

P-16

30nm細孔コアシェルシリカ粒子 の開発とペプチド分析への適用

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>



市販されているコアシェルカラム

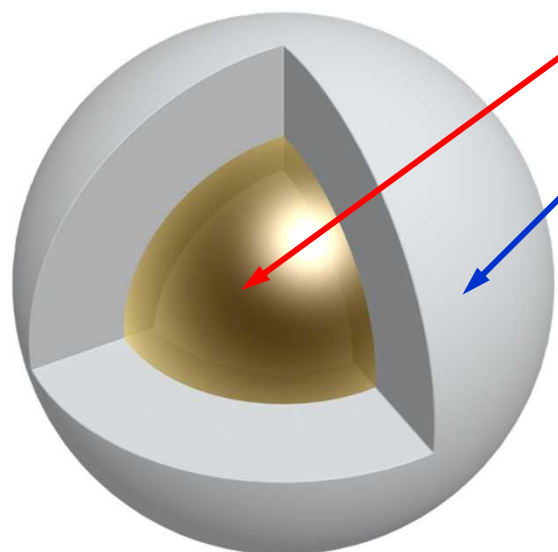
SunShell (クロマニクテクノロジーズ)	: C18, PFP, C8, Phenyl, RP-Aqua
Halo (AMT)	: C18, PFP, CN, PentaHILIC, BioClass
Capcell Core (資生堂)	: C18, PFP, AQ, PC
Kinetex (フェノメネックス)	: C18, PFP, C8, XB-C18, HILIC,
Kinetex Aeris (フェノメネックス)	: C18, C8, C4 (タンパクペプチド分析用)
Ascentis Express (シグマアルドリッチ)	: C18, F5(PFP), C8, OH5, RP-Amide
BioSehII (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



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1.3~5 μm
- 細孔径は9~30 nm
(3 μm 以下の粒子径では8~20 nm)

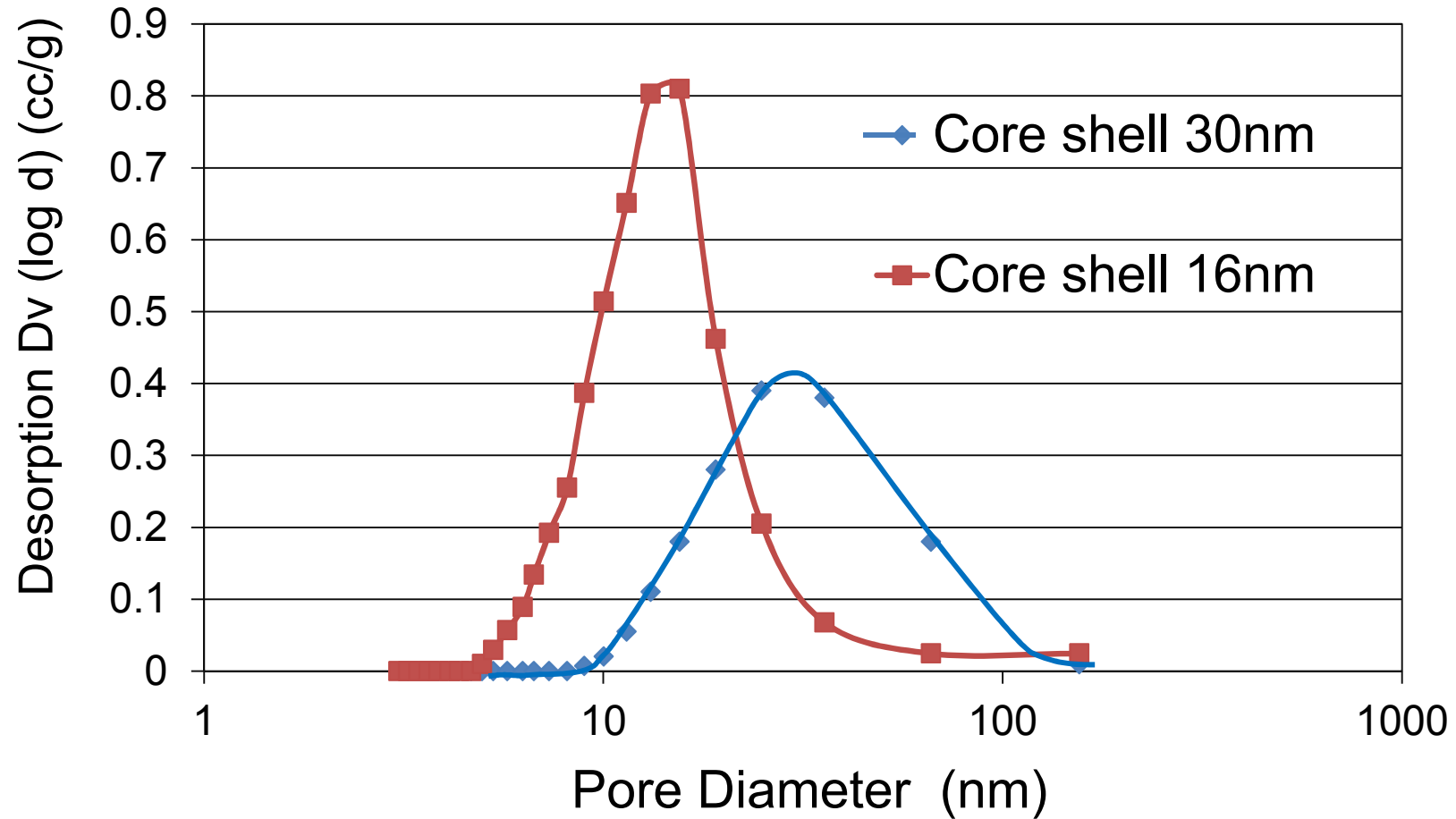
粒子径2.6 μm で30 nmの細孔を持つ
コアシェル粒子はまだ販売されていない



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 C18-30 2.1 x 100 mm	C46961	30 nm	40 m ² /g	1.3%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C8-30 2.1 x 100 mm	C36961	30 nm	40 m ² /g	1.2%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell C4-30 2.1 x 100 mm	C26961	30 nm	40 m ² /g	0.9%	3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes

Particle diameter is 2.6 μm for all.

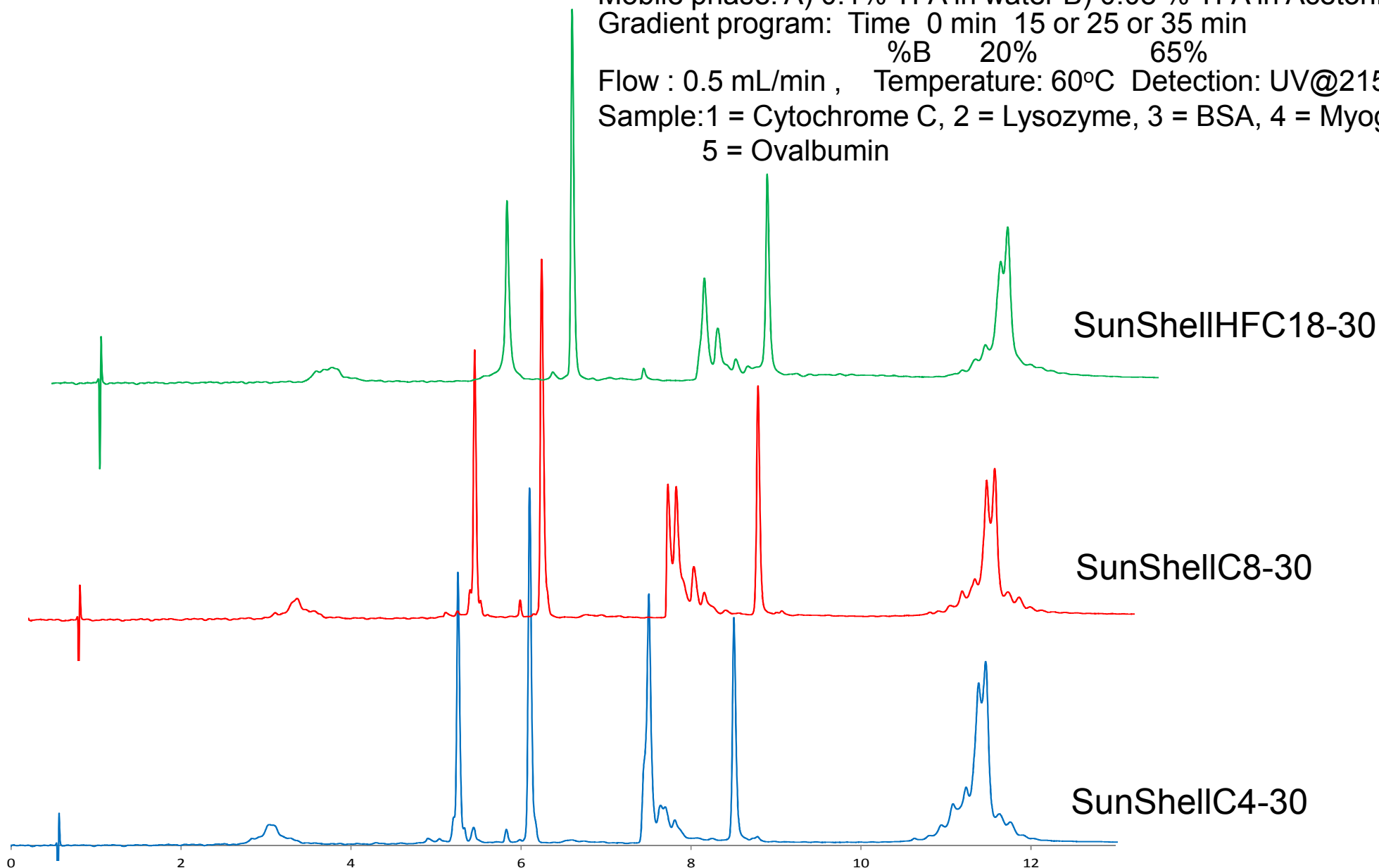


タンパクの分離

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) 100 x 2.1 mm,

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

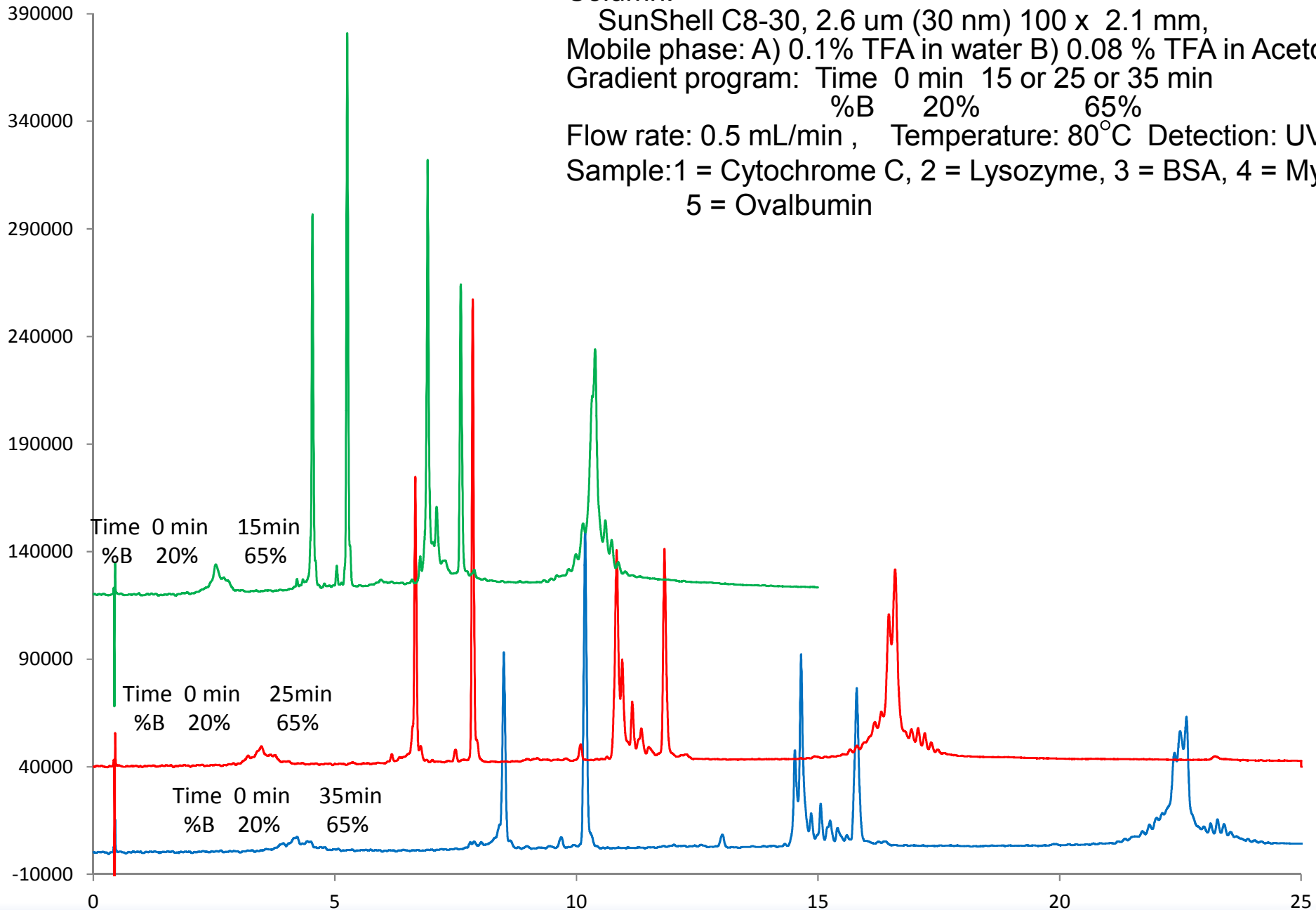
Gradient program: Time 0 min 15 or 25 or 35 min

%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,

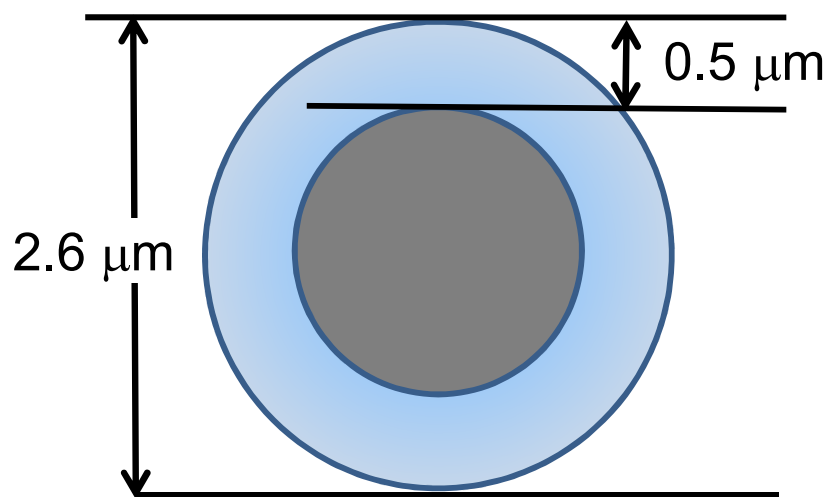
5 = Ovalbumin





多孔質層の厚さが異なるコアシェルシリカ

SunShell particle

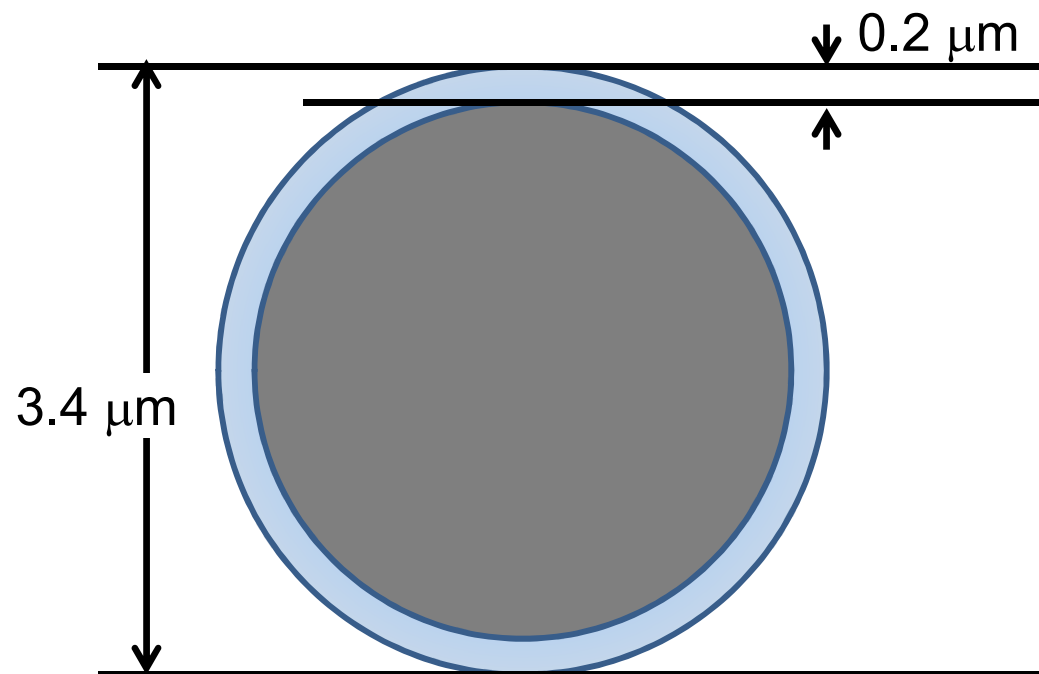


Particle size: 2.6 μm

Thickness of porous layer: 0.5 μm

Specific surface area: 40 m²/g

Prototype particle



Particle size: 3.4 μm

Thickness of porous layer: 0.2 μm

Specific surface area: 15 m²/g



多孔質層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)

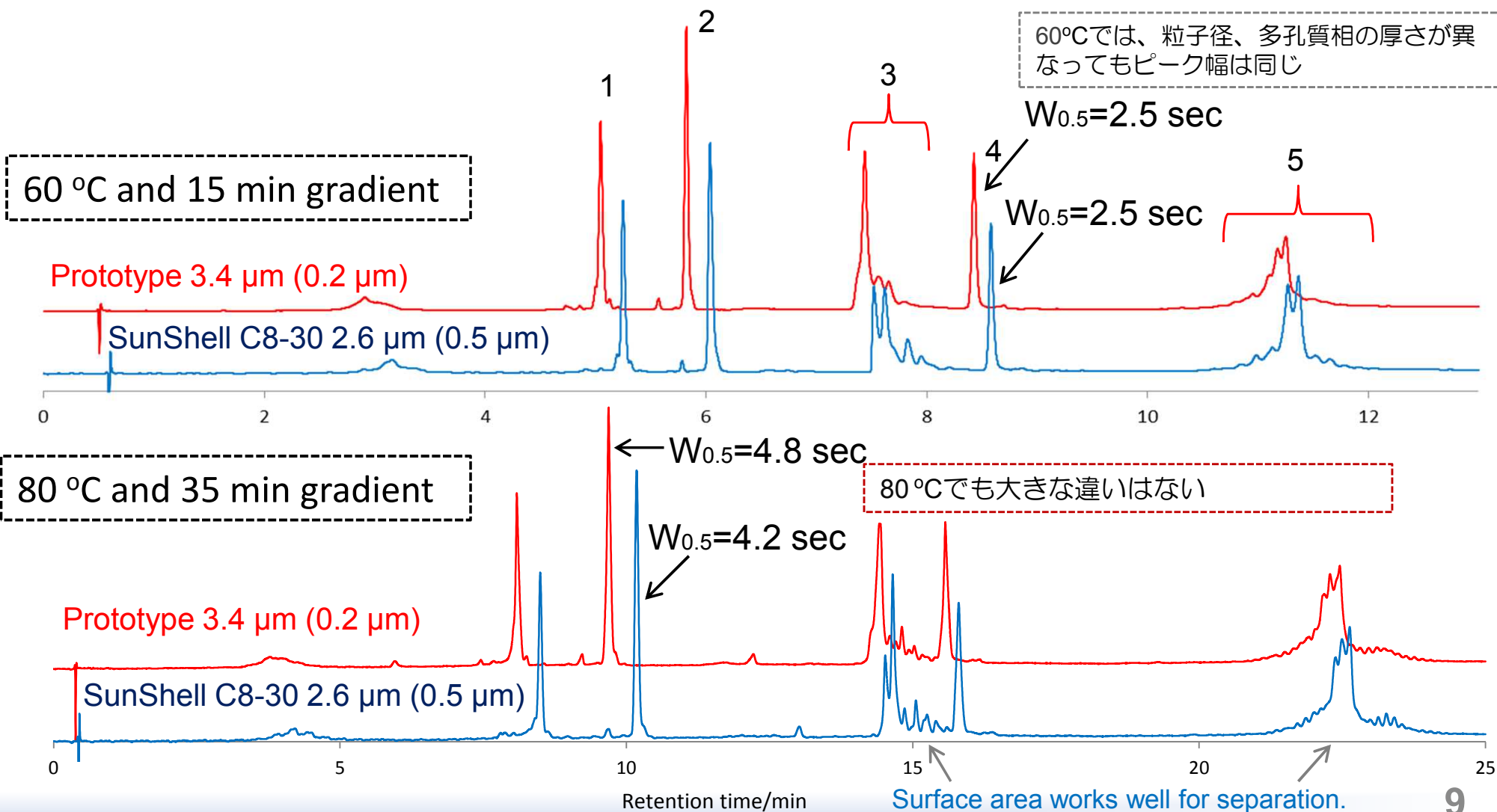
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 15 or 35 min

%B 20% 65%

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature: 60 or 80 °C, Detection: UV@215 nm,

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





多孔質層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)

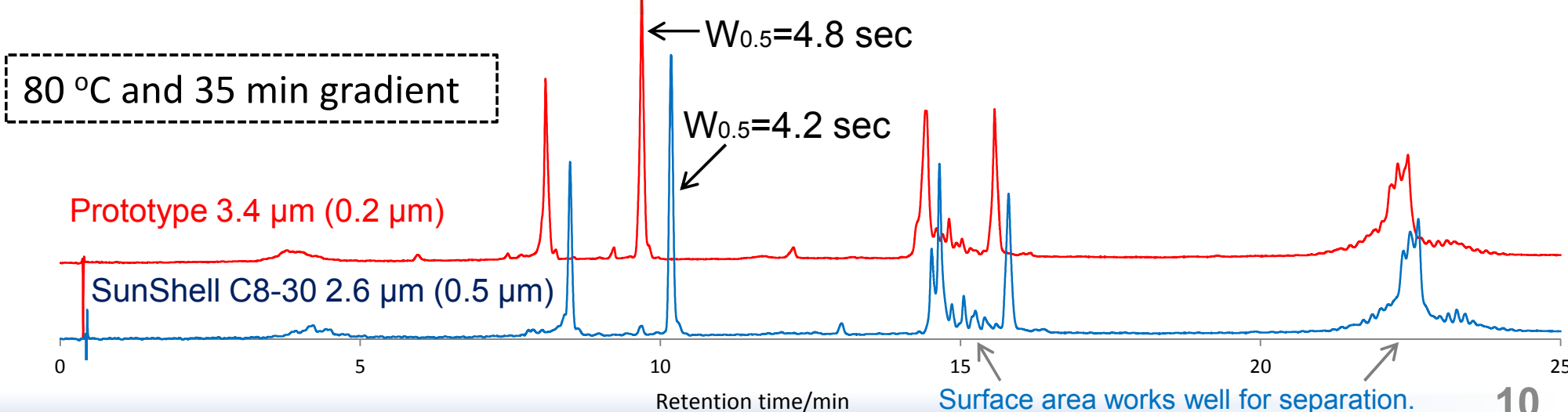
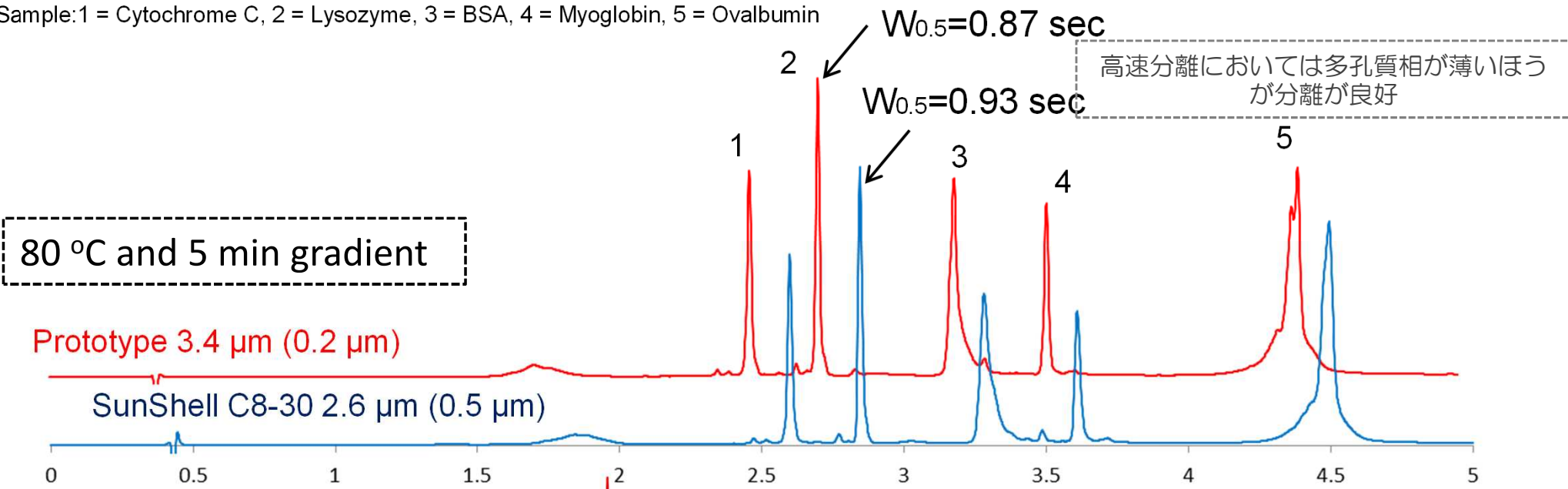
Mobile phase: A) 0.1% TFA in water B) 0.08 % TFA in Acetonitrile

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,

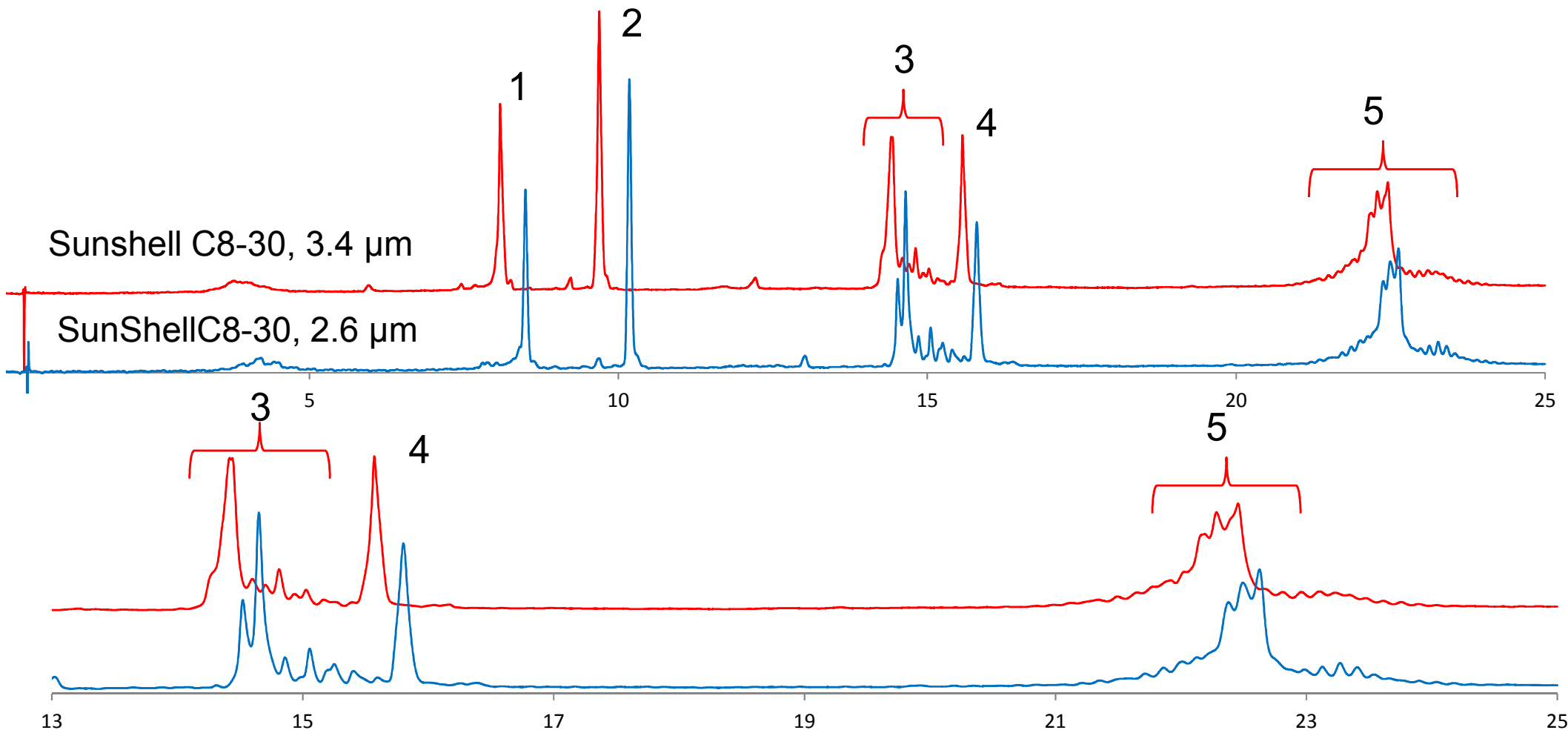
Sample: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme, 3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin





多孔質層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) 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 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





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

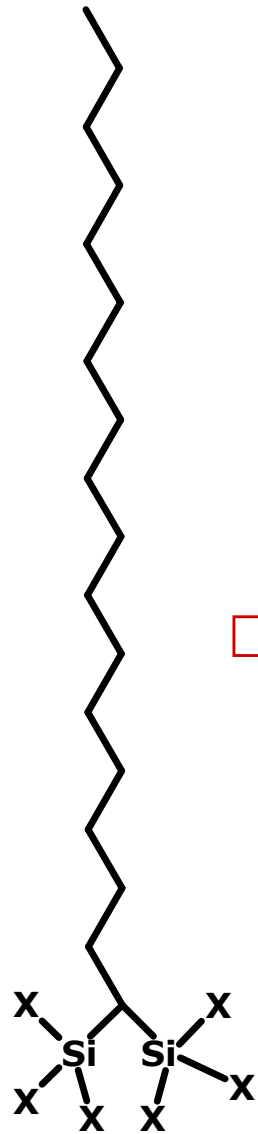
HFC18-WP は1対のシリル基によりC18を結合しますので、結合密度が低くなります。C18-WPに比べ約1/2です。

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。



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

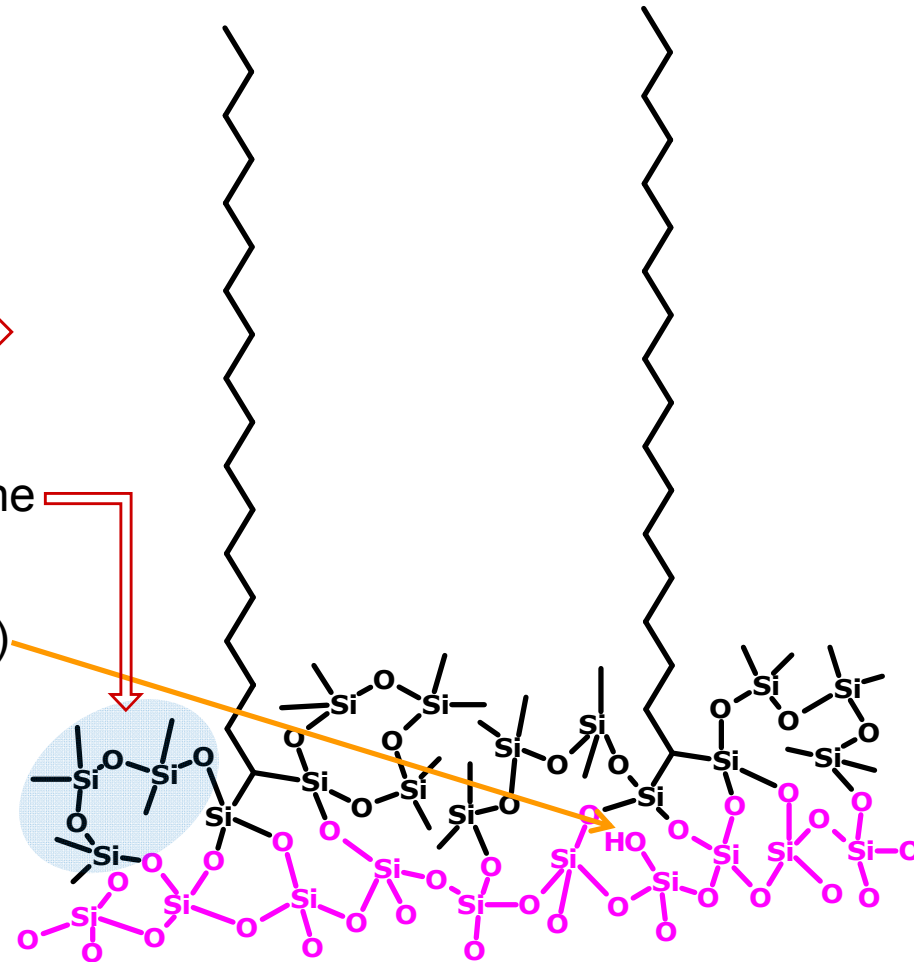


(X: Cl, OCH₃, OC₂H₅)

HFC18試薬の概略図



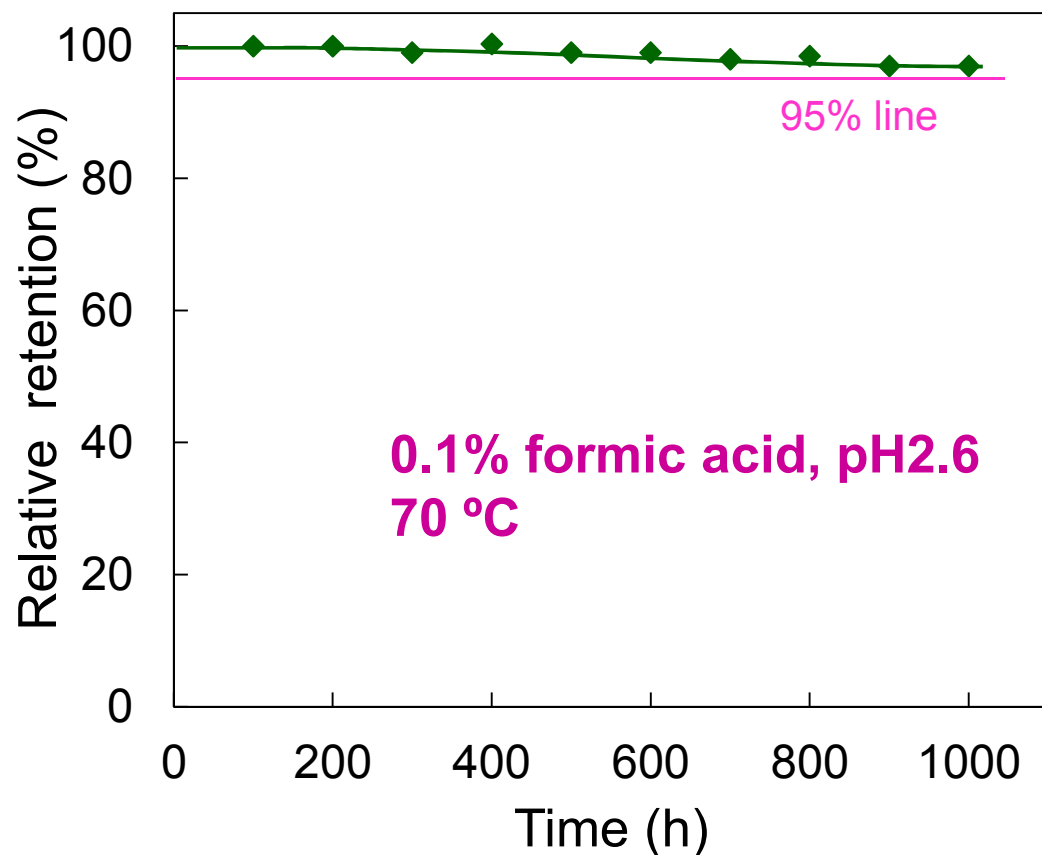
Hexamethyldichlorotrisiloxane
+
Trimethylchlorosilane (TMS)



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

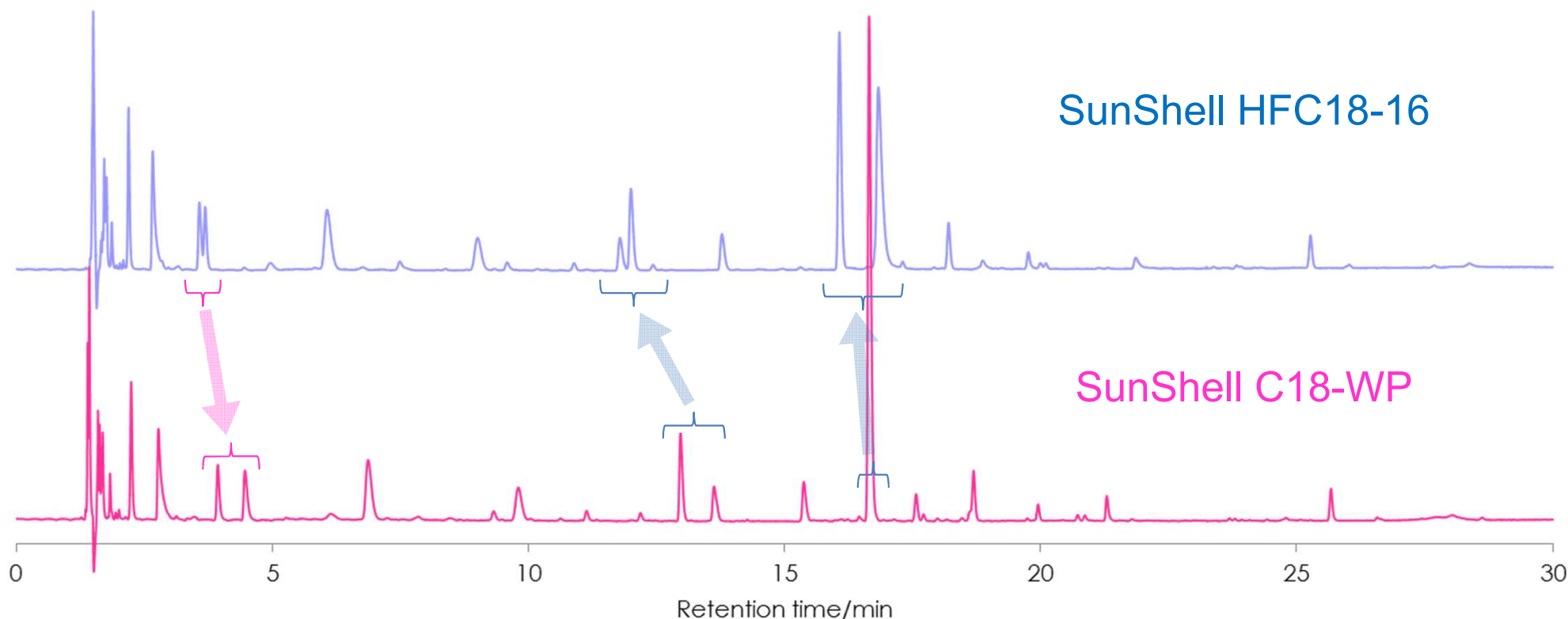
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

2 = Butylbenzene



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

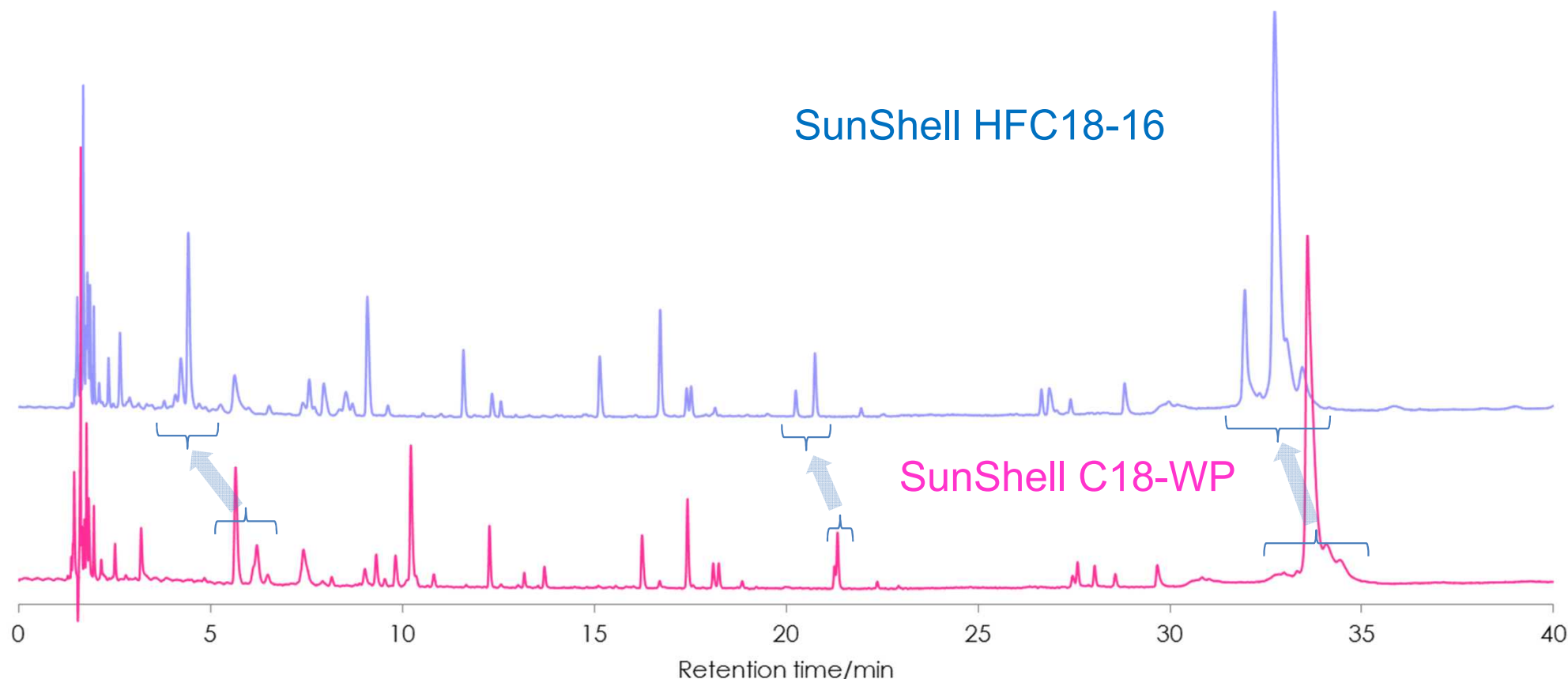
%B 5% 5% 50%

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 ,

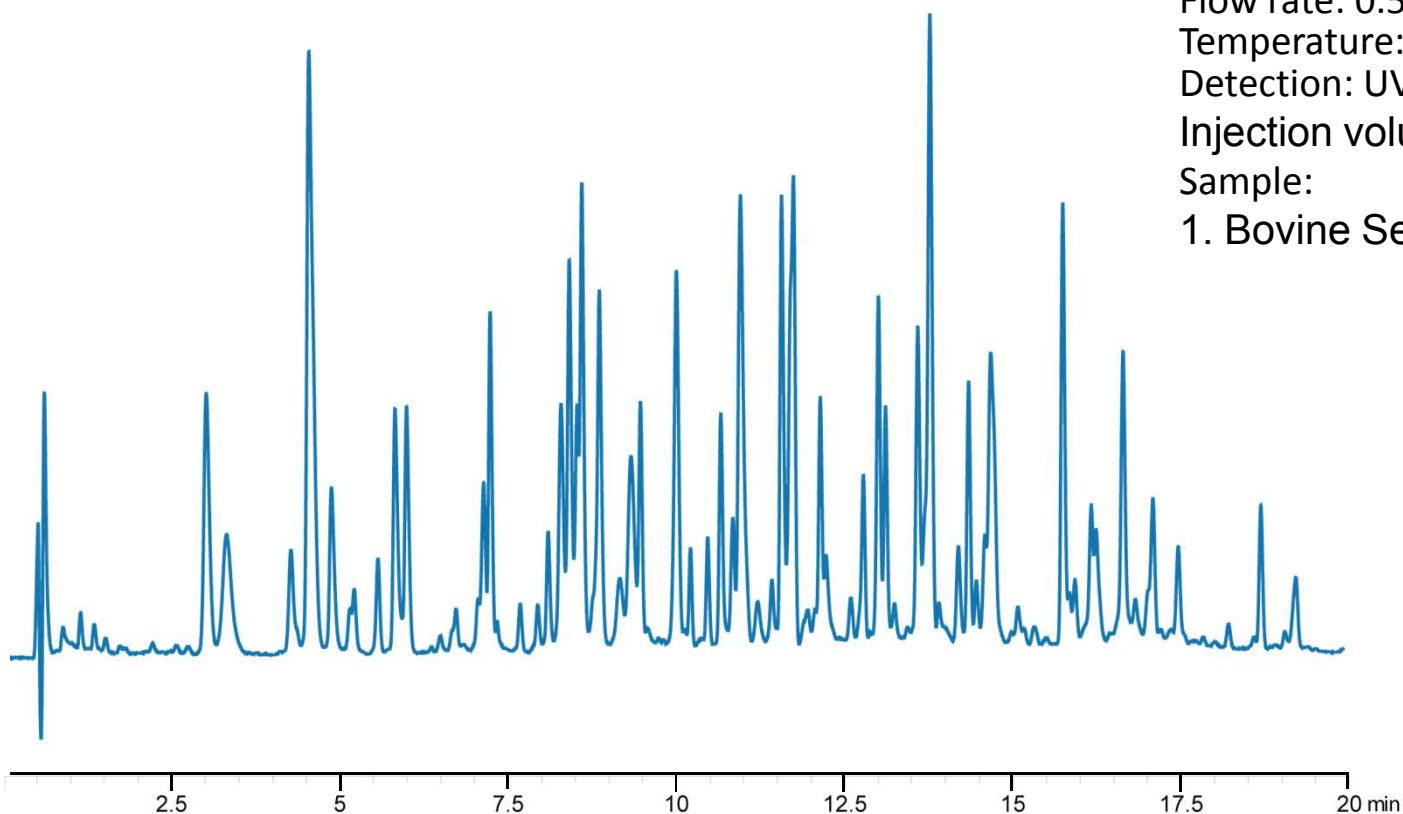
Temperature: 40 °C

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10 μL ,

Sample:

1. Bovine Serum Albumin Digest





まとめ

- 30 nm細孔を持つコアシェルシリカの合成に成功した。
- 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。
- 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。