

新技術・新製品セミナー
あっと驚くコアシェルでの
タンパク分析：
層の厚さによる 分離比較

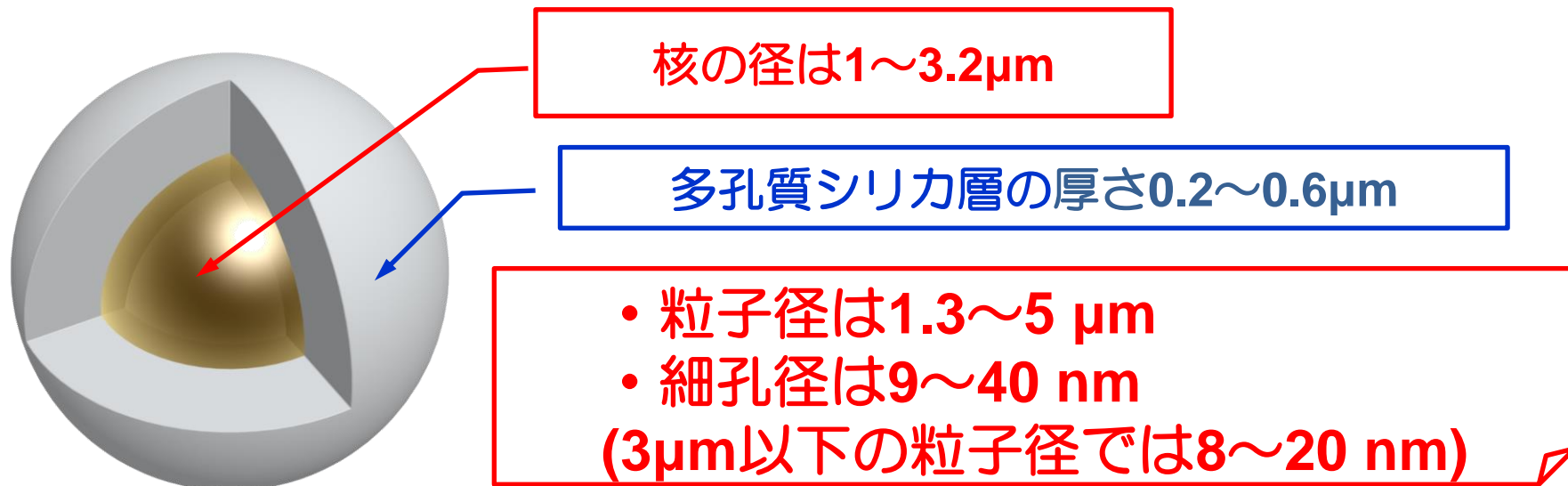
クロマニックテクノロジーズ

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シリカ



タンパク用のコアシェルシリカは
0.2 μm 等の薄い多孔質層が主流

ハイブリッドタイプのコアシェルカラムも
市販され始めた



市販されているコアシェルカラム

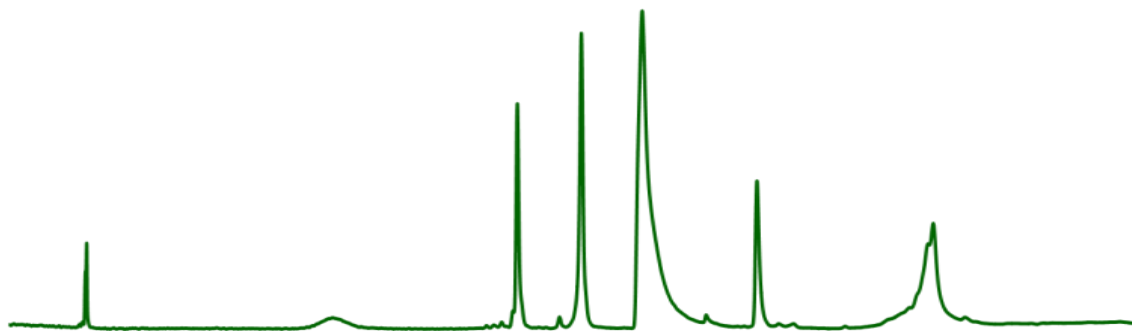
SunShell (クロマニクテクノロジーズ)	: C18, PFP, C8, RP-Aqua, C4-30, C8-30
Halo (AMT)	: C18, PFP, CN, PentaHILIC, BioClass
Capcell Core (資生堂)	: C18, PFP, AQ, PC, MP, WP
Kinetex (フェノメネックス)	: C18, PFP, C8, XB-C18, HILIC, EVOC18
Kinetex Aeris (フェノメネックス)	: C18, C8, C4 (タンパクペプチド分析用)
Ascentis Express (シグマアルドリッチ)	: C18, 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, SB-AQ, HPH-C18
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, Cholesterol
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

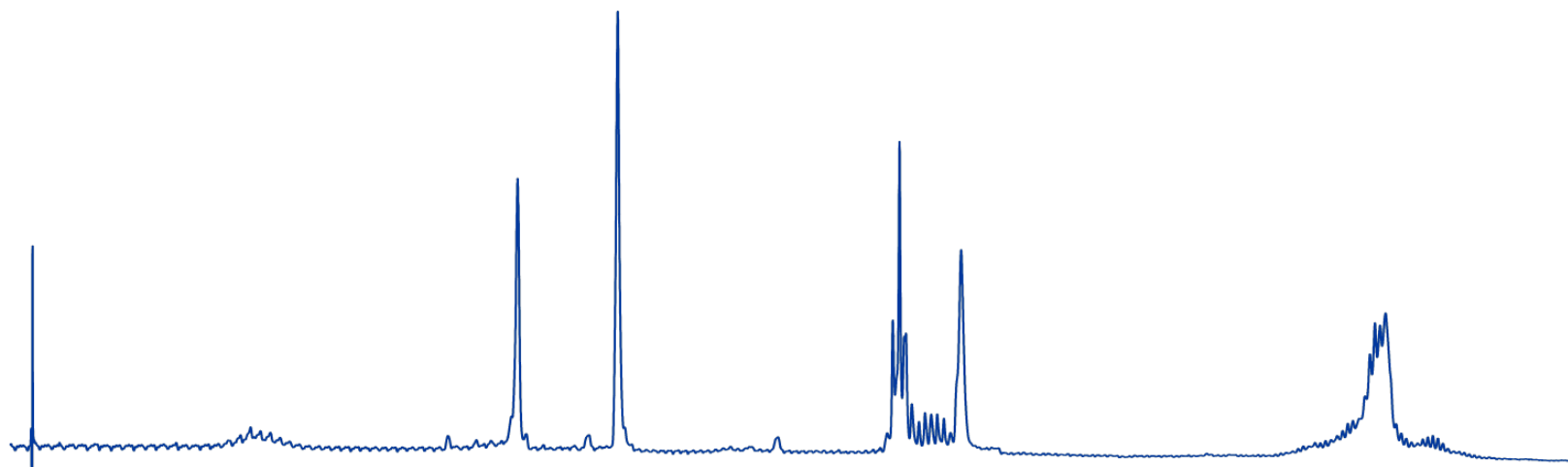


コアシェルカラムでタンパク分析



コアシェルカラムに変わると・・・

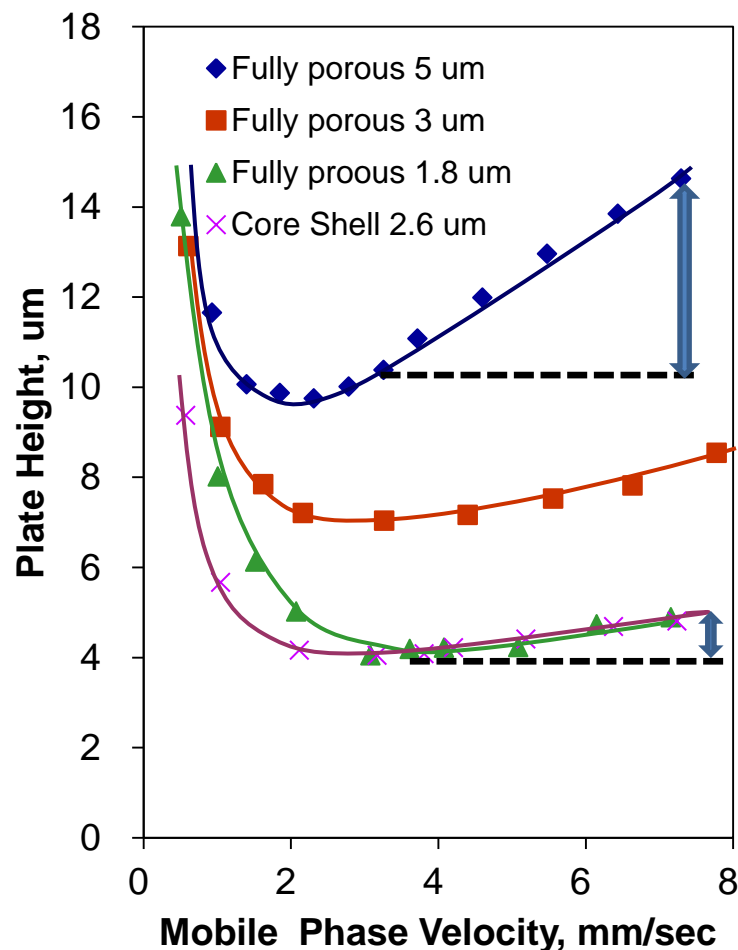
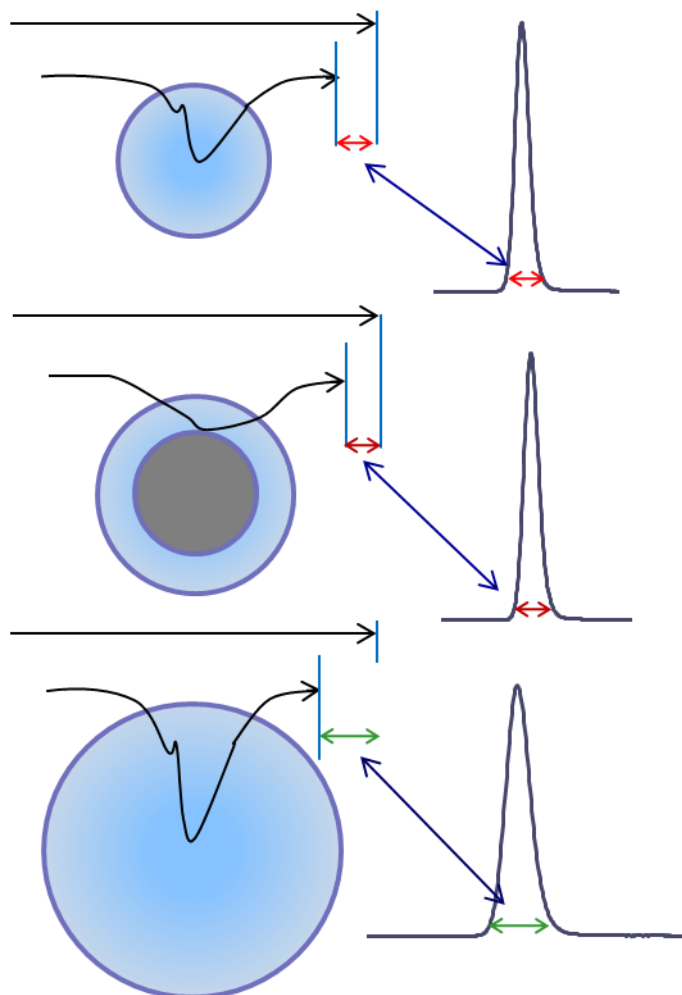
高分離能 高理論段数 高速化



高分子分析にもコアシェルカラムは効果的



『拡散による物質移動（の遅れ）』とC項

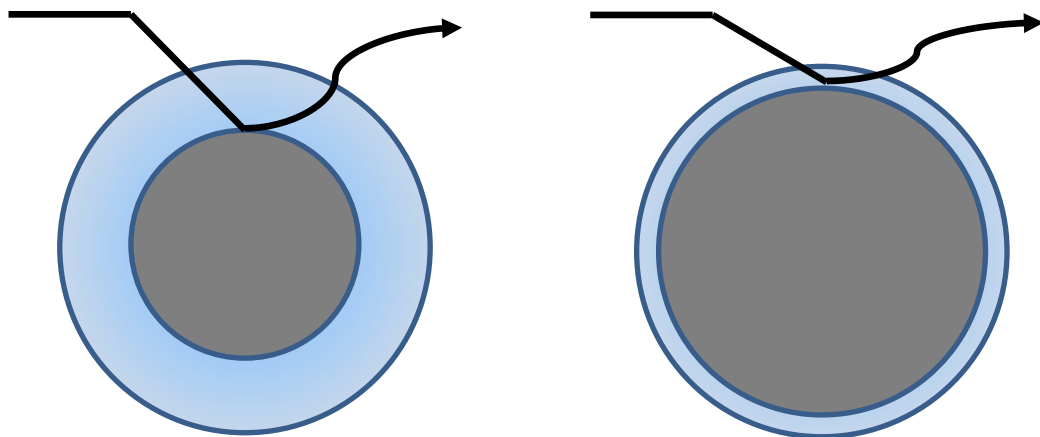


コアシェルシリカは・・・

多孔質層が薄いため、溶質の拡散距離が短くなる → Cが小さくなる



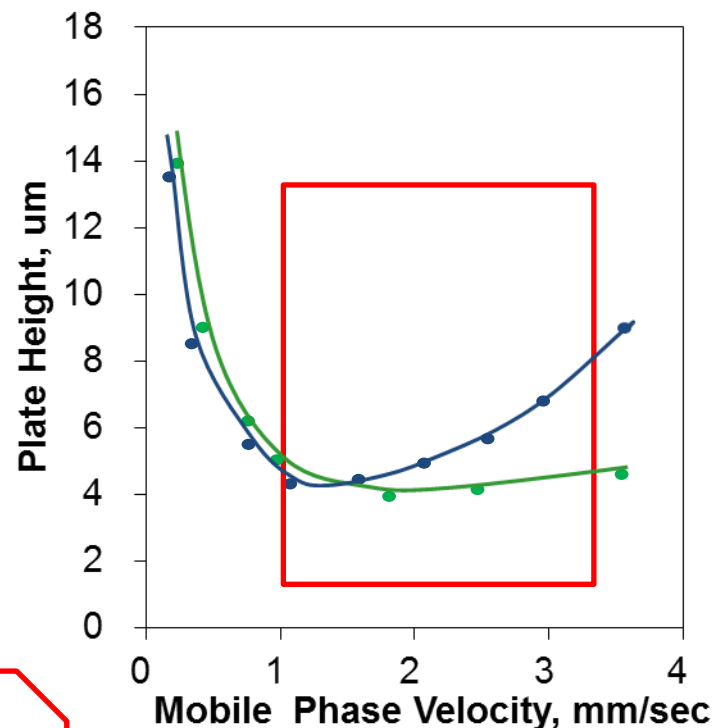
薄い多孔質層の利点



• 高分子の拡散速度は遅い

多孔質層が薄いと・・・

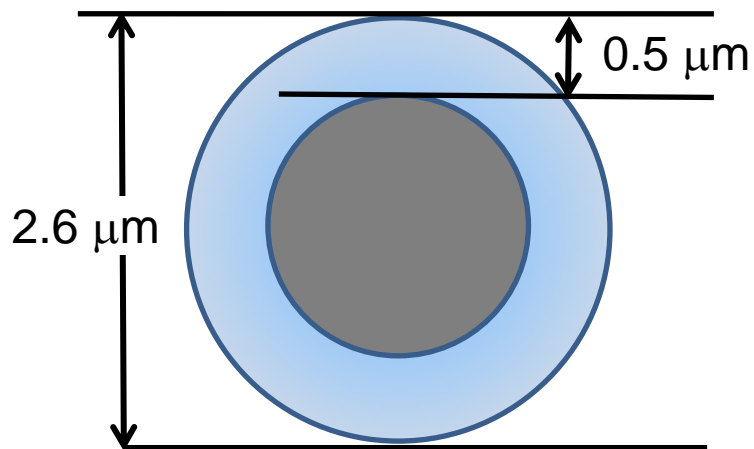
- 溶質の拡散距離が短くなる
 - シャープなピーク
 - 高速分離が可能
- 試料負荷量が小さい





多孔質相の厚さが異なるコアシェルシリカ

SunShell particle

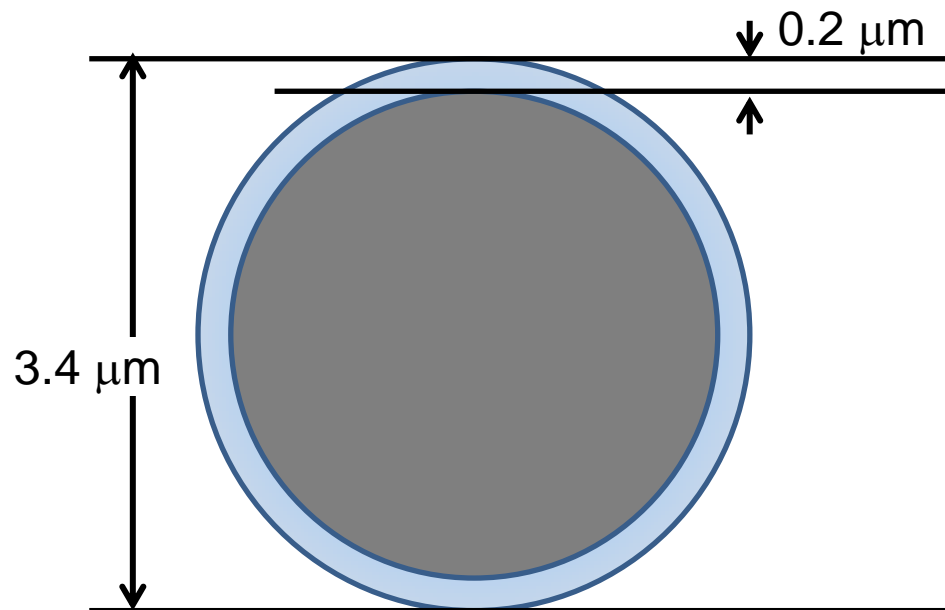


Particle size: 2.6 μm

Thickness of porous layer: 0.5 μm

Specific surface area: 40 m^2/g

Prototype particle



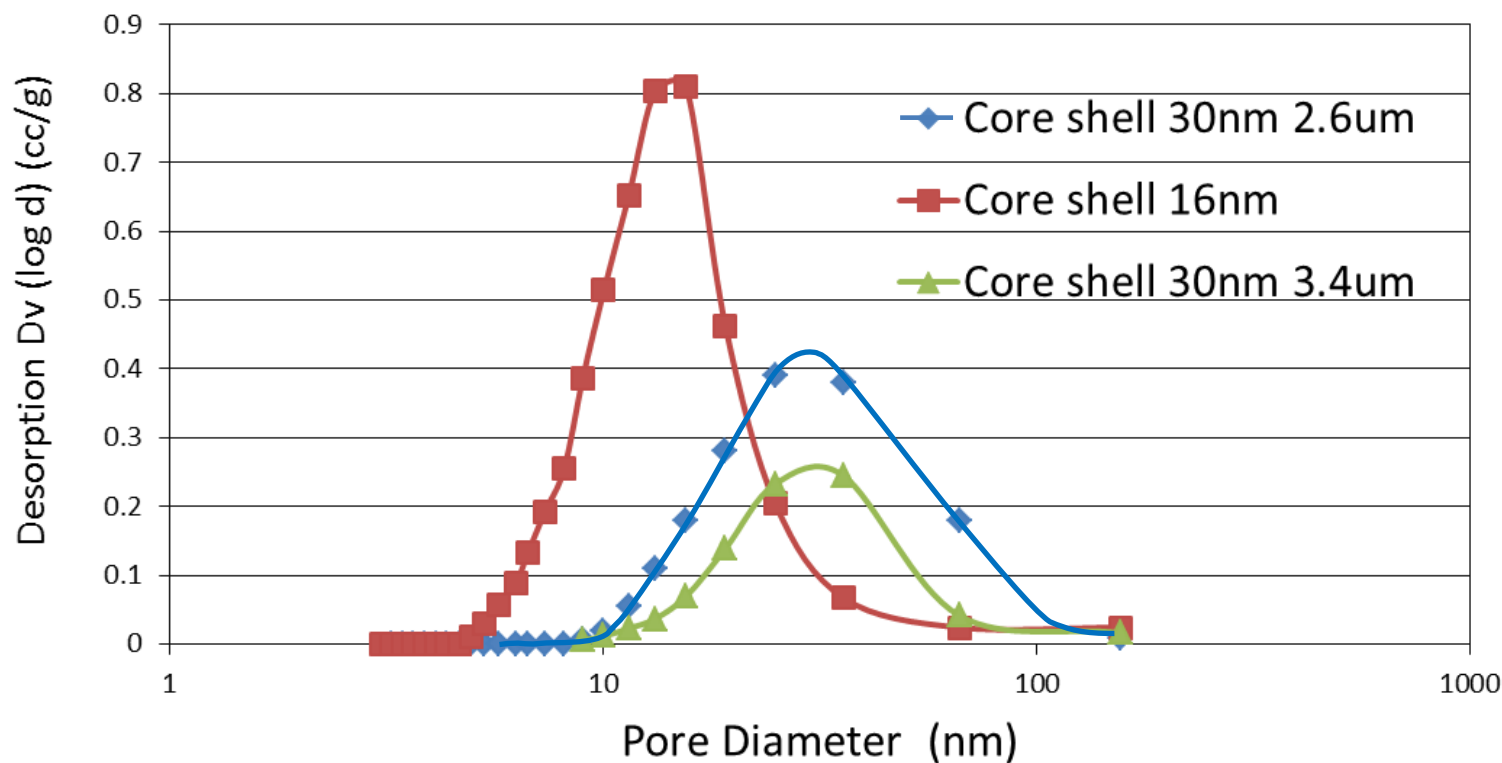
Particle size: 3.4 μm

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

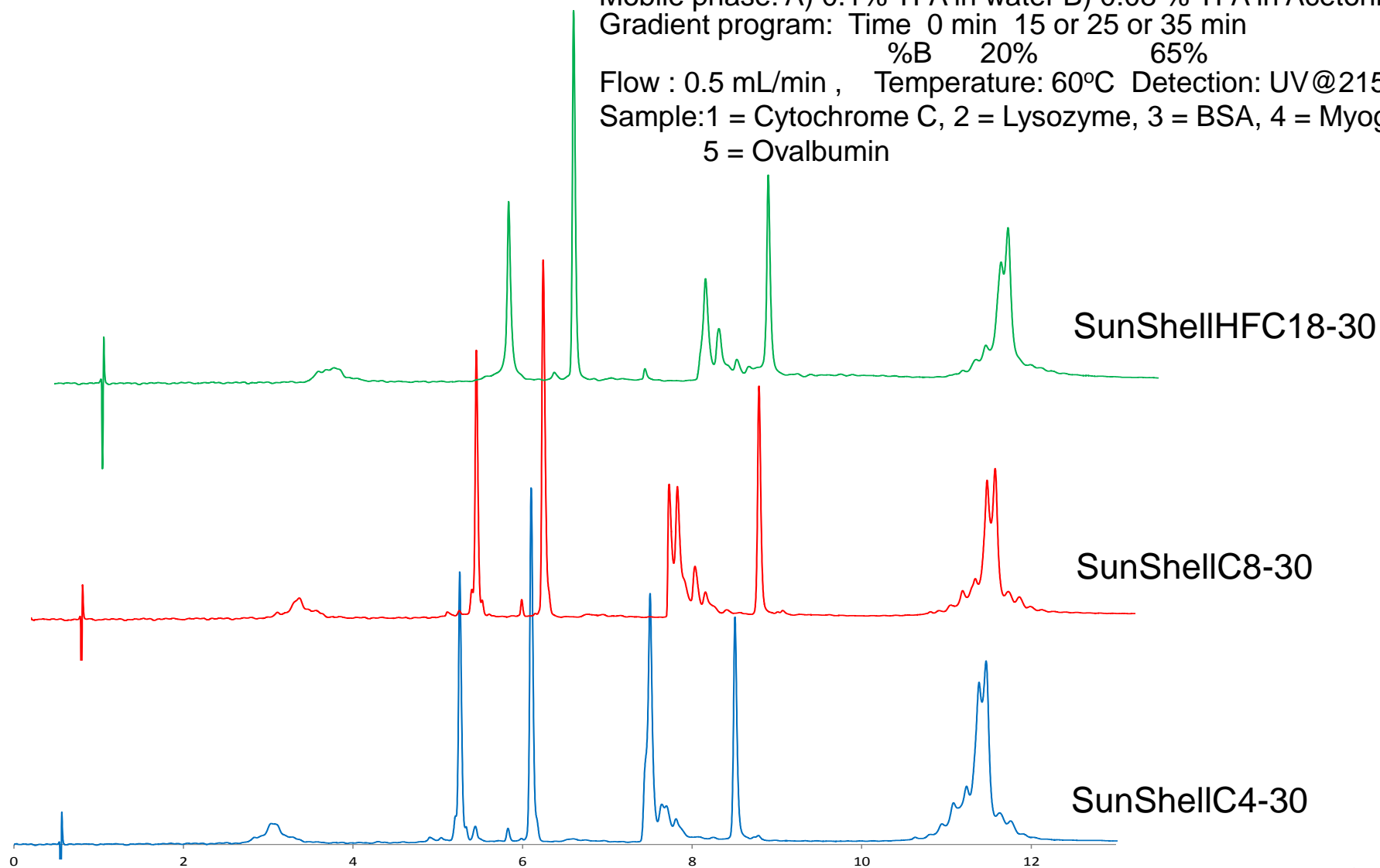
Gradient program: Time 0 min 15 or 25 or 35 min

%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





グラジエントの違いによる分離の変化

Column:

SunShell C8-30, 2.6 μ m (30 nm) 150 x 2.1 mm,

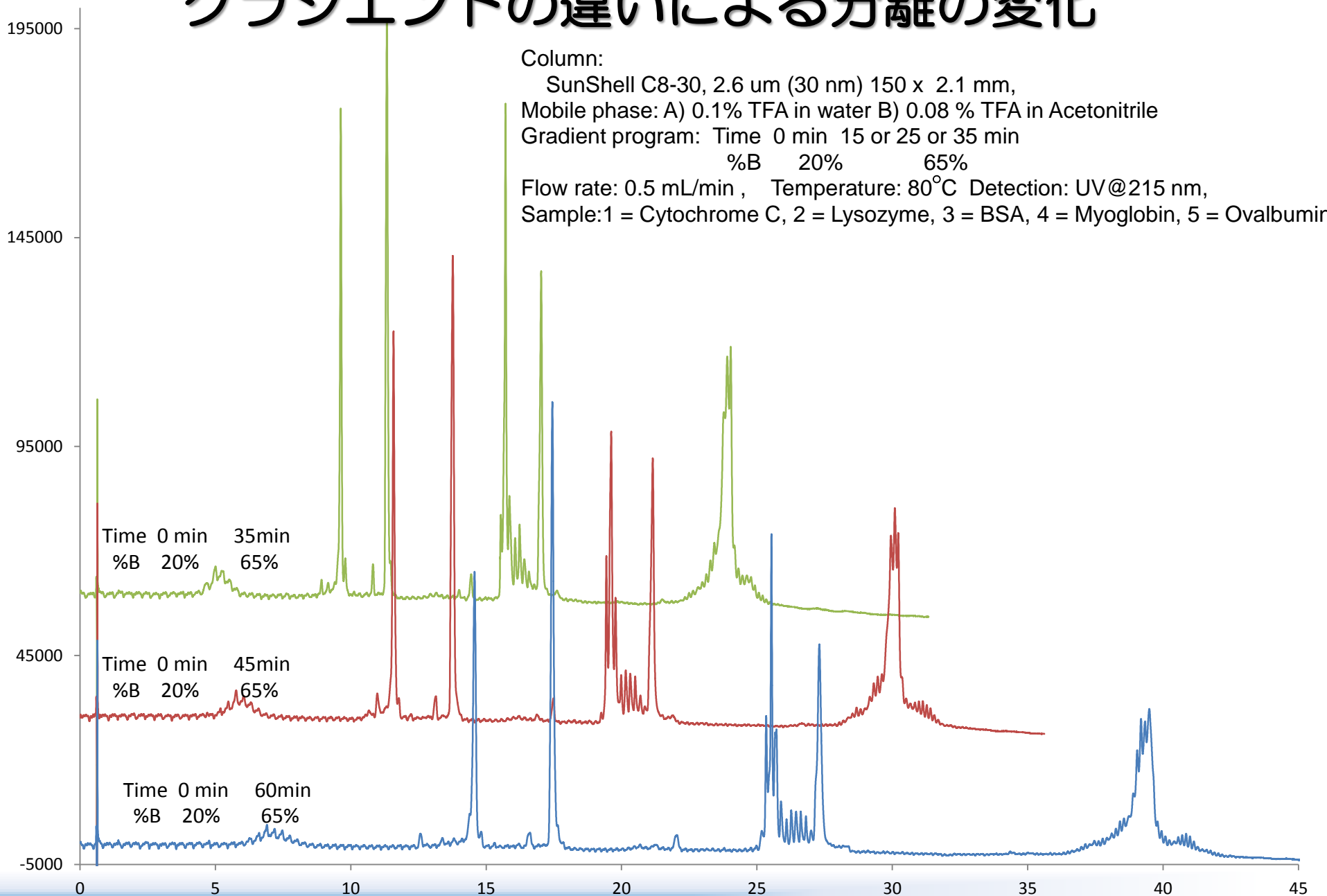
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

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)

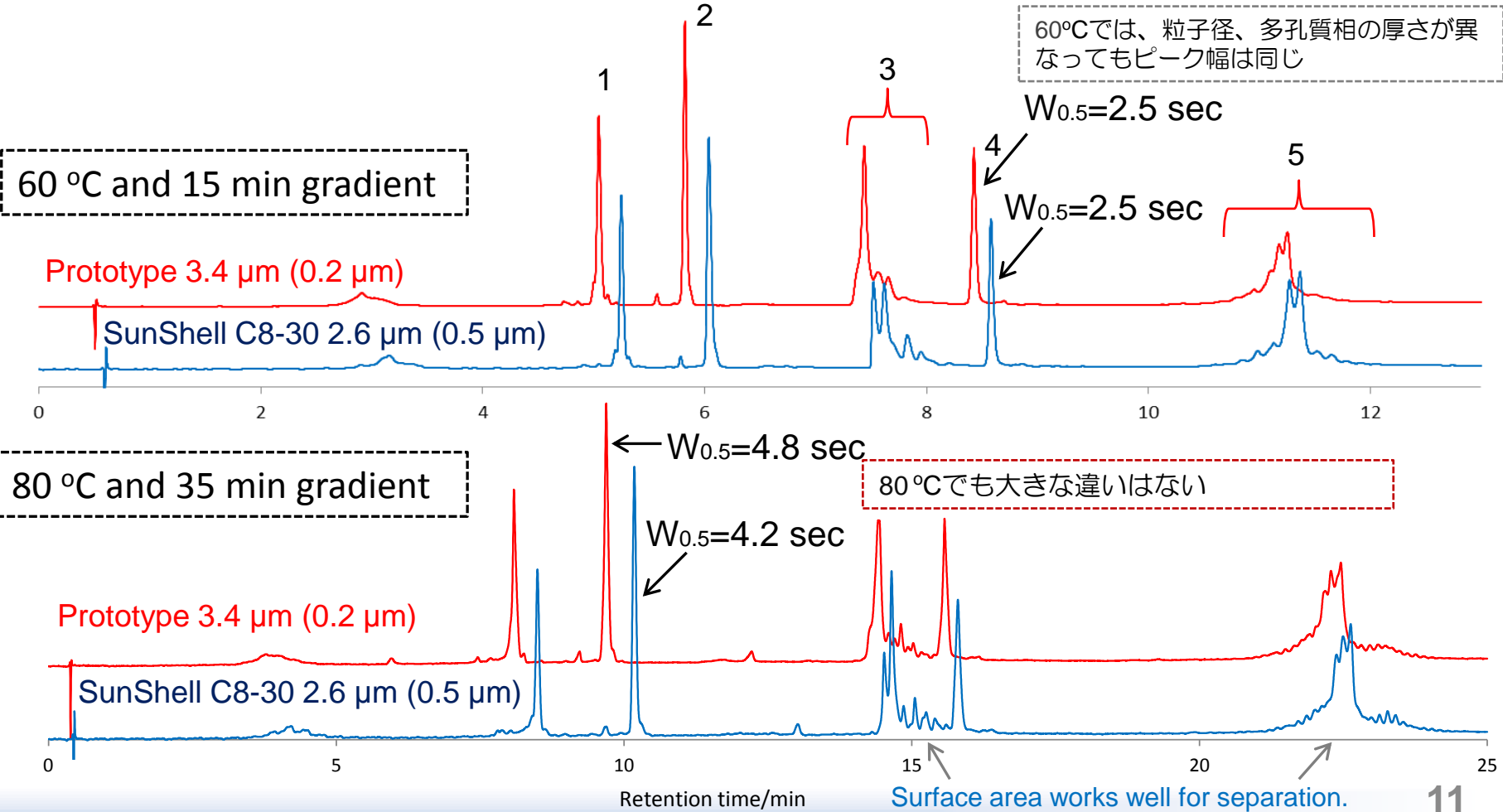
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

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,

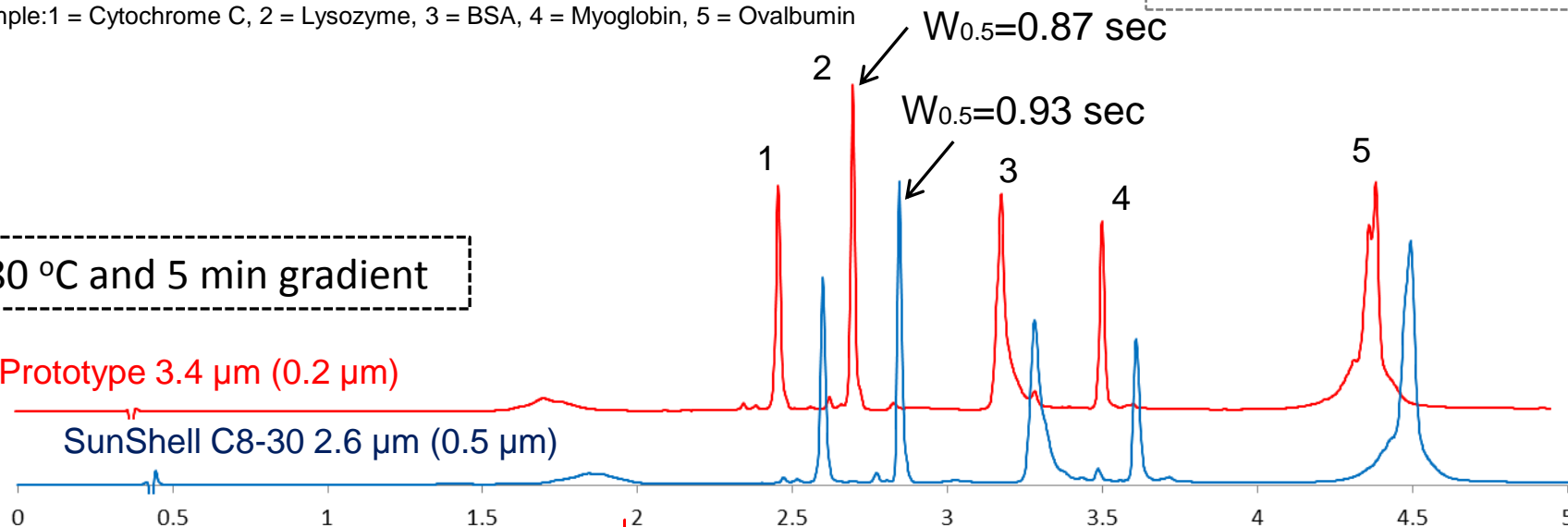
Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin

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)

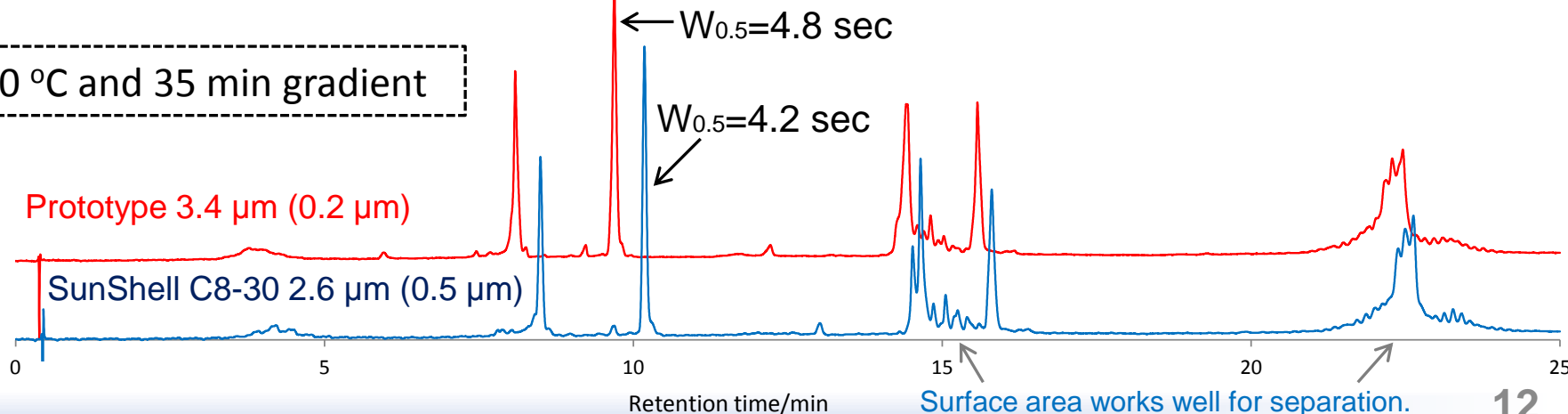
SunShell C8-30 2.6 μm (0.5 μm)



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:

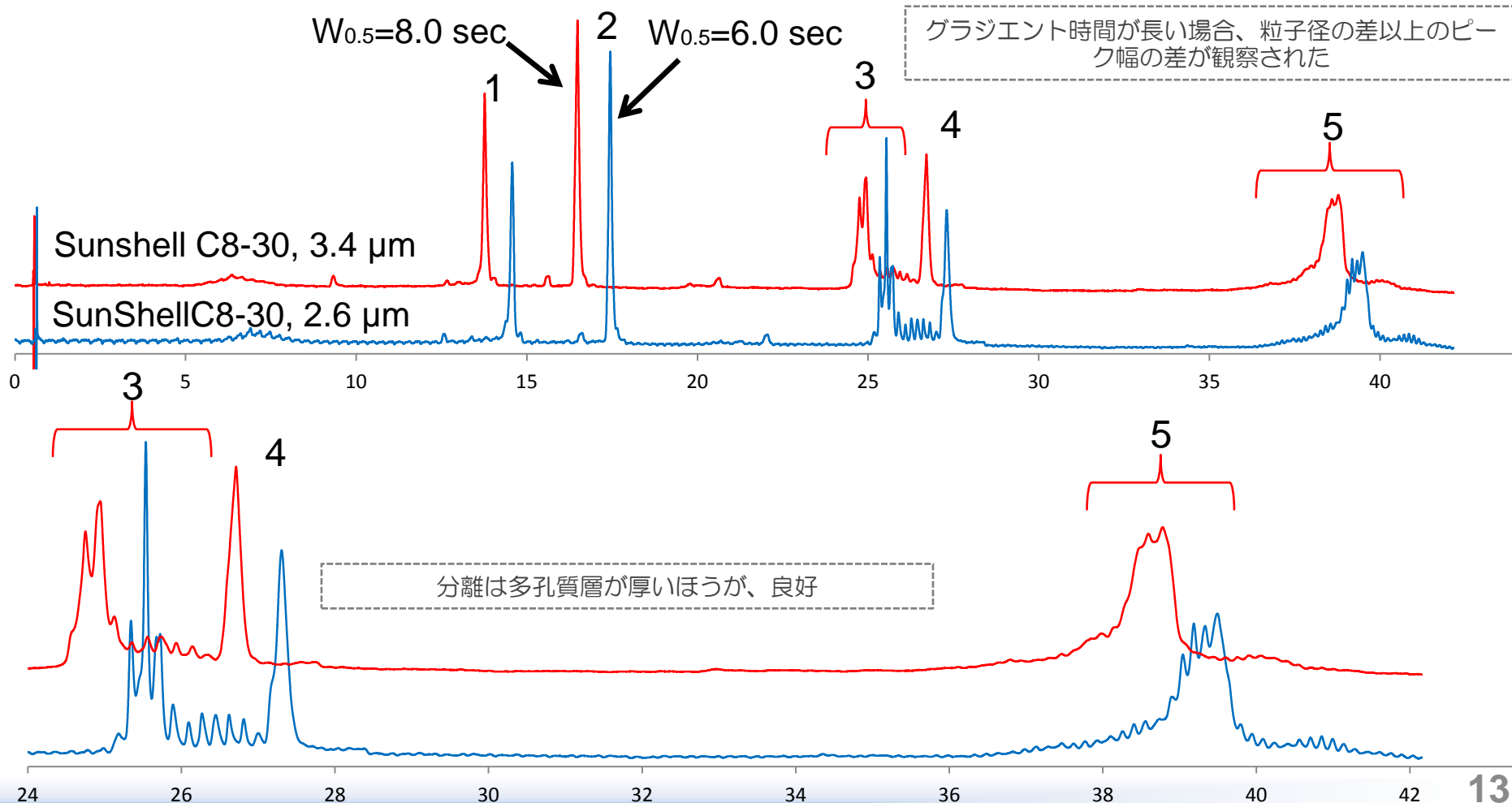
SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm, 0.5 μm layer) 150 x 2.1 mm, Sunshell C8-30, 3.4 μm (30 nm, 0.2 μm layer) 150 x 2.1 mm (prototype)

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

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

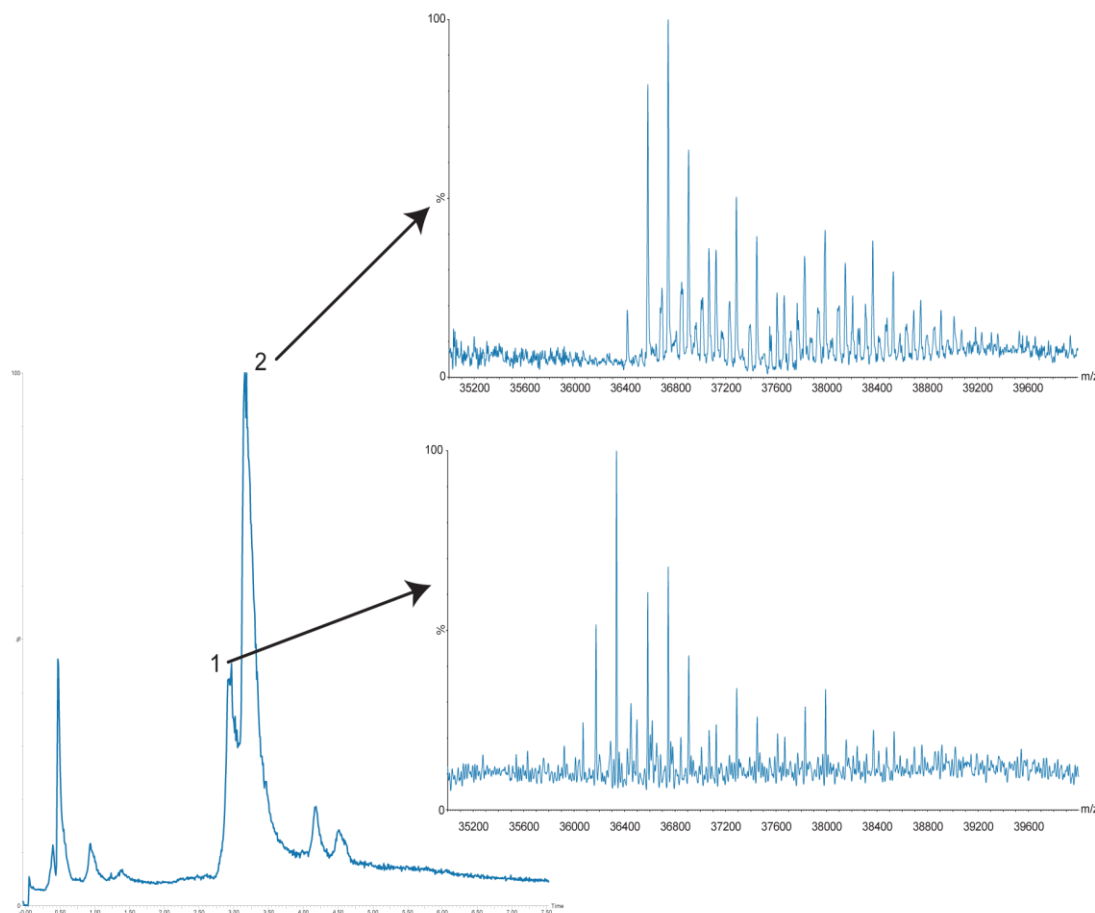
Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 80°C Detection: UV@215 nm,

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





リパーゼの分離(Sun Shell C8-30)



Column:

SunShell C8-30, 2.6 μm (30 nm) 100 x 2.1 mm,

Mobile phase: A) 0.1% Formic acid in water

B) 0.1 % Formic acid in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 10 min

%B 15% 60%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

Temperature: 60 $^{\circ}\text{C}$

Detection: MS,

Injection volume: 10 μL ,

Concentration: 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ each protein,

Sample:

1. Lipase Impurity

2. Lipase



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 μ mol/m ²	Yes
SunShell C18-WP 4.6 x 150 mm	CW6471	16 nm	90 m ² /g	5%	2.5 μ mol/m ²	Yes

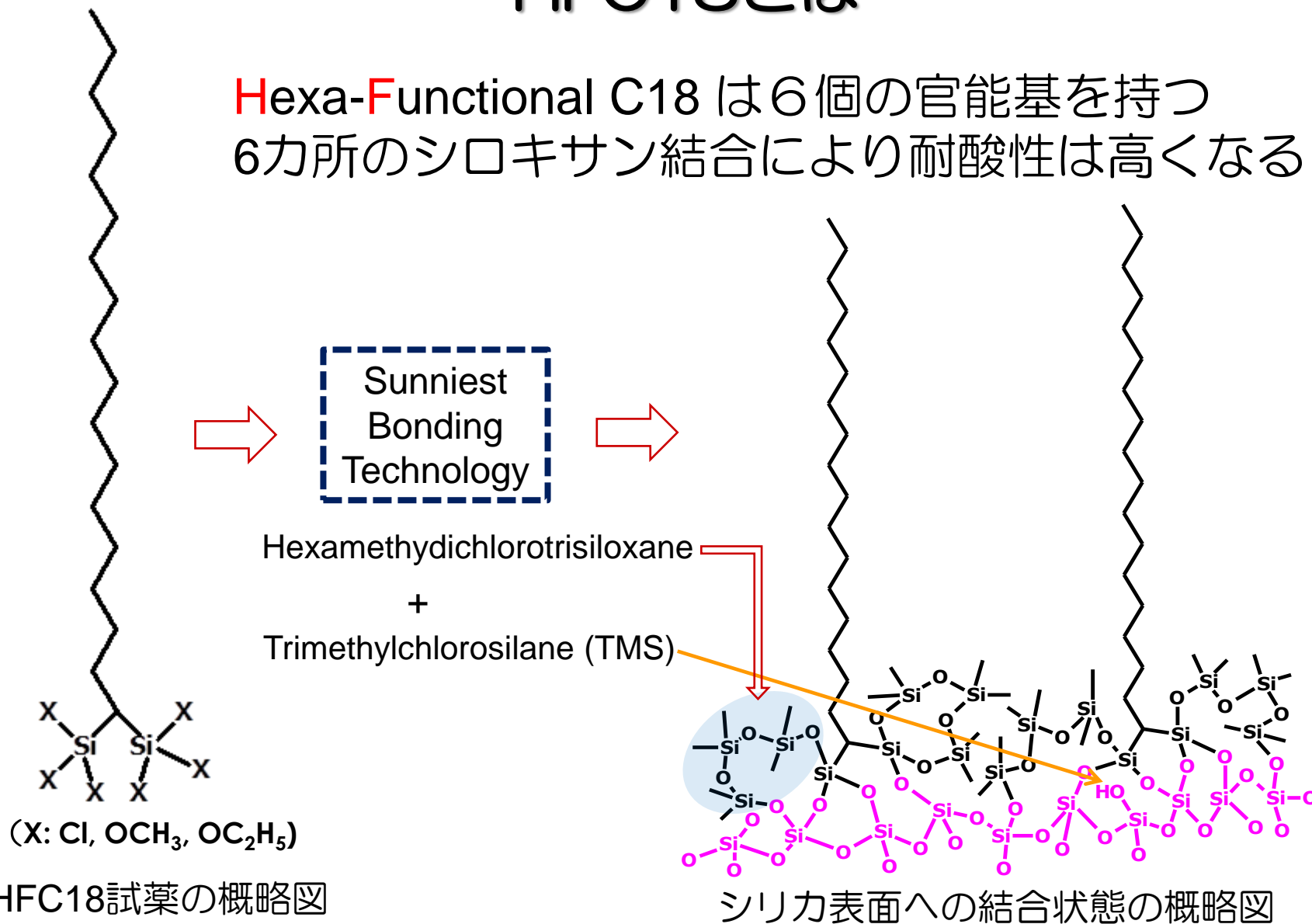
HFC18-WP は1対のシリル基によりC18を結合しますので、結合密度が低くなります。C18-WPに比べ約1/2です。

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。



HFC18とは

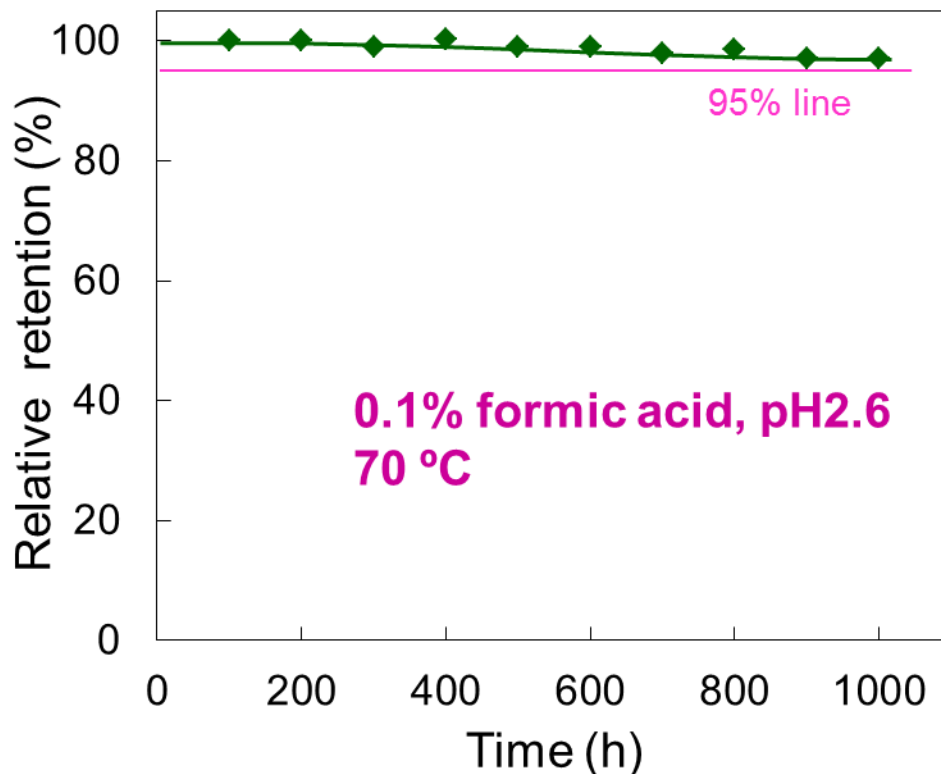
Hexa-Functional C18 は6個の官能基を持つ
6カ所のシロキサン結合により耐酸性は高くなる



HFC18試薬の概略図



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

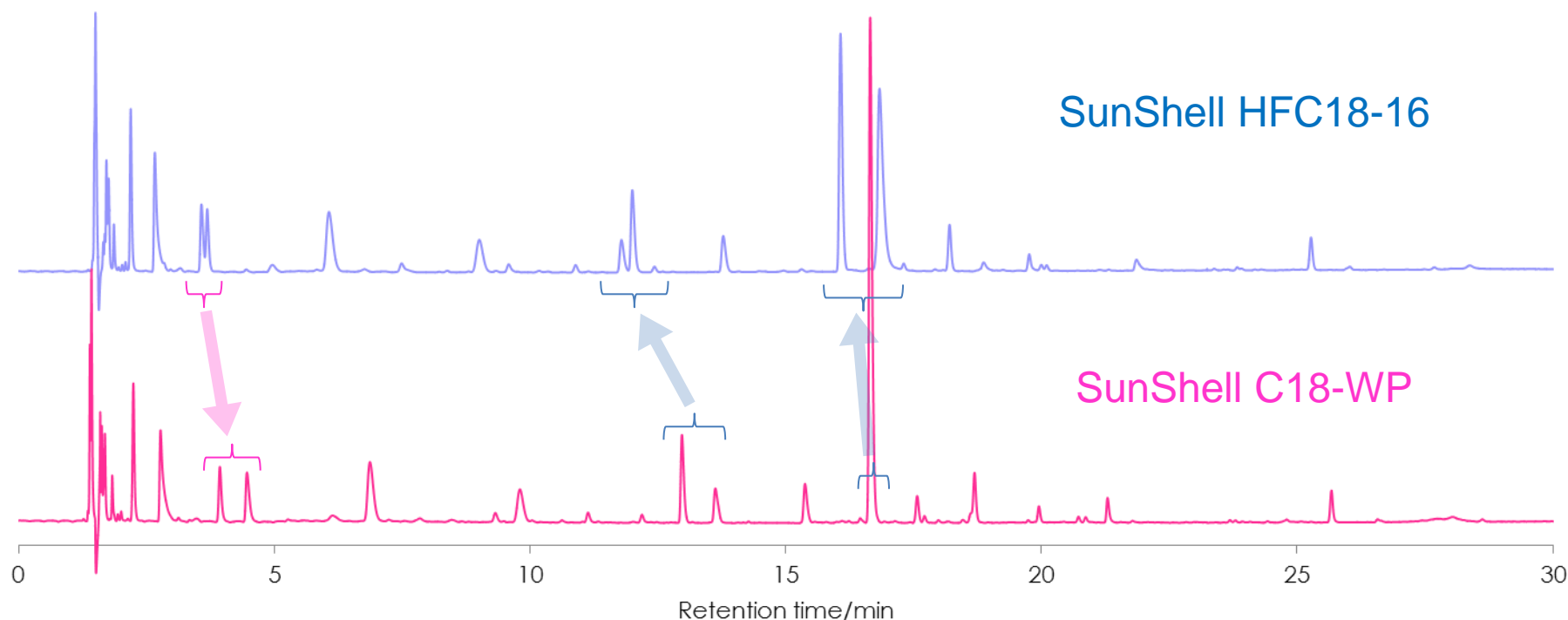
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Butylbenzene



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

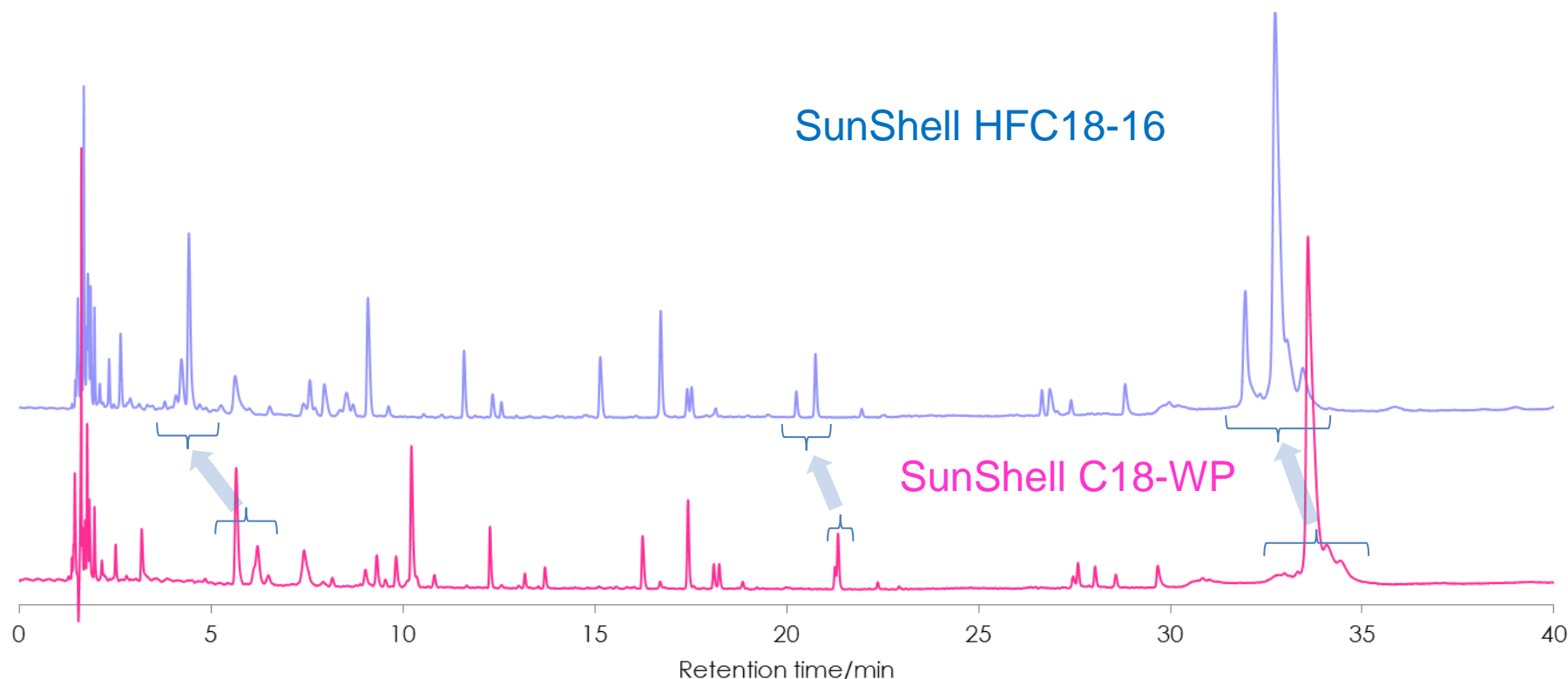
%B 5% 5% 50%

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

Sample: Tryptic digest of cytochromC



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



ペプチドの分離(SunShell HFC18-16)

Column:

Amplus C18-16, 2.6 μm (16 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 1 min 21 min

%B 10% 10% 40%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

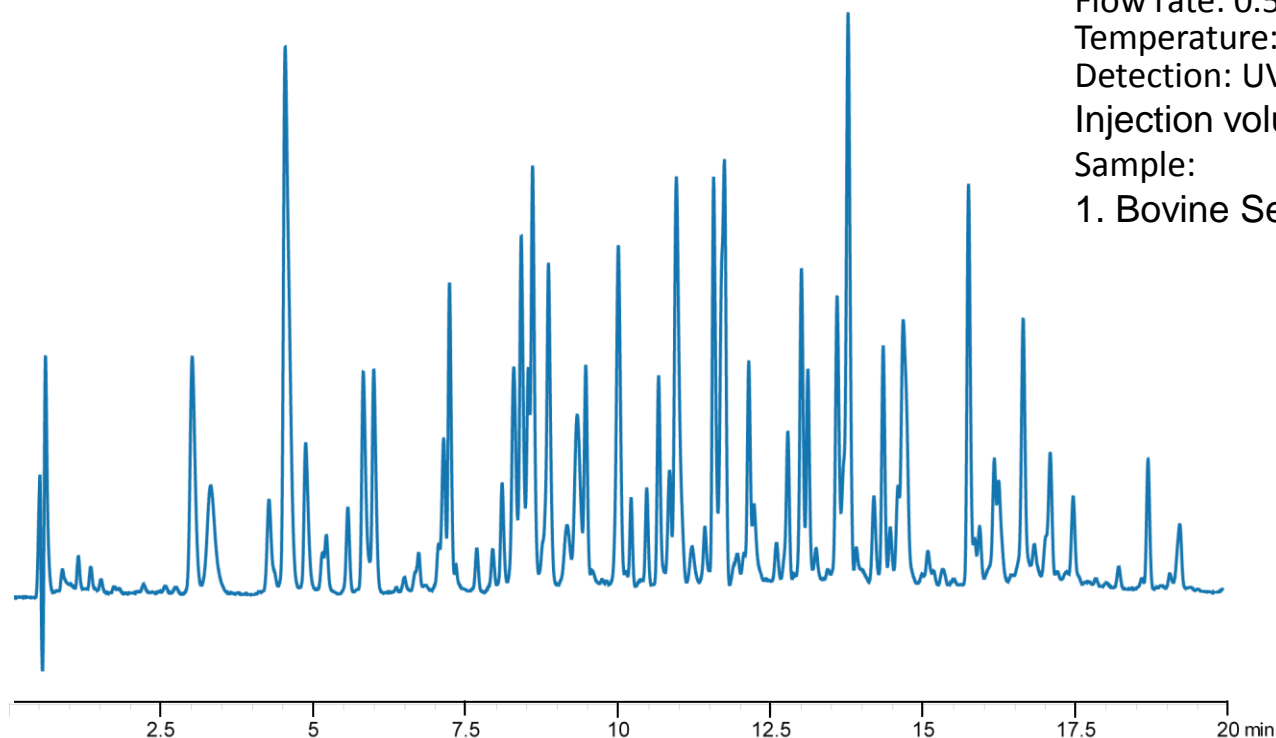
Temperature: 40 °C

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10 μL ,

Sample:

1. Bovine Serum Albumin Digest





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。
- 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。
- HFC18-16のLC-MS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。
- 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



クロマニックオープン10周年 特別キャンペーン



SunShell RP Guard Filter
スターターキット(新オシネジ)(型番CBGAKN)



SunShell RP Guard Filter
交換用C18フィルター5個 (型番CBGAAC)

*CBGAKNは1/4インチのスパナ締め配管になります

キャンペーン期間: 2014年9月1日 ~ 2015年4月30日

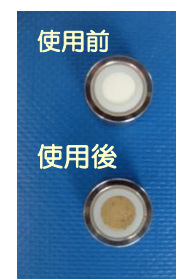
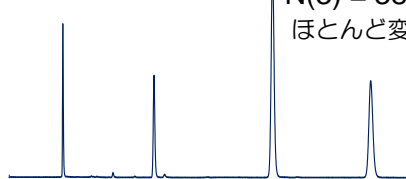
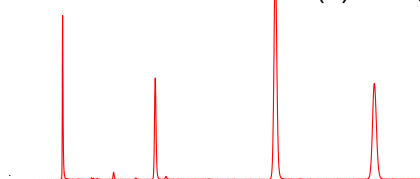
<<ガードフィルター使用例>>

SunShell C18, 2.6 µm 150 x 4.6 mm

ガードフィルターなし

$t_R(3) = 3.24 \text{ min}$
 $N(3) = 39,345$

ガードフィルターあり
 $t_R(3) = 3.26 \text{ min}$
 $N(3) = 38,940$
ほとんど変化なし



SunShell

Core Shell Particle

クロマニクオープン10周年キャンペーン第2弾

SunShell C18, 5 μ m

50% 引きセール

期間: 2015/4/1 ~ 2016/3/31

SunShell C18 5 μ m, 4.6x250mm
移動相: アセトニトリル/水=7/3
流速: 1.0mL/min
カラム圧: 6.7 MPa

理論段数: 40,000段以上

5 μ mのカラム圧で3 μ mの性能を発揮!

全多孔性C18と同等な価格! 是非お試しください!!

	内径(mm) 長さ(mm)	3.0			4.6		
		型番	価格	キャンペーン価格	型番	価格	キャンペーン価格
SunShell C18, 5 μ m	150	CB3371	¥84,000	¥42,000	CB3471	¥84,000	¥42,000
	250	CB3381	¥110,000	¥55,000	CB3481	¥110,000	¥55,000

