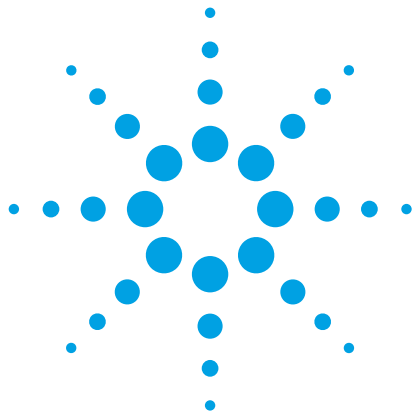




Agilent A-Line UHPLC 피팅

기술 개요

서론

HPLC와 UHPLC를 이용하는 크로마토그래피 전문가들은 피크 테일링, 피크 넓어짐, 피크 갈라짐, 교차 오염 같은 문제에 종종 직면합니다. 이 같은 문제의 보편적 원인으로서 자주 간과되면서도 해결에 큰 비용을 유발하는 것이 튜브 연결 불량입니다. Dead volume 또는 튜브 연결부의 미세 누출은 특히 최근의 UHPLC 및 Fast LC 컬럼을 이용한 크로마토그래피 분석의 성능과 재현성에 큰 영향을 미칩니다[1-2].

피팅 연결 요구사항

피팅 연결부가 분석물질의 피크 모양에 매우 큰 영향을 미칠 수 있습니다. 이상적인 피팅 연결은 다음과 같은 특징을 가져야 합니다.

- 튜브와 유입 포트 사이에 dead volume 없음
- 초고압 및 고온에서 leak 없는 상태 유지 가능
- 높은 견고성으로 장기간 사용에도 튜브 미끄러짐 방지
- 사용 편의성



STOP THE PRESSES - Agilent Quick Connect 피팅, 권위 있는 R&D 100s Awards 2015 후보에 오르다 R&D 매거진 편집위원들은 50 여년이 넘도록 꾸준히 “지난 한해 동안 시장에 출시된 제품 중에서 기술적으로 가장 우수한 제품” 100가지를 선정해 발표하고 있습니다. 이번에도 애질런트는 최첨단 제품의 행렬을 이어가고 있습니다.

2014년 TASIA
수상 제품

A-Line Quick Connect 피팅이 2014년 분석 과학자 기술 혁신상(TASIA)을 수상하였습니다. 이는 유일하게 손가락만으로 단단히 조일 수 있고 1,300bar의 압력에 견디는 UHPLC 피팅으로, 반복적인 사용에도 성능 저하가 없습니다.



Agilent Technologies

기존 제품

조정 불가능한 금속 피팅

UHPLC에서 가장 일반적으로 사용되는 조정 불가능한 2피스 또는 3피스 금속 피팅은 조립되고난 후 영구적이며 조정할 수 없습니다[3]. 서로 다른 컬럼 하드웨어 제조사가 컬럼 말단 피팅에 다른 디자인을 사용하기 때문에(그림 1), 모든 브랜드의 컬럼마다 새로운 세트의 튜브와 피팅이 필요합니다. 이렇게 하면 스템 길이(페룰(ferrule)의 맨 아래와 튜브의 말단 사이 길이)가 완벽히 일치하게 됩니다(그림 2C).

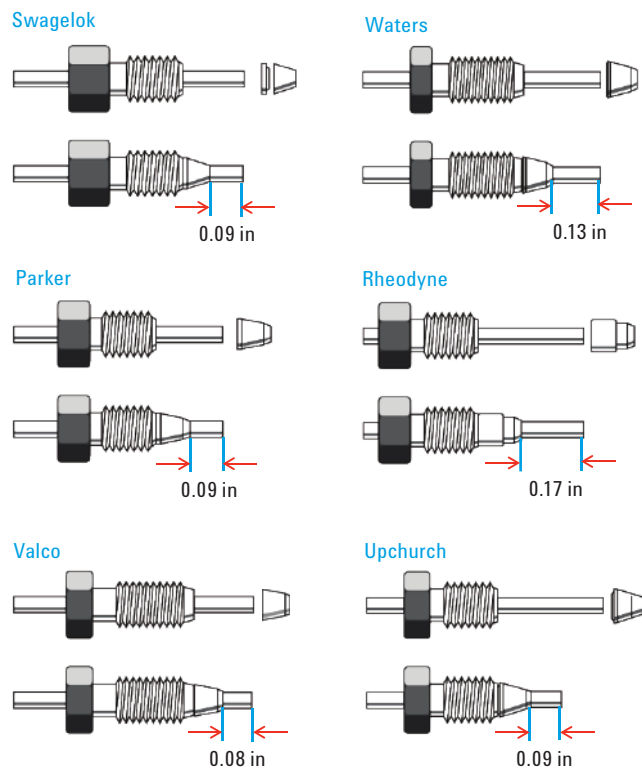
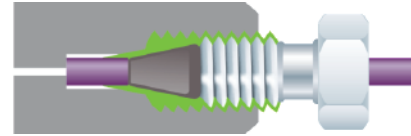


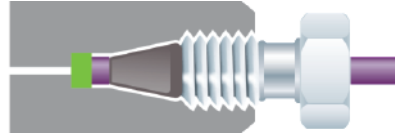
그림 1. 서로 다른 제조업체의 일반적인 HPLC 커넥터

스스템 길이가 너무 짧으면, dead volume이 생겨 피크 모양이 나빠지고, 분리능이 낮아지며 교차 오염이 발생할 수 있습니다(그림 2B 및 3). 스템 길이가 너무 길면, 페룰(ferrule)이 제대로 장착되지 않아 leak가 발생할 수 있습니다(그림 2A). 게다가, 기존 피팅과 페룰(ferrule)은 렌치를 사용할 경우 종종 과도하게 조여져 피팅이 컬럼에 영구적으로 고착됩니다.

A: 스템 길이 너무 김 → leak 발생



B: 스템 길이 너무 짧음 → dead volume 발생



C: 적절히 장착된 튜브, dead volume 없음

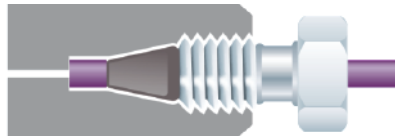


그림 2. 올바른 피팅 연결과 잘못된 피팅 연결의 비교

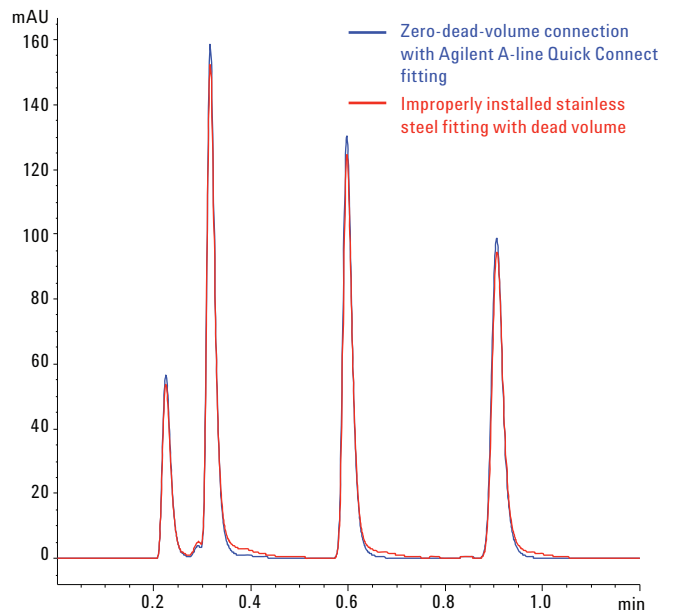


그림 3. Agilent A-Line Quick Connect 피팅은 피크 모양을 개선하여 dead volume이 없습니다.

조정 가능한 손가락으로 조이는 피팅

기존 피팅의 문제를 해결하기 위해, 다양한 컬럼에 호환되는 손가락으로 조이는 피팅이 개발되었습니다. 이러한 피팅은 대개 폴리머(예: PEEK) 페룰(ferrule)로서 페룰(ferrule)이 튜브에 영구적으로 연결되지 않기 때문에 피팅을 재사용할 수 있습니다. 그러나, 이러한 피팅 중 대부분은 여전히 다음과 같은 약간의 단점이 있습니다.

- 도구 없으면 1,300bar의 초고압에 도달할 수 없음
- 과도한 조임을 방지하기 위해 정확한 토크 또는 회전 각도 범위에 대한 엄격한 지침을 따라야 함
- 재연결 후에는 매번 leak를 점검해야 함
- 피팅을 종종 다시 조여야 함
- 폴리머 페룰(ferrule)이 튜브를 충분히 단단히 잡지 못할 경우, 초고압이나 압력 순환에서 유입 포트가 미끄러질 수 있어서 dead volume이 생김

Agilent A-Line 피팅

Agilent A-Line UHPLC 피팅은 이러한 단점이 없고, 재현성이 좋고 leak 없는 컬럼 연결이 가능합니다. 두 가지 유형의 A-Line 피팅이 있습니다. A-Line Quick Connect 피팅(그림 4A)을 이용해 1,300bar의 밀봉성을 가진 컬럼 연결이 가능합니다. 렌치를 사용할 필요가 없습니다. A-Line Quick Turn 피팅(그림 4B)은 컬럼 주입구/배출구, 밸브 및 기타 연결부를 비롯해 다양한 흐름 경로 연결에 사용됩니다. 이 피팅은 손가락으로 조여서 최대 600bar까지(사용자 및 연결 위치에 따라 다름) 그리고 렌치를 사용하여 1,300bar까지 밀봉할 수 있습니다.

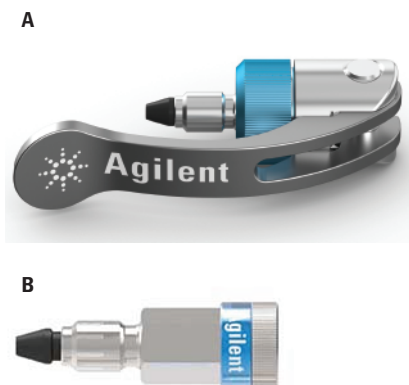


그림 4. Agilent A-Line 피팅. A) Quick Connect 피팅, B) Quick Turn 피팅.

두 유형의 피팅은 새로운 스프링 장착 설계(그림 5)로 튜브를 유입 포트에 향해 계속 밀기 때문에 dead volume 없이 재현성 있는 연결이 가능해 안정적인 크로마토그래피 성능을 실현할 수 있습니다. 스프링을 통해 스템 길이를 조절할 수 있어 두 피팅이 모든 유형의 LC 컬럼과 호환됩니다. 게다가, A-Line Quick Connect 피팅은 레버-작동 설계를 채택하여, 레버를 비롯한 스프링 어셈블리가 페룰(ferrule)을 튜브에 누르는 일정한 압력을 가하여 튜브 미끄러짐을 방지합니다. 도구 없이도 힘을 조금만 가하면 피팅을 1,300bar(18,850psi)까지 사용할 수 있도록 조일 수 있습니다. 단지 손으로 너트를 돌려 조이면서 처음 저항을 느끼면 레버를 내립니다(그림 6).

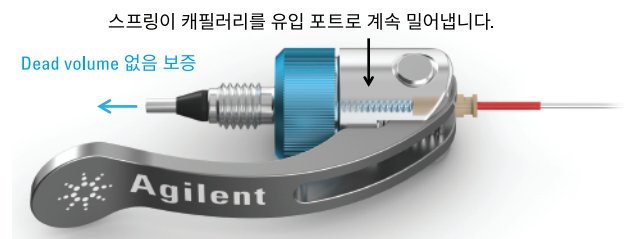


그림 5. Agilent A-Line 피팅의 고유한 스프링 장착 디자인

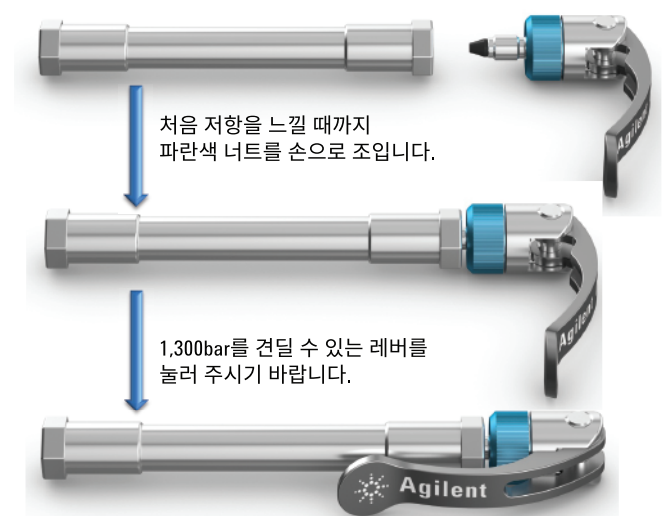


그림 6. Agilent A-Line Quick Connect 피팅의 설치

실험

Agilent A-Line 피팅의 성능을 Agilent 1290 Infinity Binary LC를 이용해 평가했습니다. 견고성 테스트를 위해 테스트된 피팅(Agilent A-Line Quick Connect 피팅 또는 애질런트 제품이 아닌 UHPLC 손가락으로 조이는 피팅)을 컬럼 주입구에 연결하였습니다. 호환성 테스트를 위해 서로 다른 컬럼 브랜드의 A-line 피팅을 컬럼 주입구에 연결하였으며, 컬럼 배출구와 검출기에 A-line Quick Turn 피팅(p/n 5067-5966)이 사용되었습니다. 물/아세트오닐릴 40/60(v/v)에 용해된 Uracil(10µg/mL), Phenol(200µg/mL), 4-chloronitrobenzene(25µg/mL), Naphthalene(40µg/mL)의 혼합물이 분석물질로 사용되었습니다.

견고성과 유용성 평가를 위한 조건

컬럼: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8µm(p/n 959758-902)
 이동상: A) 물
 B) 아세트오닐릴; A:B 40:60 등용매
 유속: 1.4mL/분(시스템 압력 1,100bar)
 주입량: 1µL
 컬럼 온도: 40°C
 DAD 파장: 254nm/4nm, ref 400nm/100nm

서로 다른 컬럼 브랜드와의 호환성 평가를 위한 조건

컬럼: 서로 다른 공급업체의 C18 고정상, 2.1 × 50mm, sub-2µm 컬럼
 이동상: A) 물
 B) 아세트오닐릴; A:B 45:55 등용매
 유속: 1.2mL/분(컬럼에 따라, 시스템 압력은 600 ~ 1,000bar임)
 주입량: 1µL
 컬럼 온도: 25°C
 DAD 파장: 254nm/4nm, ref 400nm/100nm

결과 및 토의

200회 이상 재연결할 수 있는 견고성

Agilent A-Line Quick Connect 피팅의 재할용성과 견고성을 평가하기 위해 피팅을 200회 분리 후 재연결했습니다. 200회 재연결 전후의 크로마토그램이 그림 7에서 나타납니다. 200회 재연결 후 크로마토그램에 눈에 보이는 변화가 없음을 확인할 수 있습니다. 머무름 시간이 긴 피크의 Tailing factor(Naphthalene)와 작은 머무름 인자(phenol 및 uracil)를 가진 피크의 이론 단수가 모니터링되었습니다. 이들은 추가적인 컬럼 부피 또는 미세 누출을 통해 피크 넓어짐 효과를 측정할 수 있는 가장 민감한 방법입니다. 그림 8은 실험 변수 내에서 Tailing factor와 이론 단수가 일정하게 유지됨을 보여줍니다. 이는 200회 재연결 후에도 피팅 연결에 dead volume과 leak가 없다는 증거입니다.

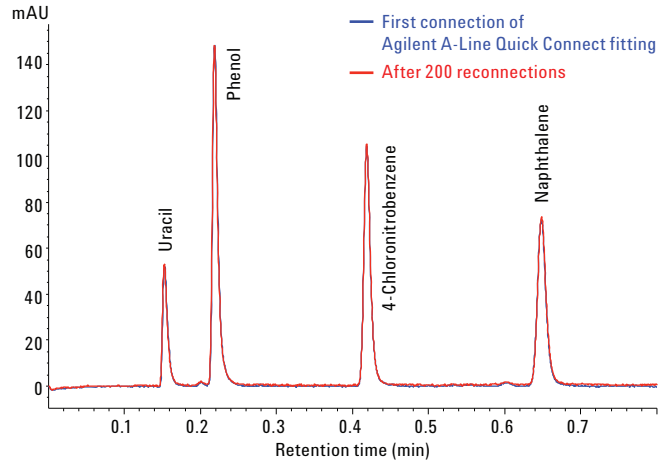


그림 7. 200회 재연결 전후 Agilent A-Line Quick Connect 피팅의 비교

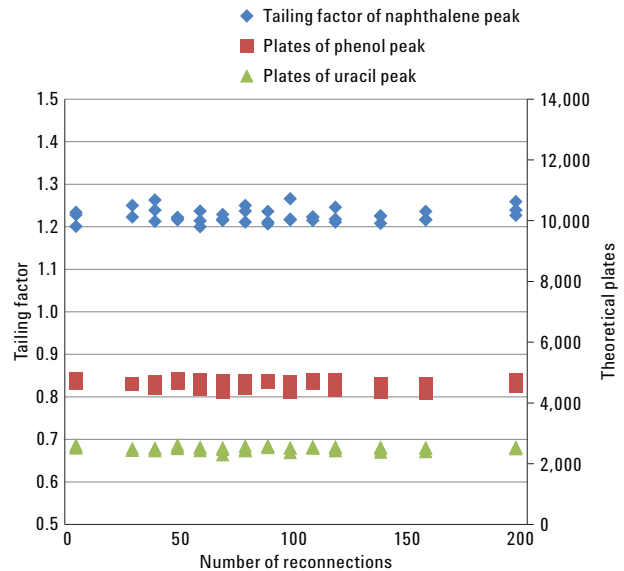


그림 8. Agilent A-Line Quick Connect 피팅의 200회 이상 재연결에 대한 Tailing factor 및 이론 단수의 모니터링

다른 공급업체의 피팅에 비해 우수한 견고성

다른 공급업체의 폴리머 페룰(ferrule)과 재사용 가능한 손가락으로 조이는 UHPLC 피팅을 이용해 동일한 실험을 다시 진행했습니다. 그림 2B에서 보여주는 바와 같이 불과 30회 재연결 후, 폴리머 페룰(ferrule)이 캐필러리에 고착되어 조정할 수 없게 되므로 dead volume이 생겼습니다. 또한 이는 30회 재연결 후 피크 테일링이 생기고 피크 높이가 낮아지는 등 피크 모양의 저하를 현저하게 보여주는 그림 9에서 크로마토그램에서 비교 확인되었습니다.

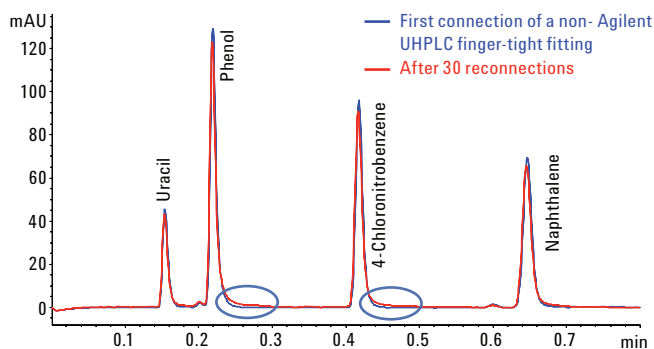


그림 9. 다른 제조업체의 UHPLC 손가락으로 조이는 피팅이 30회 재연결 전후 크로마토그램의 비교

서로 다른 컬럼 브랜드와의 호환성

피팅 연결 디자인은 컬럼 제조업체 사이에 상이하고 피팅의 부적절한 스템 길이로 leak가 발생하고 불량한 피크 모양을 유발할 수 있습니다. 서로 다른 컬럼 브랜드와 Agilent A-Line 피팅의 호환성을 평가하기 위해, Agilent A-Line 피팅을 이용해 Waters, Phenomenex 및 Supelco 등 세 컬럼 제조업체가 만든 컬럼을 연결했습니다(입구에 Quick Connect 피팅과 출구 및 검출기에 Quick Turn 피팅 사용). 모든 컬럼에 동일한 세트의 A-line 피팅과 튜브를 사용했습니다. 일반적인 스테인리스강 피팅이 사용된 경우, 컬럼 연결의 기하학적 형태를 맞추기 위해 각 컬럼 브랜드 제품에 새로운 세트의 피팅과 튜브가 필요합니다. 그림 10에서 Agilent A-Line 피팅을 이용한 크로마토그램을 적절히 형을 떠서 만든 스테인리스강 피팅과 비교했습니다. 여기서 차이가 없음을 확인할 수 있으며, A-Line 피팅이 테스트된 컬럼 브랜드 모두에 완벽하게 적합하다는 사실을 나타냅니다.

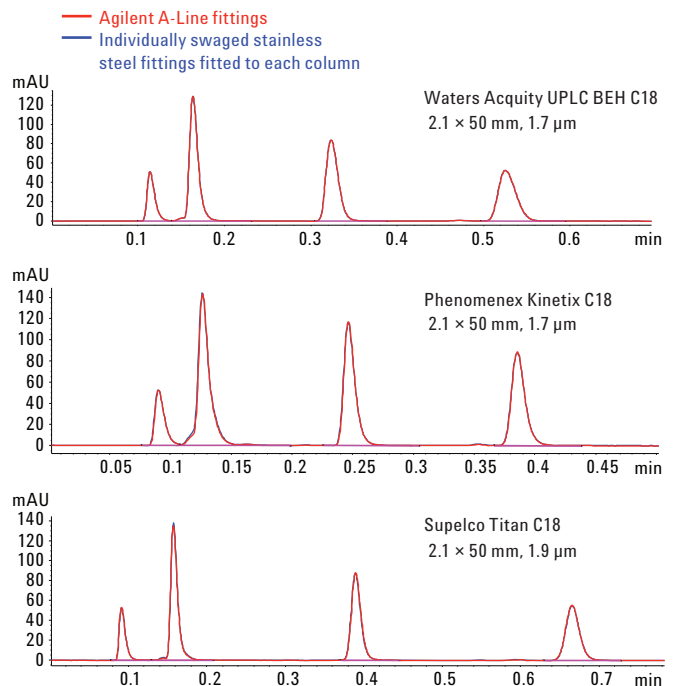


그림 10. 다른 공급업체의 컬럼과 Agilent A-Line 피팅의 호환성

결론

Agilent A-Line 피팅은 다음과 같은 유용성, 견고성 및 UHPLC 성능을 제공합니다.

- 피팅을 200회 재연결하더라도 일정하게 유지된 Tailing factor, 이론 단수 및 피크 높이의 면에서 우수한 크로마토그래피 성능
- 고유한 스프링 장착 설계로 dead-volume 없는 연결을 보증
- 일반적인 브랜드의 컬럼과 호환 가능
- 사용 편의성

참고 문헌

1. Rogatsky, E.; Shaynah, B.; Cai, M.; Daniel, T. S. Optimizing UHPLC Fittings and Connections: A Case Study. *J. Chromatogr. Sep. Techniq.* **2013**, *4*, 193. doi: 10.4172/2157-7064.1000193.
2. Fountain, K. J.; Neue, U. D.; Grumbach, E. S.; Diehl, D. M. Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2- μ m porous particles. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5979-5988.
3. Majors, R. E. Fittings and Tubing for Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. *LCGC North America* **2014**, *32*, 840-853.

자세한 내용은 제품 비디오를 참고하십시오

<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/LC-LC-MS-Columns/Pages/greatconnections.aspx>

Agilent A-Line Quick Connect 피팅의 주문 정보

A-Line Quick Connect 피팅	Part no.
Assemblies	
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-5961
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6163
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6164
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6165
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-5957
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-5958
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-5959
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-5960
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6166
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6167
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6168
Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5067-6169
Stainless steel 0.25 × 105 mm with a female connection	5067-6210

참고: 각 어셈블리에는 Quick Connect 피팅, 캐필러리 및 Swagelok 피팅 또는 지정된 경우 female 연결부가 장착됩니다.

교체 부품	
Quick Connect LC Fitting	5067-5965
Front ferrule	5043-0924
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1174
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1175
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1176
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1177
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1178
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1173
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1172
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1171
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1170
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1179
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1180
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1181
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1182
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1183
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1230
Capillary Stainless Steel 0.075 × 105 mm	5500-1231
Stainless steel 0.25 × 105 mm with a female connection	5500-1258
Stainless steel 0.25 × 150 mm	5500-1259
Stainless steel 0.25 × 150 mm	5500-1260

참고: A-Line Quick Connect 피팅은 상기 표에 명시된 A-Line Capillary에서만 사용할 수 있습니다. A-Line Capillary에는 스프링과 홀더가 장착되어 있습니다.

Agilent A-Line Quick Turn 피팅의 주문 정보

A-Line Quick Turn parts	Part no.
Fittings and ferrules	
Quick Turn UHPLC fitting	5067-5966
Front ferrule	5043-0924
Capillaries	
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1198
Stainless Steel 0.075 × 150 mm long socket	5500-1232
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1188
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1189
Stainless Steel 0.075 × 150 mm long socket	5500-1233
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1190
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1191
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1192
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1193
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1194
Stainless Steel 0.075 × 150 mm long socket	5500-1234
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1195
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1196
Stainless Steel 0.075 × 150 mm long socket	5500-1235
Stainless Steel 0.075 × 150 mm long socket	5500-1236
Stainless steel, 0.075 × 105 mm long socket	5500-1197
Stainless Steel 0.075 × 150 mm long socket	5500-1237
Stainless steel 0.25 × 105 mm long socket with a female connection	5500-1261
Stainless steel 0.25 × 150 mm long socket	5500-1262
Stainless steel 0.25 × 150 mm long socket	5500-1263

참고: A-Line Quick Turn 피팅은 상기 표에 명시된 캐필러리에서만
사용해야 합니다.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여
발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015, 2016

2016년 7월 20일 한국에서 인쇄
5991-5525KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies