

多孔質層の厚さが異なる コアシェル粒子のタンパク分離比較

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>



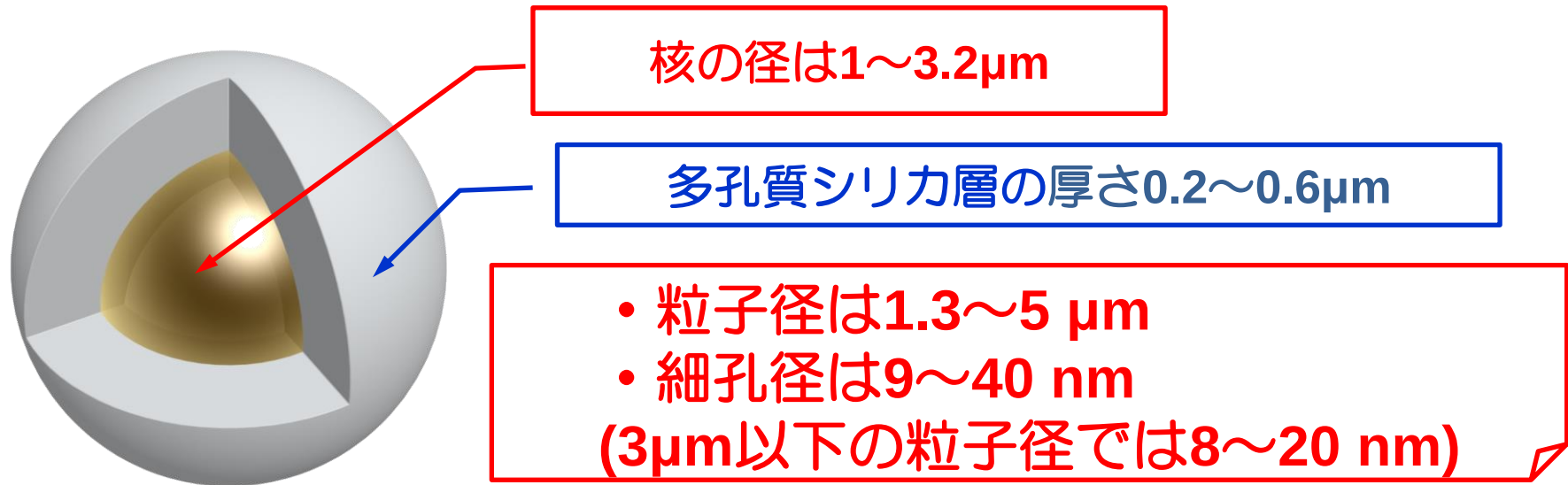
市販されているコアシェルカラム

SunShell (クロマニクテクノロジーズ)	: C18, PFP, C8, Phenyl, RP-Aqua
Halo (AMT)	: C18, PFP, CN, PentaHILIC, BioClass
Capcell Core (資生堂)	: C18, PFP, AQ, PC, MP, WP
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
BioSehl (シグマアルドリッチ)	: C4, C8, C18
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
Blue Shell (KNAUER)	: C18, PFP, Phenyl-Hexyl, C18A, HILIC
Cortecs (Waters)	: C18, C18+, HILIC
Raptor (Restek)	: Biphenyl, ARC18
Ultracore (Ace)	: C18, Phenyl-Hexyl
SpeedCore (Fortis)	: C18, PFP, Diphenyl, HILIC
Coresep (Sielc)	: Mixmode
COSMOCORE (Nacalai)	: C18
Meteoric Core (YMC)	: C18, C8, C18Bio

(固定相は抜粋)

コアシェルカラムは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



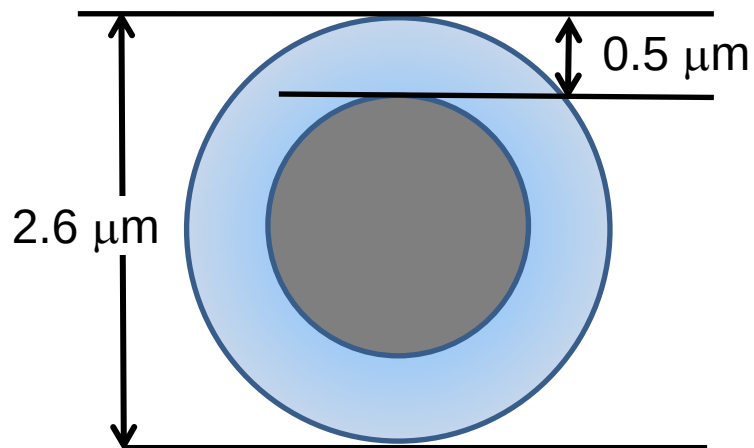
タンパク用のコアシェルシリカは
 $0.2 \mu\text{m}$ 等の薄い多孔質層が主流

- 多孔質層の厚さが異なるコアシェルシリカのタンパク分離を比較した



多孔質相の厚さが異なるコアシェルシリカ

SunShell particle

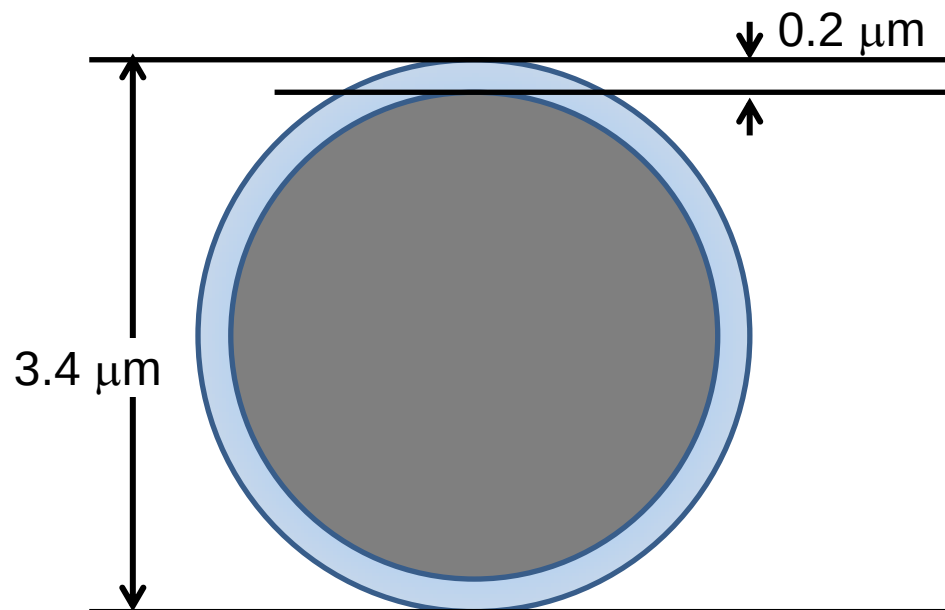


Particle size: 2.6 μm

Thickness of porous layer: 0.5 μm

Specific surface area: 40 m^2/g

Prototype particle



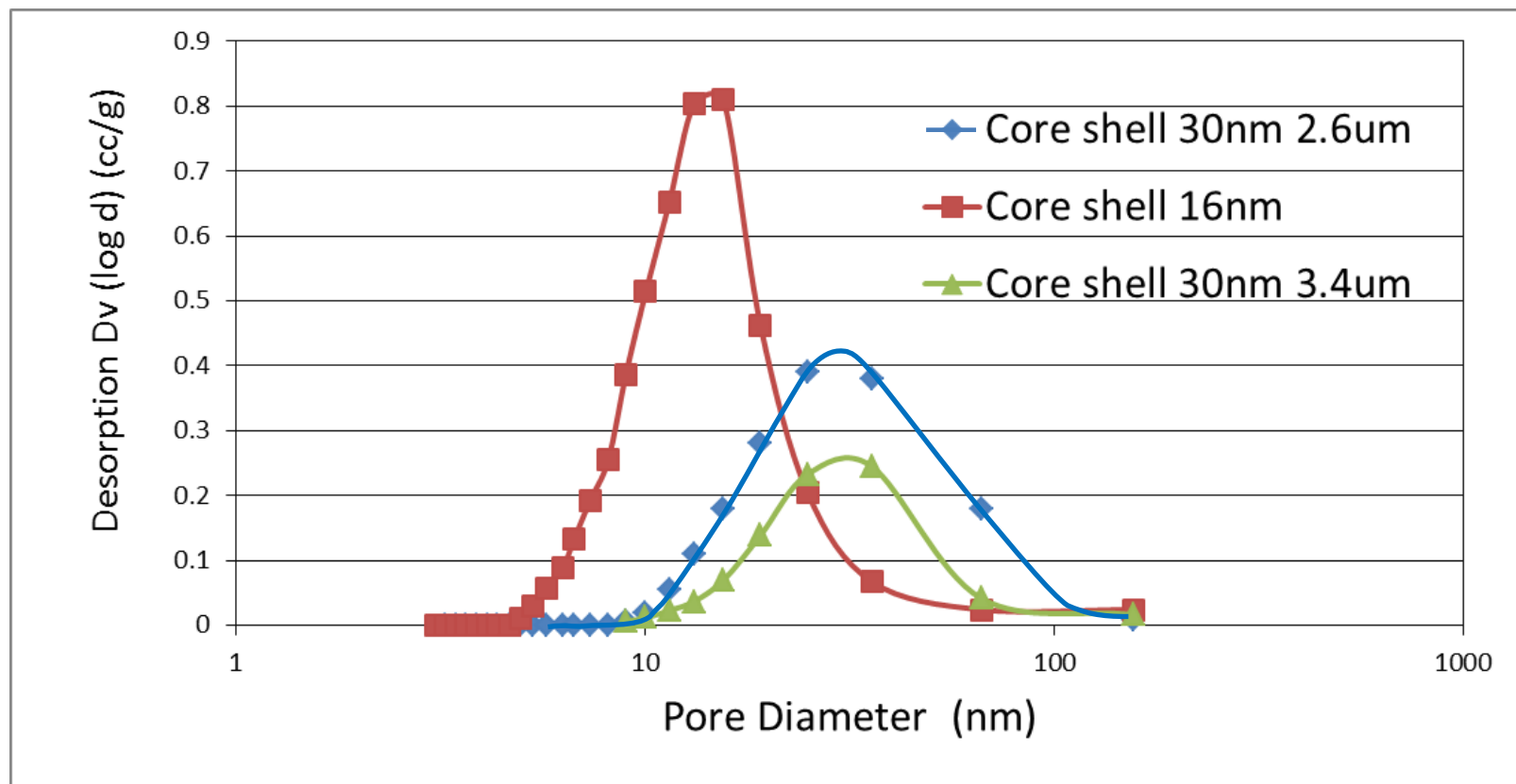
Particle size: 3.4 μm

Thickness of porous layer: 0.2 μm

Specific surface area: 15 m^2/g



作成したコアシェルシリカの細孔分布





タンパクの分離

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

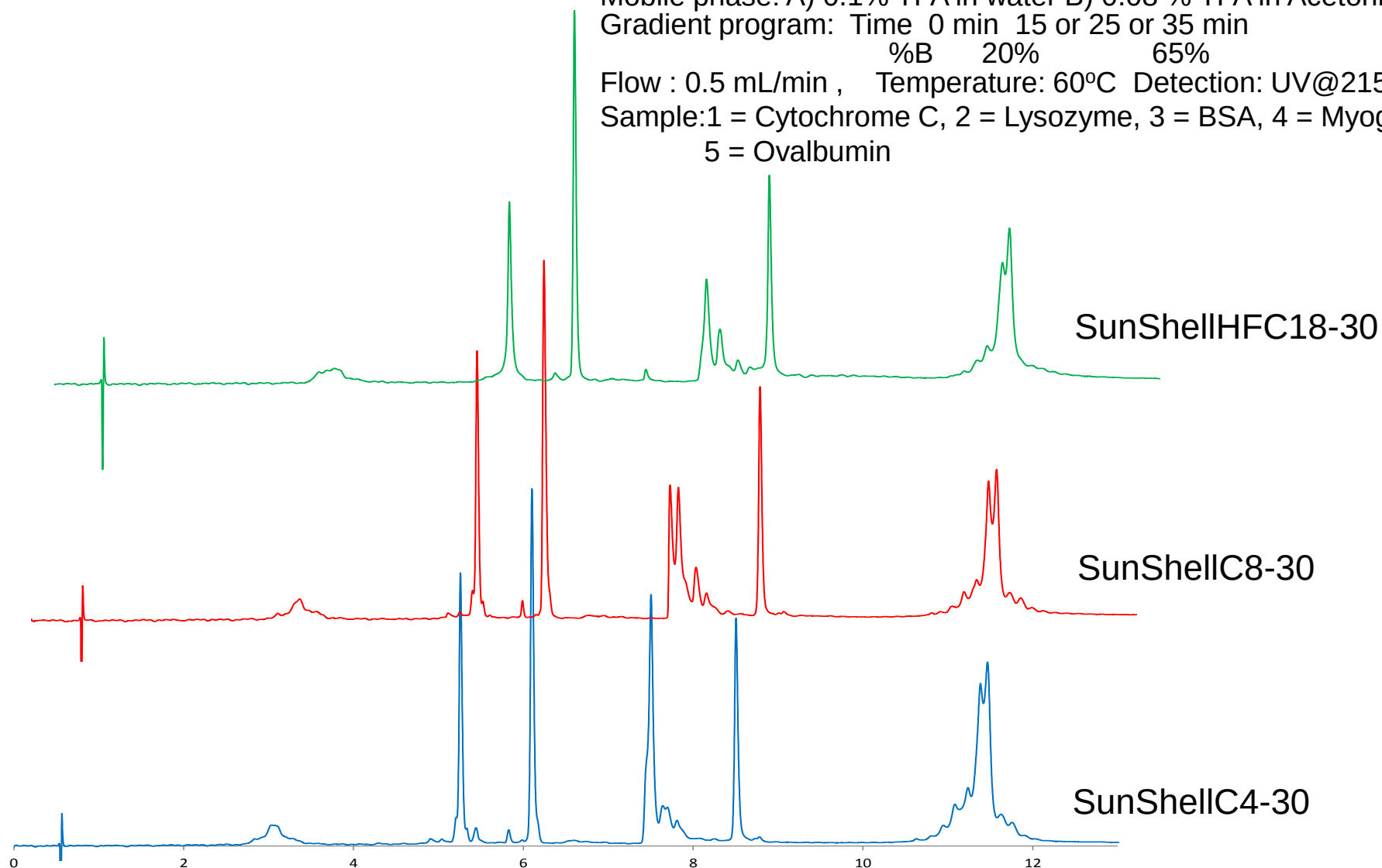
Gradient program: Time 0 min 15 or 25 or 35 min

%B 20% 65%

Flow : 0.5 mL/min , Temperature: 60°C Detection: UV@215 nm,

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

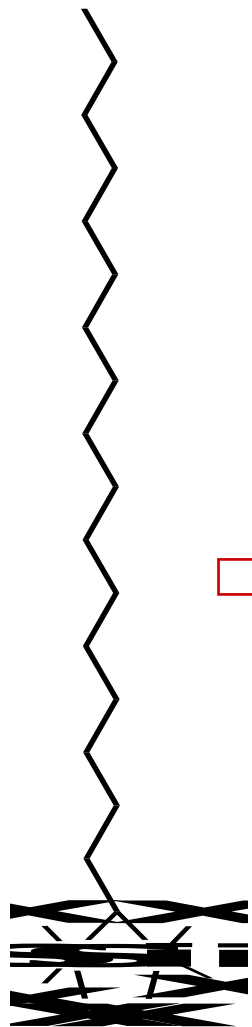
5 = Ovalbumin





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

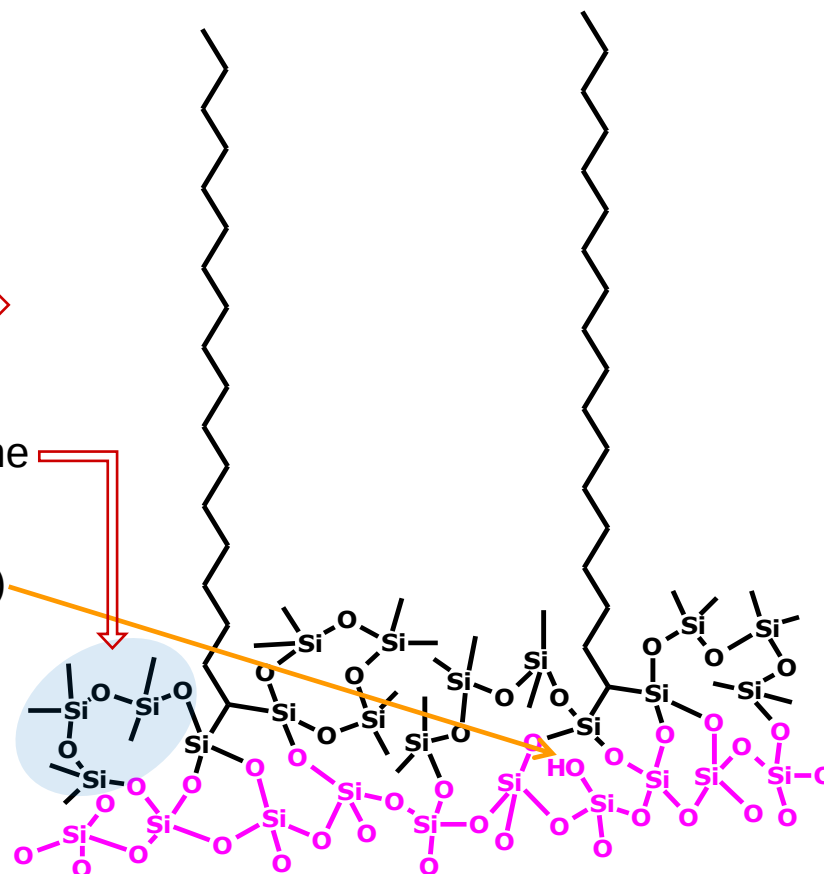


(X: Cl, OCH₃, OC₂H₅)

HFC18試薬の概略図



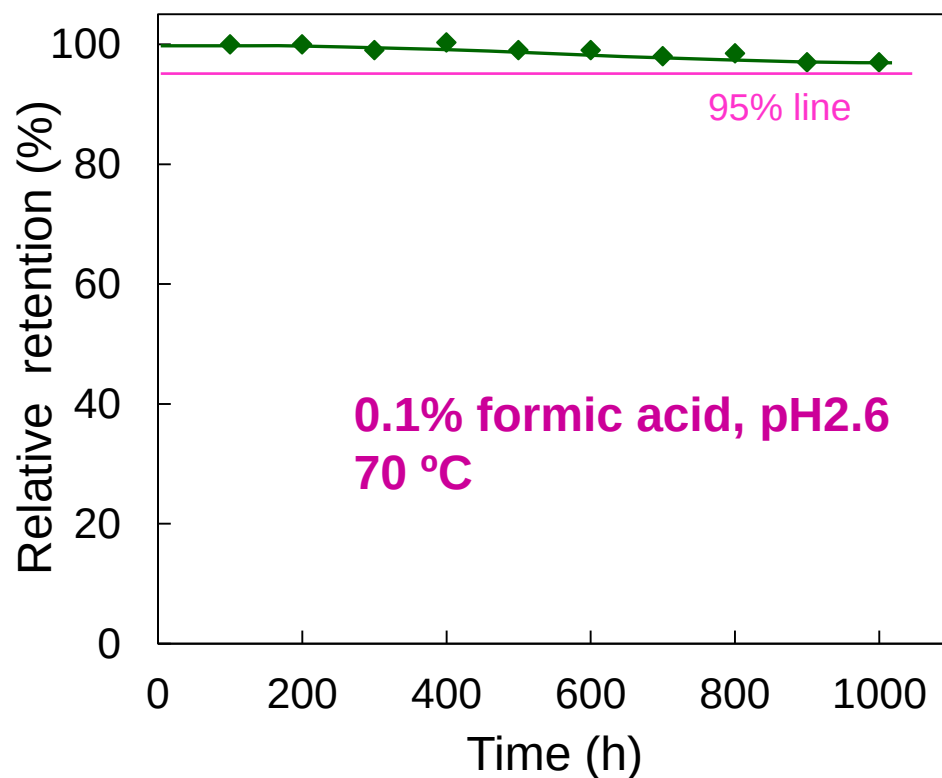
Hexamethyldichlorotrisiloxane
+
Trimethylchlorosilane (TMS)



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



グラジエントの違いによる分離の変化

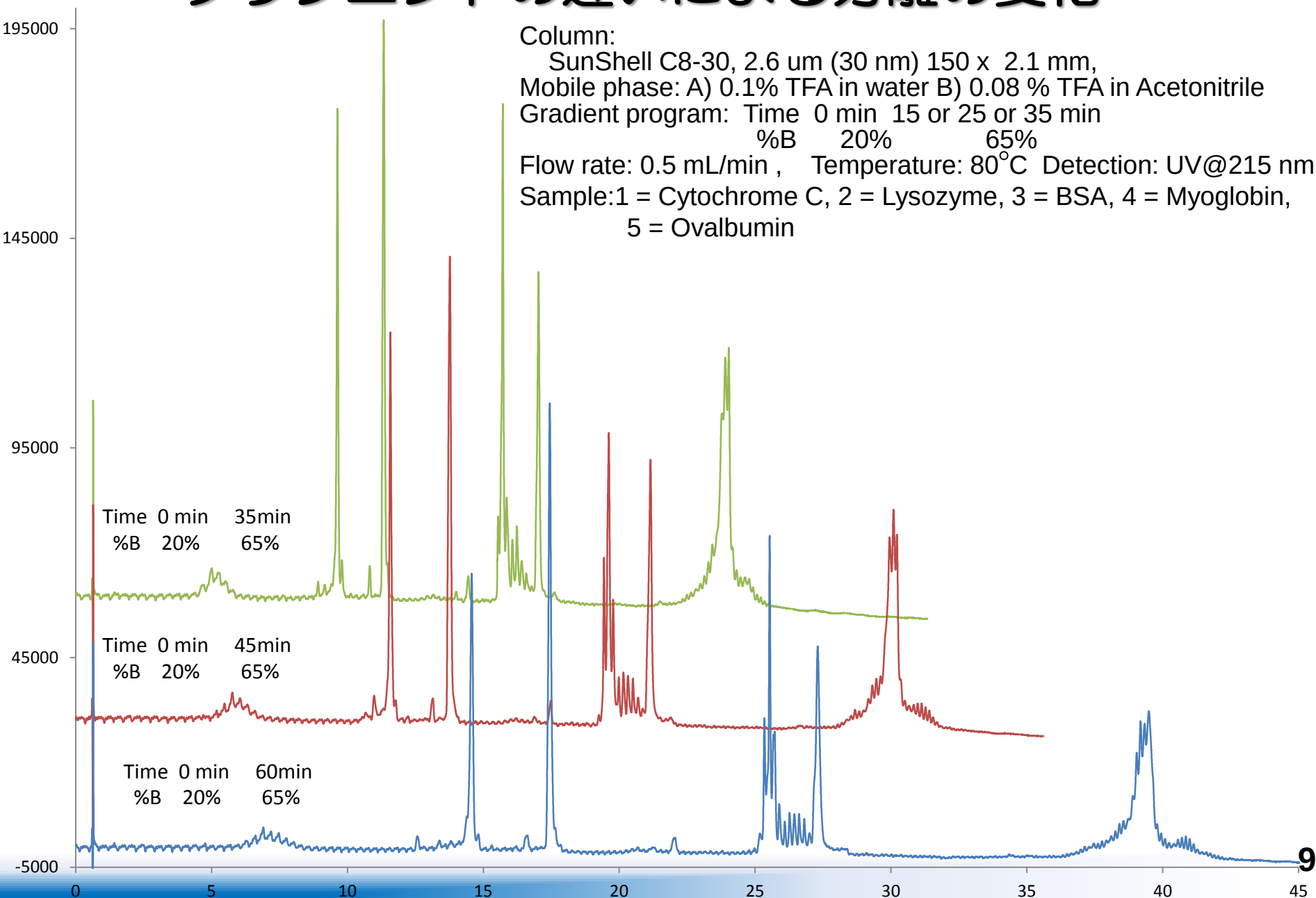
Column:

SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm) 150 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 25 or 35 min
%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min , Temperature: 80°C Detection: UV@215 nm,

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





多孔質相の厚さが異なるコアシェルカラムの比較 1

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

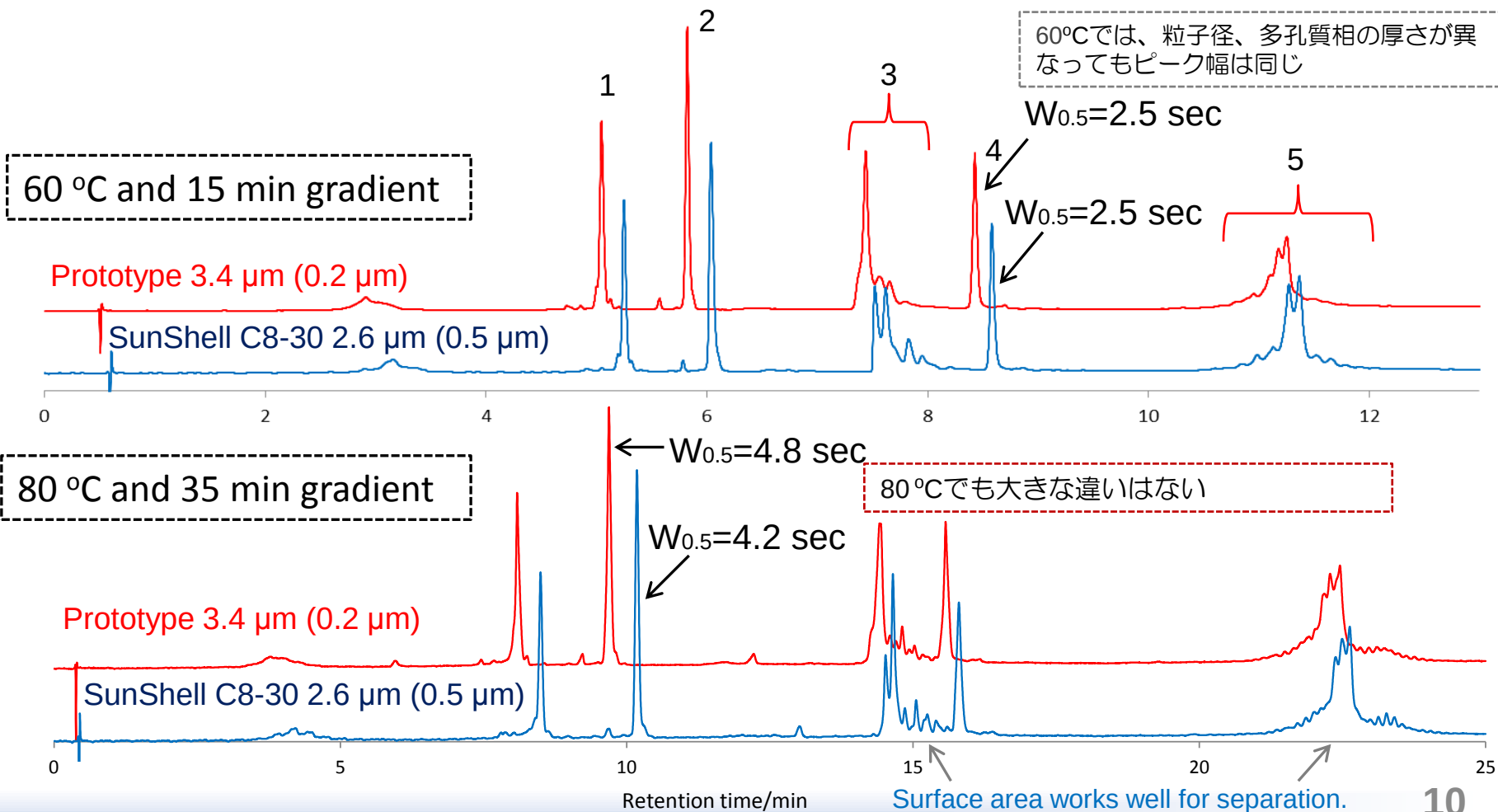
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 15 or 35 min

%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 60 or 80 $^{\circ}\text{C}$, Detection: UV@215 nm,

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





多孔質相の厚さが異なるコアシェルカラムの比較2

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

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

Gradient program: Time 0 min 5 or 35 min

%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 60 or 80 $^{\circ}\text{C}$, Detection: UV@215 nm,

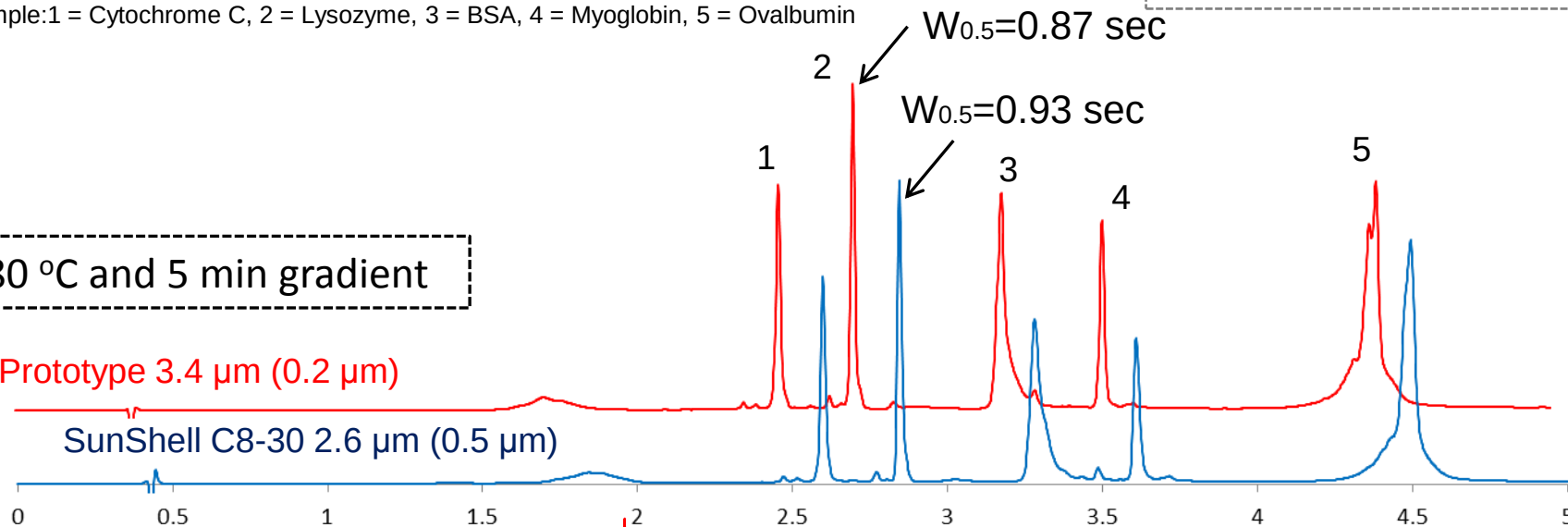
Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

高速分離においては多孔質相が薄いほうが分離が良好

80 $^{\circ}\text{C}$ and 5 min gradient

Prototype 3.4 μm (0.2 μm)

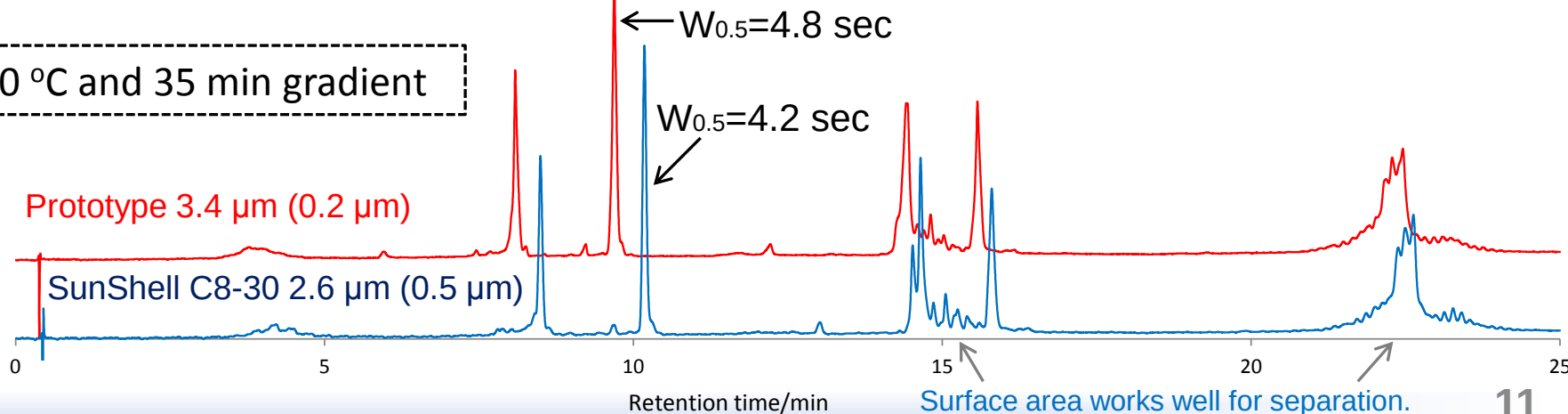
SunShell C8-30 2.6 μm (0.5 μm)



80 $^{\circ}\text{C}$ and 35 min gradient

Prototype 3.4 μm (0.2 μm)

SunShell C8-30 2.6 μm (0.5 μm)





多孔質相の厚さが異なるコアシェルカラムの比較 3

Column:

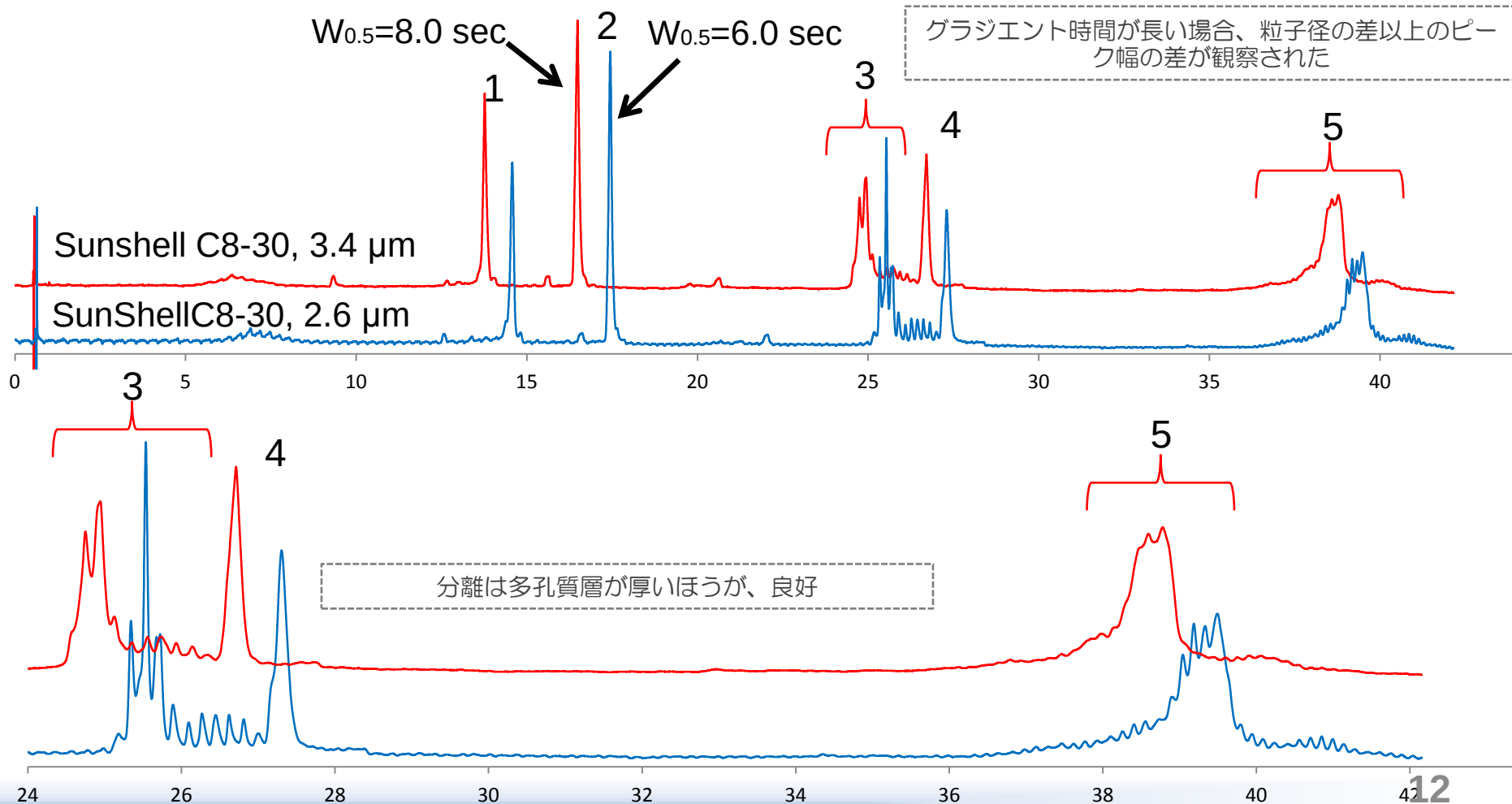
SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm, 0.5 μm layer) 150 x 2.1 mm, Sunshell C8-30, 3.4 μm (30 nm, 0.2 μm layer) 150 x 2.1 mm (prototype)

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

Gradient program: Time 0 min 60 min
%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 80°C Detection: UV@215 nm,

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





まとめ

- 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。
- 特にグラジエント時間が長い分析では、多孔質層が厚い粒子での分離が良好であった。
- 溶出の速いグラジエント条件下においては、多孔質層が薄い粒子が有用であった。
- LC-MSを想定した耐酸試験において、HFC18カラムは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。