

# 3. 칼럼 압력이 높을 때 응급 처치요령

## 소개

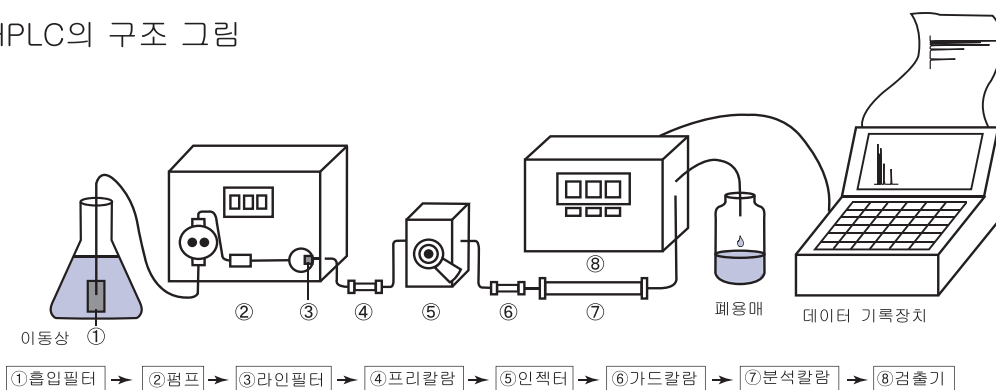
반복적인 분석은 칼럼에 압력이 증가할 수 있습니다. HPLC칼럼을 고압력으로 지속적인 분석은 기기의 과부하로 고장이 날 수 있습니다. 그러므로 칼럼에 걸리는 압력을 정기적으로 점검하는 것이 제때에 문제를 해결할 수 있다는 것을 인지하고 실천하는 것이 중요합니다.

칼럼의 압력의 증가는 기기내의 유로중 어딘가 막히거나 칼럼에 작은 입자나 기타 이물질이 막혀서 압력이 증가합니다. 그래서 압력이 증가하면 맨 먼저 어디가 막혔는지 다음 부분을 참고로 확인합니다.

## 막힌 부위의 확인

배압(back pressure)의 증가는 칼럼에 의한 원인 또는 장비내 유로가 막혀서 발생할 수 있습니다. 먼저 막힌 부위가 어디인지 확인을 하십시오.

### HPLC의 구조 그림



먼저 분석 칼럼을 제거하고 직접 검출기에 관을 연결합니다. 칼럼 없이 용매를 흘릴 때 압력을 봅니다. 일반적으로 HPLC 자체 관의 길이나 종류에 관계없이 압력이 거의 걸리지 않습니다. 만약 용매를 흘릴 때 압력이 상승한다면 HPLC 기기별로 하나씩 관을 제거할 때 압력을 점검하고 어느 부위에서 막혔는지 확인한다. 기기를 연결한 관이 막혔을 때 아래 II절에 나와 있는 유발 원인과 해결 방안에 대하여 참고합니다.

## 장비 내 유로에 막힘

위의 방법에 따라 장비의 유로에 막히는 곳을 확인합니다.

### (사례 1) 유로 관이 막힘으로 고압 발생

- 원인 : 염이 유로 관에 석출되어 있음.
- 해답 : 막힌 유로 관에 물로 흘리기 전에 먼저 칼럼 및 다른 장비와 연결을 떼어 냅니다, 막힌 부분에서 반대 방향으로 물을 흘립니다. 만약 상황이 개선이 안되면 새로운 관으로 교체합니다.

### (사례 2) 펌프가 막힘으로 고압 발생

- 원인 : 펌프의 라인 필터가 막힘.
- 해답 : 라인 필터를 떼어 낸 다음 용매에 담긴 후 초음파세척기로 세척합니다. 만약 상황이 개선이 안되면 새로운 라인 필터로 교체합니다.

### (사례 3) 수동식 인젝터가 막혀 고압 발생

- 원인 : 수동식 인젝터가 막힘.
- 해답 : 오염된 물질을 녹이기 위하여 20ml(예., 메탄올)을 실린지로 주입합니다. "LOAD" 과 INJECT" 위치의 양쪽 관을 세척합니다. 인젝터 전체를 초음파 세척기 안에 넣고 세척하면 효과적입니다. 만약 위와 같은 방법으로도 개선이 안되면 인젝터 유로 관에 교체 입자가 막혔으므로 유로 관의 반대로 용매를 흘려줍니다. 만약 위와 같은 방법으로도 개선이 안되면 새로운 인젝터로 교환합니다.

**칼람이 막혀서 압력이 증가하면 어떻게 조치합니까?**

(사례 1) 버퍼 용액 사용 후 고농도의 유기 용매를 사용함으로써 칼람 안에서 염의 석출.

- 원인 : 칼람 안에 염의 석출.
- 해답 : 염의 석출을 녹이기 위해서 물에 10% 유기용매 (메탄올 또는 아세토나이트릴) 을 이용하여 보통 유량 사용 조건의 반의 유량으로 30 분간 칼람에 흘립니다 . 만약 상황이 개선이 안되면 같은 조건으로 100% 물로 다시 흘립니다 .
- 예방책 : 버퍼 용매를 사용 후 고농도 유기용매를 전환하기 위해서 먼저 무 염 (salt free) 이동상 (버퍼 조건과 같은 유기용매 농도 )로 칼람을 세척하고 다시 고농도 유기용매 조건으로 흘립니다 .  
예 : 10/90 (v/v) 아세토나이트릴 /20mmol/l 인산버퍼 (pH2.5) 에서 90/10 (v/v) 아세토나이트릴 / 물로 이동상 조건을 전환하기 위해서 먼저 칼람에 10/90(v/v) 아세토나이트릴 / 물로 15 분 동안 흘리고 다시 90/10 (v/v) 아세토나이트릴 / 물로 전환하여 흘립니다 .

(사례 2) 시료가 완전히 녹지 않거나 필터가 잘 안됨

- 원인 : 시료 중 녹지 않는 물질이나 다른 불순물에 의해 칼람 프리트 (frit) 이 막혔음 .
- 해답 : 칼람을 검출기로부터 분리하고 칼람을 다시 반대방향으로 연결한 다음 분석했던 같은 이동상으로 보통 유량의 반으로 30 분 동안 세척합니다 . 만약 상황이 개선 안되면 칼람 입구의 프리트를 새것으로 교환합니다 ( 나카라이에서 프리트 판매제공 가능) .
- 예방책 : 시료나 이동상은 반드시 필터를 해야 합니다 . 더 많은 정보는 193 페이지의 기술 정보 4 의 HPLC 사용을 위한 시료전처리 1) 필터 을 참조하십시오 .
- 주의 : 만약 칼람을 반대 방향으로 지속적으로 사용했다면 칼람 성능이 저하됨 .

(사례 3) 칼람에 단백질이 쉽게 흡착되거나 시료가 이동상에 완전히 녹지 않음

- 원인 : 시료가 칼람의 충전물에 흡착하거나 칼람 안에서 석출됨 .
- 해답 : 용매를 이용하여 보통 유량에서 반으로 30 분 동안 칼람을 세척하면 흡착된 물질을 녹여 용출 시킬 수 있습니다 . 다음은 각 칼람의 타입에 따라 세척 순서를 열거하였습니다 .

[역상 칼람]

- a) 흡착하는 물질이 단백질이 아닐 경우 메탄올이나 THF 로 세척합니다 .
- b) 흡착하는 물질이 단백질일 경우 50-70% 의 아세토나이트릴 / 물 (0.1% trifluoroacetic acid 가 포함되어 있는 ) 로 세척합니다 . 그러나 단백질은 고농도의 유기용매에 침전될 수 있습니다 .

[COSMOSIL SL-II] 메탄올 , THF 또는 에탄올로 세척하십시오 .

[Fullerene 칼람 ] o-dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene 로 세척하십시오 .

[COSMOSIL Sugar-D/NH<sub>2</sub>/HILIC 칼람 ] NH<sub>2</sub>-MS 는 50/50 (v/v) 아세토나이트릴 / 물로 세척 , Sugar-D 와 HILIC 칼람은 100% 물로 세척 .

- 예방책 : (a) 각 시료에 대하여 적당한 시료 전처리를 선택합니다 . 더 많은 정보는 193 페이지 , 시술정보 4 를 참조하십시오 . (b) 가드 칼람을 사용하십시오 . 199 페이지 기술정보 6 을 참고하십시오 .
- 주의
  - 칼람을 세척할 때 칼람의 출구를 검출기에 연결하지 마십시오 . 칼람의 출구 유로를 폐기용기에 위치하십시오 .
  - 장기적 칼람 세척은 칼람의 성능을 저하시킵니다 .
  - 실리카 베이스 충전물 칼람은 강한 알칼리 용매 (pH7.5 이상 ) 또는 강산 용매 (pH2.5 이하 ) 을 절대 사용하지 마십시오 .
  - 칼람 세척 후 제조사에서 요구하는 보관 용매로 충전 후 보관하십시오 .
  - 세척 후 칼람 성능이 개선이 안되면 새 칼람으로 교환하십시오 .

(사례 4) 장기적으로 점진적 압력 증가

- 원인 1 : 장기적 사용으로 인한 칼람 오염.
- 예방책 : (사례3)과 같이 칼람을 세척.
- 원인 2 : 장기적 사용으로 인한 칼람 손상.
- 예방책 : 새 칼람으로 교체.

세척 후에도 칼람 성능 개선 안됨

칼람 세척 후에도 성능이 개선이 안되면 고 압력으로 인한 장비의 부담을 덜어주기 위하여 새 칼람으로 교체하십시오. 칼람의 최대 압력이 20MPa 이하이고 피크 모양이 좋다면 칼람으로 지속적으로 사용할 수 있습니다.