

日本薬学会第138年会

コアシェルカラムを用いる ペプチド・タンパク質の分離

(クロマニックテクノロジーズ)

長江 徳和, 塚本友康, 佐藤誠

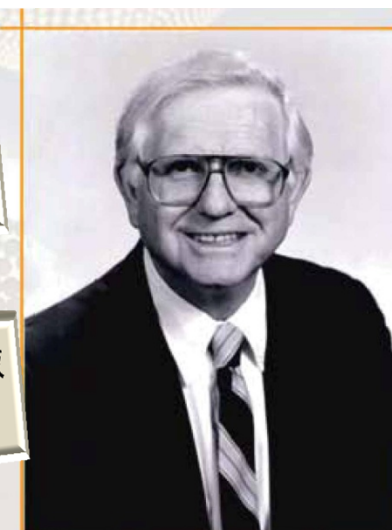
コアシェル型シリカの歴史

1969年カーランドにより発表されたHPLCで使用されていた充填剤 - 直径 $30\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層

1967・1968年に基本特許は出願されている。

2000年にカーランドらにより発表¹ タンパク質の高速分離用充填剤 - 直径 $4.5\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.25\mu\text{m}$ の多孔質層 (細孔径 30nm)

2007年三度カーランドらにより発表², 全多孔性sub $2\mu\text{m}$ 充填剤に匹敵する充填剤 - 直径 $1.7\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層 (細孔径 9nm)



• Fused-Core technology was developed by Jack Kirkland.

(1) J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, and G.S. Engel, J. Chromatogr., A 890, 3–13 (2000).

(2) J.J. Kirkland, T.J. Langlois, and J.J. DeStefano, Am. Lab. 39, 18–21 (2007).

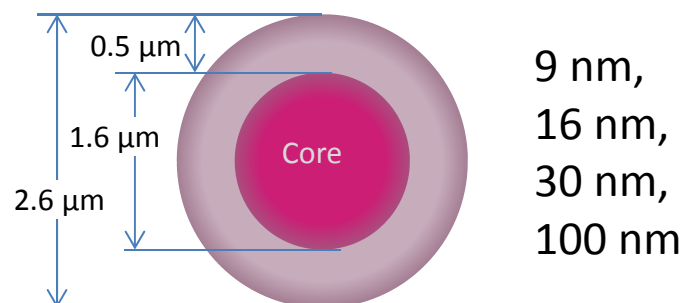
2007年に微小粒子の製造法の特許が出願された。

コアシェルカラム

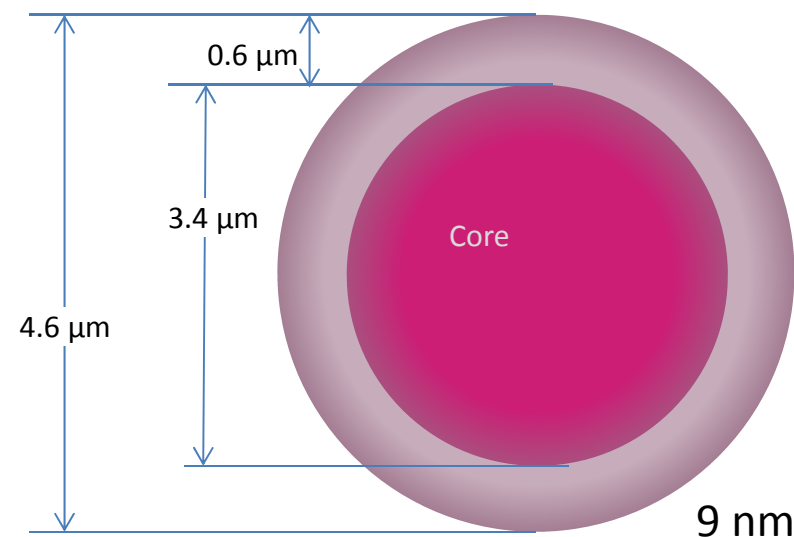
	Manufacturer	Brand	Particle size (μm)	Porous layer thickness (μm)	Pore diameter (nm)	Surface area (m ² /g)	Bonded phase
1	Advanced Chromatography Technologies	UltraCore	2.5, 5		9.5	130	C18, Phenyl-hexyl
2	Advanced Mterials Technologies	HALO	2.0, 2.7, 3.4, 4.6	0.4, 0.5, 0.2, 0.6	9, 16, 40, 100	120, 135, 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, 30	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	0.4, 0.5, 0.4, 0.6	9, 12, 16, 30, 100	150, 90, 40, 15	C18, RP-AQUA, C8, PFP, Pphenyl-Hexyl, 2-Ethylpyridine, 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, 30	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	0.4, 0.5, 0.2, 0.6	9, 16, 40,	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, Cholesterol, Pentabromobenzyl
14	Perkin Elmer	Brownlee SPP	2.7	0.5	9, 16		C18, C8, Phenyl-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, 20	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	Shiseido	Capcell Core	2.7	0.5	9, 16, 30	150	C18, AQ, Adamantyl, Phosphocholine, PFP
19	SIELC Technologies	Coresep	2.7		9		Mixed mode: RP + cation exchange, aRP + anion exchange, HILIC + ion exchange
20	Thermo Scientific	Accucore	2.6, 4		8, 15	130	C18, C8, AQ, Phenyl-Hexyl, Phenyl, C30, PFP
21	Waters	Cortecs	1.6, 2.7	0.26	9	100	C18, C8, Phenyl-Hexyl, HILIC
22	Welch	Boltimate	2.7	0.5	9	120	C18, Phenyl-Hexyl, PFP, HILIC
23	YMC	Meteoric Core	2.7	0.5	8, 16	150, 90	C18, C8

コアシェル粒子 (クロマニクテクノロジーズ)

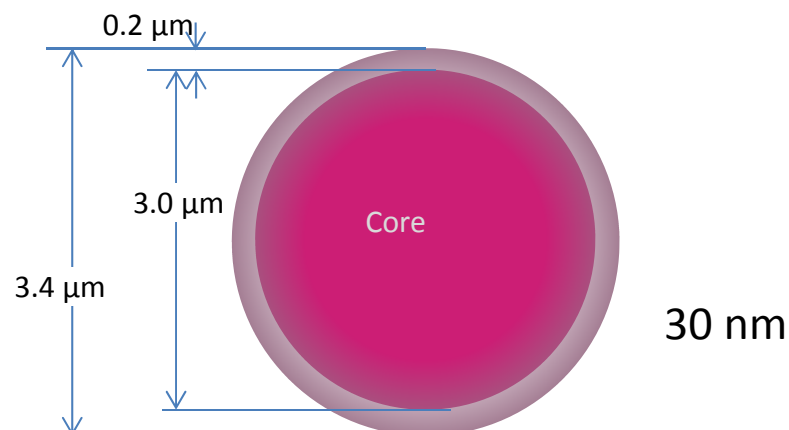
2.6 μm



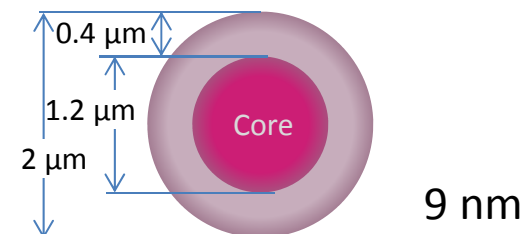
5 μm for routine



3.4 μm for protein



2 μm

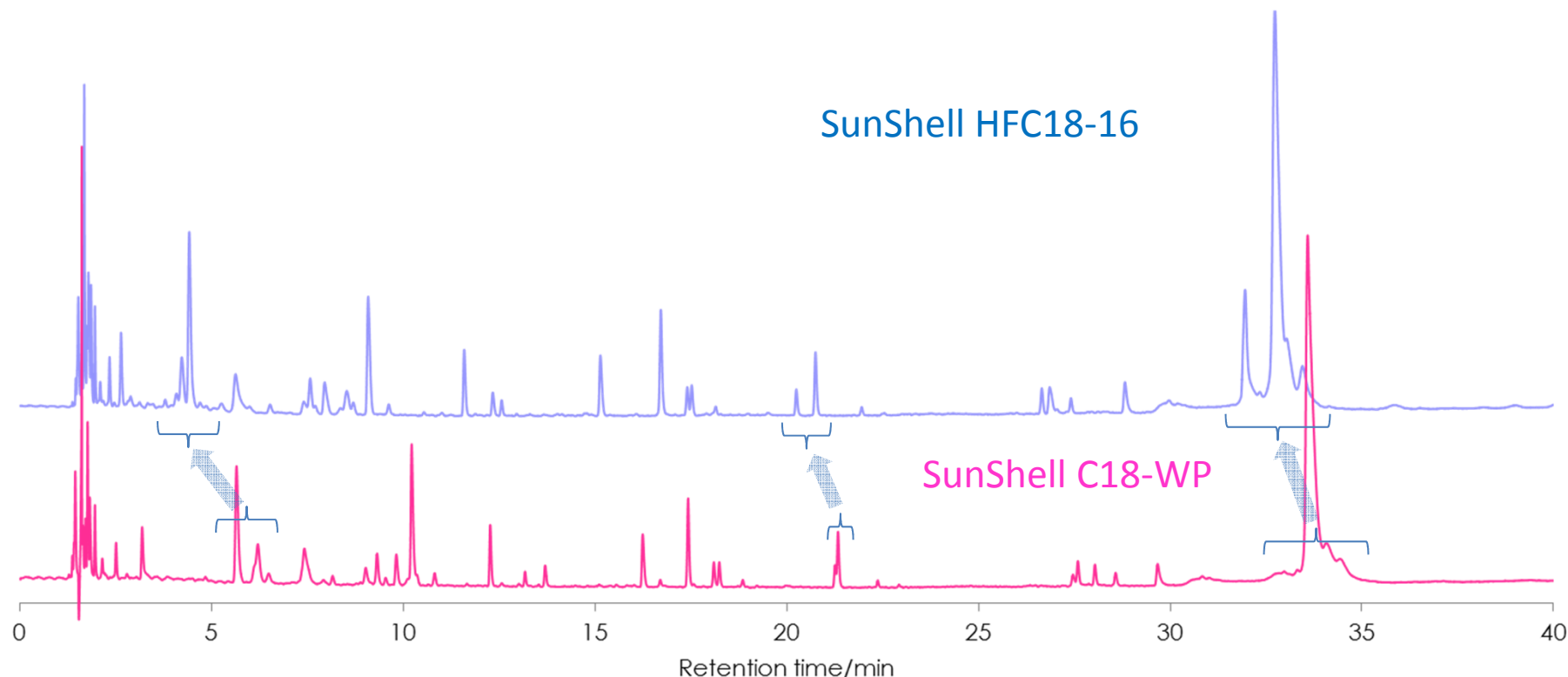


ペプチド分離用コアシェルカラム

	P/N	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	Surface coverage	End-capping
SunShell C18-WP 4.6 x 150 mm	CW6471	16 nm	90 m ² /g	5%	2.5 μmol/m ²	Yes
SunShell HFC18-16 4.6 x 150 mm	CG6471	16 nm	90 m ² /g	2.5%	1.2 μmol/m ²	Yes
SunShell RP-AQUA 4.6 x 150 mm	CR6471	16 nm	90 m ² /g	4%	1.2 μmol/m ²	Yes

Particle diameter is 2.6 μm for all.

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 μ m (16 nm) 150 x 4.6 mm,

SunShell C18-WP, 2.6 μ m (16 nm) 150 x 4.6 mm

Mobile phase: A) 0.1% TFA in Acetonitrile/water(10:90)

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

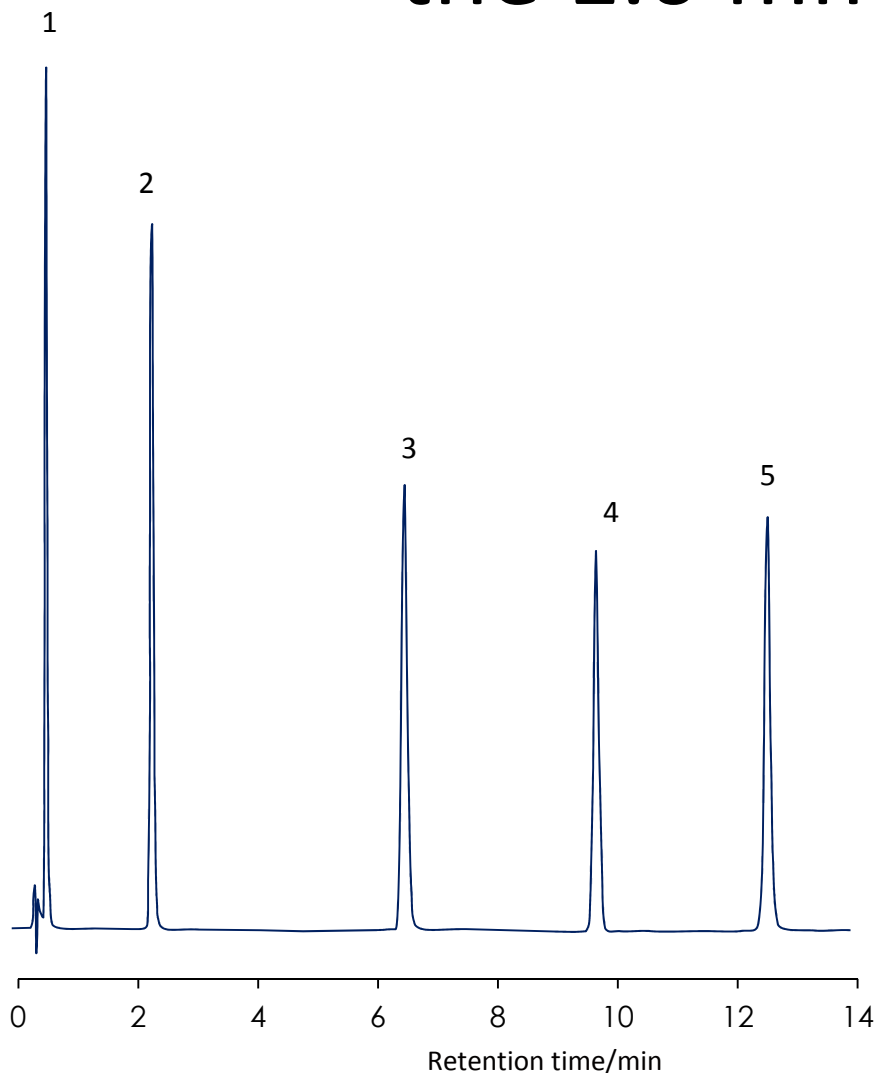
Gradient program:

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

Separation of peptides using the 1.0 mm i.d. column



Column: SunShell RP-AQUA (16 nm), 2.6 μ m 100 x 1.0 mm

Mobile phase: A) 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) in water

B) 0.08 % trifluoroacetic acid (TFA) in acetonitrile
%B 10% to 30% in 25 min

Flow rate: 0.15 mL / min

Temperature: 60 °C

Detection: UV@214 nm

Sample: 1 = Gly-Tyr, 2 = Val-Tyr-Val, 3 = Met enkephalin,

4 = Leu enkephalin, 5 = Angiotensin II

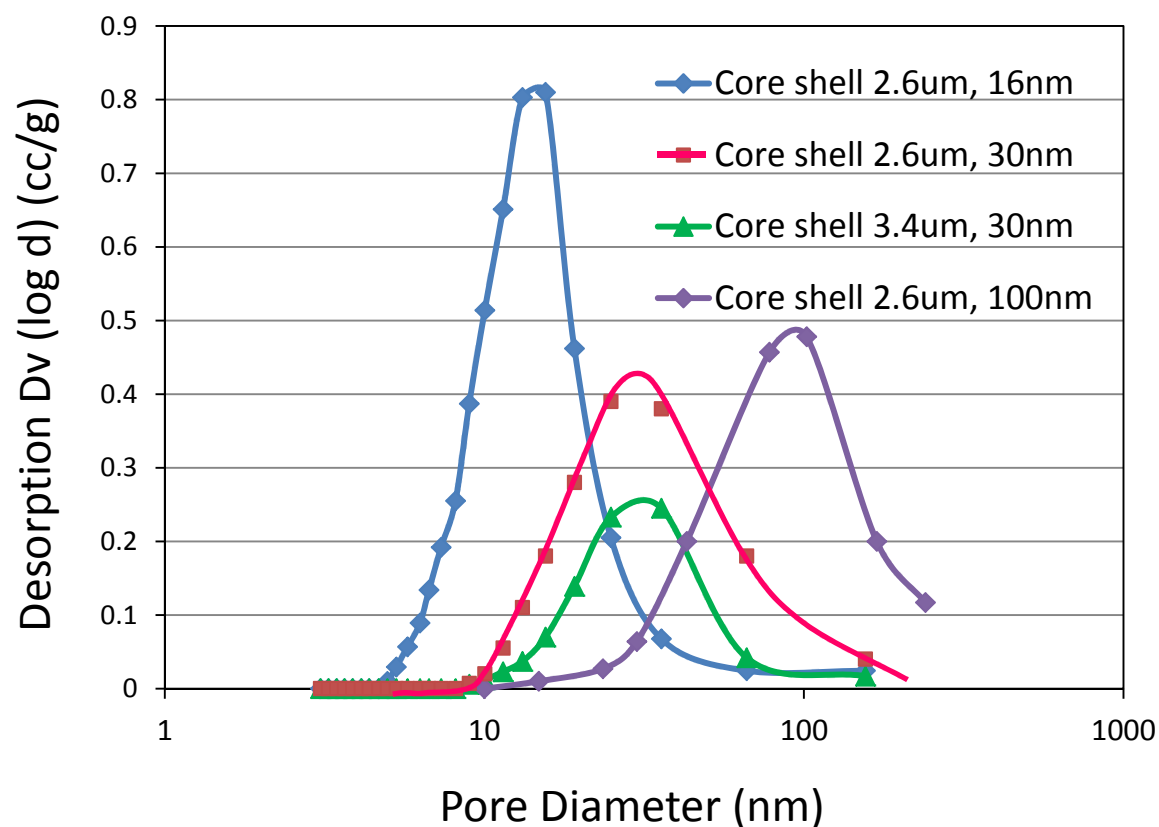
(HPLC peptide standard mixture by Sigma-Aldrich)

UHPLC instrument: Jasco X-LC

高分子分離用コアシェルカラム (タンパク質用)

	P/N	Particle size	Core diameter	Thickness of porous layer	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	Surface coverage	End-capping
SunShell C4-100 2.1 x 100 mm	C66961	2.6 μm	1.6 μm	0.5 μm	100 nm	22 m^2/g	0.6%	3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C4-30 4.6 x 150 mm	C26961	2.6 μm	1.6 μm	0.5 μm	30 nm	40 m^2/g	0.9%	3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C8-100 2.1 x 100 mm	C76961	2.6 μm	1.6 μm	0.5 μm	100 nm	22 m^2/g	0.9%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C8-30 2.1 x 100 mm	C36961	2.6 μm	1.6 μm	0.5 μm	30 nm	40 m^2/g	1.2%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C8-30HT 2.1 x 100 mm	C56961	3.4 μm	3.0 μm	0.2 μm	30 nm	15 m^2/g	0.5%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes

コアシェル粒子の細孔分布



タンパク質分離 温度の影響

Column:

SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm) 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 min

%B 20% 65%

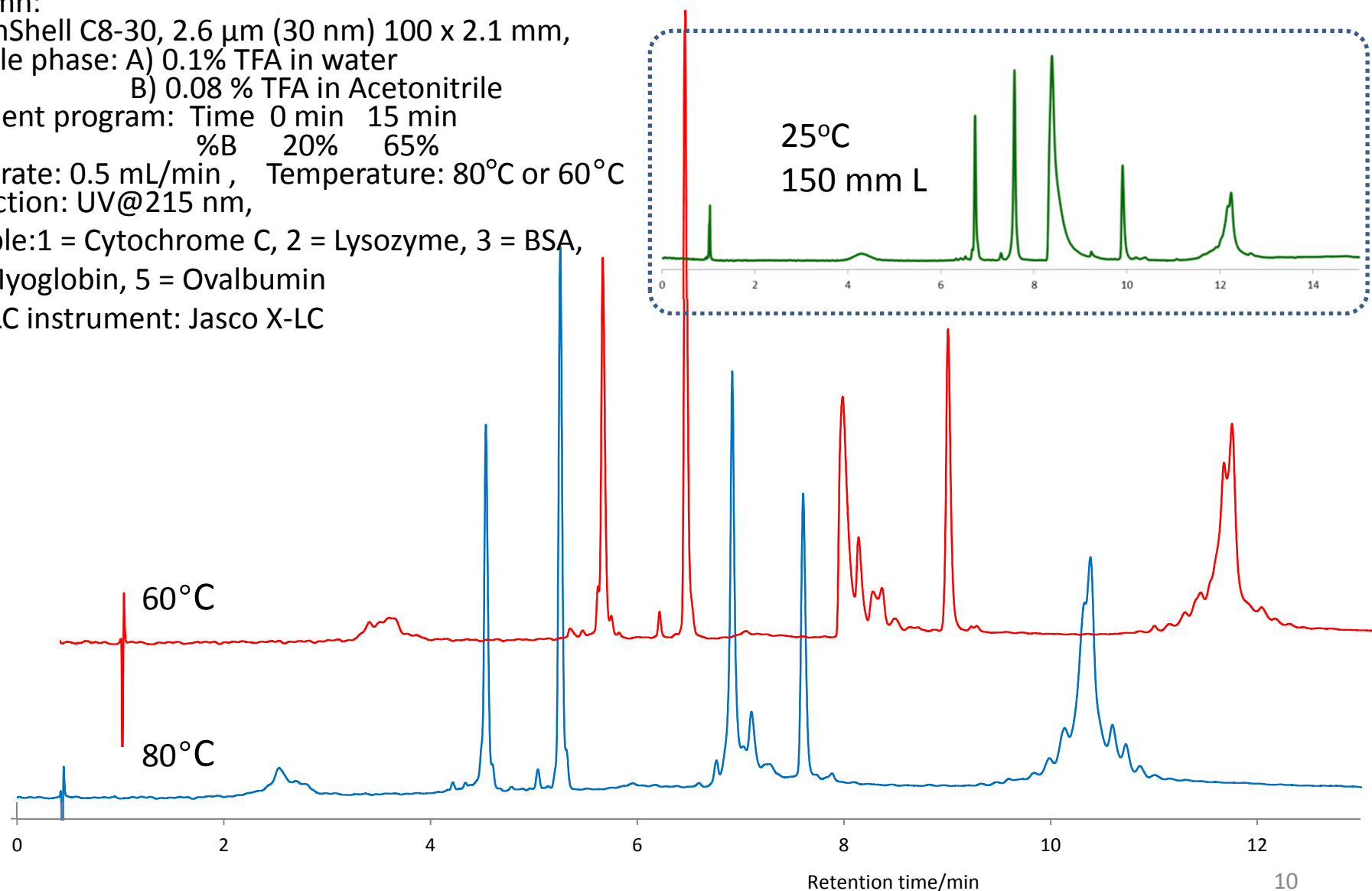
Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 80°C or 60°C

Detection: UV@215 nm,

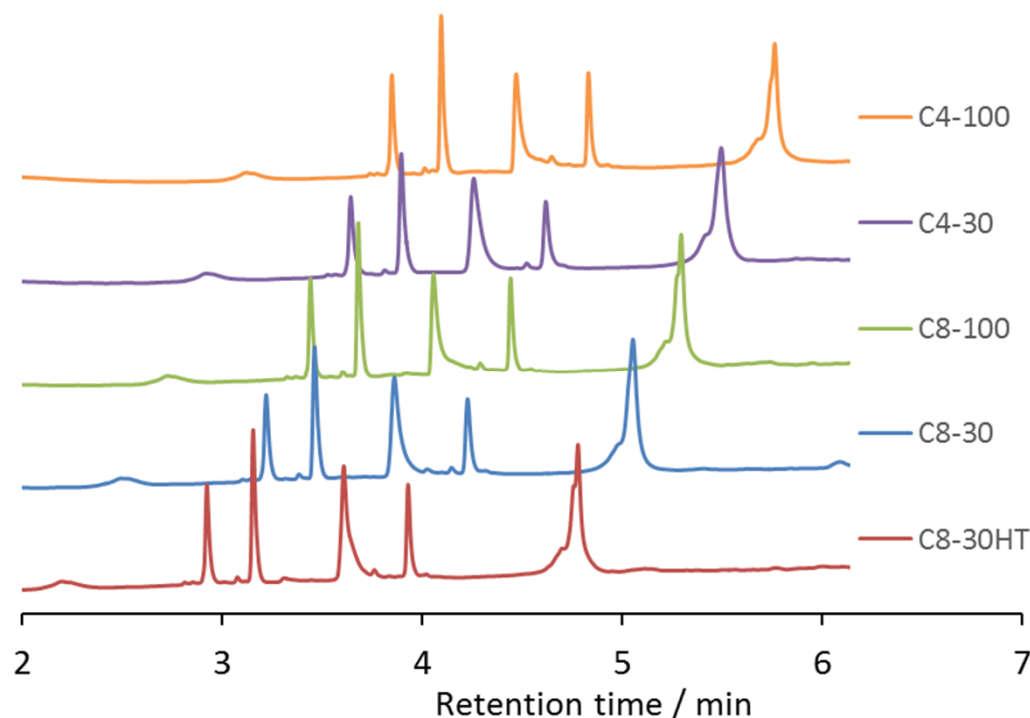
Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA,

4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

UHPLC instrument: Jasco X-LC



標準タンパク質の分離(5min)



Column:

SunShell C4-100, 2.6 μ m (100 nm) 100 x 2.1 mm,
SunShell C4-30, 2.6 μ m (30 nm) 100 x 2.1 mm,
SunShell C8-100, 2.6 μ m (100 nm) 100 x 2.1 mm,
SunShell C8-30, 2.6 μ m (30 nm) 100 x 2.1 mm,
SunShell C8-30HT, 3.4 μ m (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 μ L

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

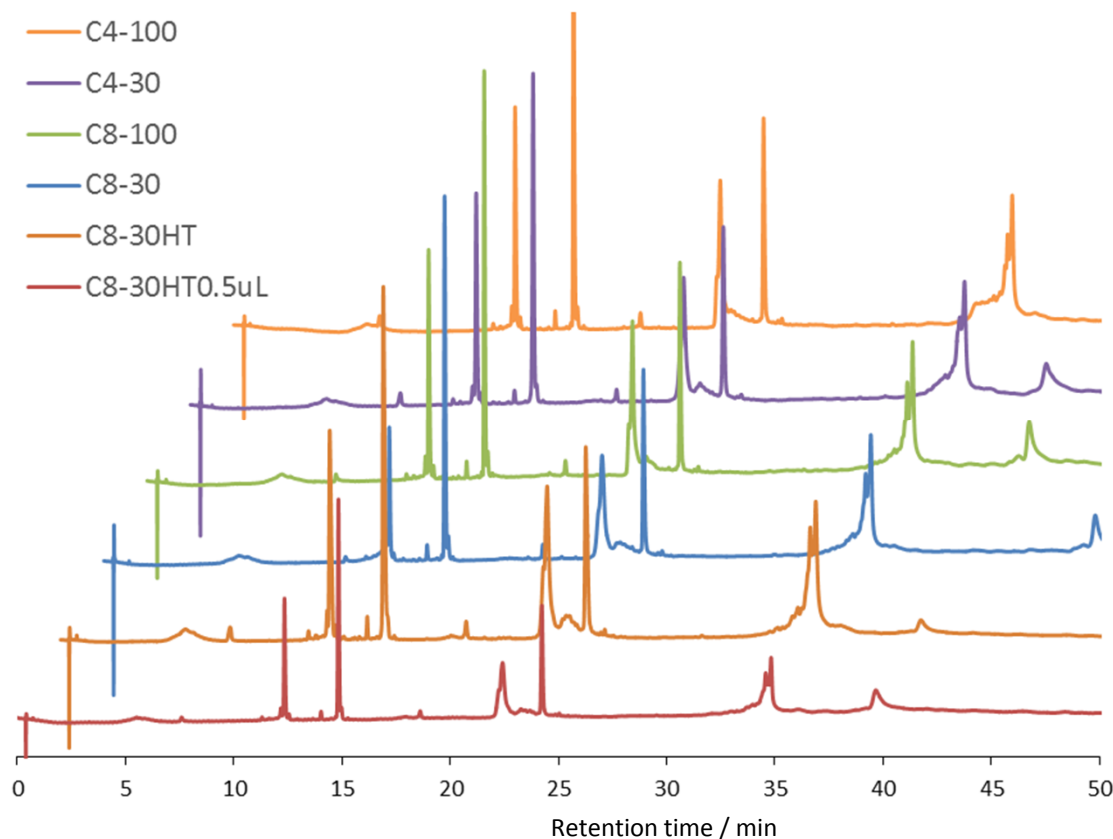
4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

UHPLC instrument: HITACHI Chromaster

ピーク幅(W0.5, min)

	C4-100	C4-30	C8-100	C8-30	C8-30HT	試料濃度
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%
Ovalbmin	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

%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,

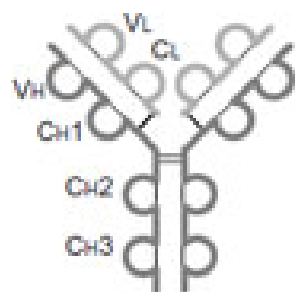
4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

UHPLC instrument: HITACHI Chromaster

ピーク幅(W0.5, min)

	C4-100	C4-30	C8-100	C8-30	C8-30HT	C8-30HT 0.5uL	試料濃度
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%
Ovalbmin	0.391	0.889	0.247	0.428	0.184	0.176	0.050%

細胞培養によって得られた精製抗体 (IgG) の分離



Mobile phase: A) water/TFA (100/0.1)
B) acetonitrile/TFA (100/0.085)
30-45%B (0-30 min)

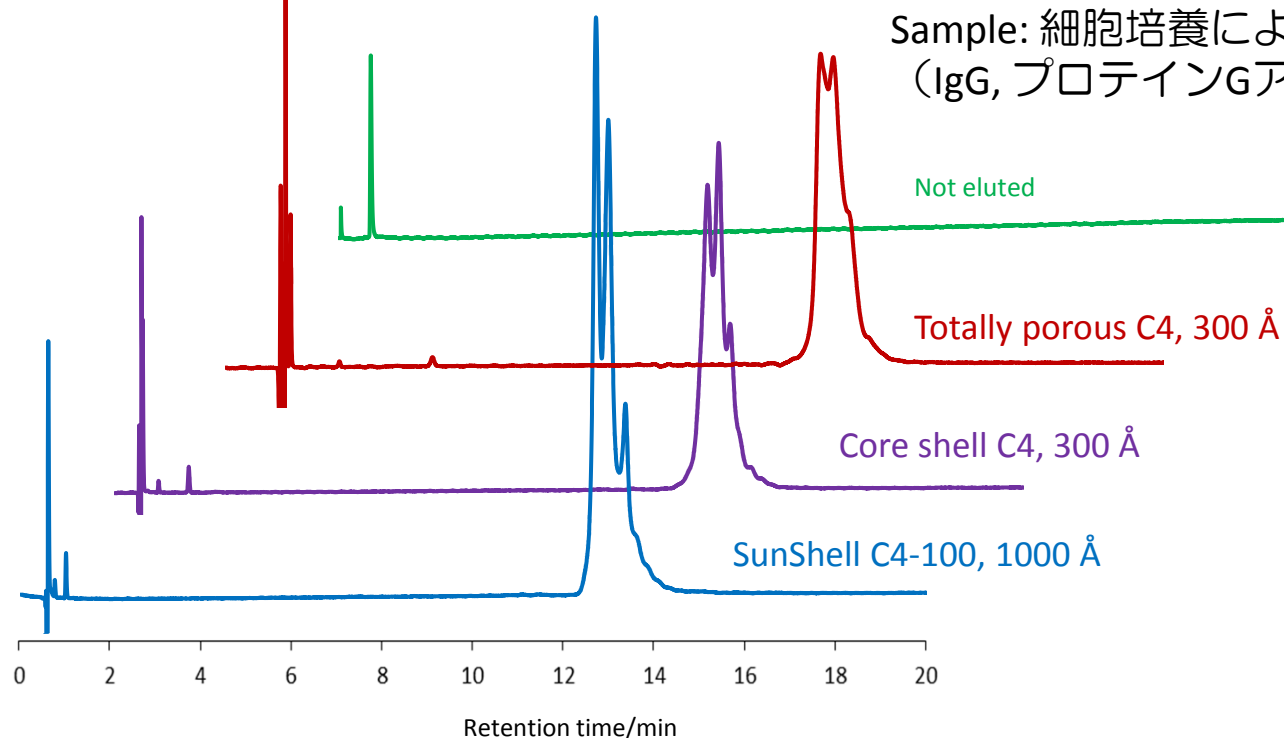
Flow rate: 0.4 mL/min

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)



Core shell C8, 300 Å

この移動相条件の場合、C8
カラムではIgGは溶出しない

2-プロパノールを移動相に添加したIgGの分離

Mobile phase: A) water/TFA (100/0.1)
B) acetonitrile/2-propanol/TFA (80/20/0.085)
15%B (0-0.5 min) and 15-50%B (0.5-50 min)

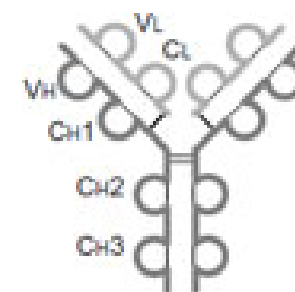
Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 80 °C

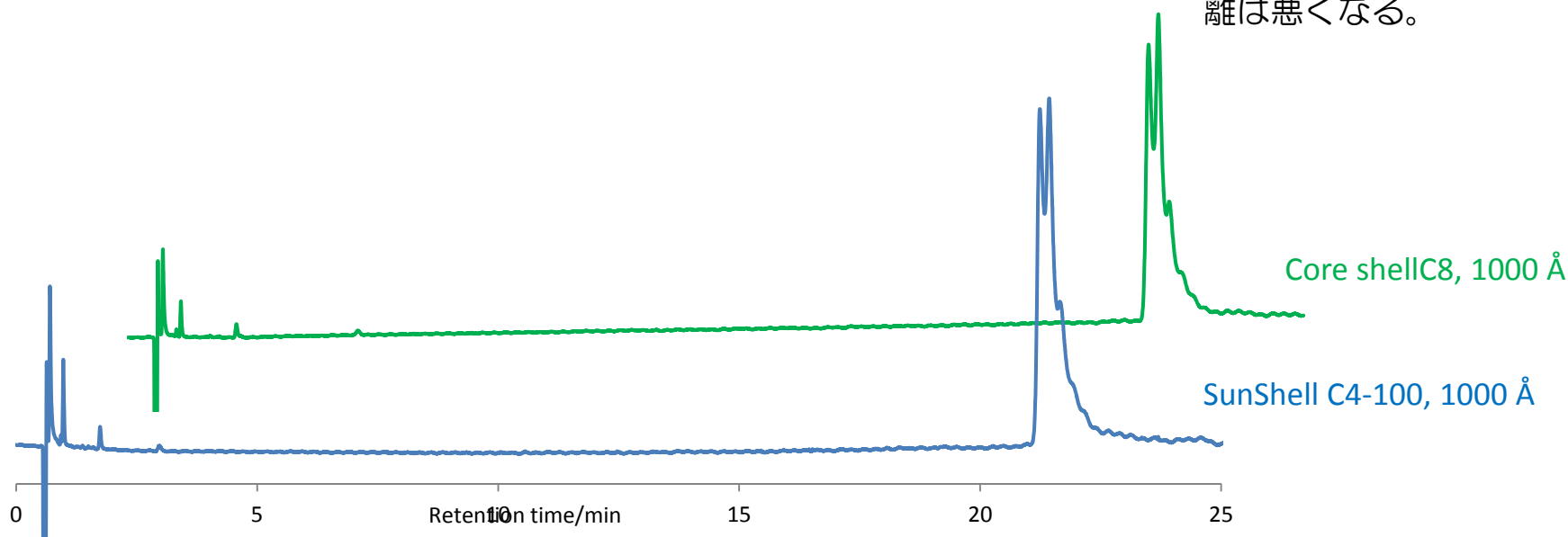
Detection UV at 215 nm

Injection 5 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)



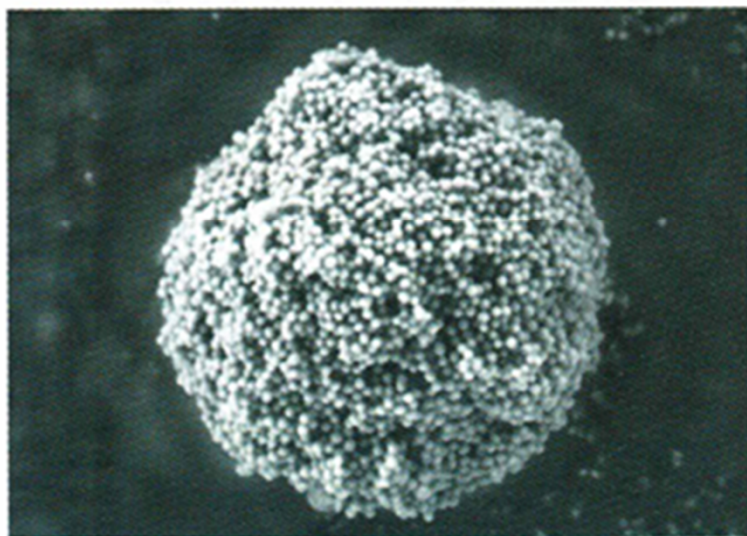
2-プロパノールはC8カラムでもIgGを溶出させるが、分離は悪くなる。



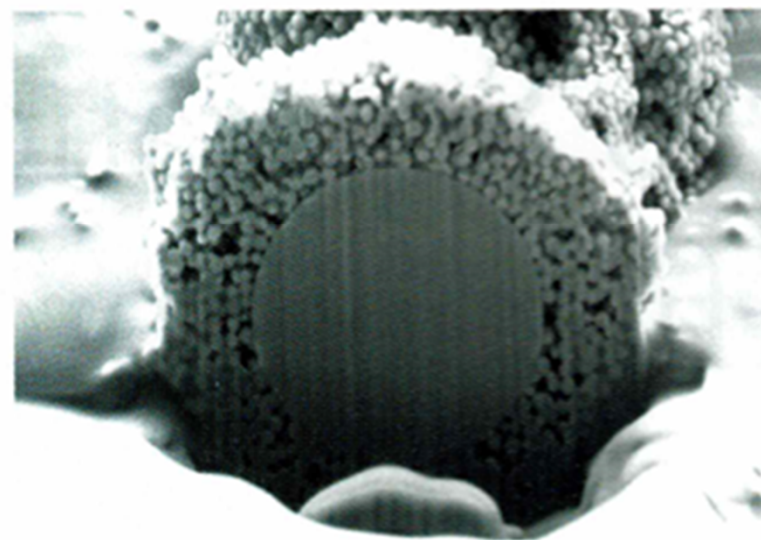
細孔径100nmの コアシェルシリカ

CHROMATOGRAPHY
TODAY February / March 2017

A



B



A: SEM image of a 2.7 μm superficially porous 1000Å particle. B: FIB image of a 1000Å SPP showing the 1.7 μm core with 0.5 μm shell.

- ★直径0.1 μm のシリカ一次粒子から多孔質層が形成されている。
- ★粒子径0.1 μm のノンポーラス充填剤と同等な分離ができ、カラム圧は2.7 μm 粒子相当になる。
- ★したがって、粒子径0.1 μm のカラムに比べ、2.7 μm のカラムは 1/700の背圧になる。

まとめ

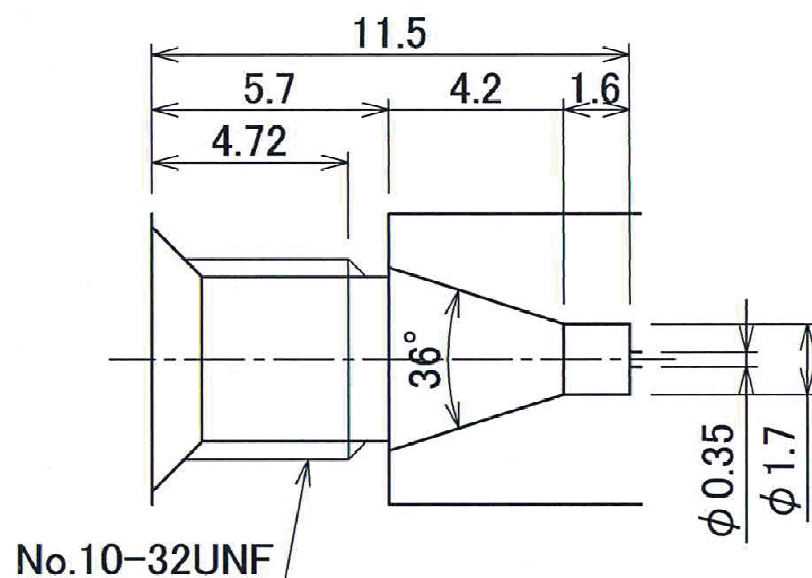
- ✓コアシェル粒子は表面に多孔質層が存在し、この層が0.5 μm 以下であり、拡散の遅い高分子の移動距離が全多孔性粒子よりも短く、短時間で平衡化されるため、分離が改善される。
- ✓モノクロナール抗体のような分子量が15万を超える試料は、100nmの細孔径が有利に働く。
- ✓C4固定相は試料の吸着が少なく、2-プロパノールのような強溶媒を用いなくても分離可能である。

ご静聴ありがとうございました

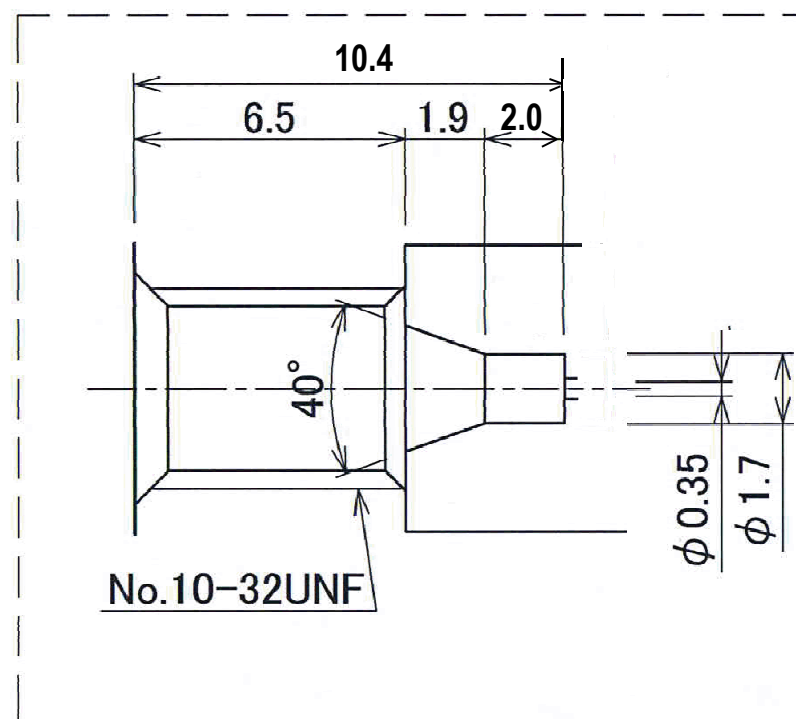


エンドフィッティングの違い

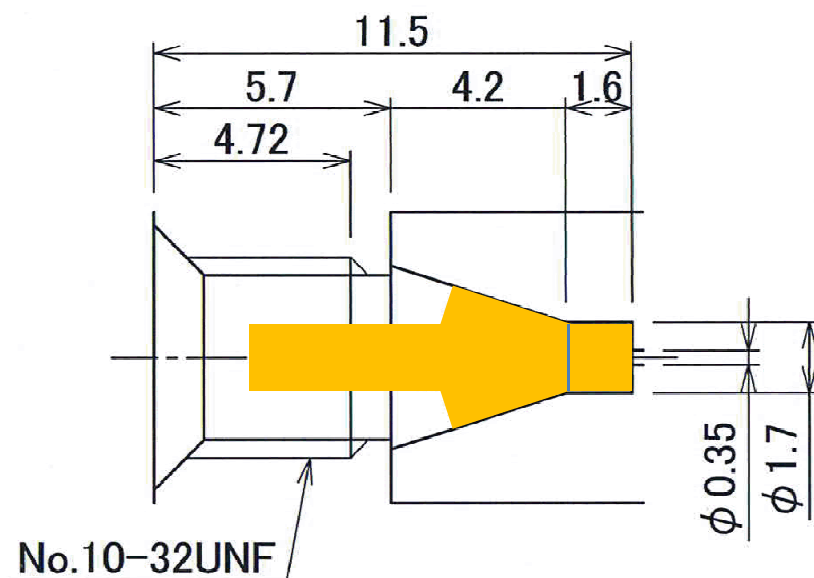
A 社 接続部



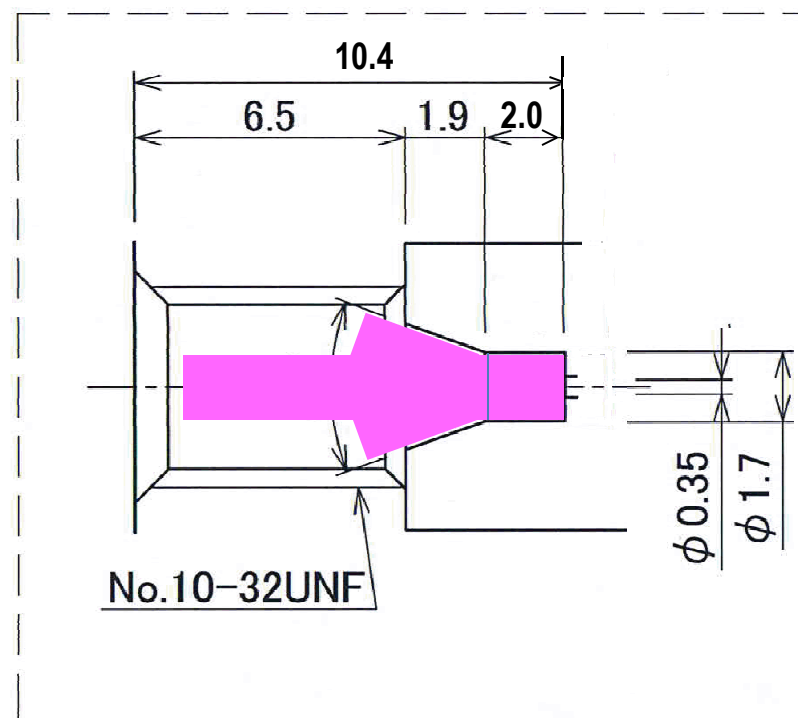
パーカータイプ 接続部
(IDEX社 IsoBar hardware)



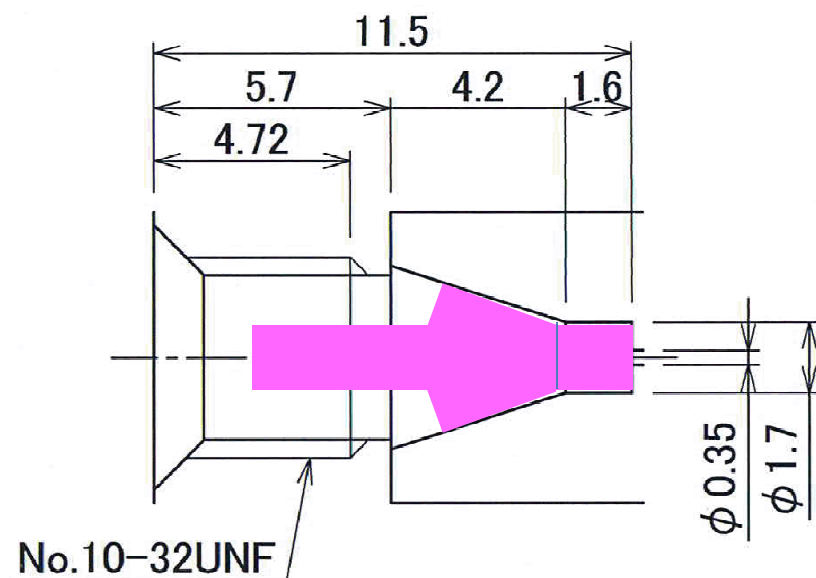
A 社 接続部



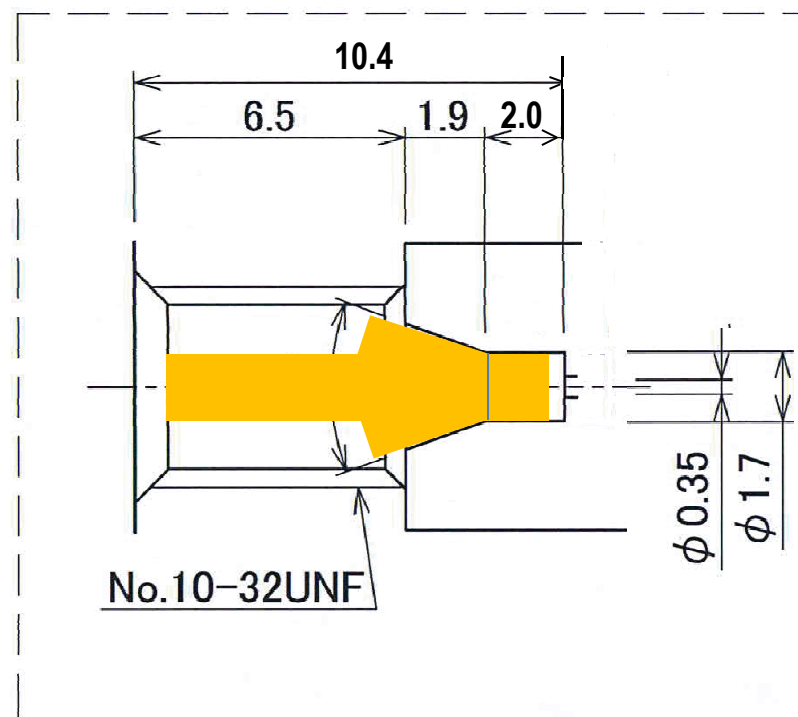
パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar hardware)



A 社 接続部



パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar hardware)



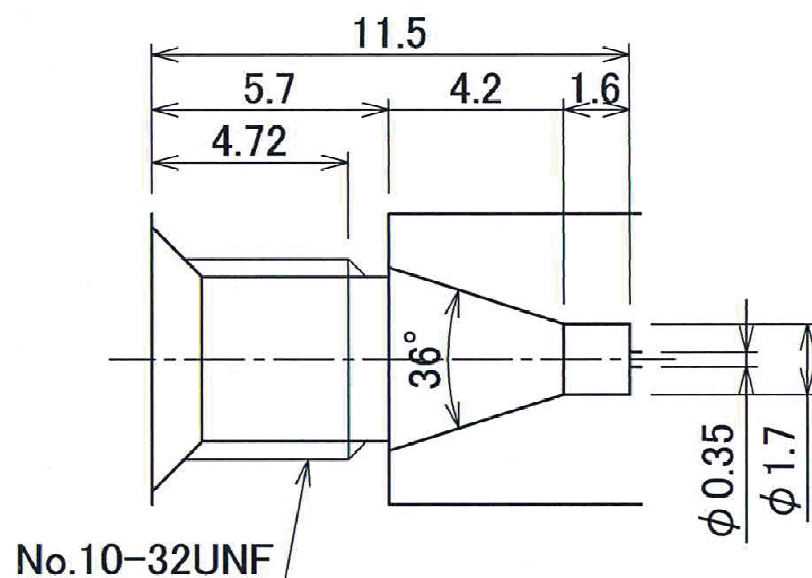
IDEX社 IsoBar と同じ接続のカラム



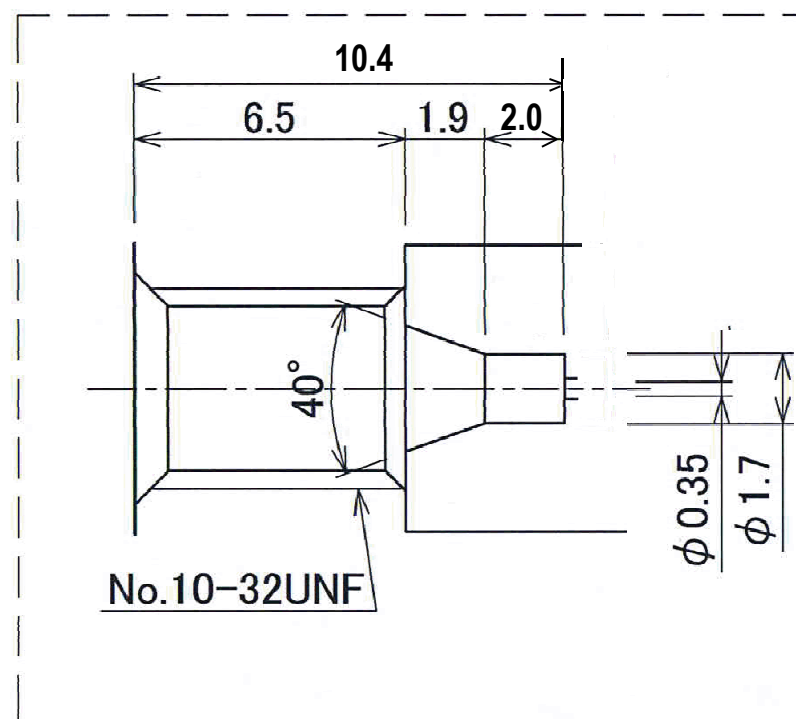
SunShell, Halo, Ascentis Express, Perkin Elmer SPP, Kinetex, CosmoCore, ClassicShell, MeteoricCore, UltraCore, OpalShell, Capcell Core

エンドフィッティングの違い

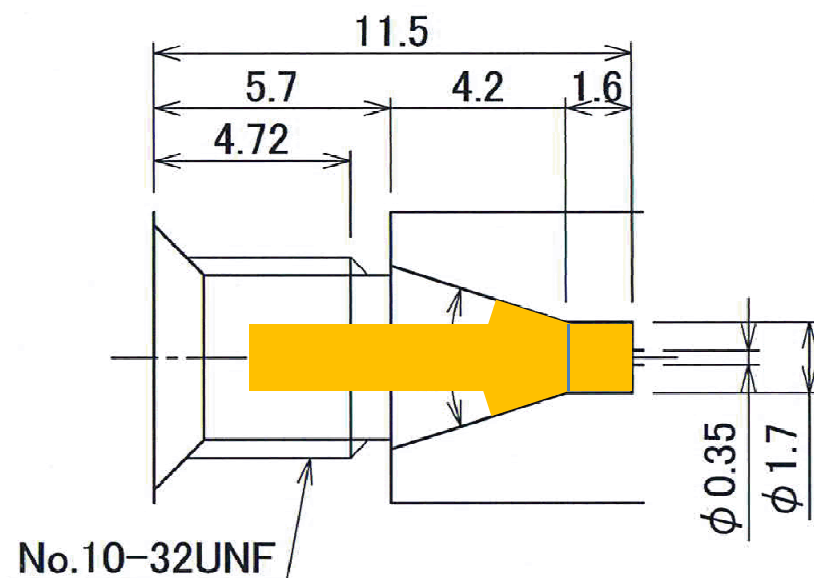
A 社 接続部



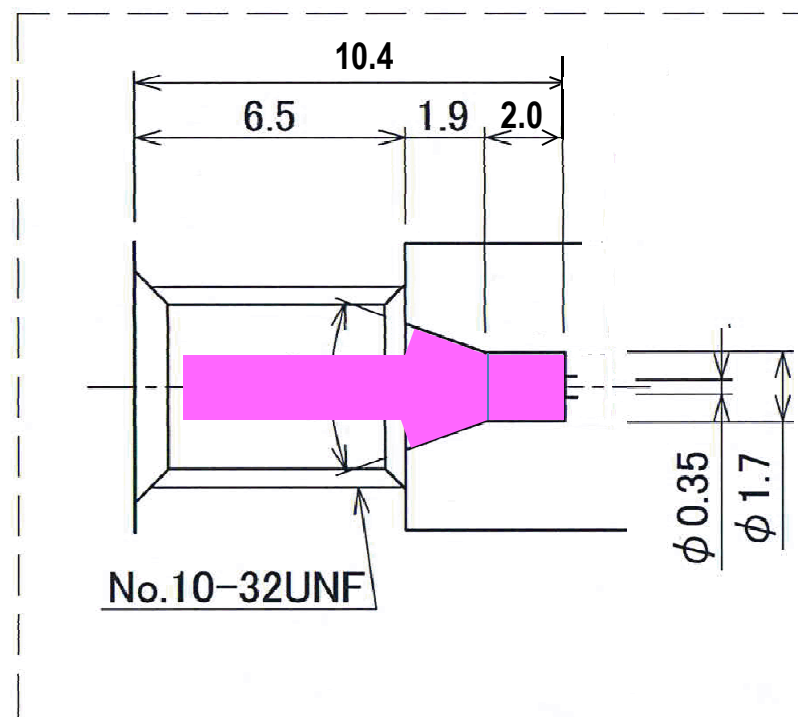
パーカータイプ 接続部
(IDEX社 IsoBar hardware)



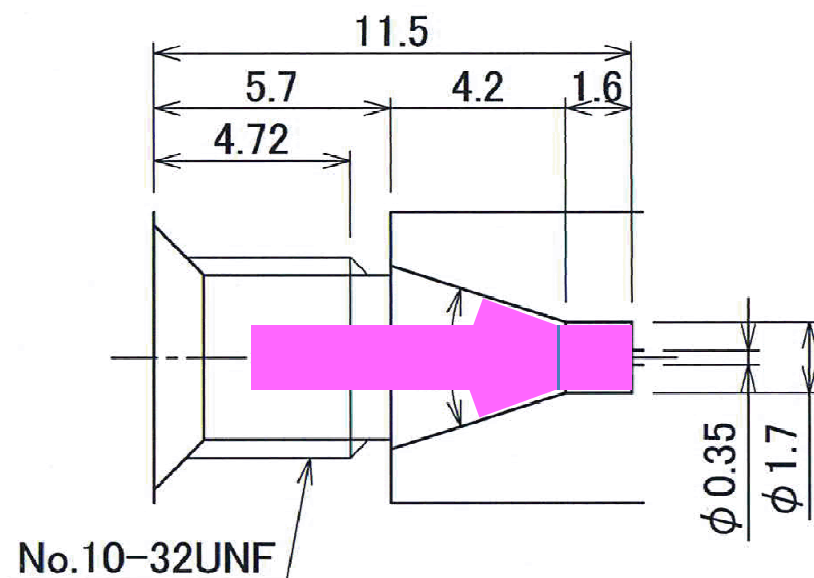
A 社 接続部



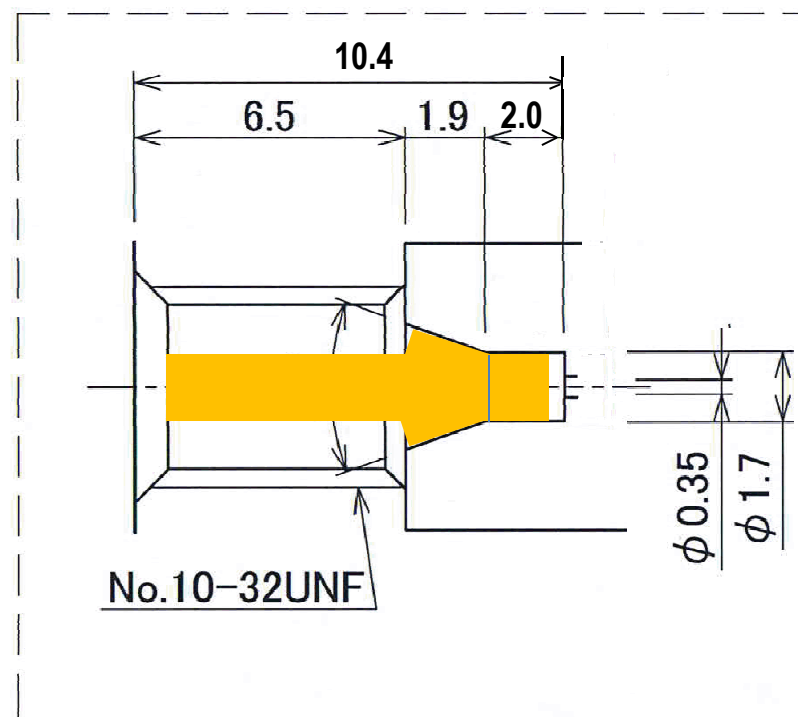
パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar hardware)



A 社 接続部



パーカータイプ 接続部 (IDEX社 IsoBar hardware)



IDEX社IsoBarと同じ接続のカラム



SunShell, Halo, PoroShell,
Ascentis Express, Perkin Elmer SPP,
Kinetex, CosmoCore, ClassicShell,
MeteoricCore, UltraCore, OpalShell,
Capcell Core