

# 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

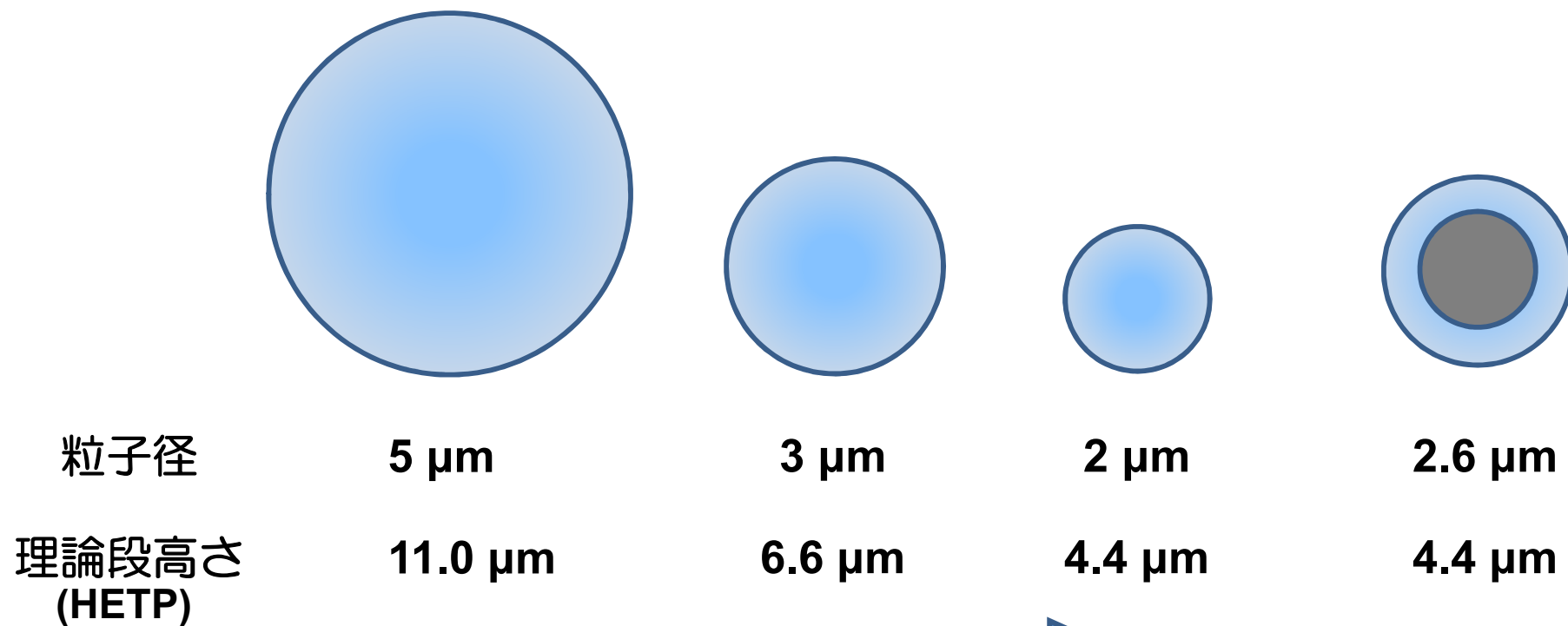
Email: [info@chromanik.co.jp](mailto:info@chromanik.co.jp)

<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

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

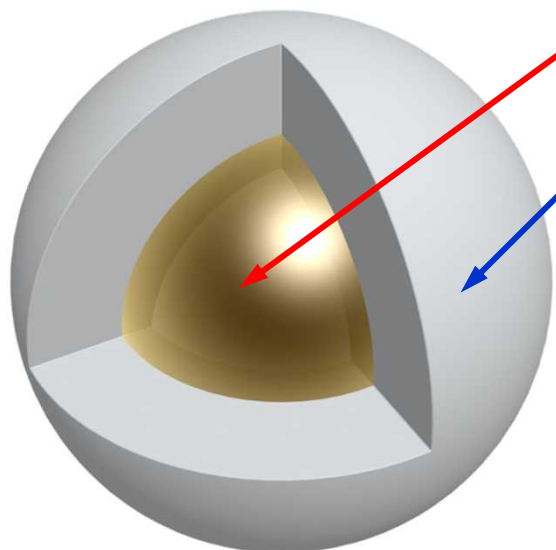
上記のメーカーより様々な固定相のコアシェルカラムが販売されてる。

(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 $\mu\text{m}$

多孔質シリカ層の厚さ0.2~0.6 $\mu\text{m}$

- 粒子径は1.7~5  $\mu\text{m}$
- 細孔径は9~30 nm  
(3 $\mu\text{m}$ 以下の粒子径では8~20 nm)

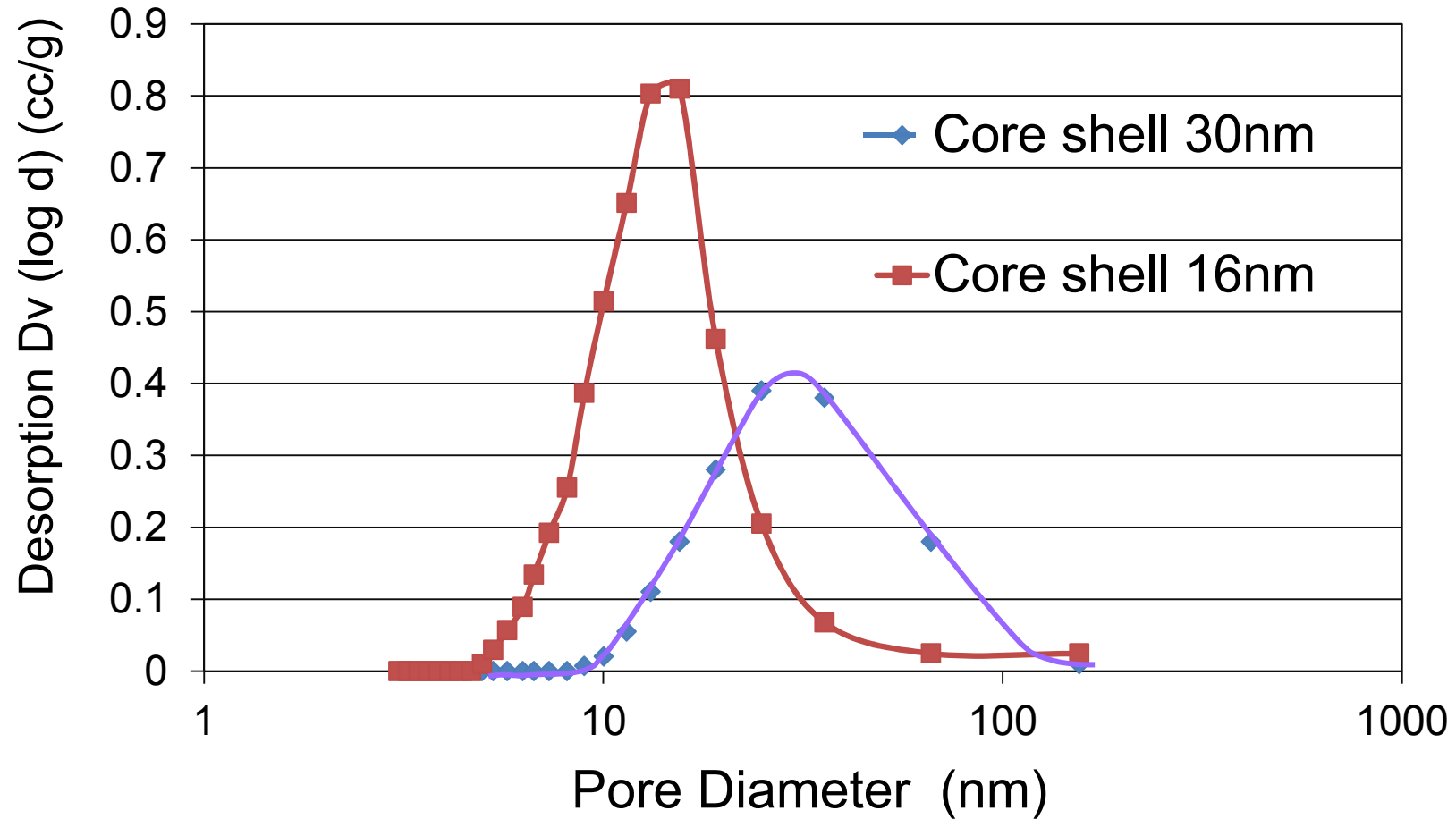
粒子径2.6  $\mu\text{m}$ で30 nmの細孔を持つ  
コアシェル粒子はまだ販売されていない



粒子径2.6  $\mu\text{m}$ 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

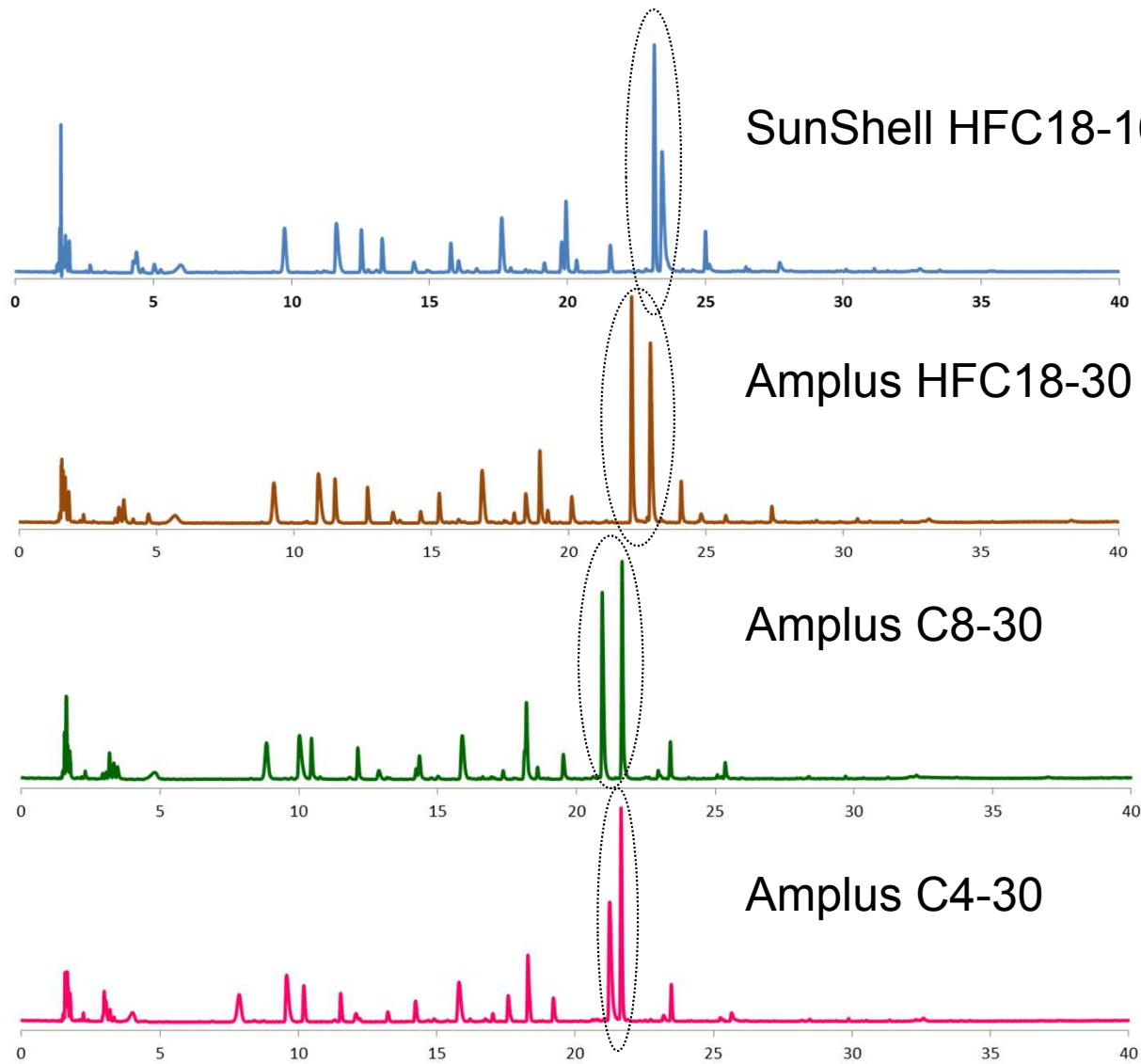
作成した粒子径2.6  $\mu\text{m}$ で30 nmの細孔を持つ  
コアシェル粒子を用いて以下のカラムを作成した

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

Particle diameter is 2.6  $\mu\text{m}$  for all.



# ペプチドの分離



Column:

SunShell HFC18-16, 2.6  $\mu\text{m}$  (16 nm) 150 x 4.6 mm,  
SunShell HFC18-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (30 nm) 150 x 4.6 mm,  
SunShell C8-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (30 nm) 150 x 4.6 mm,  
SunShell C4-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (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

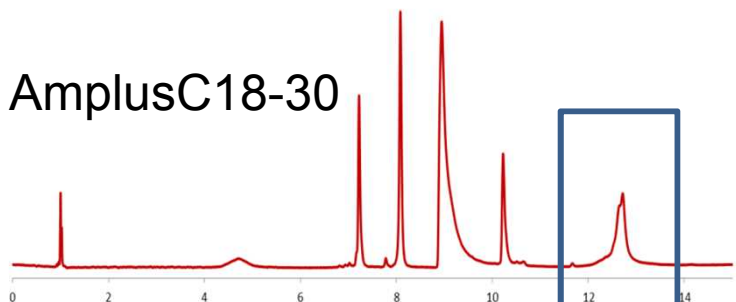
Detection: UV@210 nm,

Sample: Tryptic digest of cytochrome C

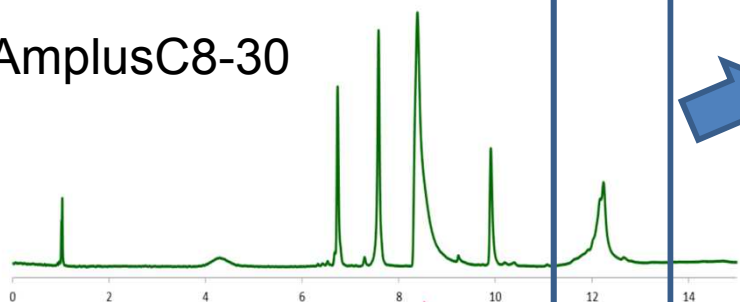


# タンパクの分離

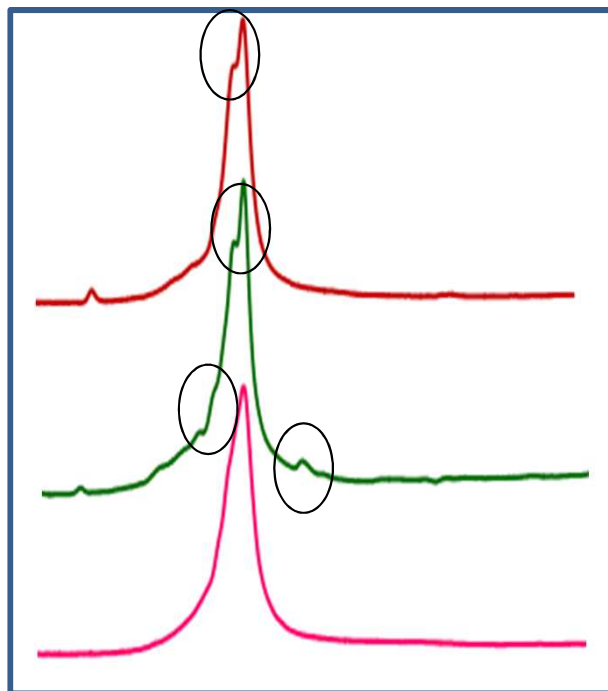
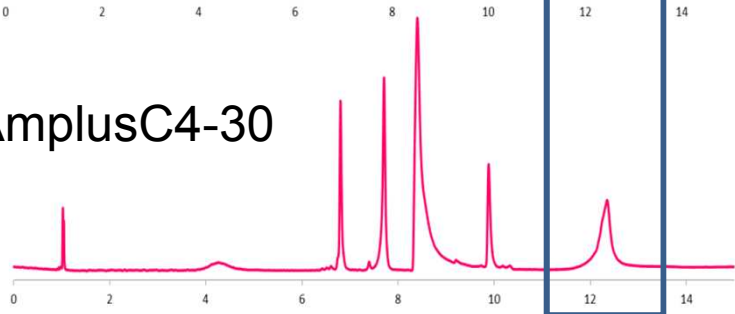
AmplusC18-30



AmplusC8-30



AmplusC4-30



Column:

Amplus C18-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (30 nm) 150 x 4.6 mm,

Amplus C8-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (30 nm) 150 x 4.6 mm,

Amplus C4-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (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,

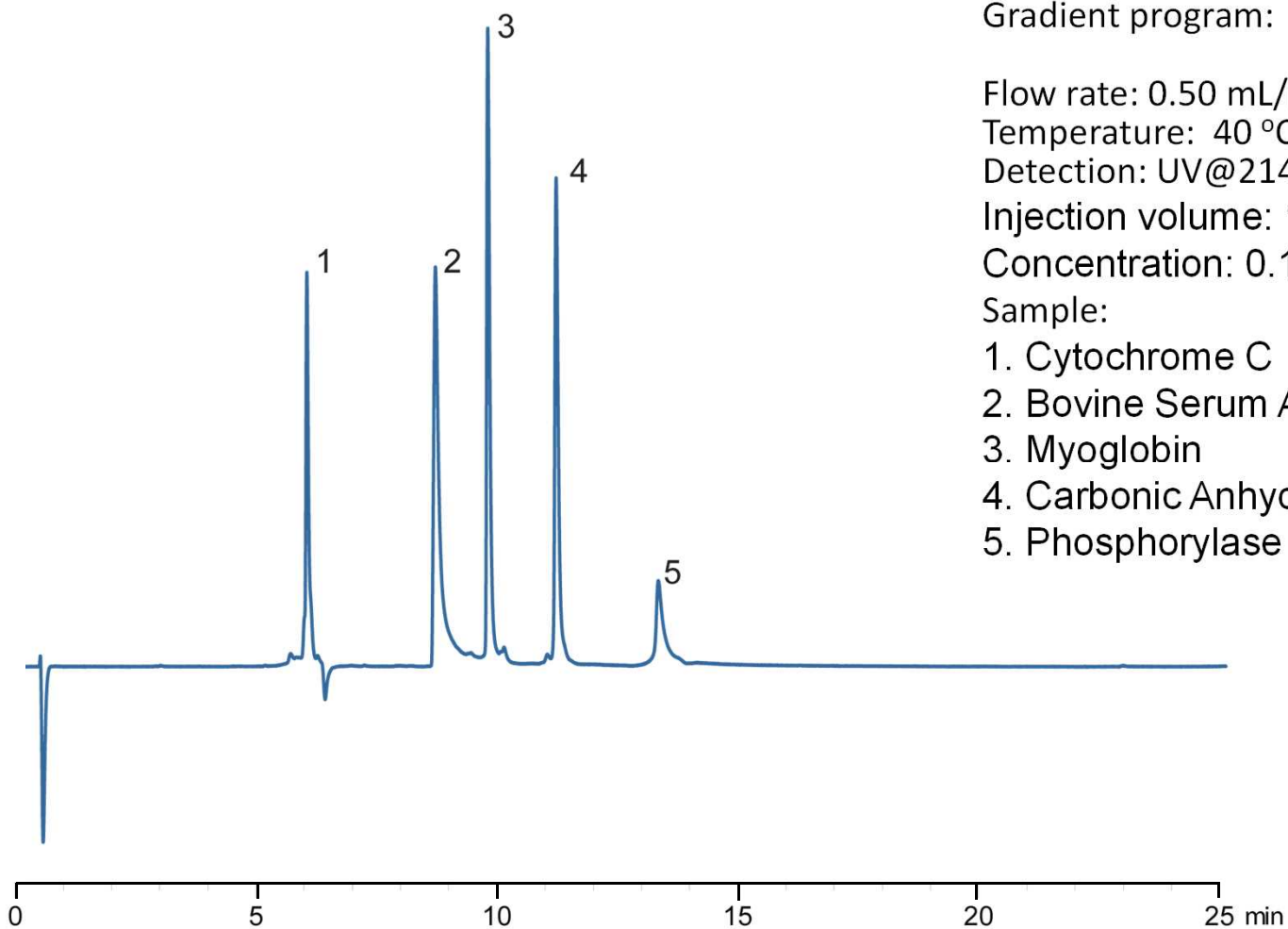
Sample:1 = Cytochrome C, 2 = Lysozyme,

3 = BSA, 4 = Myoglobin, 5 = Ovalbumin





# タンパクの分離 (Amplus C4-30)



Column:

Amplus C4-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (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 25 min

%B 22% 70.5%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10  $\mu\text{L}$ ,

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

Sample:

1. Cytochrome C

2. Bovine Serum Albumin

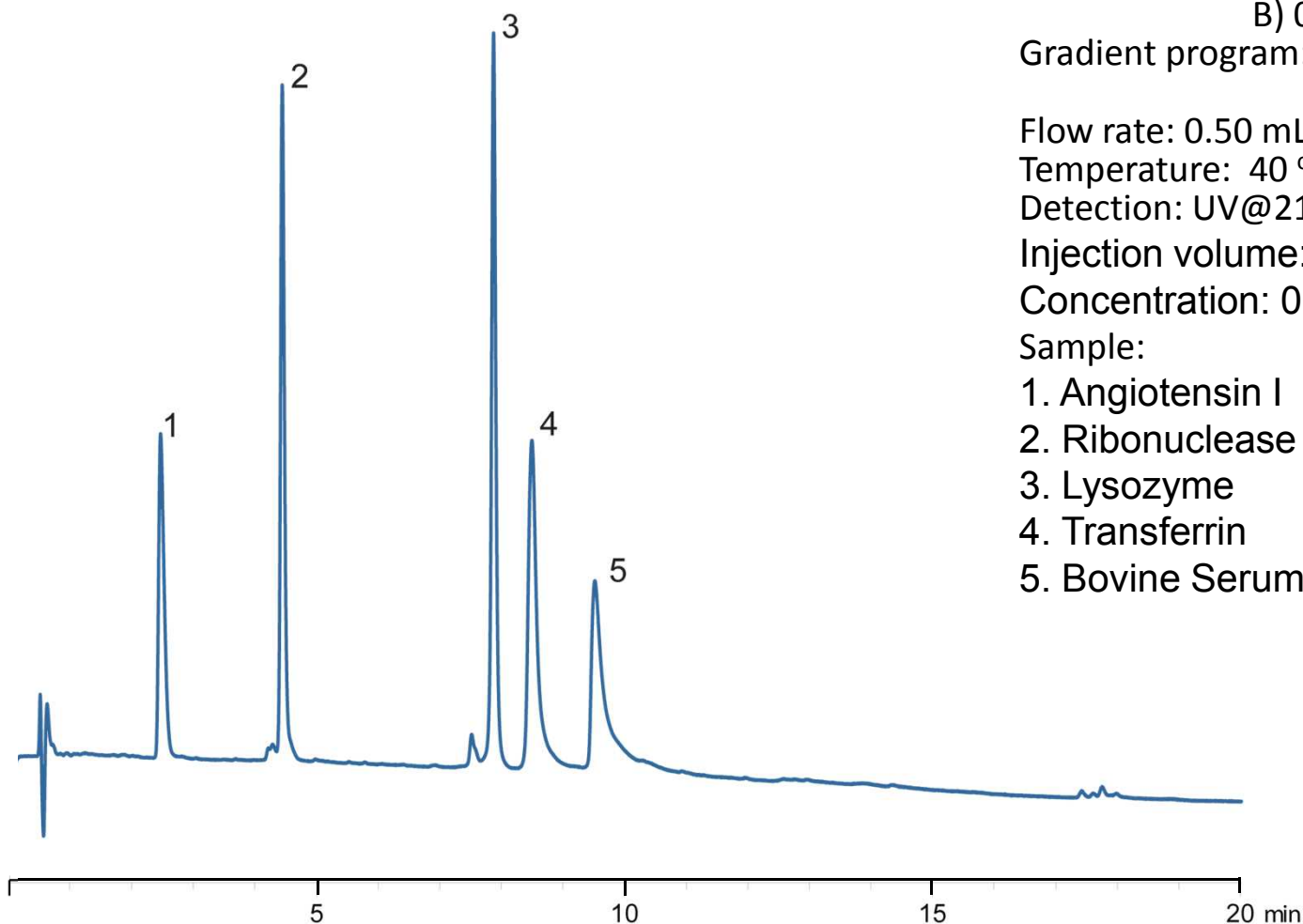
3. Myoglobin

4. Carbonic Anhydrase

5. Phosphorylase B



# タンパクの分離 (Amplus C18-30)



Column:

Amplus C18-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (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 20 min

%B 22% 70.5%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10  $\mu\text{L}$ ,

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

Sample:

1. Angiotensin I

2. Ribonuclease A

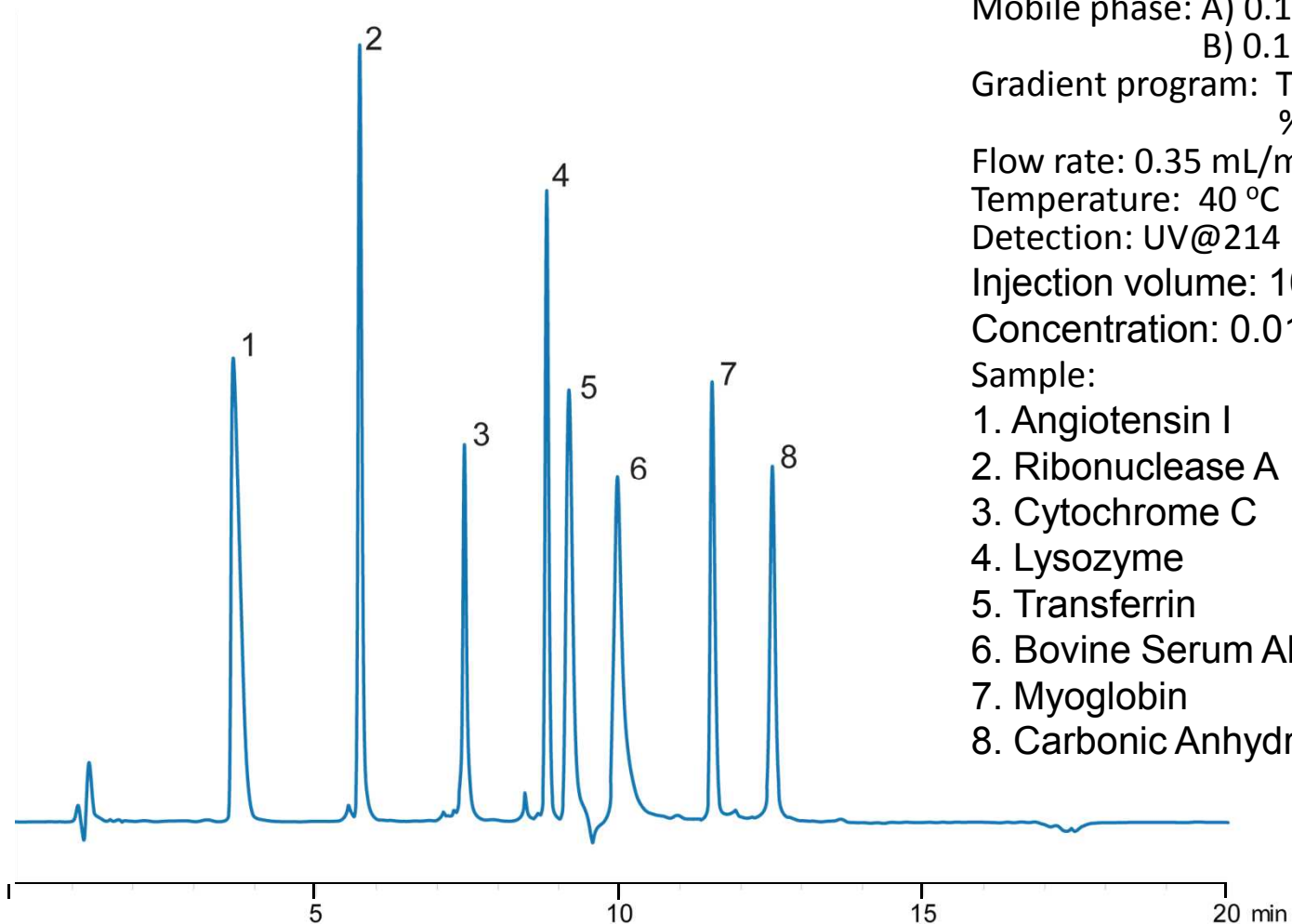
3. Lysozyme

4. Transferrin

5. Bovine Serum Albumin



# タンパクの分離 (Amplus C8-30)



Column:

Amplus C8-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (30 nm) 150 x 2.1 mm,

Mobile phase: A) 0.1% TFA in water

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

Gradient program: Time 0 min 20 min

%B 22% 70.5%

Flow rate: 0.35 mL/min ,

Temperature: 40  $^{\circ}\text{C}$

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10  $\mu\text{L}$ ,

Concentration: 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  each protein,

Sample:

1. Angiotensin I

2. Ribonuclease A

3. Cytochrome C

4. Lysozyme

5. Transferrin

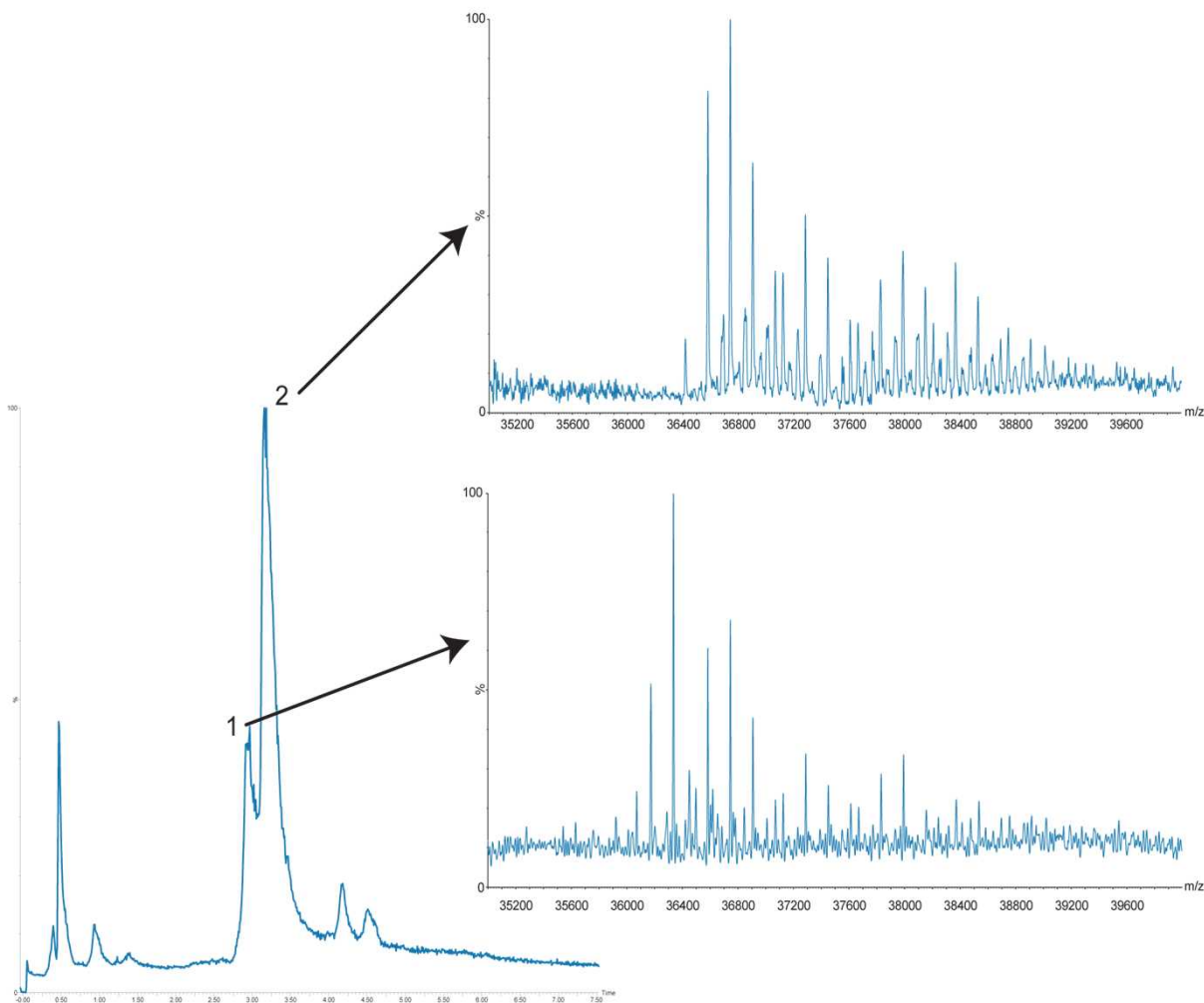
6. Bovine Serum Albumin

7. Myoglobin

8. Carbonic Anhydrase



# リパーゼの分離 (Amplus C8-30)



Column:

Amplus C8-30, 2.6  $\mu\text{m}$  (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 °C

Detection: MS,

Injection volume: 10  $\mu\text{L}$ ,

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 <sup>2</sup> /g	2.5%	1.2 μmol/m <sup>2</sup>	Yes
SunShell C18-WP 4.6 x 150 mm	CW6471	16 nm	90 m <sup>2</sup> /g	5%	2.5 μmol/m <sup>2</sup>	Yes

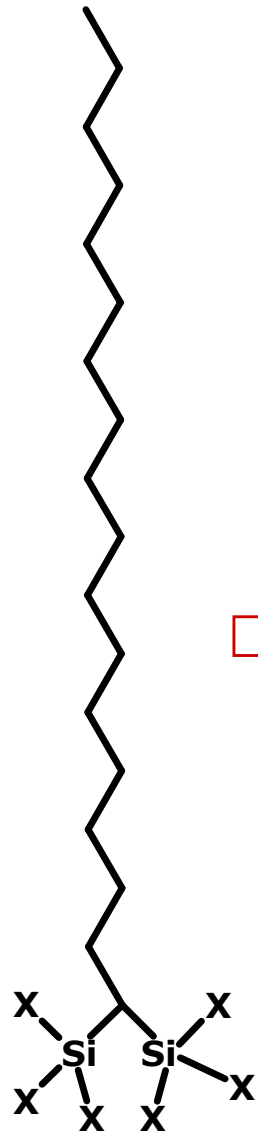
HFC18-WP は1対のシリル基によりC18を結合しますので、結合密度が低くなります。C18-WPに比べ約1/2です。

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

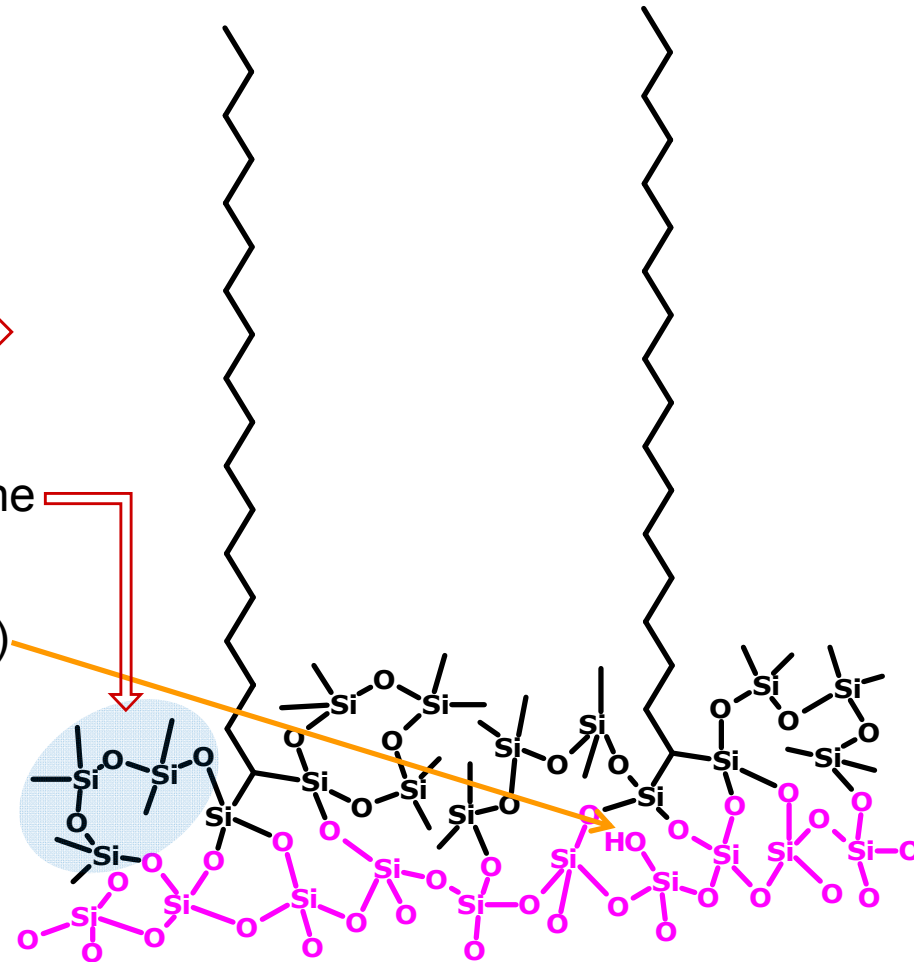


(X: Cl, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)

HFC18試薬の概略図



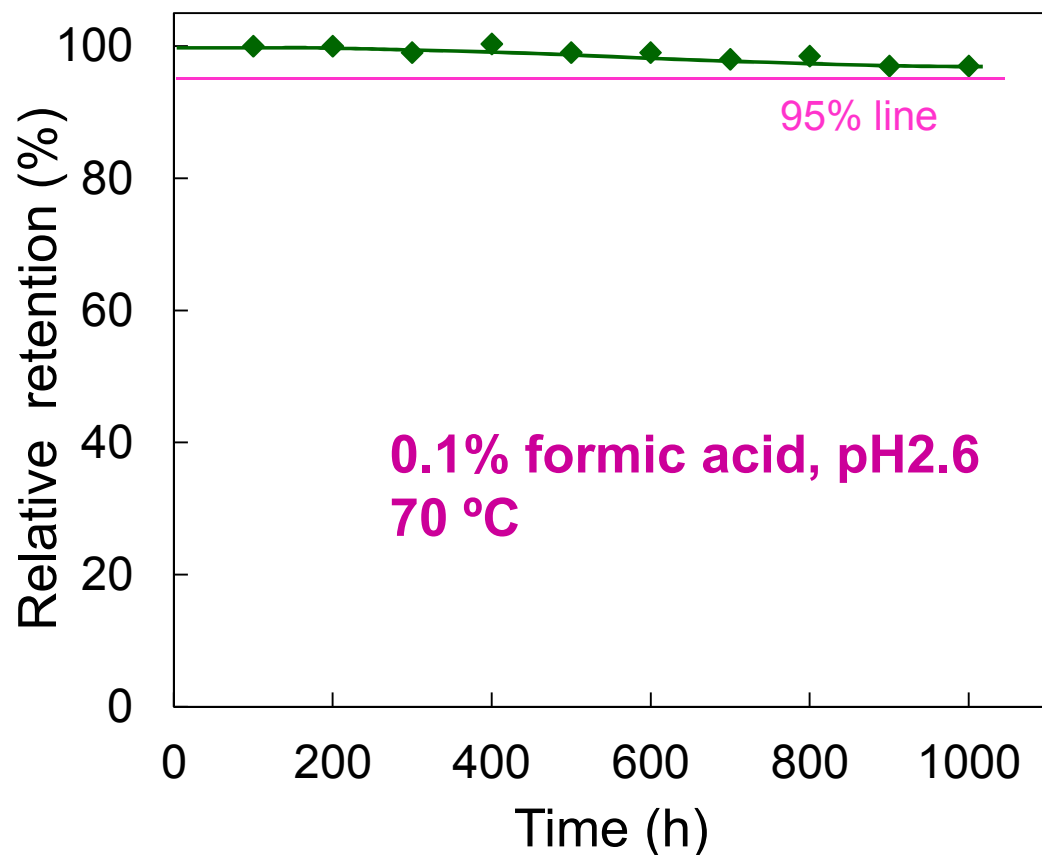
Hexamethyldichlorotrisiloxane  
+  
Trimethylchlorosilane (TMS)



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 $\mu$ m, 50 x 2.1 mm

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/0.1%  
formic acid, pH2.6=40/60

Flow rate: 0.4 mL/min

Temperature: 70 °C

Measurement condition

Mobile phase: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O=60/40

Flow rate: 0.4 mL/min

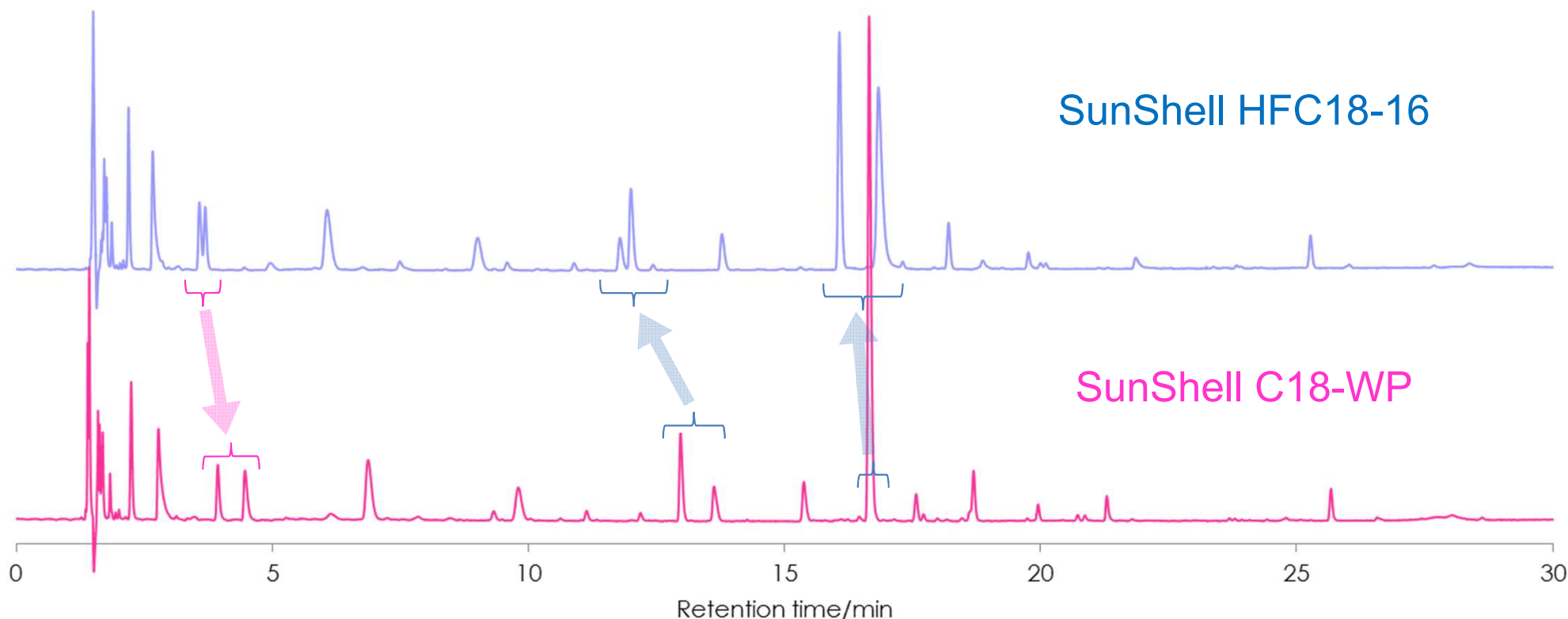
Temperature: 40 °C

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  $\mu\text{m}$  (16 nm) 150 x 4.6 mm,

SunShell C18-WP, 2.6  $\mu\text{m}$  (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%

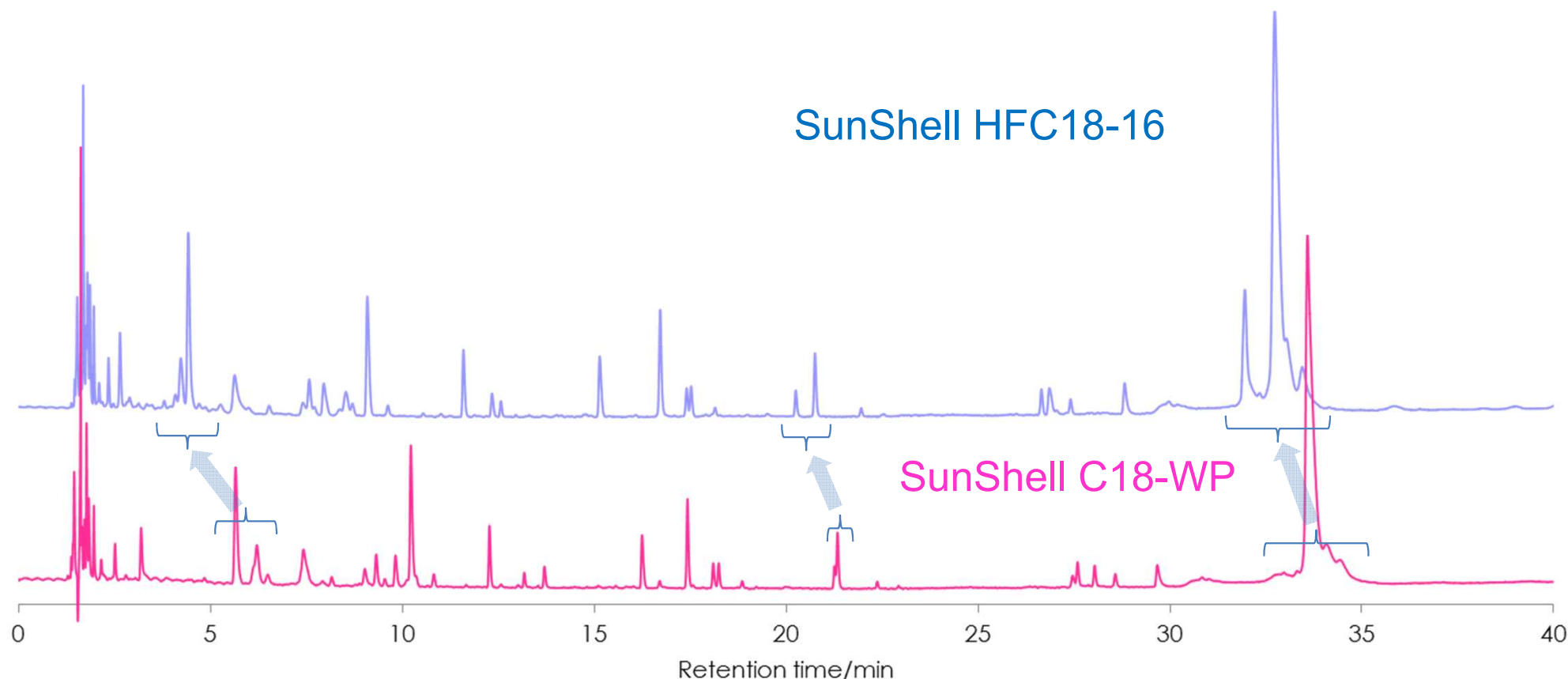
Flow rate: 1.0 mL/min , Temperature: 25  $^{\circ}\text{C}$ , Detection: UV@210 nm,

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  $\mu\text{m}$  (16 nm) 150 x 4.6 mm,  
SunShell C18-WP, 2.6  $\mu\text{m}$  (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  $^{\circ}\text{C}$ , 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  $\mu\text{m}$  (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 ,

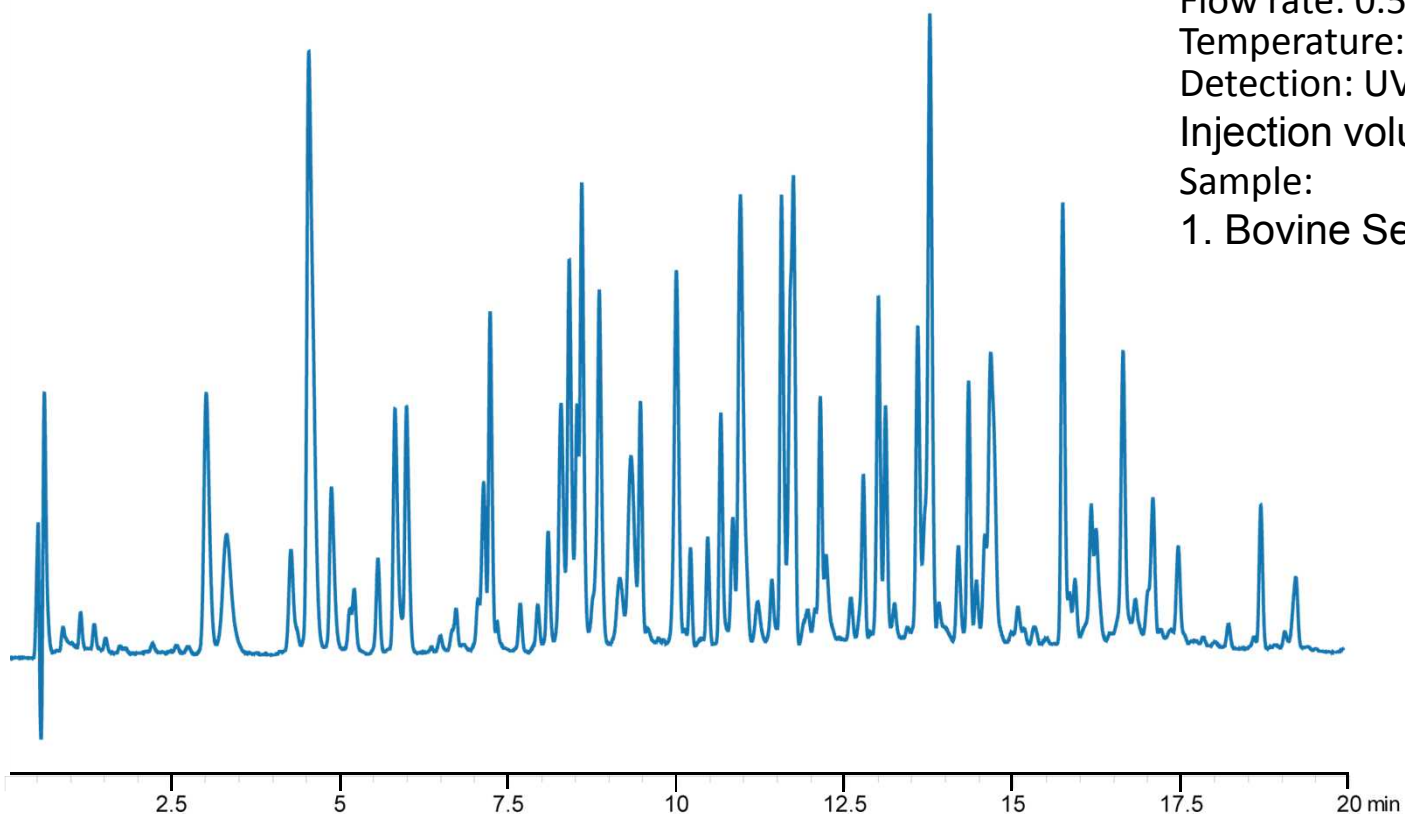
Temperature: 40 °C

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10  $\mu\text{L}$ ,

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。
- 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。