستون برای نمونه‌هایی با غلظت بالاتر نسبت به لایه نازک باریک‌تر سازگارتر است.

### ضریب فاز (β)

اثرات ضخامت لایه نازک فاز ساکن و قطر داخلی ستون به یک دیگر وابسته‌اند. ضریب فاز، بتا، که عبارت است از ضریب حجم گاز و حجم فاز ساکن در ستون، بصورت زیر تعریف می‌شود:

$$\beta = \text{Column radius } (\mu\text{m}) / 2 \times \text{film thickness } (\mu\text{m})$$

بجای عبارت‌های "لایه نازک ضخیم و لایه نازک باریک" بهتر است از مقادیر β استفاده نمود. بطور کلی انتخاب ستون‌ها با استفاده از



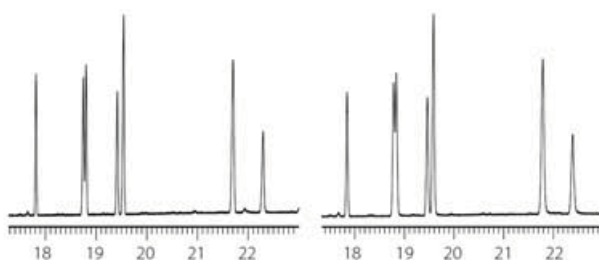
مقادیر  $\beta$  بصورت زیر است:

مقدار $\beta$	کاربردها
<100	ترکیب بسیار فرار و وزن مولکولی کم
100-400	آنالیز عمومی، بسیاری از ترکیبات
>400	ترکیباتی با وزن مولکولی زیاد و آنالیز مواد کمیاب

مقادیر  $\beta$ ، وقتی قطر داخلی ستون و ضخامت لایه نازک برای آنالیز خاصی با هم تغییر می‌نماید، مفید هستند. زیرا ستون‌هایی با ضریب فاز یکسان، زمان بازداری و ترتیب شستشوی بسیار مشابهی را در شرایط یکسان از خود نشان می‌دهند.

### ستون‌هایی با مقادیر مشابه $\beta$

EL-5MS, 30 m x 0.25 mm I.D.,  $0.50 \mu\text{m}$  ( $\beta = 265$ )      EL-5MS, 30 m x 0.53 mm I.D.,  $0.25 \mu\text{m}$  ( $\beta = 250$ )



### مرحله ۴ - طول ستون

عموماً، یک ستون ۳۰ متری بهترین توازن بین تفکیک پذیری، زمان آنالیز و فشار ورودی ستون را برای کاربردهای عمومی بوجود می‌آورد. این اطلاعات در جدول ۲ نشان داده شده است. البته بایستی توجه داشت که کاربردهای خاص ممکن است طول ستون متفاوتی را طلب نمایند. جدول ۲. اثرات طول ستون

طول ستون (m)	فشار ورودی (psi)	زمان بازداری (Min.)	قابلیت تفکیک (R)	کارآیی (N)
15	5.9	8.33	0.8	43875
30	12.0	16.68	1.2	87750
60	24.9	33.37	1.7	175500

**ستون‌های بلندتر:** تفکیک پذیری خوبی دارند ولی فشار برگشتی<sup>۳۸</sup> را افزایش می‌دهند. بایستی خاطر نشان کرد که دو برابر شدن طول ستون، الزاماً منجر به دو برابر شدن تفکیک‌پذیری نمی‌شود (عموماً تفکیک‌پذیری با جذر طول ستون افزایش می‌یابد). برای مثال زمانی که جداسازی دو ترکیب کامل صورت نگرفته و پیک‌های آن‌ها همپوشانی دارند، اگر تفکیک‌پذیری کمتر از ۱ باشد، دو برابر کردن طول ستون شروع و پایان پیک هر کدام از این ترکیبات را به خط پایه<sup>۳۹</sup> نمی‌برد (حداقل مقدار تفکیک‌پذیری بایستی ۱/۵ باشد). برای افزایش تفکیک‌پذیری، افزایش طول ستون بایستی آخرین گزینه باشد. موثرترین روش برای افزایش تفکیک‌پذیری، کاهش قطر داخلی ستون است.

**ستون‌های کوتاه‌تر:** وقتی تفکیک‌پذیری بالا مورد نظر نیست، برای مثال کاربردهای غربالگری<sup>۴۰</sup> یا برای نمونه‌های ساده‌ای که ترکیبات آن‌ها از نظر ماهیت شیمیایی یکسان نیستند، ستون‌های کوتاه‌تر بکارگرفته می‌شوند. با کاهش همزمان طول و قطر داخلی ستون، تفکیک‌پذیری ثابت می‌ماند و در بعضی از مواقع واقعا افزایش می‌یابد.

1. Harold McNair and James Miller, "Basic Gas Chromatography" (1997), Wiley, ISBN 0-471-17261-8.
2. David Grant, "Capillary Gas Chromatography" (1996), Wiley, ISBN 0-471-95377-6.
3. Dean Rood, "A Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems" (1991), Hüthig, ISBN 3-7785-1898-4.
4. Konrad Grob, "Split and Splitless Injection in Capillary GC" (1993), Hüthig, ISBN 3-7785-2151-9.
5. Konrad Grob, "On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography" (1991), Hüthig, ISBN 3-7785-2055-5.
6. William McFadden, "Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis" (1988), Robert E. Krieger Publishing Company, ISBN 0-89464-280-4.
7. Marvin McMaster and Christopher McMaster, "GC/MS: A Practical User's Guide" (1998), Wiley-VCH, ISBN 0-471-24826-6.
8. Janusz Pawliszyn, "Solid Phase Micro extraction: Theory and Practice" (1997), Wiley-VCH, ISBN 0-471-19034-9.