

1000Å細孔を持つコアシェル粒子 のタンパクを用いた分離評価

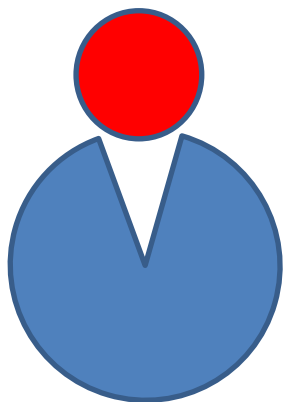
クロマニックテクノロジーズ
塚本友康 佐藤誠 長江徳和

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>



適切な細孔径を選ぶのは・・・



高分子に小さいポアサイズ

活用できる表面積が狭くなる



低分子に大きいポアサイズ

粒子の持つ表面積が狭い



適切な細孔径を選ぶことで
分離に必要な面積を確保できる



粒子の細孔径

細孔径	0 nm (ノンポラス)	8 - 12 nm	16 - 20 nm	20 - 100 nm
比表面積	極小	大 ←————→		小
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細孔径が30 nmでC4やC8が主流

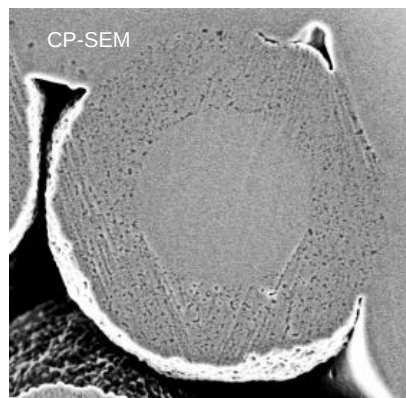
試料の分子量に対し細孔径が小さすぎるものを選ぶと
テーリングや保持が短くなることがある

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

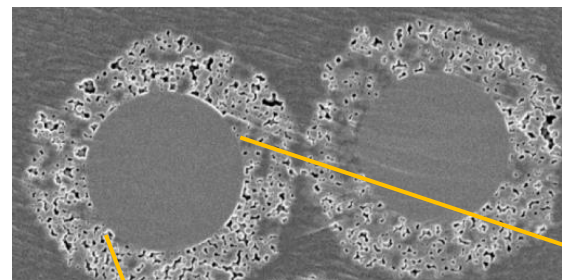
1000 Å 細孔を持つコアシェル粒子のタンパクを用いた分離評価を行った



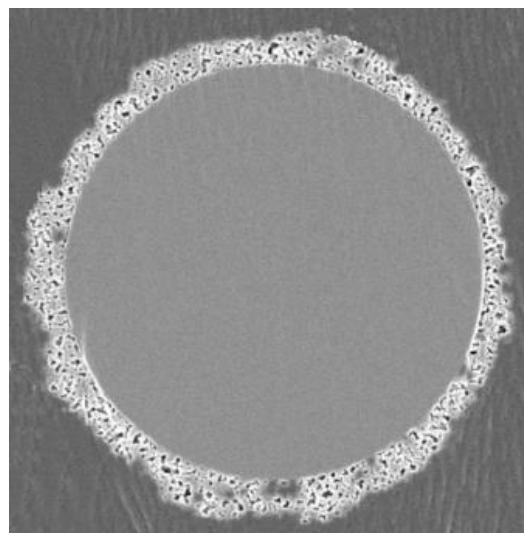
コアシェルシリカの電子顕微鏡写真



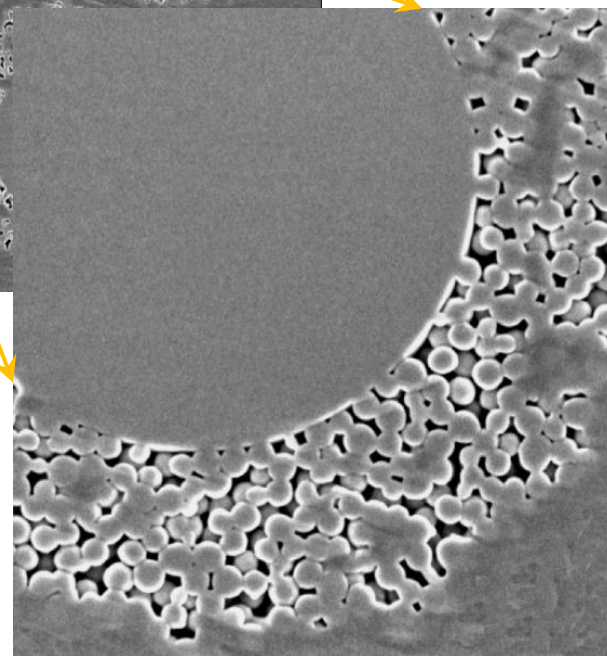
粒子径: $2.6\ \mu\text{m}$
細孔径: $16\ \text{nm}$



粒子径: $2.6\ \mu\text{m}$
細孔径: $100\ \text{nm}$



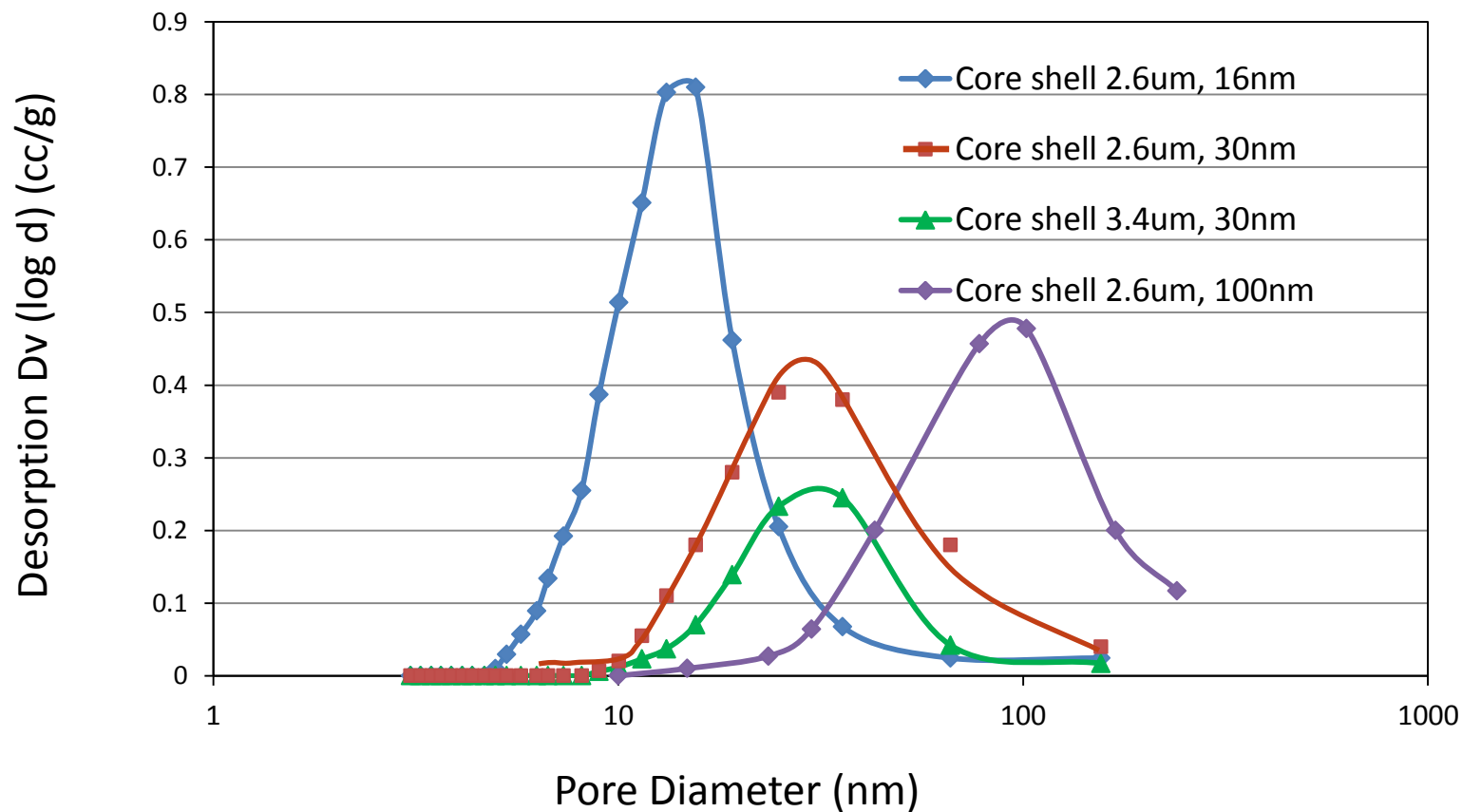
粒子径: $3.4\ \mu\text{m}$
細孔径: $30\ \text{nm}$



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(フェーズドシリカ)とその周りの多孔質層が確認できます。

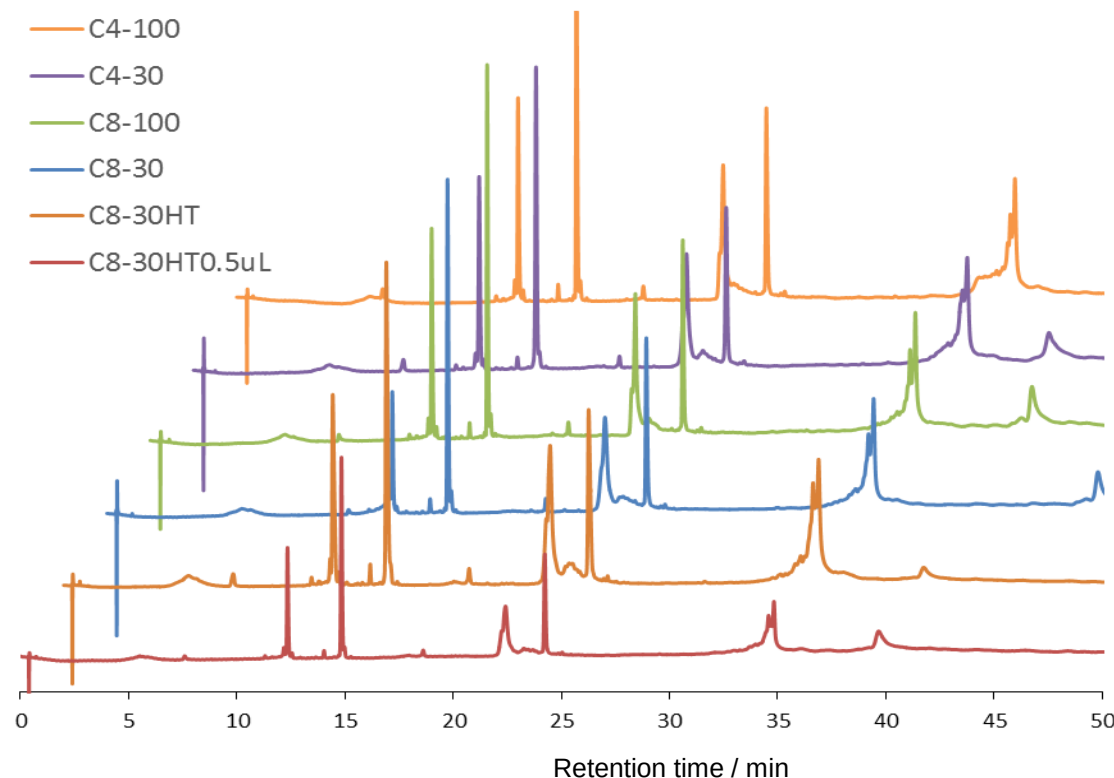


コアシェル粒子の細孔分布





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

%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min ,

Temperature: 80 $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@215 nm,

Injection volume: 1.0 μL

Sample:1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA,
4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

UHPLC instrument: HITACHI Chromaster

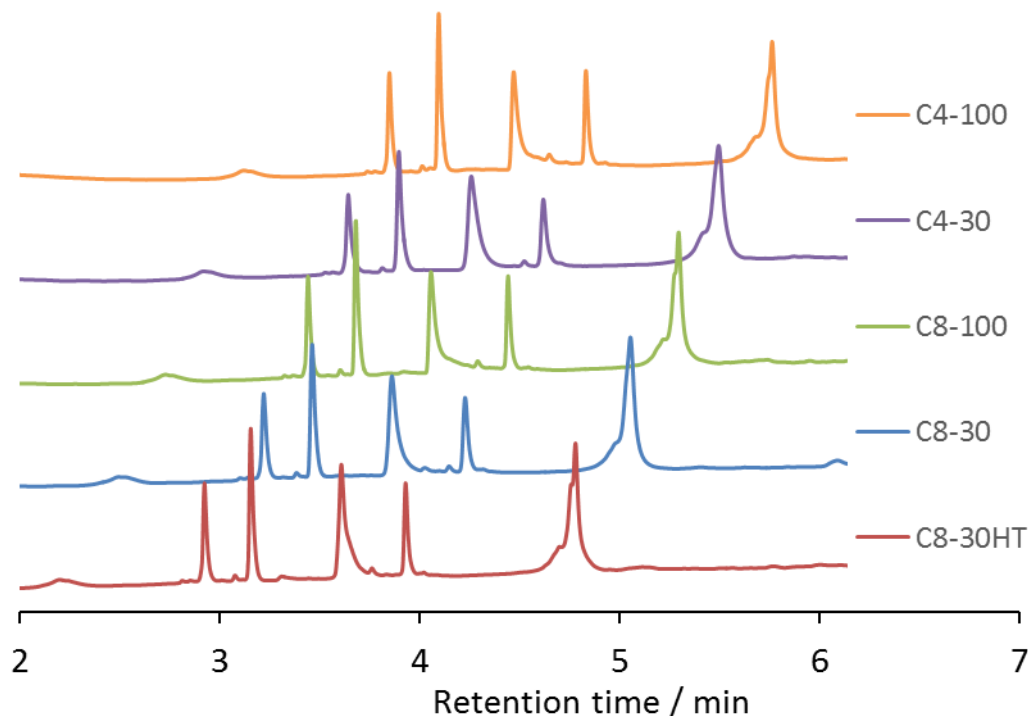
ピーク幅(W0.5, min)

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。

	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%



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 μL

Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA,
4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

UHPLC instrument: HITACHI Chromaster

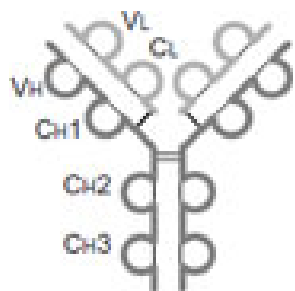
タンパク質分離には多孔質層が薄い方が有利と言われるが、細孔径1000 Å (100nm)の場合には多孔質層は0.5 μm でも問題ない。

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%



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



Column dimension: 100 x 2.1 mm i.d.

100 x 0.15 mm i.d. (nano-

column)

Mobile phase: A) water/TFA (100/0.1)

B) acetonitrile/TFA (100/0.085)

30-45%B (0-30 min) (0-15min)

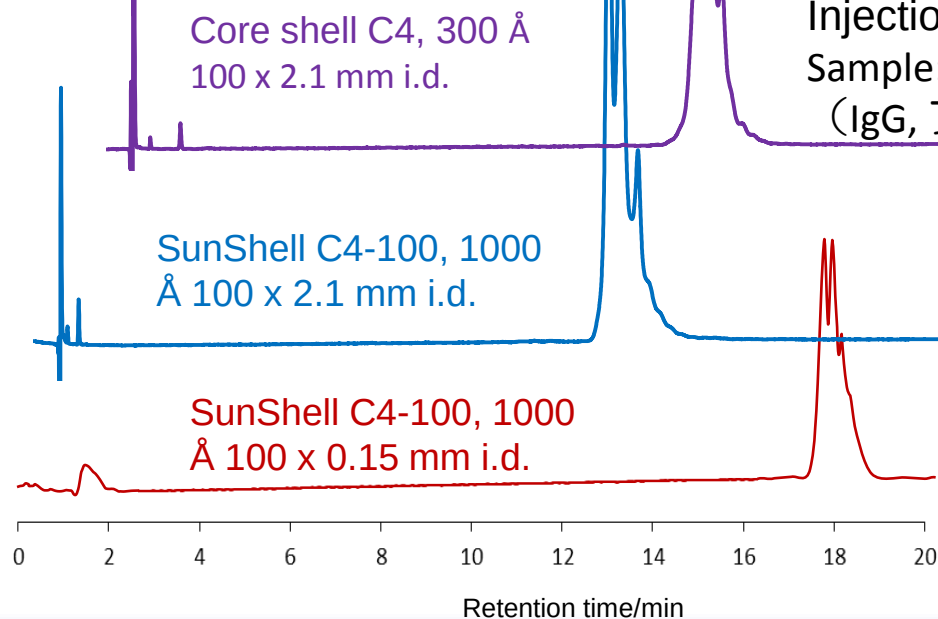
Flow rate: 0.4 mL/min, 0.004 mL/min (nano-column)

Temperature: 80 °C

Detection: UV at 215 nm

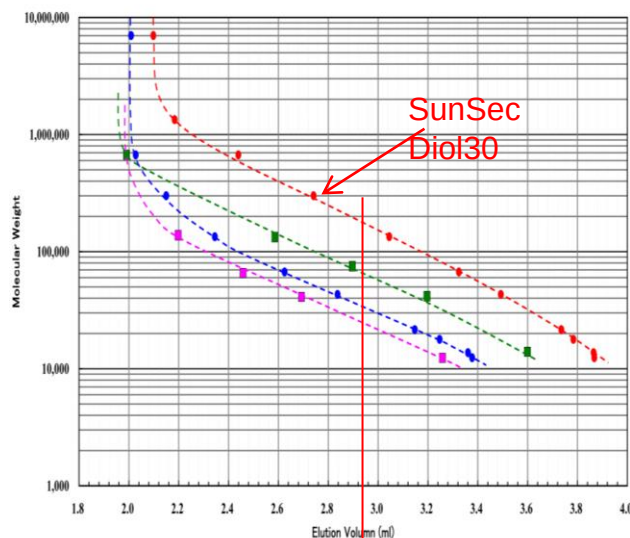
Injection: 5 μ L, 0.1 μ L (nano-column)

Sample: 細胞培養によって得られた精製抗体
(IgG, プロテインGアフィニティーカラムで精製)





精製抗体 (IgG) のサイズ排除分離



Column: SunSec Diol30, 4 μ m 300 x 4.6 mm i.d.

Mobile phase:

0.1M Phosphate buffer + 0.2 M NaCl (pH6.8)

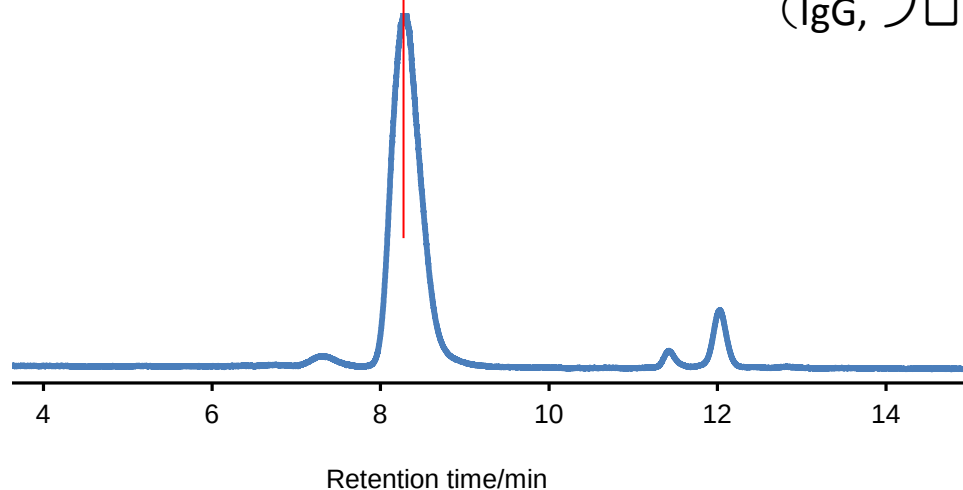
Flow rate: 0.35 mL/min

Temperature: 25 °C

Detection UV at 220 nm

Injection 2 μ L

Sample: 細胞培養によって得られた精製抗体
(IgG, プロテインGアフィニティーカラムで精製)





2-プロパノールを移動相に添加したIgGの分離

Column dimension: 100 x 2.1 mm i.d.

Mobile phase: A) water/TFA (100/0.1)

B) acetonitrile/2-propanol/TFA (20/80/0.085)

15%B (0-0.5 min) and 15-50%B (0.5-50 min)

Flow rate: 0.4 mL/min

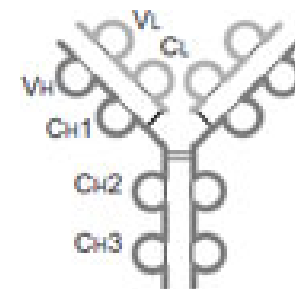
Temperature: 80 °C

Detection UV at 215 nm

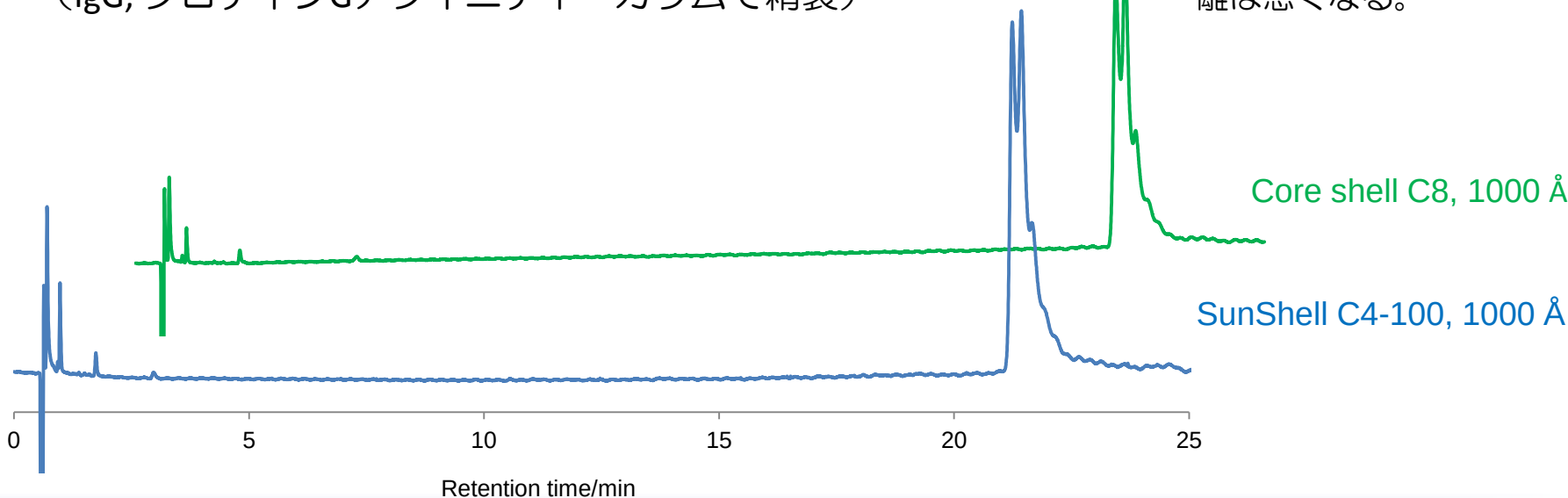
Injection 5 μ L

Sample: 細胞培養によって得られた精製抗体

(IgG, プロテインGアフィニティーカラムで精製)

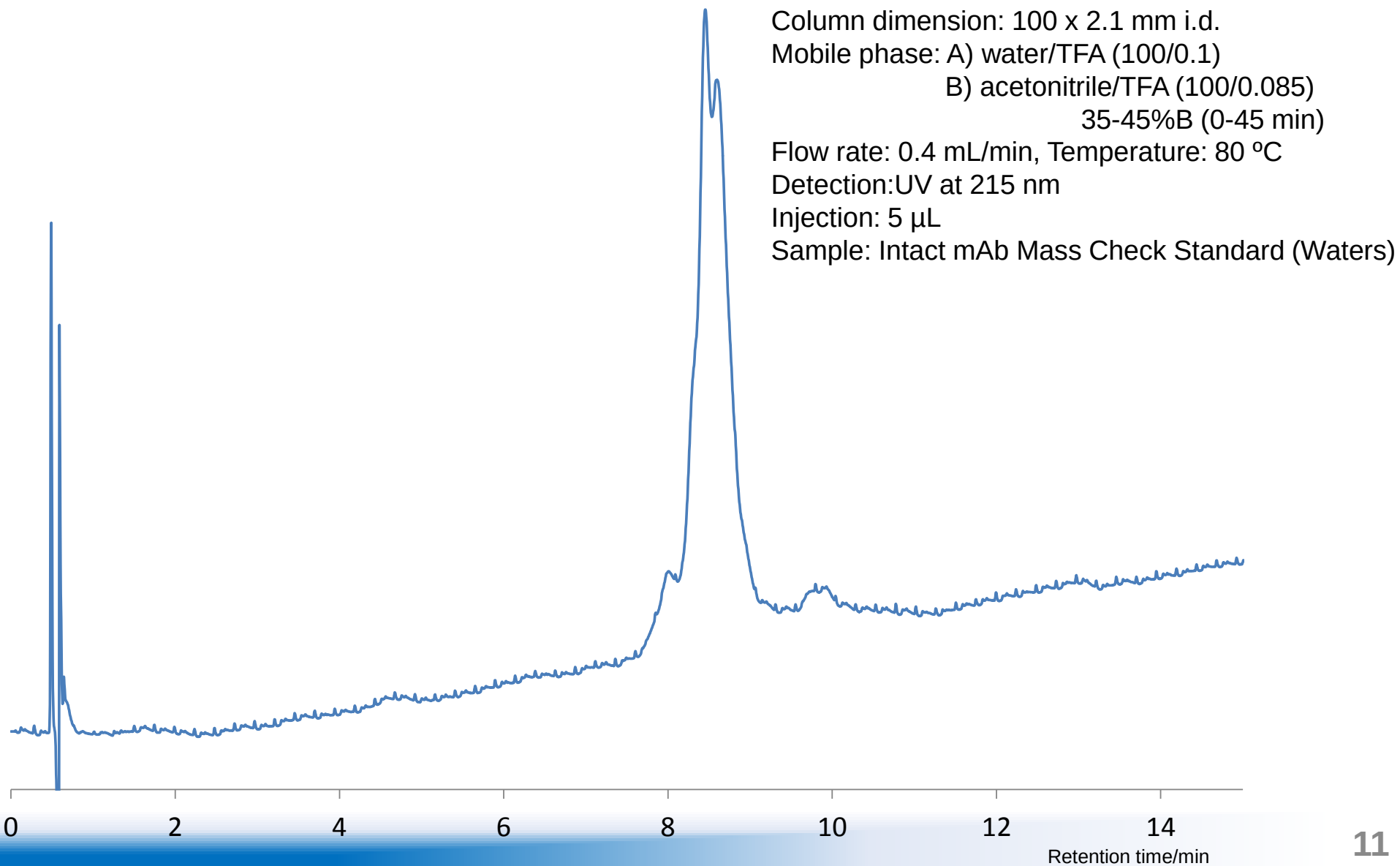


2-プロパノールはC8カラムでもIgGを溶出させるが、分離は悪くなる。





IgG standardのクロマトグラム





IgG standardのクロマトグラム2

Column: SunSec Diol30, 4 μm 300 x 4.6 mm i.d. $\times$ 2

Mobile phase:

0.1M Phosphate buffer + 0.2 M NaCl (pH6.8)

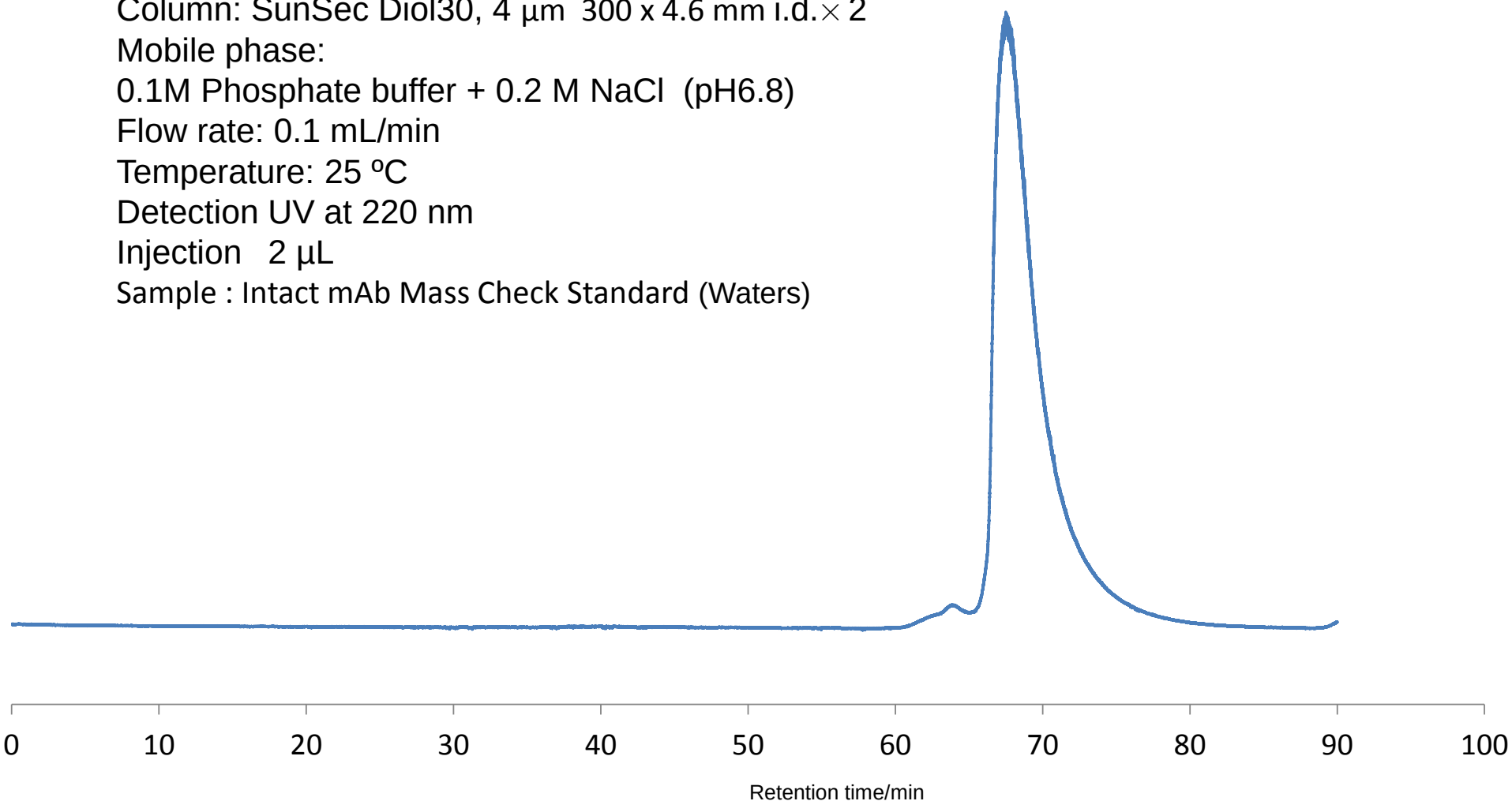
Flow rate: 0.1 mL/min

Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$

Detection UV at 220 nm

Injection 2 μL

Sample : Intact mAb Mass Check Standard (Waters)





まとめ

- 100 nm細孔を持つコアシェルシリカカラムはC4、C8とともに30 nm細孔のコアシェルカラム より、たんぱく質標準品において良好な分離を示した。
- グラジエント時間の長さに関わらず、100 nm細孔のコアシェル粒子カラムはタンパク標準品において良好な分離を示した
- 精製抗体(IgG)サンプルを用いた場合、30 nm細孔を有するC4コアシェルカラムは、30 nm細孔の全多孔性C4カラムより、良好な分離を示した。さらに100 nm細孔を有する、C4コアシェルカラムは最も良い分離を示した
- 100 nm細孔を持つコアシェル粒子は高分子分析において有用であることが示唆された。