



# 多様な細孔径と多孔質層がもたらす コアシェルカラムの分離挙動: 低分子から高分子まで

# クロマニックテクノロジーズ 塚本友康 佐藤誠 小島瞬 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp http://chromanik.co.jp











				ChromaNik Technologies Inc.
	市販さ	れているコア	シェル粒子	
粒子径	<b>1.3 - 2</b> μm	<b>2.4</b> - <b>2.7</b> µm	<b>3.4 - 3.6</b> μm	<b>4 - 5</b> μm
細孔径	9 - 10 nm	8 - 16 nm, 30 nm, 100 nm	20 - 40 nm	8 - 12 nm
多孔質層	$0.22$ - $0.4 \ \mu m$	0.3 - 0.5 µm	0.2 - 0.5 µm	<b>0.?- 0.6</b> μm
比表面積	100 - 120 m²/g	$90 - 150 \text{ m}^2/\text{g},$ $25 - 40 \text{ m}^2/\text{g}$	<b>15</b> m²/g	90 m²/g
多孔質%	58 – 78%	58 - 77%	27%	60%





# コアシェルカラム

	Manufacturer	Brand	Particle size (µm)	Porous layer thickness (µm)	Pore diameter (nm)	Surface area (m²/g)	Bonded phase
1	Advanced Chromatography Technologies	UltraCore	2.5, 5		9.5	130	C18, Phenyl-hexyl
2	Advanced Mterials Technologies	HALO	2.0, 2.7, 3.4,4.6	0.2, 0.4, 0.5, 0.6	9, 16, <mark>40, 100</mark>	120, 135, 15, 90	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, Cyano, RP-Amide, HILIC, Pentahydroxy-HILIC, C4, Glycan
3	AkzuNobel	Kromasil ClassicShell/ EternityShell	2.5	0.5		110	C18, C8
4	Agilent Technologies	PoroShell	1.9, 2.7, 4, 5	0.25, 0.5	12, <mark>30</mark>	130	C18, C8, Phenyl-Hexyl, PFP, SB-Aq, Cysno, HILIC
5	Chrom4	Isosceles	2.6, 4.6	0.5, 0.6	9.5, 16	140, 90	C18, AQ, C8, C3, Phenyl-hexyl, PFP, Amide(HILIC)
6	ChromaNik Technologies	SunShell	2.0, 2.6, 3.4, 4.6	0.2, 0.4, 0.5, 0.6	9, 12, 16, <mark>30,</mark> 100	150, 90, 40,15, 22	, C18, RP-AQUA, C8, PFP, Pnenyl-Hexyl, 2-Etheylpyridine, HILIC- Amide, C30, Hexafunctional C18, C4
7	Dr Maisch	PeproShell	2.6				C18
8	Fortis Technologies	SpeedCore	2.6, 3.5, 5	0.4	8, 16, <mark>30</mark>	140	C18, C18-Amide, C18-PFP, Diphenyl, PFP, HILIC C8, C4
9	GL Sciences	InertCore	2.4	0.3	9	100	C18
10	Knauer	BlueShell	2.6, 4.5	0.5	8	130	C18, C8
11	Merck (supelco)	Ascentis Express/ BioShell	2.0, 2.7, 3.4, 5	0.2, 0.4, 0.5, 0.6	9, 16, <mark>40,</mark>	120, 135, 80, 15, 90	C18, C8, C4, RP-Amide Phenyl-Hexyl, Biphenyl, Cyano, PFP, Pentahydroxy-HILIC
12	Macherey-Nagel	NucleoShell	2.7	0.5	9	130	C18,Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
13	Nacalai Tesque	CosmoCore	2.6	0.5	9	150	C18, Cholestrol, Pentabromobenzyl
14	Perkin Elmer	Brownlee SPP	2.7	0.5	9, 16		C18, C8, Phnyl-Hexyl, PFP, RP-Amide, HILIC
15	Phenomenex	Kinetex/ Aeris	1.3, 1.7, 2.6, 3.6, 5	0.2, 0.23, 0.35, 0.67	10, <mark>20</mark>	200	C18, C8, Phenyl-hexyl, PFP, Biphenyl, HILIC, C4
16	Restek	Raptor	2.7		9	150	C18, Biphenyl, PFP, HILIC
17	Sepax Technologies	Opalshell	2.6	0.5	9	150	C18
18	Osaka Soda	Capcell Core	2.7	0.5	9, 16, <mark>30</mark>	150	C18, AQ, Adamantyl , Phosphocholine, PFP
19	SCAS	Sumipax ODS Z-Shel Sumichiral OA-Shell P1	2.6	0.5	9, <mark>30</mark>	150, 40	C18, Poly(diphenylacetylene) derivative
20	SIELC Technologies	Coresep	2.7		9		Mixed mode: RP + cation exchange, aRP + anion exchnge, HILIC + ion exchange
21	Thermo Scientific	Accucore	2.6, 4		8, 15	130	C18, C8, AQ, henyl-Hexyl, Phenyl, C30, PFP
22	Waters	Cortecs	1.6, 2.7	0.26	9	100	C18, C8, Phenyl-Hexyl, HILIC
23	Welch	Boltimate	2.7	0.5	9	120	C18, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
24	YMC	Meteoric Core	2.7	0.5	8, 16	150, 90	C18, C8





### コアシェルシリカの電子顕微鏡写真



粒子径: 2.6 µm 細孔径: 16 nm



粒子径: 3.4 µm 細孔径: 30 nm



コアシェルシリカ粒子を樹脂包埋し、Arイオンミリングにより断面加工し、導通処理のためOs(オスミウム)蒸着して観察しました。コア(フューズドシリカ)とその周りの多孔質層が確認できます。









コアシェル粒子の多孔質層の厚さは粒子の比表面積 の大きさに影響 クラムでは、保持時間、負荷量に大きく影響





### 標準試料の分離比較





ÇH₃



# アミトリプチリンの負荷量比較

Mobile phase: Acetonitrile/20mM phosphate buffer pH7.0=(60:40)







### 界面活性剤の分離 Triton X-100















### 多孔質相の厚さが異なるコアシェルシリカ

#### **SunShell particle**



Particle size: 2.6 µm Thickness of porous layer: 0.5 µm Specific surface area: 40 m<sup>2</sup>/g Particle size: 3.4  $\mu$ m Thickness of porous layer: 0.2  $\mu$ m Specific surface area: 15 m<sup>2</sup>/g



Column: SunShell C8-30, 2.6 µm (30 nm, 0.5 µm layer) 100 x 2.1 mm, Sunshell C8-30HT, 3.4 µm (30 nm, 0.2 µm layer) 100 x 2.1 mm

Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 15 or 35 min

%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 60 or 80 °C, Detection: UV@215 nm, Sample:1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin









# 選択性の異なるC18の比較

	P/N	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	C18 Surface coverage	End- capping
SunShell HFC18-16 4.6 x 150 mm	CG6471	16 nm	90 m²/g	2.5%	1.2 µmol/m²	Yes
SunShell C18-WP 4.6 x 150 mm	CW6471	16 nm	90 m²/g	5%	2.5 µmol/m²	Yes

HFC18-WP は1対のシリル基によりC18を結合しますので、結合密度が低くなります。C18-WPに比べ約1/2です。

ペプチドやタンパク質はC18の結合密度により、分離が変化します。







# HFC18カラムのLC/MS移動相条件に おける耐酸性



Durable test condition Column : SunShell HFC18-16 2.6 $\mu$ m, 50 x 2.1 mm Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/0.1% formic acid, pH2.6=40/60 Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 70 °C

Measurement condition Mobile phase:  $CH_3CN/H_2O=60/40$ Flow rate: 0.4 mL/min Temperature: 40 °C Sample: 1 = Uracil 2 = Butylbenzene



Column: SunShell HFC18-16, 2.6 μm (16 nm) 150 x 4.6 mm, SunShell C18-WP, 2.6 μm (16 nm) 150 x 4.6 mm Mobile phase: A) 0.1% TFA in Acetonitrile/water(10:90)

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile Gradient program: Time 0 min 5 min 40 min %B 5% 5% 50% Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25 °C, Detection: UV@210 nm, Sample: Tryptic digest of CytochromC



Column: SunShell HFC18-16, 2.6 µm (16 nm) 150 x 4.6 mm, SunShell C18-WP, 2.6 µm (16 nm) 150 x 4.6 mm Mobile phase: A) 0.1% TFA in Acetonitrile/water(10:90)

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile Gradient program: Time 0 min 5 min 40 min %B 5% 5% 50% Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25 °C, Detection: UV@210 nm, Sample: Tryptic digest of Myoglobin





## 粒子の細孔径

細孔径	<b>0</b> nm (ノンポーラス)	8 - 12 nm	16 - 20 nm	<b>20 - 100</b> nm
比表面積	極小	大 🔶		<b></b> /」\
保持	極小	大きい		小さい
試料	タンパク	低分子化合物	ペプチドなど	高分子 (タンパクなど)

分子量の大きいタンパクなどの高分離向けのカラムはC4やC8が主流

#### 試料の分子量に対し細孔径が小さすぎるものを選ぶと テーリングや保持が短くなることがある

ノンポーラスの充填剤は、試料負荷量が小さすぎるため実用的ではない











#### コアシェル粒子の細孔分布







#### 標準タンパク質の分離(5min)



#### Column:

SunShell C4-100, 2.6 μm (100 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C4-30, 2.6 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C8-100, 2.6 μm (100 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C8-30HT, 3.4 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm, Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

- Gradient program: Time 0 min 5 min %B 20% 65% Flow rate: 0.5 mL/min , Temperature: 80 °C
- Detection: UV@215 nm, Injection volume: 0.5  $\mu$ L Sample:1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA,
- 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin
- UHPLC instrument: HITACIHI Chromaster

タンパク質分離には多孔質層 が薄い方が有利だと言われる が,細孔径1000Å(100nm)の 場合には多孔質層は0.5 µm でも問題ない。

#### ピーク幅(W0.5, min)

	C4-100	C4-30	C8-100	C8-30	C8-30HT	試料濃度
多孔質層	0.5 µm	0.5 µm	0.5 µm	0.5 µm	0.2 µm	
Cytochrome C	0.047	0.057	0.047	0.057	0.046	0.025%
Lysozyme	0.045	0.056	0.046	0.056	0.046	0.025%
BSA	0.079	0.122	0.077	0.100	0.075	0.050%
Myoglobin	0.048	0.066	0.047	0.063	0.045	0.025%
Ovalbumin	0.109	0.133	0.109	0.119	0.109	0.025%





#### 標準タンパク質の分離(60min)



#### Column:

SunShell C4-100, 2.6 µm (100 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C4-30, 2.6 µm (30 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C8-100, 2.6 µm (100 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C8-30, 2.6 µm (30 nm) 100 x 2.1 mm, SunShell C8-30HT, 3.4 µm (30 nm) 100 x 2.1 mm, Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.1 % TFA in Acetonitrile Gradient program: Time 0 min 60, min 20% %B 65% Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 80 °C Detection: UV@215 nm, Injection volume: 1.0 µL Sample:1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin UHPLC instrument: HITACIHI Chromaster

多孔質層が薄い場合には 試料負荷量が小さくなり,	
注入量を考慮しなければ ならない。	

ピーク	幅(W0	.5, min
_ /	100 (	,

	C4-100	C4-30	C8-100	C8-30	C8-30HT	C8-30HT 0.5uL	試料濃度
多孔質層	0.5 µm	0.5 µm	0.5 µm	0.5 µm	0.2 µm	0.2 µm	
Cytochrome C	0.167	0.177	0.160	0.155	0.212	0.144	0.050%
Lysozyme	0.164	0.180	0.153	0.166	0.196	0.145	0.050%
BSA	0.308	0.410	0.276	0.514	0.422	0.330	0.100%
Myoglobin	0.197	0.221	0.180	0.199	0.238	0.176	0.050%
Ovalbumin	0.391	0.889	0.247	0.428	0.184	0.176	0.050%

24





# ナノカラムによる細胞培養によって得られた 精製抗体(IgG)の分離





### 精製抗体(lgG)のサイズ排除分離



Column: SunSec Diol30, 4 µm 300 x 4.6 mm i.d. Mobile phase: 0.1M Phosphate buffer + 0.2 M NaCl (pH6.8) Flow rate: 0.35 mL/min Temperature: 25 °C Detection UV at 220 nm Injection 2 µL Sample: 細胞培養によって得られた精製抗体 (IgG, プロテインGアフィニテイーカラムで精製)

Retention time/min





# 2-プロパノールを移動相に添加したlgGの分離







# lgG standardのクロマトグラム















まとめ

- 低分子において多孔質層が厚い方が保持、負荷量とも に大きくなった。
- 多孔質層の厚さが異なるコアシェルシリカを比較した 結果、タンパク分離において差が観察された。
- 高速分離においては、多孔質層が薄いコアシェルカラムのほうが優れたピーク形状を示した。
- 結合密度の低いHFC18-16カラムにおいて、いくつかのペプチドで分離の改善が見られた。
- モノクロナール抗体のような分子量が15万を超える試料は、100nmの細孔径が有利に働く。
- 多孔質層の厚さの違うそれぞれのコアシェルカラムを サンプルや目的に応じて使い分けることが重要となる









# Sunshell Core Shell HPLC column C4-100

2018,8,

モノクローナル抗体分離用