

色谱柱柱压异常的原因及解决办法

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)$$

在我们所熟悉的基本色谱分离方程式中，分离度 R 和柱效 (N)、选择因子 (α) 以及容量因子 k' 相关，和柱压无关。但柱压 (P) 仍不失为 HPLC 方法中的最重要参数之一，因为柱压反映了色谱柱的内部状况。

现今能承受 400 bar 压力的 HPLC 泵很常见，色谱柱如在远低于上限的压力下正常运行，不需要我们重点关注；当柱压升高接近上限或者柱压有异常升高，往往意味着色谱柱出状况了，需及时进行维护和补救，严重时色谱柱就已报废了。本节将详细考察柱压问题并提出可行的解决方案。

柱压方程

$$\Delta P = \frac{\eta FL}{K_0 \pi r^2 d_p^2}$$

The diagram shows the equation $\Delta P = \frac{\eta FL}{K_0 \pi r^2 d_p^2}$ with green arrows pointing to each variable and its corresponding label: η (viscosity), F (flow), L (length), K_0 (specific permeability), r (column radius), and d_p (particle diameter).

对填充色谱柱，柱压与黏度 (η)、柱长 (L) 和流速 (F) 成正比，与填料粒径 (d_p) 以及柱管半径 (r) 的平方成反比。K₀ 是比渗透性系数，对填充床，其值约为 0.001。通过此公式可近似计算出给定色谱条件下的理论柱压。只有当新柱实际测得的柱压和理论柱压相差很大，才能说柱压存在问题。

黏度 (η) 取决于流动相溶剂的选择，为降低柱压，反相色谱中倾向于选择低黏度的乙腈，而不是高黏度的异丙醇。当然选择时还需考虑溶剂强度、极性、分析物的溶解度以及和分析物兼容性等。柱长 (L) 增加可以提高分离度 (R)，流速 (F) 提高能加快分离，但都会导致柱压上升，选择确定这些运行参数时，需综合平衡和折中。

填料粒径对柱压影响极大， d_p 降低一倍，柱压将增加 4 倍。UHPLC 中采用的 sub-2 μm 填料，柱压超过普通 HPLC 泵的 400Bar 上限很多。提高柱温因可降低黏度 η ，相应降低柱压。在梯度洗脱时，黏度随流动相组成的变化而改变，柱压也会处在不断变化中。对水/甲醇流动相体系，在 55:45 时，黏度和柱压有个极大值。

内径的影响同样很大，根据线流速相同柱压相同的原则，4.6mm 内径的色谱柱流速为 1ml/min，约相当于在 2.1mm 内径色谱柱上的 0.2ml/min 流速，在 10mm 半制备色谱柱上的 5ml/min，计算公式为 $v = 1.0\text{ml/min} \times (\text{内径 } r/4.6)^2$ 。所以在换不同内径色谱柱时，请及时调整流速，以免因高柱压损伤色谱系统。

柱压下降是仪器系统的连接有泄漏，柱压不稳定一般认为是流路中有气泡或空穴，和色谱柱相关的柱压问题是柱压上升。

色谱柱结构:

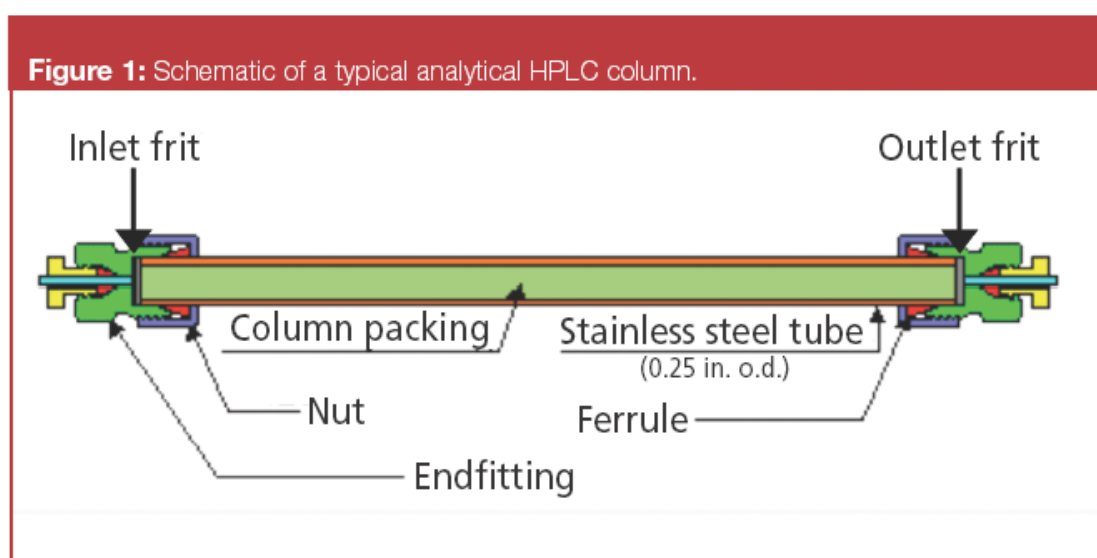


图 1. Compress 型不锈钢色谱柱的基本构造

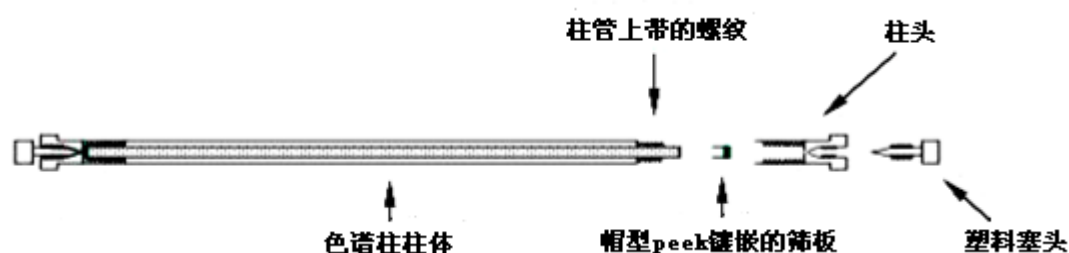


图 2. Modular Column 基本构造

和柱压相关最大的是进口端筛板（inlet frit）以及其后面 1-50px 长度的柱头填料。筛板上有比填料粒径小的小孔，筛板上的小孔或柱头填料的间隙被部分堵塞，是柱压上升的主要原因。有以下几类情况：

1. 填料破碎和使用后有填料粉末生成

填料破碎一般在装柱过程中发生，装柱压力过大或所选硅胶机械强度过低所致，设定柱压出厂标准可解决；流动相中高 pH 值缓冲盐使硅胶溶解并重新形成填料粉末，堵塞出口端筛板，这种情况下反冲不起作用，只有更换后筛板，不过打开承压的后筛板，对柱床会有不良影响。

2. 颗粒物堵塞引起柱压上升和对策

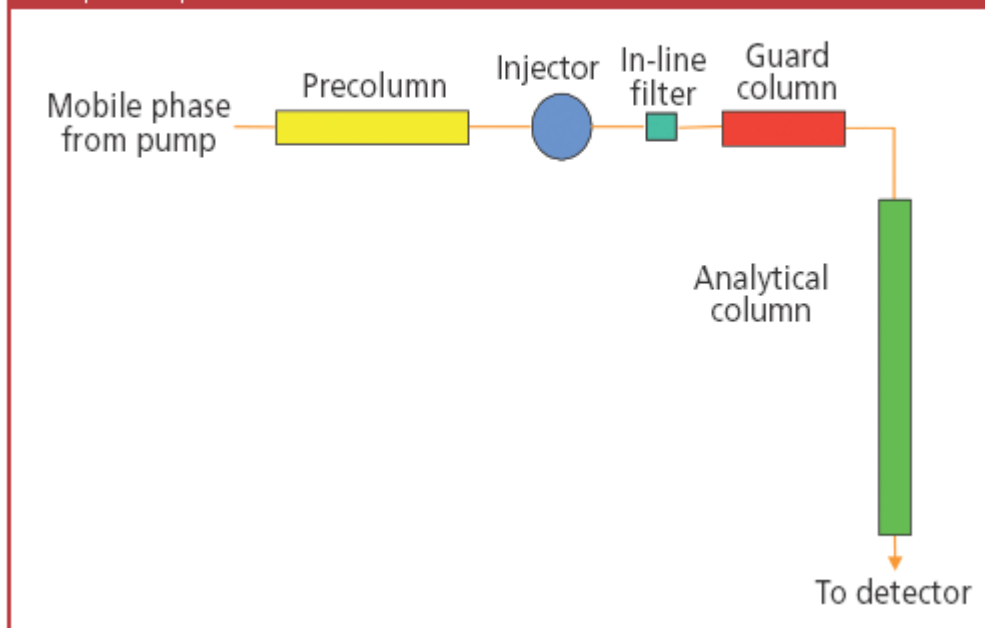
可能堵塞进口端筛板（前筛板）和柱头填料间隙的颗粒物来源有：样品（制样时灰尘和滤纸等带入）、进样阀密封圈磨损、流动相（溶剂本身含有和配制过程进入）、液相仪器中泵阀密封圈的磨损、缓冲盐析出（一般在梯度运行和进样时盐的溶剂环境改变导致）。水和缓冲盐流动相内生长的细菌，也是颗粒物来源的一种，可堵塞筛板和填料间隙。应避免将这类流动相在室温下久放，可放入冰箱存放。

1) 预防措施

样品（甚至标准品）和流动相过滤，既预防了筛板、柱头和毛细管堵塞，又能减少进样阀、活塞杆和截止阀等仪器关键部件的磨损。普通用 0.45um 孔径滤膜过滤样品和流动相，对使用 2um 以下填料的超高压柱的，可用 0.20um 滤膜。滤膜材质有再生纤维素、聚四氟乙烯、尼龙、硝酸纤维和醋酸纤维等，须根据和样品溶剂及分析物的适应性慎重选择。

使用保护柱或在线过滤器，具体安装位置见下图：

Figure 2: Schematic of an LC system showing in-line devices used to prevent back-pressure problems.



在线过滤器内装有可更换的滤片，滤片孔径一般有 2 μ m 和 0.5 μ m 两种。安装位置有两个可选择，在进样器和色谱柱之间时，对样品和流动相中的颗粒物都有效；在泵和进样器之间，则只对流动相有过滤作用。

保护柱是缩小版的色谱柱，内含带填料的可更换的柱芯，安装在进样阀和色谱柱之间，用于防止色谱柱的化学污染为主，也有过滤颗粒物的作用。

2) 故障排除

反冲色谱柱：不连接检测器，直接将堵在前筛板上的颗粒物冲出排到废液瓶中。开始时反冲压力可低于正常使用压力，待颗粒物有冲出后，逐步提高冲洗压力。有时颗粒物已非常牢固嵌入到筛板内部，反冲不一定奏效，早反冲、勤反冲相对效果更好。有的厂商为避免堵塞，使用了较大孔径（2-5 μ m）的前筛板，这种情况反冲会将填料冲出。

换筛板：一般不建议这样做，因为换筛板会带走粘在筛板上的部分填料，使柱床的均一性受影响，导致柱效下降。不过如果反冲不能解决问题，也只能不得已而为之，要不然就要把色谱柱报废了。

如果系统中不接色谱柱，柱压仍然高，说明泵出口到色谱柱之间的其它部位，包括进样器、在线过滤器和保护柱等有堵塞，可逐一排查。为了减少死体积，毛细管都做得尽可能的细，也可能被堵。

3. 化学污染物引起柱压上升和对策

来源同样是样品、流动相和系统，不过来源于样品的污染最普遍，特别是对复杂基体样品未经前处理或前处理不够的时候。化学污染物主要有：分子量很大的化合物、盐类、脂质、蜡类、油脂、腐殖酸、蛋白质等其它生物来源的物质。

像盐类这样的保留能力极小的污染物会在死体积处很快从柱中洗脱出去，检测器一般对此类物质响应不大，有时表现为干扰峰、基线波动、斑点甚至负峰。

保留能力中等的污染物，会被慢慢洗出色谱柱，表现为宽峰、基线馒头形波动和基线缓慢漂移。

对强保留的污染物，一般流动相强度不足以将其从柱中洗出，会逐步在柱头累积。有时，累积在柱头的污染物可作为新固定相对分析物起作用，引起保留时间改变、峰拖尾和峰分叉等。污染物在柱头累积到一定程度，如果不采取措施，会堵塞填料间隙，引起柱压上升。最好的办法是选用合适的溶剂冲洗溶解这些物质，同时又不对填料本身有损害。如聚合物柱中累积的蛋白类污染物可用 pH13-14 的强碱溶液洗掉，但这种方法不适合硅胶基质色谱柱。

1) 预防措施：

a . 制样时采用 SPE 固相萃取等方法，预先将色谱柱杀手类的污染物质清除掉；

b . 连接保护柱。保护柱是分析柱的延伸，在填料类型和粒径上应于分析柱一致，才能最大限度起保护作用，又不影响色谱性能。一个设计和装填良好的保护柱，还可增加分析柱的分离效率。如果因某种原因需在保护柱中用不同的填料，也应选择比其所保护的的分析柱保留能力弱的固定相，这时的保护柱完全用于截住强保留物质，类似于 SPE 小柱的功效。当保护柱柱芯保护功能用尽时，也不能说不可再清洗后复用，但价格低不值得去花这个时间。

C . 经常对分析柱进行冲洗维护：

流动相中不含缓冲盐	分析完成后，用甲醇（或乙腈）：水 = 90：10 反向冲洗色谱柱 45min
流动相中含有缓冲盐	分析完成后，先用甲醇（或乙腈）：水 = 10：90 反向冲洗 45min，然后再用甲醇（或乙腈）：水 = 90：10 反向冲洗色谱柱 45min；（注意：甲醇（或乙腈）：水 = 10：90 容易长菌，使用时间不可超过 3 天）；

2) 故障排除：

已经累积很多污染物，用甲醇或乙腈简单冲洗不奏效，推荐使用下面方法清洗反相柱

100%甲醇---100%乙腈---75%乙腈/25%异丙醇---100%异丙醇---100%二氯甲烷---
100%正己烷

用每种溶剂冲洗至少 10 个柱体积，对于 250mm×4.6mm 的分析柱，合适的冲洗流速是 1 ~ 2ml/min。最后用 10 柱体积的异丙醇过渡，然后回到原来的流动相体系。

对受蛋白类污染的硅胶基质反相柱，纯有机溶剂如乙腈或甲醇不能溶解多肽和蛋白质。由有机溶剂、缓冲液和酸,有时还加上离子对试剂等组成的配方清洗效果极佳，譬如用三氟乙酸水溶液和三氟乙酸/丙醇溶液对柱子重复进行梯度洗来再生；Bhadwaj 和 Day 试验了在 250mm×46mm 的柱子中注入 100μL 的三氟乙醇，再生效果良好。

清洗硅胶、CN 和 Diol 等正相柱建议方法：先用 20 柱体积 50：50 正己烷/氯仿冲洗，然后用甲醇、二氯甲烷或者 100%醋酸乙酯冲洗。对油脂类物质，可用异丙醇清洗。