

コアシェル型充填カラムの 固定相の展開と ペプチド・タンパク質への応用

クロマニックテクノロジーズ

塚本友康 長江徳和

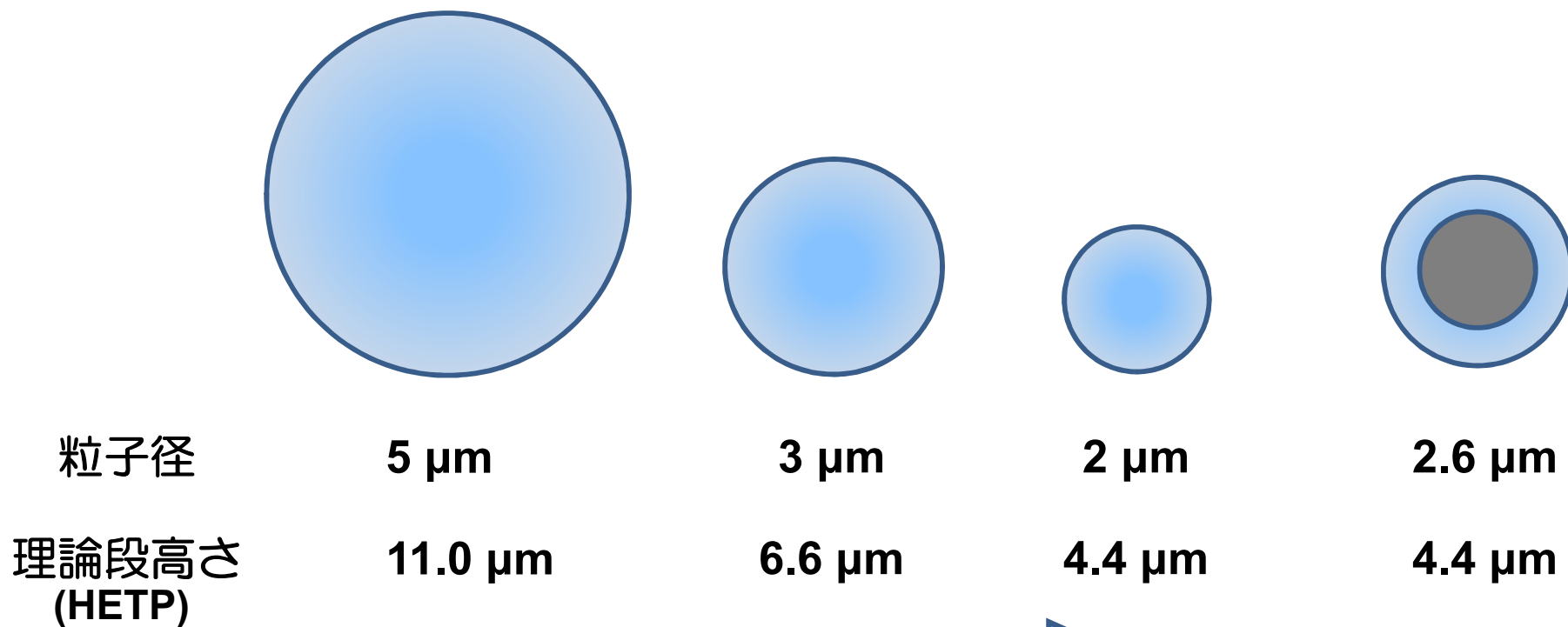
Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>



理論段数を上げるために

- 粒子径を小さくすることでカラム性能を上げることが可能
($HETP \approx 2.2 \times \text{粒子径}$)
- カラム背圧は粒子径の2乗に反比例する
(性能が高いカラムほど高圧)



粒子径が小さいほど理論段高さは低くなる

コアシェル粒子では・・・？



市販されているコアシェルカラム

SunShell (クロマニックテクノロジーズ)	: C18, PFP, C8, Phenyl, RP-Aqua
Halo (AMT)	: C18, PFP, CN, PentaHILIC, RP-Amide
Capcell Core (資生堂)	: C18, PFP, AQ, PC
Kinetex (フェノメネックス)	: C18, PFP, C8, XB-C18, HILIC,
Kinetex Aeris (フェノメネックス)	: C18, C8, C4 (タンパクペプチド分析用)
Ascentis Express (シグマアルドリッチ)	: C18, F5(PFP), C8, OH5, RP-Amide
Poroshell (アジレントテクノロジー)	: C18, C8, CN, Phenyl-Hexyl, SB-AQ
Accucore (サーモフィッシャー)	: C18, PFP, Phenyl-Hexyl, aQ, RP-MS
Nucleoshell (ナーゲル)	: C18, PFP, Phenyl-Hexyl, HILIC
Brownlee SPP (パーキンエルマー)	: C18, PFP, C8, Amide, HILIC

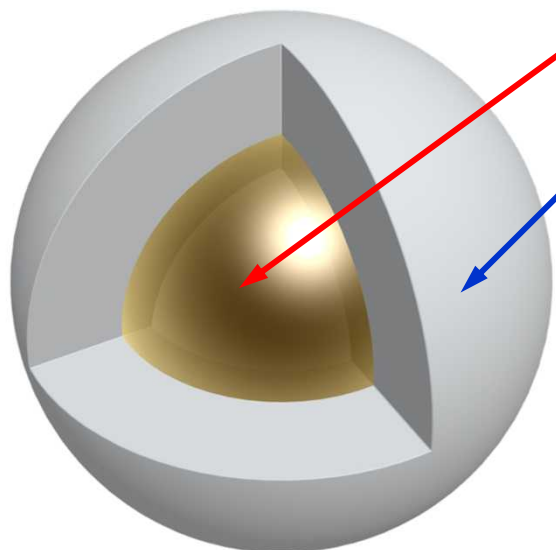
上記のメーカーより様々な固定相のコアシェルカラムが販売されてる。

(固定相は抜粋)

コアシェルカラムはHPLCにおいて広く使用されるようになってきている



市販されているコアシェルシリカ



核の径は1~3.2 μm

多孔質シリカ層の厚さ0.2~0.6 μm

- 粒子径は1.7~5 μm
- 細孔径は9~30 nm
(3 μm 以下の粒子径では8~20 nm)

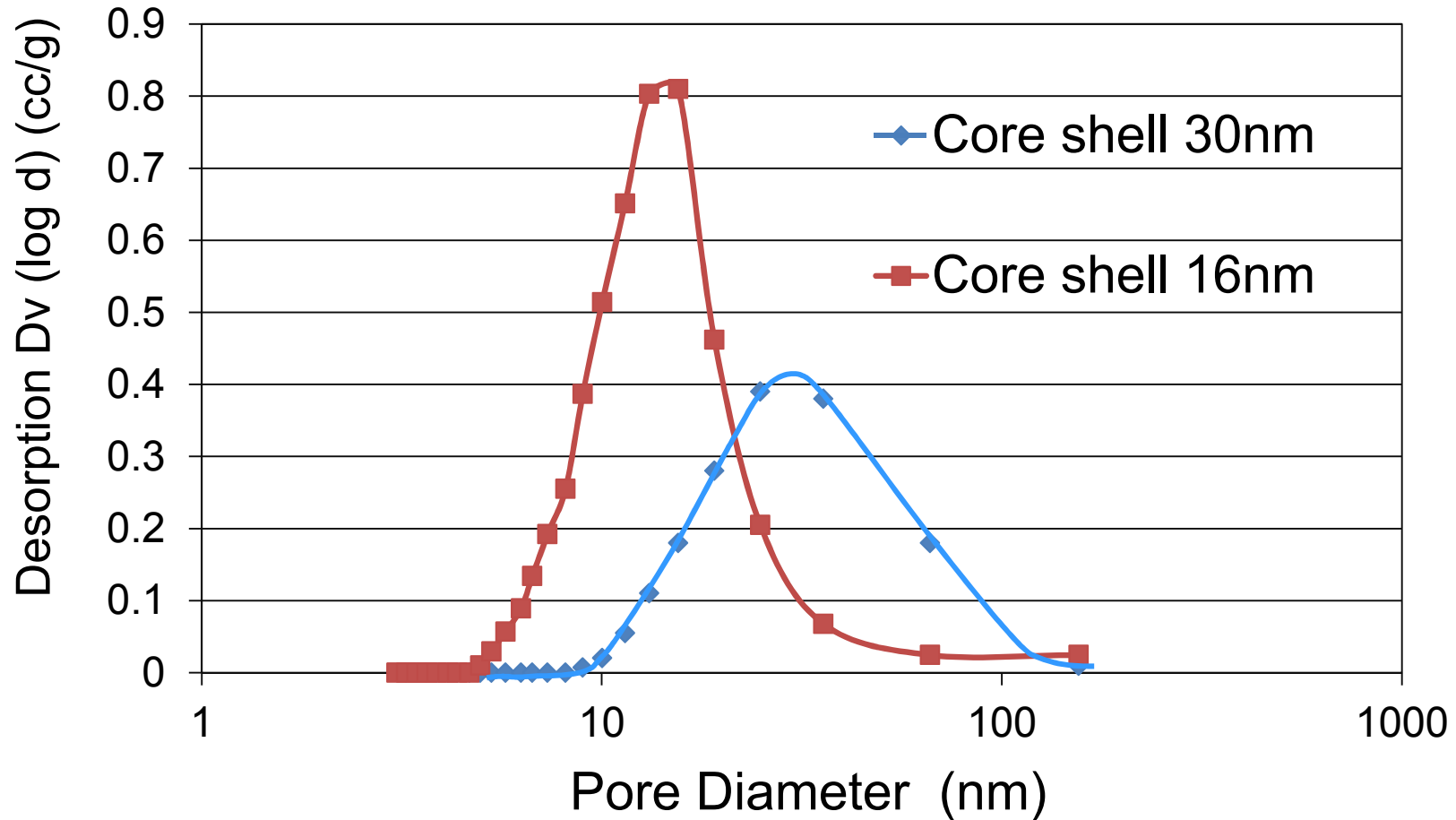
粒子径2.6 μm で30 nmの細孔を持つ
コアシェル粒子はまだ販売されていない



粒子径2.6 μm で30 nmの細孔を持つ
コアシェル粒子の開発を試みた



作成したコアシェルシリカの細孔分布





高分子分離用コアシェルカラム

作成した粒子径2.6 μm で30 nmの細孔を持つ
コアシェル粒子を用いて以下のカラムを作成した

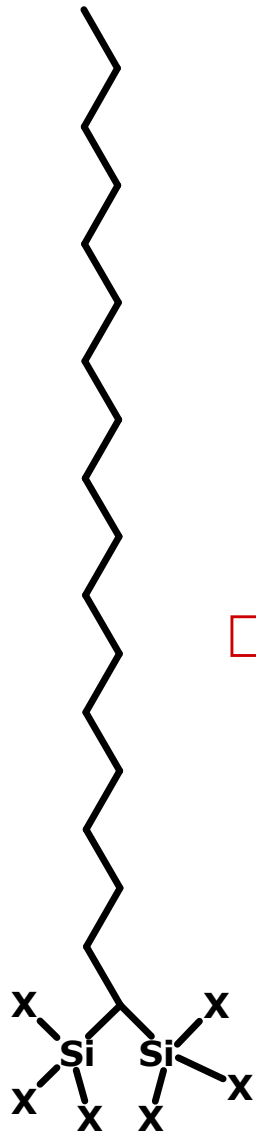
	P/N	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	C18 Surface coverage	End-capping
SunShell HFC18-30 4.6 x 150 mm	C46471	30 nm	40 m ² /g	1.3%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C8-30 4.6 x 150 mm	C36471	30 nm	40 m ² /g	1.2%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C4-30 4.6 x 150 mm	C26471	30 nm	40 m ² /g	0.9%	3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes

Particle diameter is 2.6 μm for all.



HFC18とは

Hexa-Functional C18 は6個の官能基を持つ
6カ所のシロキサン結合により耐酸性は高くなる

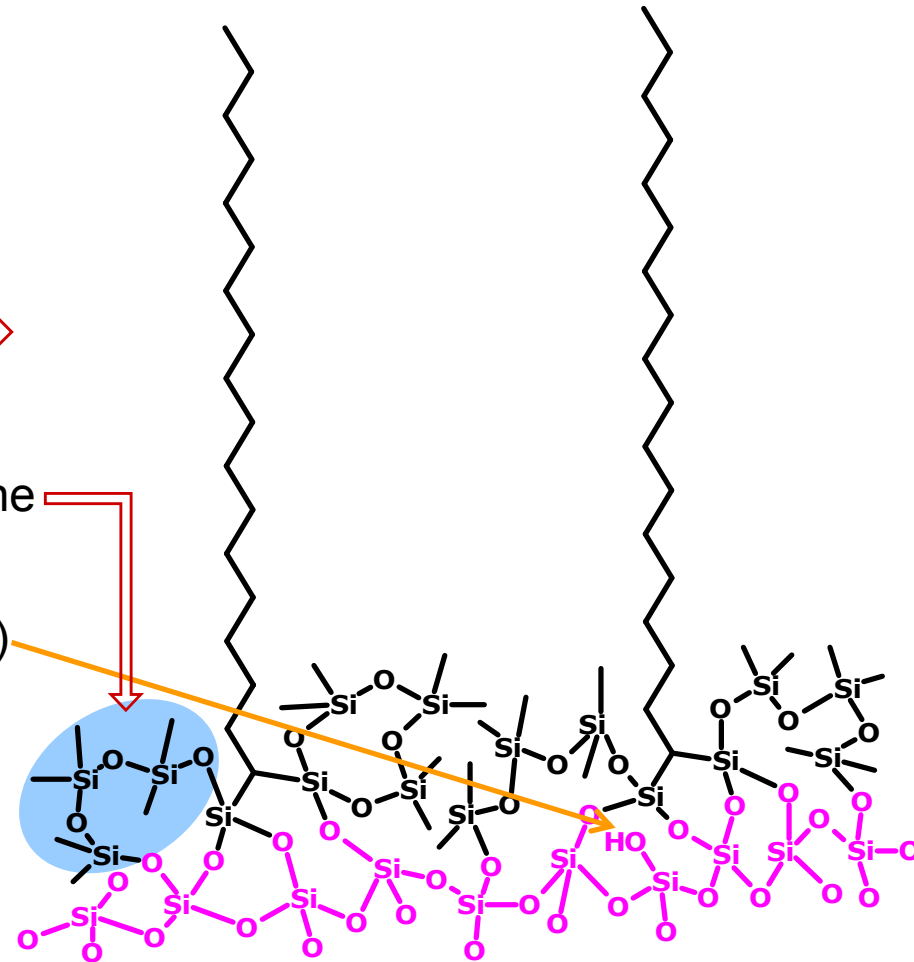


(X: Cl, OCH₃, OC₂H₅)

HFC18試薬の概略図



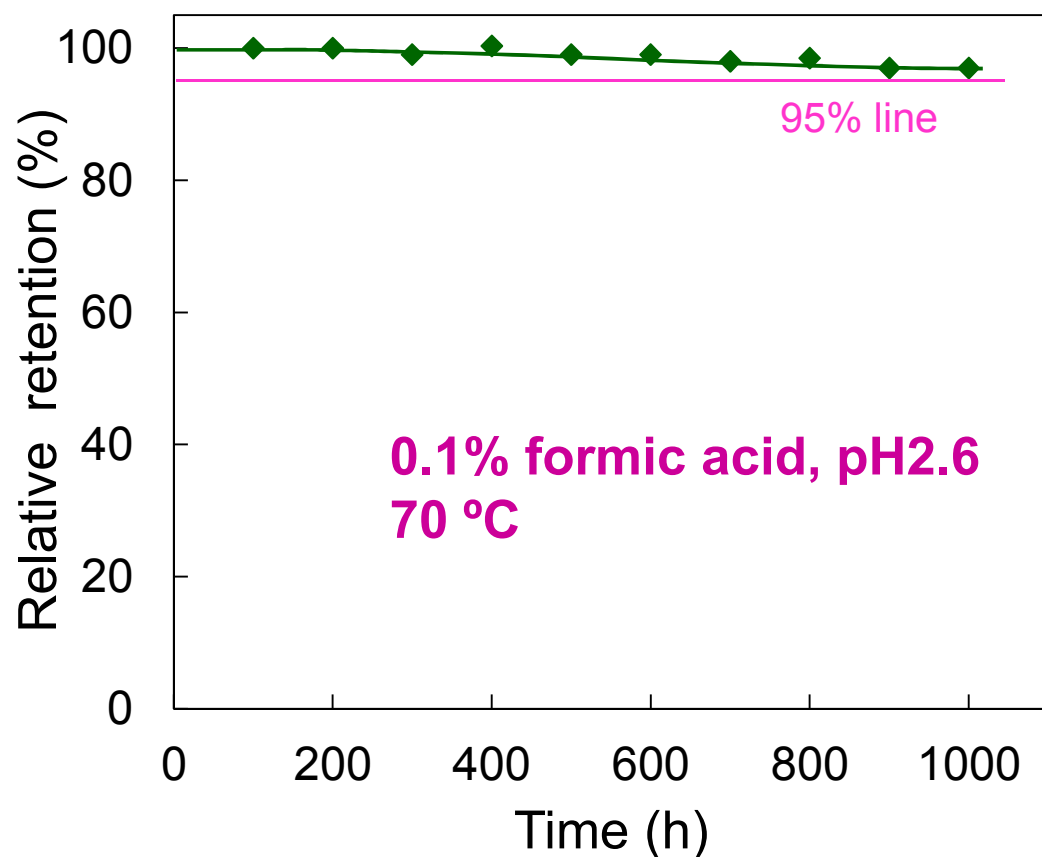
Hexamethyldichlorotrisiloxane
+
Trimethylchlorosilane (TMS)



シリカ表面への結合状態の概略図



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 μ m, 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH₃CN/0.1%
formic acid, pH2.6=40/60

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 70 °C

Measurement condition

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40

Flow rate: 0.4 mL/min

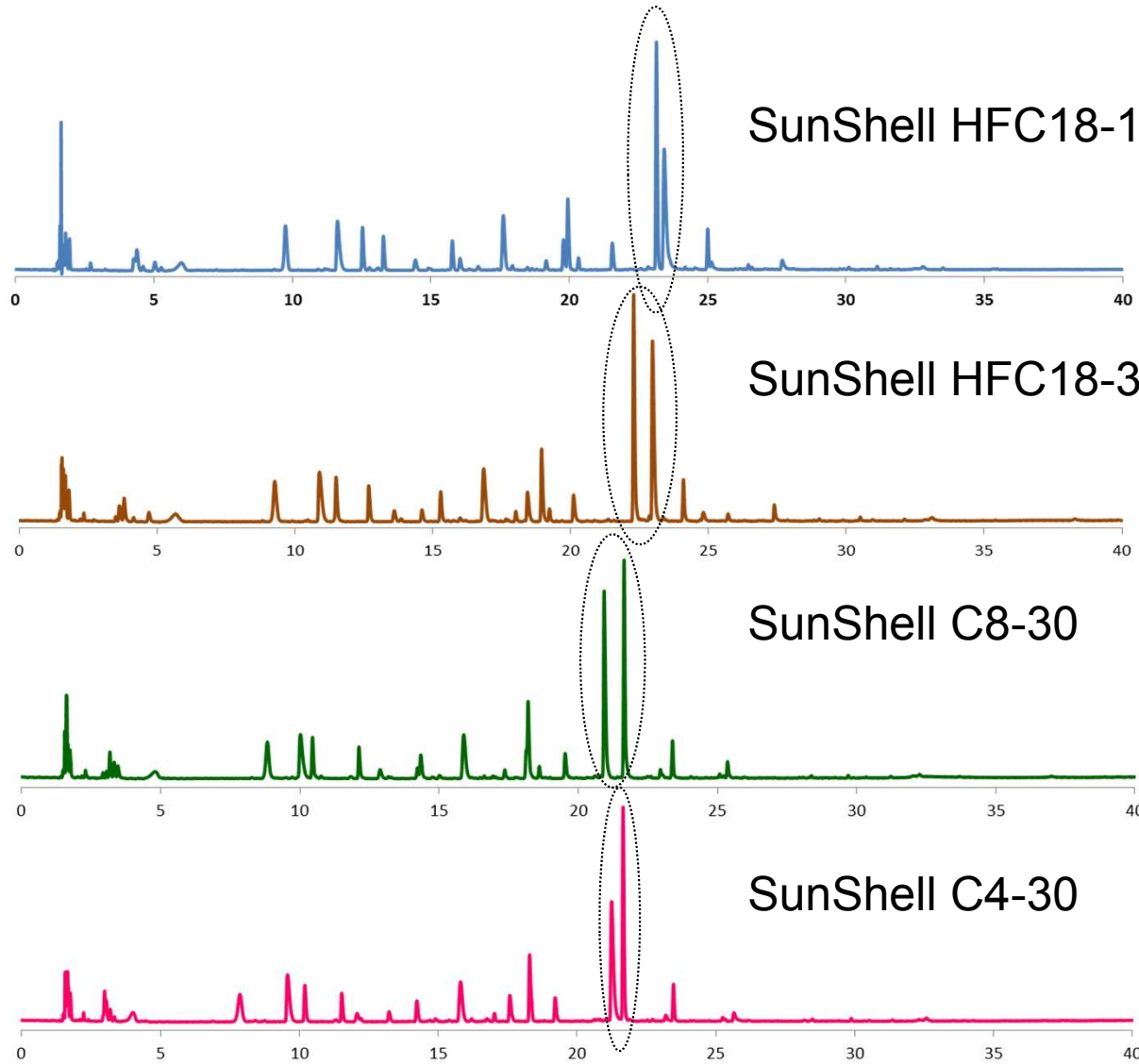
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Butylbenzene



ペプチドの分離



SunShell HFC18-16

SunShell HFC18-30

SunShell C8-30

SunShell C4-30

Column:

SunShell HFC18-16, 2.6 μm (16 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell HFC18-30, 2.6 μm (30 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell C4-30, 2.6 μm (30 nm) 150 x 4.6 mm,

Mobile phase: A) 0.1% TFA in water

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 3 min 40 min
%B 5% 5% 50%

Flow rate: 1.0 mL/min ,

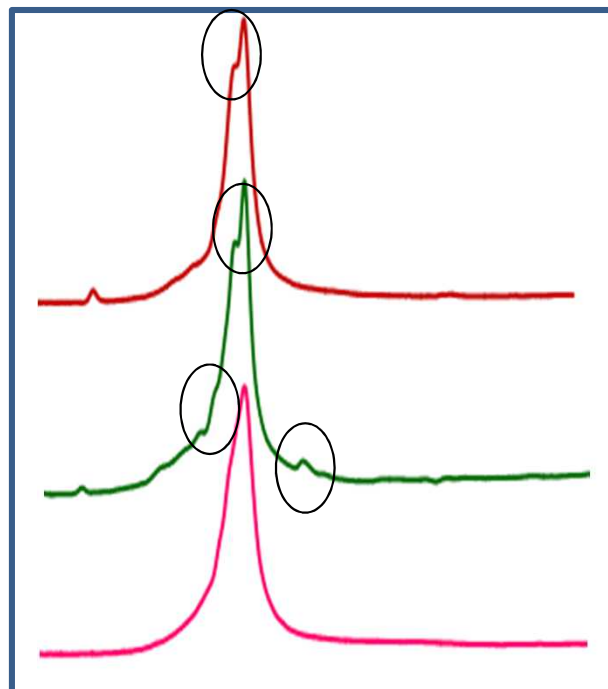
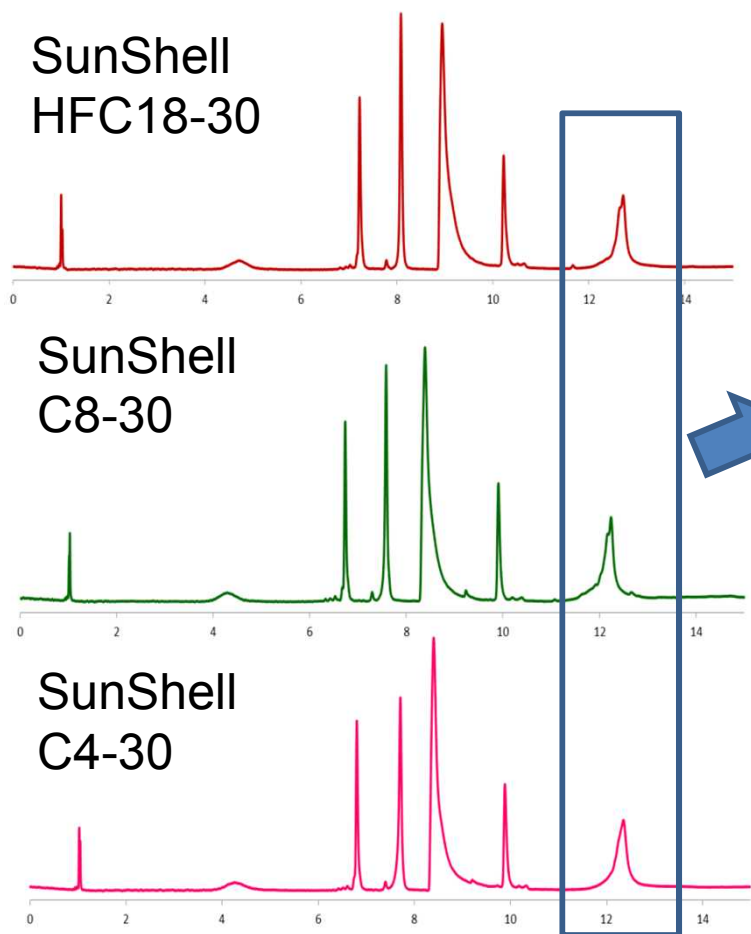
Temperature: Ambient

Detection: UV@210 nm,

Sample: Tryptic digest of cytochrome C



タンパクの分離



Column: SunShell HFC18-30, 2.6 μm (30 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell C4-30, 2.6 μm (30 nm) 150 x 4.6 mm,
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water, B) 0.1 % TFA in Acetonitrile
Gradient program: Time 0 min 15 min
 %B 20% 65%

Flow rate: 1.5 mL/min ,
Temperature: Ambient
Detection: UV@210 nm,

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



選択性の異なるC18の比較

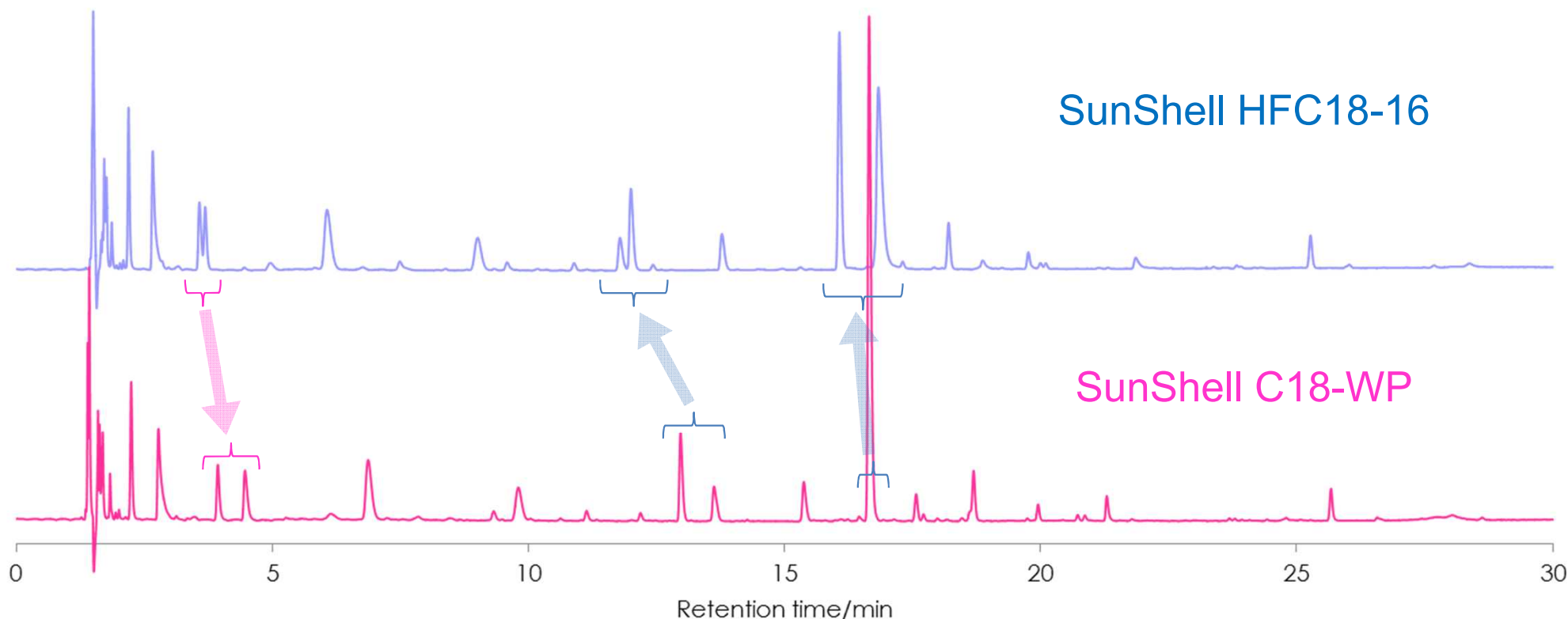
	P/N	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	C18 Surface coverage	End-capping
SunShell HFC18-16 4.6 x 150 mm	CG6471	16 nm	90 m ² /g	2.5%	1.2 μmol/m ²	Yes
SunShell C18-WP 4.6 x 150 mm	CW6471	16 nm	90 m ² /g	5%	2.5 μmol/m ²	Yes

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。



結合密度の異なるC18のペプチドの分離比較



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

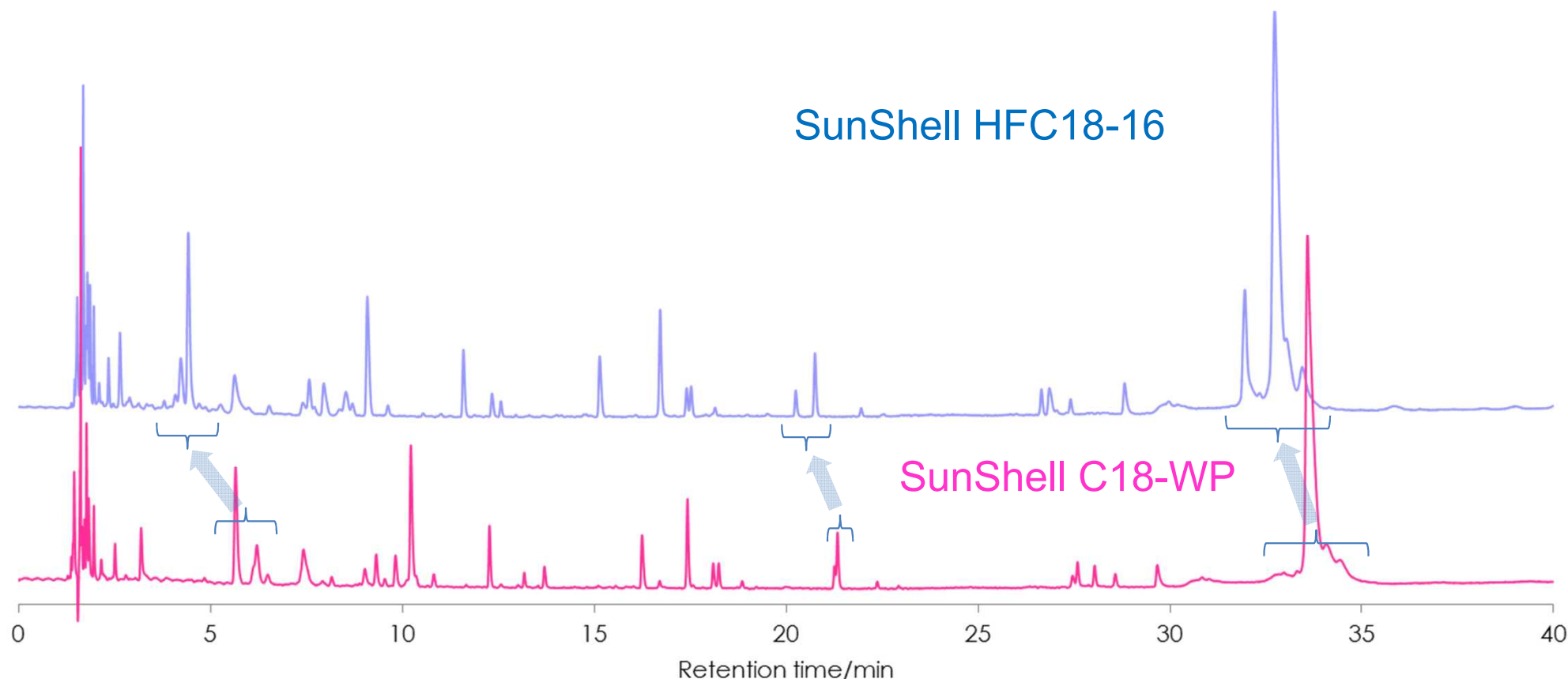
Gradient program:

Time	0 min	5 min	40 min
%B	5%	5%	50%

Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$, Detection: UV@210 nm,
Sample: Tryptic digest of cytochrome C



結合密度の異なるC18のペプチドの分離比較



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

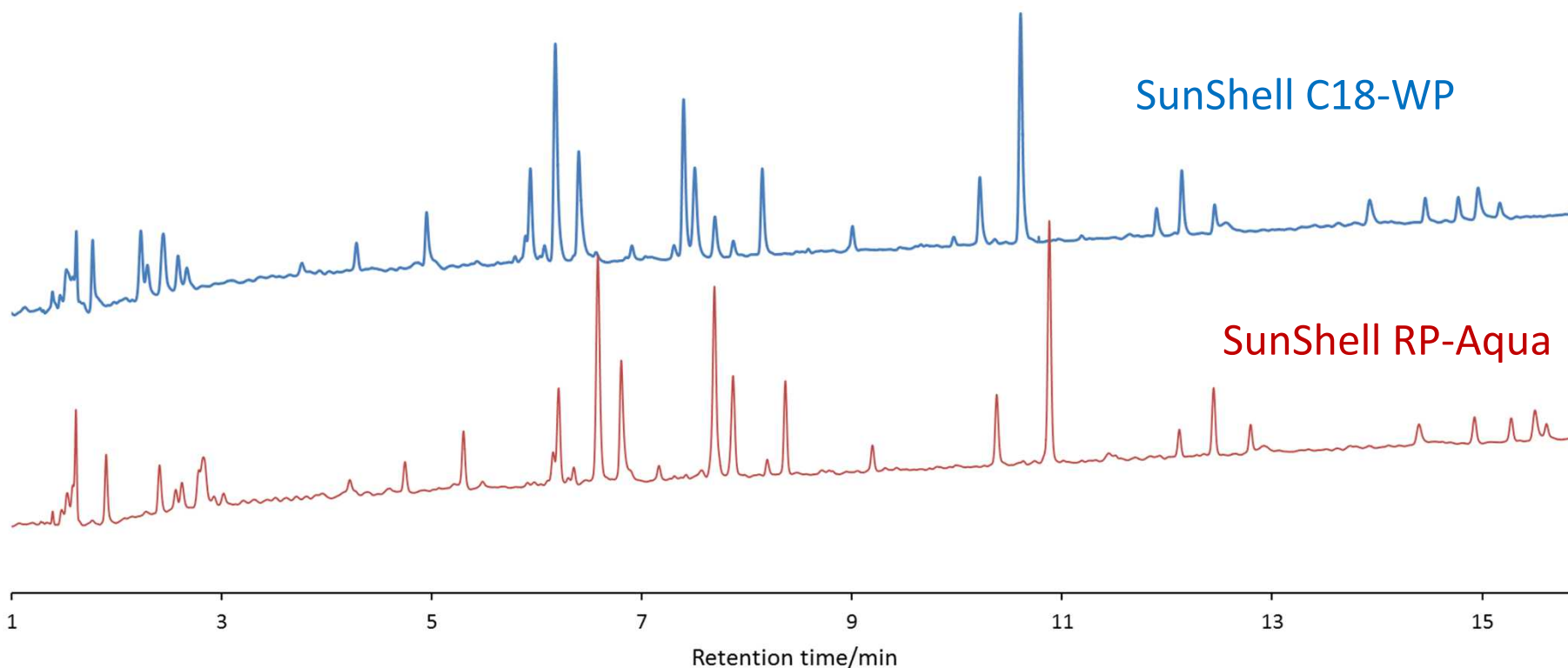
Gradient program:

Time	0 min	5 min	40 min
%B	5%	5%	50%

Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$, Detection: UV@210 nm,
Sample: Tryptic digest of myoglobin



SunShell C18-WPとRP-Aquaによる ペプチドの分離



Column: SunShell C18-WP, 2.6 μm (16 nm) 150 x 4.6 mm,
SunShell RP-Aqua, 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: %B 0% – 100% in 35 min

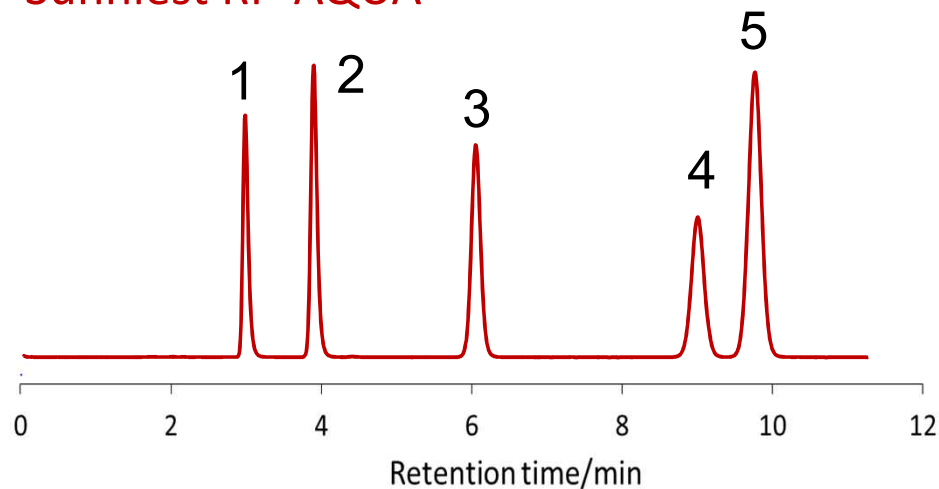
Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25 °C, Detection: UV@210 nm,

Sample: Tryptic digest of myoglobin

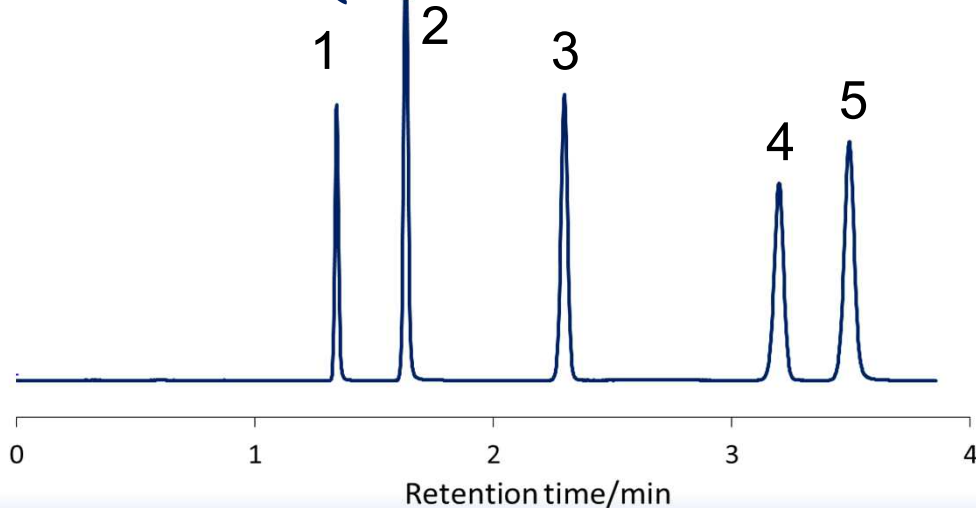


SunShell RP-Aquaによる核酸塩基の分離比較

Sunniest RP-AQUA



SunShell RP-AQUA



Column:

Sunniest RP-AQUA 5 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell RP-AQUA, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Water

Flow rate: 1.0 mL/min for Sunniest

1.5 ml/min for SunShell

Temperature: 24°C

Sample: 1 = Cytosine

2 = Uracil

3 = Thymidine

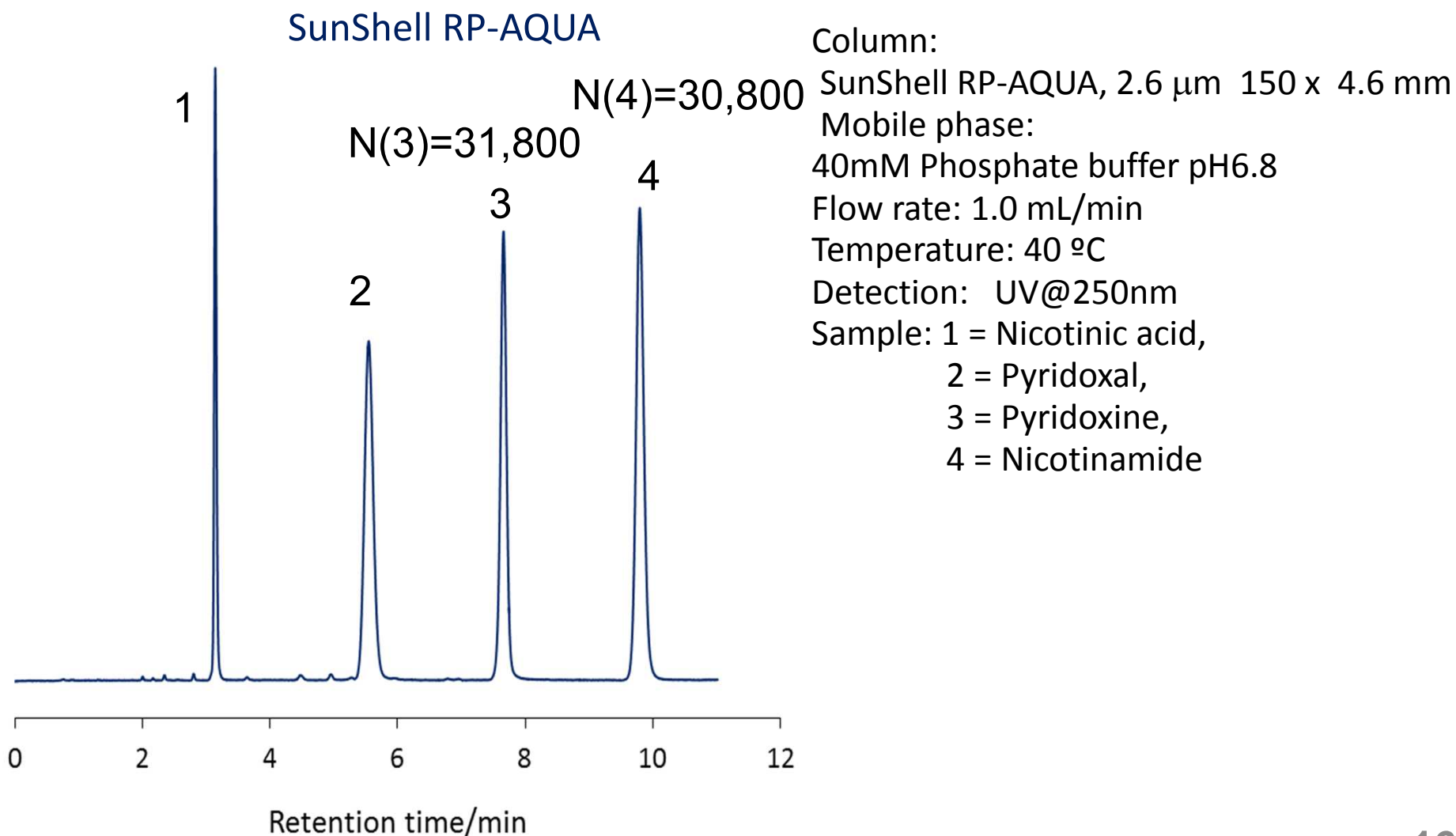
4 = Uridine

5 = Thymine

	Plate(5)	Resolution (4,5)
Sunniest	14,000	1.98
SunShell	30,000	3.79



SunShell RP-Aquaによる 水溶性ビタミンの分離

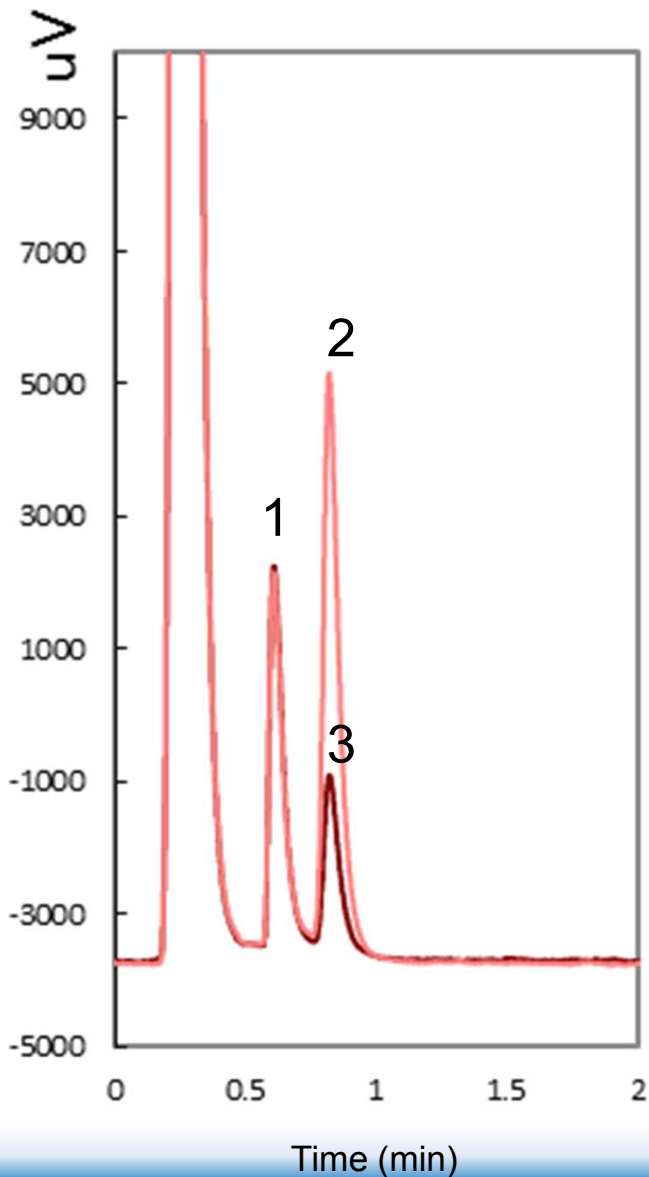




SunShell AI 微量アルミニウム測定専用カラム

★13ppbアルミニウム標準品の測定例
オキシンを用いたキレート錯体として測定

1 検体1minで測定完了
従来の5 μ mカラムの1/3に短縮



Column: SunShell AI 2.6 μ m, 4.6 x 30 mm
Mobile phase: 2-Propanol/buffer (pH7) = 30/70
Flow rate: 1.5 mL/min
Column Temperature: 25 °C
Pressure: 19.3 MPa
Fluorescence detection: EX= 370 nm, Em= 504 nm
Injection volume: 20 μ L
Instrument: HPLC with 0.13 mm i.d. tubing from injector to detector.

1: Oxine peak
2: 13ppb Aluminum standard solution
3: Blank (pure water)
Resolution of peak number 1 and 2: 2.00

This aluminum measurement is based on "Pharmaceutical Regulatory Science 35, 565-580 (2004)".



まとめ

- 30 nm細孔を持つコアシェルシリカの合成に成功した。
- そのコアシェルシリカを用いて合成したカラムをペプチド、タンパクの分離に適用した。
- 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。
- HFC18-16のLCMSでの使用を想定した耐酸試験において、1000時間以上の耐酸性能を確認できた。
- 今後コアシェルカラムは、多くの固定相が開発されていくと考えられる。