

HPLC/UHPLC カラムの エンドフィッティング接続の留意点

長江 徳和¹, 塚本 友康¹, 小山 隆次¹, シーラ 悦子²

1 はじめに

HPLC/UHPLC 装置は吐出ポンプ, オートサンプラー, インジェクター, カラム, 検出器間を 1/16 インチのステンレス鋼配管などで接続されており, 配管の容量や, 接続部で発生するカラム外容積はカラムの性能に大きく影響する事が知られている. 本稿ではカラムのエンドフィッティング接続での間違いやトラブル回避方法, さらにエンドフィッティング規格にかかわらず接続可能な配管の評価などを紹介する.

2 オシネジとフェラルを用いた接続

LC (液体クロマトグラフィー) が HPLC に発展した当初は High Pressure Liquid Chromatography と言われており, 文字通り高圧化で操作する LC であった. したがって高圧に耐えるカラム管・配管としてステンレス鋼 (SUS316) 素材を用い, 図 1 に示されている様に, カラム管エンドと 1/16" 配管を接続する際に金属製の円錐型のフェラルとオシネジを用いていた. オシネジを回すことにより, このフェラルに力がかかり, かしめられることにより変形してカラム管の入口側と出口

側のカラム管エンドに密着して, 移動相の漏れを防いでいる. 図 1A はイラストで表しており, 図 1B は金属フェラルと金属オシネジを用いているが, 金属フェラルをかしめておらず, 金属フェラルが変形していない状態である. 更に分かり易くするために図 1C は着色した樹脂のフェラルとオシネジを用いて接続状態を示した.

HPLC 創世期の 1970 年代にはオシネジの代わりに袋ナットが用いられたり, オシネジのネジがインチ規格とミリ規格が混在していたり, フェラルの向きを逆にして接続するタイプなど, さまざまな形式のエンドフィッティングが利用されていたが, 1980 年代以降, 袋ナットは使用されなくなり, オシネジのネジはインチ規格の No.10-32UNF に統一されるようになった. しかしながら現在でも, HPLC/UHPLC 装置メーカーはそれぞれ, フェラルから先の配管 (1/16" チューブ) の長さを独自に決めており, フェラルから先の配管の長さが 1.6 mm から 3.5 mm までの数種類のエンドフィッティング規格が存在している. 一部の大手充填カラムメーカーは数種類のエンドフィッティング規格に対応したカラムを供給しているが, 多くの充填カラムメーカーは市場ニーズの高いウォーターズ (Waters) タイプやパーカー (Parker) タイプなど一種類のみか又は二種類のフィッティング規格のカラムを供給していることが多い.

3 エンドフィッティング規格の差によるトラブル

上述の様に金属製フェラルを用いた接続ではフェラルはかしめられ, 先端が配管に食い込むことによりフェラルは配管に固定される. フェラル先の配管長さの異なるフィッティング規格同士で接続した場合には図 2 に示されている様な不具合が起こる. 図 2A はフェラル先の配管の長さが短く, 配管とカラム管の間に大きな空間が発生する. ここで試料成分の拡散が起こり, ピークがブロードになったり, 尾を引くようなテーリング状態になったりする. 図 2B はフェラル先の配管が長すぎる場合であり, フェラルがカラム管エンドに密着せず, 液漏れを起こす. 図 2C はフェラル先の配管の長さが適正であり, カラム外容積の増加もなく, ピーク形状への影響はない. エンドフィッティング規格の異なるカラムを接

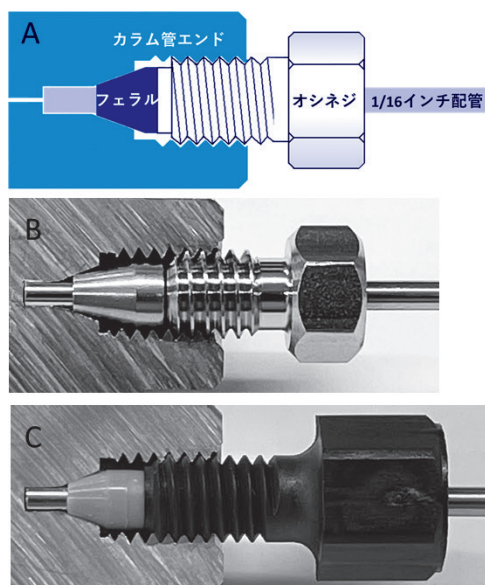
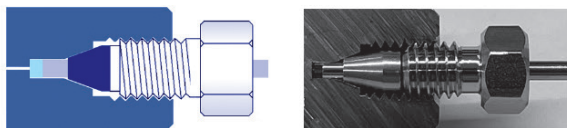
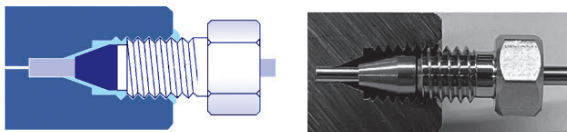


図1 オシネジとフェラルを用いた接続

A フェラル先の配管の長さが短い⇒カラム外容積が増えピークのプロード化



B フェラル先の配管の長さが長い⇒隙間が発生し、液漏れの発生



C フェラル先の配管の長さが合う⇒カラム外容積が増えず、最適な接続

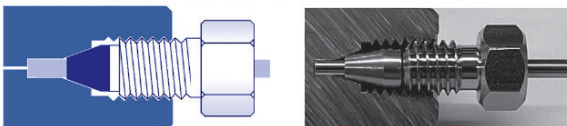


図2 カラム管フィッティング

A はフェラル先の配管が短い場合、B はフェラル先の配管が短い場合、C はフェラル先の配管の長さが適正な場合。

続するときにはそれぞれのカラムに合わせて、フェラルの固定位置を決めなければならない。金属製フェラルを用いた場合には、エンドフィッティング規格が変わるごとに配管を変えなければならない。又同じエンドフィッティング規格のカラムを用いても、何度もカラムの接続を繰り返していくと、金属フェラルは毎回少しずつではあるが変形し、最終的にこれ以上変形できなくなる。この様な時には新しい配管に更新すべきであるが、それでも漏れを防ぐためにオシネジを締め過ぎるとオシネジが切れてしまい、元に戻すことはできなくなってしまう。このような事象はベテランクロマトグラファーの多くの方が経験していると推察される。

1980年代に利用できるようになった機能性樹脂である PEEK（ピーク、Poly Ether Ether Ketone）は耐熱性、機械的強度、更に耐薬品性が高い熱可塑性樹脂であり、HPLC の部材としても用いられるようになった。カラムと配管の接続に使用されるフェラルもこの PEEK 樹脂が採用されるようになった。フェラル単独のものや、フェラルとオシネジを一体化したコネクタも PEEK 素材での成形品が開発された。この PEEK 樹脂フェラルの特徴は金属製フェラルとは異なり、ステンレスチューブに固定されないため、接続するごとにフェラル先の配管の長さを変えられることである。そのため PEEK 樹脂製のフェラルやコネクタを用いることにより、毎回それぞれのエンドフィッティング規格に合った接続が可能になった。PEEK 樹脂フェラルの欠点は、配管接続部の耐圧が 20 MPa 程度であるため、高耐圧が要求される HPLC システムでは使用できないことであったが、金属と PEEK 樹脂との複合体フェラルなどの開発により耐圧は改善された。2004 年以降 UHPLC の普及により 100 MPa 以上の耐圧が求められるようになり、再び金属製フェラルが UHPLC では主流となった。

4 異なるエンドフィッティングでの互換性

現在使用されている HPLC/UHPLC カラムのエンドフィッティングは前項でも述べた様に、ネジ規格は No.10-32UNF ですべて同じである。又フェラルとフェラルの受け側（カラム管エンド側）のテーパ角度は 40° で、ほとんどのカラムで統一されている。しかし A 社の高圧対応のカラムのカラムエンドのテーパ角度は 36° であった。市販のカラムのカラム管を中心でカットし、加工寸法を測定した結果を図 3 に示す。A 社カラム管のフィッティング部とパーカータイプのカラム管のフィッティング部を図 3a に示す。両カラム管ともネジ部分とフェラルを受けるテーパに掘られた部分が別々である 2 ピース構造になっている。A 社のテーパに掘られた部分の深さは 4.2 mm であるが、パーカータイプ

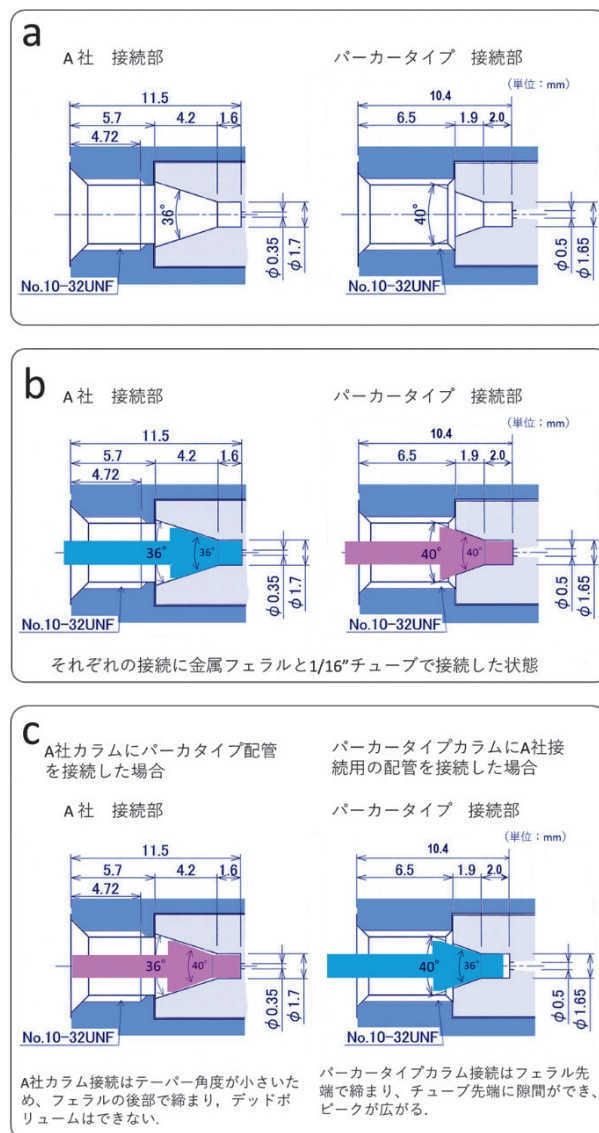


図3 A 社仕様とパーカータイプのカラム管エンドフィッティングの互換性

a はカラム管エンドフィッティングの構造、b はそれぞれのエンドフィッティングに合わせてフェラルを固定した場合の配管の図、c は配管を異なるカラム管エンドに装着した場合の図。

ブの場合は 1.9 mm であり、大きく異なっている。又テーパー部から先の配管の挿入部分の長さは、A 社では 1.6 mm であるが、パーカータイプでは 2.0 mm であった。それぞれのカラム管エンドに金属フェラルとステンレススチール配管で固定した状態を図 3b に示す。それぞれのフェラルの角度も 36° と 40° である。図 3c は A 社のカラム管エンドにパーカータイプの配管を、パーカータイプのカラム管エンドに A 社用の配管を接続したときの状態を示す。A 社のカラム管エンドにパーカータイプの配管を接続した場合にはフェラルから先の配管の長さが長いから、フェラルの先はカラムエンドに密着せず隙間が生じるが、A 社のカラム管エンドのテーパーが深いことと、テーパー角度が小さいことから、フェラル後部でカラム管エンドに密着し、移動相は漏れなくなる。又、配管先端とカラムエンドには隙間がなく、ピークがブロードになったりテーリングを生ずることもない。逆にパーカータイプのカラム管エンドに A 社の配管を接続した場合には、フェラル先端がカラム管エンドのテーパー部に密着し液漏れは起こらないが、フェラル先の配管の長さが短いため、カラム管エンド内で大きな隙間が生じる。この隙間がピークを太くしたり、テーリングを生じさせる原因になる。この様に A 社の高圧用カラムは A 社の UHPLC 装置は勿論であるが、パーカータイプのエンドフィッティング規格の UHPLC 装置にも問題なく接続できる。しかしパーカータイプのエンドフィッティング規格のカラムは A 社の UHPLC 装置の接続には問題があり、適正に接続できない。つまり、A 社のエンドフィッティング規格は特殊で、テーパー角度が 36° であり、フェラルの受け側のテーパー部分が深いことなど、他のエンドフィッティング規格と大きく異なり、これらの特殊要因によって A 社のカラムはパーカータイプのエンドフィッティング規格に適合してしまう。もし A 社のカラムはパーカータイプだと勘違いし、パーカータイプのカラムは A 社の UHPLC 装置に問題なく接続できると思い込み、A 社の UHPLC 装置で A 社カラムに加え、他社のパーカータイプのカラムの性能比較を行うと、他社パーカータイプのカラムはすべてピークがブロードになったり、テーリングが生じたりし、比較結果は A 社カラムが有利になり、それぞれのカラムの本来有している性能での比較ができない。

5 フェラルを用いない配管接続

もしフェラルを用いない HPLC/UHPLC カラムの接続方法があれば、現在存在するフェラル先の配管長さの異なる様々なエンドフィッティング規格を気にすることなくカラムを接続することができるようになる。2016 年から発売されている IDEX 社の MarvelX（マーベルエックス）配管は図 4 に示されている様にフェラルを用いない接続である。図 4A は MarvelX 配管であり、配管の

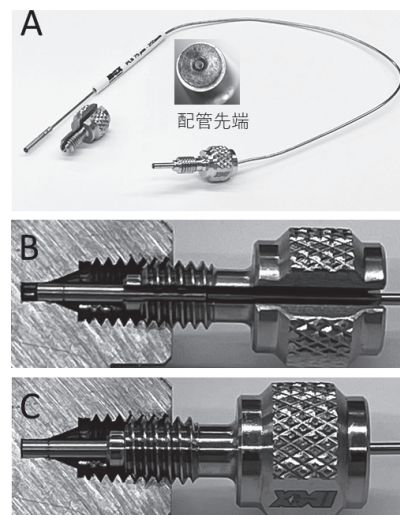


図4 MarvelX 配管とカラム管エンドフィッティングへの装着
A は MarvelX 配管と配管先端、B はカラム管エンドフィッティングに配管を装着する途中、C は装着終了。

両端は直径 1/16” のステンレススチールチューブで配管自体は直径 1/32” のステンレススチールチューブである。オシネジは切れ目が入っており、脱着できるようになっている。配管先端は PEEK 樹脂が 0.1 mm 程度出ており、この PEEK 樹脂はカラム管エンドのフィッティング部に突き当たり密着する。図 4B、4C は配管先端をカラム管エンドに装着する状態を示しており、B はまだ締め付け途中で、配管先端は浮いた状態であるが C では配管先端が密着している。スパナを用いず手締めだけで装着でき、しかも 130 MPa の耐圧が確認されている。配管内径は 25 μ m, 50 μ m, 75 μ m, 100 μ m, 125 μ m, 254 μ m の 6 種類が、配管長さは 70 mm, 15 mm, 250 mm, 350 mm, 50 mm, 600 mm が供給されている。又配管内部を PEEK 樹脂にした PEEK-Lined Stainless Steel のバイオコパチブル仕様とステンレススチールのみ通常仕様の 2 種類の配管素材が用意されている。樹脂素材は力を加えることにより、徐々に変形し、配管接続部の耐圧が低くなるが、MarvelX はステンレススチールで配管外側が覆われているため、配管を押す力に対し、接面部の PEEK 樹脂は外側に広がることのないため、繰り返し使用出来る回数が増える。更に誰が行っても同じ様に締め付けができる配管として MarvelXACT（マーベルエグザクト）も市販された。図 5 にその外観を示す。オシネジは配管に固定されているが、ある一定のトルクでオシネジが空回りする機構が設けられ、締め過ぎを防止している。



図5 MarvelXACT 配管

HPLC/UHPLC で用いられる配管は先端断面がきれいにカットされ、孔のつぶれや変形がないことが重要である。MarvelX 及び MarvelXACT 配管も同様で、クロマニックテクノロジーでは、図 4A に示されている様に、すべての MarvelX 及び MarvelXACT の配管先端の写真を撮り、詰まり、ごみの付着がないことを確認して出荷している。

6 MarvelX 配管の使用例

UHPLC では高圧条件下で操作されるため、高耐圧の配管が必要となる。一般的なステンレススチール配管では内径を最も小さくしたとしても 0.1 mm までであるが、MarvelX 及び MarvelXACT 配管は 0.025 mm まで内径を小さくすることができる。図 6 にインジェクター以降の配管の内径を細くすることによるピーク形状の変化¹⁾を示す。粒子径 2 µm コアシェル C18 (SunShell C18) を充填した内径 2.1 mm、長さ 50 mm のカラムを用いた。上段は内径 0.1 mm のステンレススチール (SUS) 及び内面フューズドシリカ (PEEKsil) の配管を、下段は内径 0.075 mm の MarvelX (内面 PEEK) 配管を用いた。配管の全長は両配管とも同じ 500 mm である。配管の内径が 0.1 mm から 0.075 mm に細くなることにより、最初に溶出するウラシル (ピーク 1) の理論段数は 1208 段から 3593 段に向上した。ピークの半値幅は 0.0094 分から 0.0051 分へと 0.0043 分狭くなった。又、アセナフテン (ピーク 3) も同様に理論段数は 13589 段から 15153 段へと 12 % 向上した。4 本のピークとも理論段数は向上し、テーリングファクターは減少した。特に早く溶出するピーク容量の小さいピー

ク程、顕著であった。カラム外の配管の容積が減少することにより、この配管内での成分の拡散が抑えられ、ピーク幅が狭くなると同時にテーリングも抑制されたと考えられる。内径 2.1 mm のカラムは通常は内径 0.1 mm の配管が使用されるが、カラム長さ 50 mm で 15000 段近い理論段数を発揮するカラムでは内径 0.1 mm の配管でも大き過ぎ、内径 0.075 mm 配管を使用することでそのカラムのもつ本来の性能に近づく。ここで用いた内径 0.075 mm の MarvelX 配管は、内径 0.025 mm まで利用できるが、配管のみに掛かる背圧は内径の 4 乗に反比例するため、内径を 0.075 mm から 0.025 mm に 1/3 のサイズに変更すると配管に掛かる背圧は 81 倍になる。配管の容積を減らす目的で内径を細くし過ぎると、配管に掛かる背圧が大きくなり過ぎることがあるので注意が必要である。図 6 の下段の内径 0.075 mm の条件では、合計 500 mm の長さの配管のみで 7.8 MPa の背圧が掛かっており、仮に内径 0.025 mm の配管にすると、81 倍の 631 MPa の背圧が配管のみに掛かることになる。

7 まとめ

本稿で紹介した様に、カラム管エンドフィッティング仕様に合った配管接続をすることはカラム性能を発揮させるために重要である。又、各社のエンドフィッティング規格は目に見えない部分での違いがあり、その違いを十分理解して使用することも重要である。MarvelX のようなフェラルを用いない配管はカラム管エンドフィッティング規格に依存せず、更に MarvelXACT は誰でも同じトルクで締め付けができる便利な配管である。内径

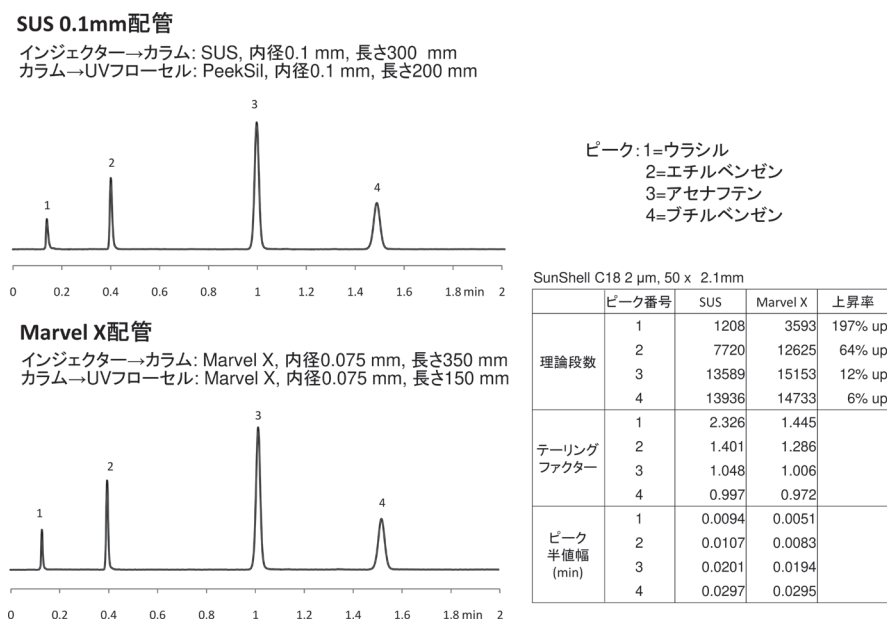


図 6 配管の内径と段数の関係

カラム, SunShell C18, 2 µm 50×2.1 mm i.d.; 移動相, アセトニトリル/水=60/40; 流速, 0.6 mL/min; カラム温度, 室温; 検出, UV250 nm; 注入容量, 0.4 µL; ピーク, 1=ウラシル, 2=エチルベンゼン, 3=アセナフテン 4=ブチルベンゼン, 配管内径は図中に表示。

2.1 mm カラムは特にカラム外容積が性能に大きく影響するため、高圧下で使用できる内径が 0.075 mm の MarvelX や MarvelXACT を用いることにより本来のカラム性能が発揮された。

文 献

- 1) 長江徳和：LC と LC/MS の知恵，2，6 (2021)。



長江徳和 (Norikazu NAGAE)
株式会社クロマニックテクノロジーズ
(〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。名古屋大学工学部応用化学卒。博士 (工学)。《主な著書》“LC/MS, LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決” (分担執筆) (オーム社)。
E-mail : nagae@chromanik.co.jp



E-mail : tsukamoto@chromanik.co.jp
小山隆次 (Ryuji KOYAMA)
株式会社クロマニックテクノロジーズ
(〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。立命館大学理工学部生物工学科卒。
《趣味》クロマトグラフィー。
E-mail : koyama@chromanik.co.jp



シーラ悦子 (Etsuko SHEARER)
株式会社バイオニックス (〒417-0801 富士市大淵 3397-19)。南オレゴン大学卒。
《趣味》乗馬。
E-mail : info@bionikinc.com



塚本友康 (Tomoyasu TSUKAMOTO)
株式会社クロマニックテクノロジーズ
(〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻博士課程修了。博士 (応用生物学)。《現在の研究テーマ》液体クロマトグラフィー用充填剤の開発。

会社ホームページ URL :

<http://chromanik.co.jp/>

<http://www.bionikinc.com>

関連製品ページ URL :

http://chromanik.co.jp/product/accessory_marvel_x.html

<http://bionikinc.com/index3506921697.html>