

日本薬学会第133年会 新技術セミナー

2.6 μm コアシェルカラム初のタンパク質分離用30nmカラムAmplus

クロマニック テクノロジーズ

長江 徳和、塚本 友康

Norikazu Nagae, Tomoyasu Tsukamoto

Email: info@chromanik.co.jp

<http://chromanik.co.jp>

コアシェル型シリカの歴史

1969年カーク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

2000年にカーク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 $4\mu\text{m}$ の核に厚さ $0.5\mu\text{m}$ の多孔質層 (細孔径 30nm)

2007年三度カークランドらにより発表², 全多孔性 $\text{sub}2\mu\text{m}$ 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)

(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).



• *Fused-Core technology was developed by Jack Kirkland.*

コアシェル充填剤とは

Superficially porous particle



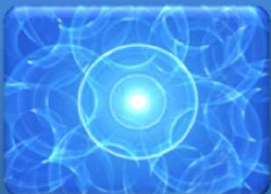
コア（核）の周りに多孔質層が存在



粒子径によりカラム圧は決まり，粒子径の2乗に反比例してカラム圧は高くなる

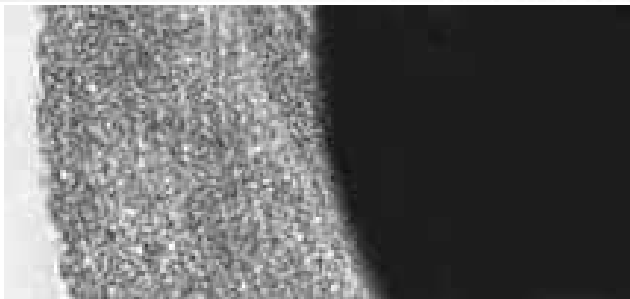
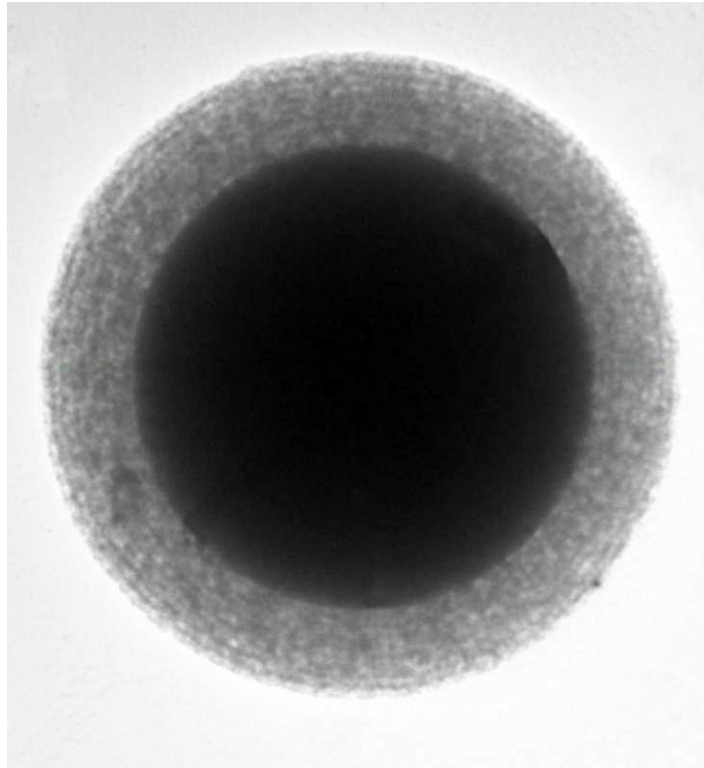


同じ粒子径の全多孔性の粒子に比べ，コアシェル粒子は多孔質層が薄いため，溶質の拡散距離が短くなり，速く平衡化するため，段数が高くなる

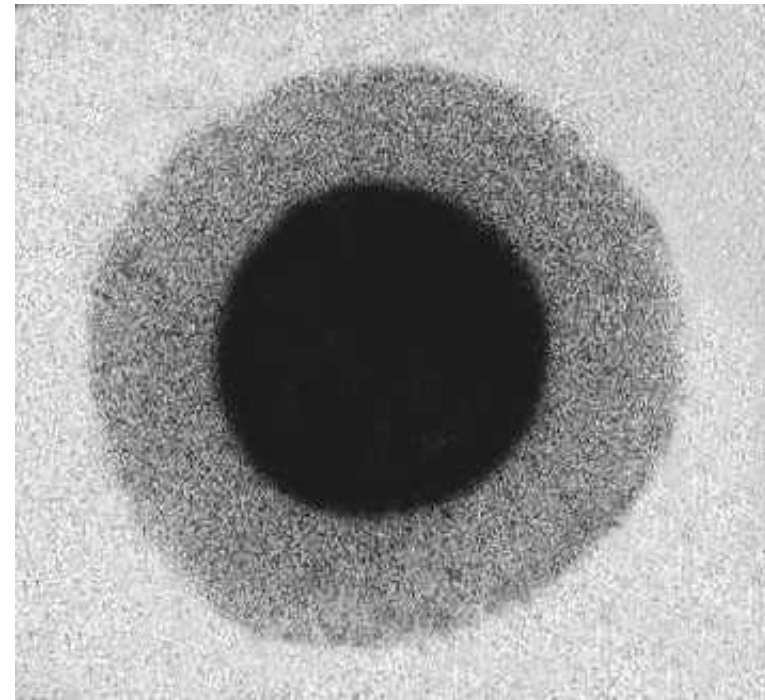


つまり，コアシェルは $3\mu\text{m}$ 粒子の圧力と同等であるにもかかわらず，サブ $2\mu\text{m}$ の性能を発揮する

二種類のコアシェル構造のシリカ粒子

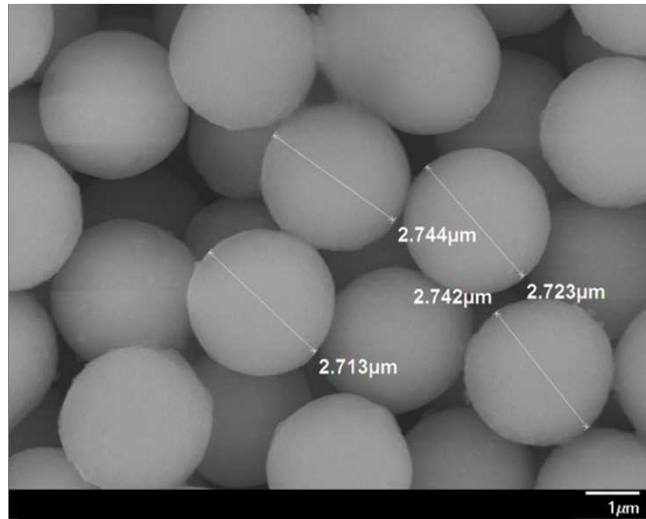


マルチレイヤー（多層）多孔質層構造



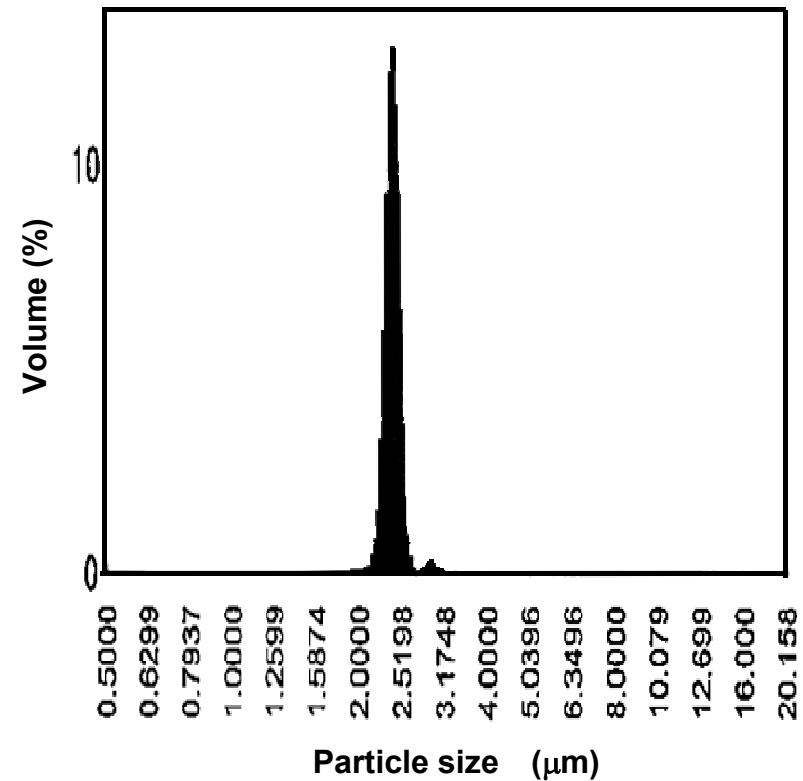
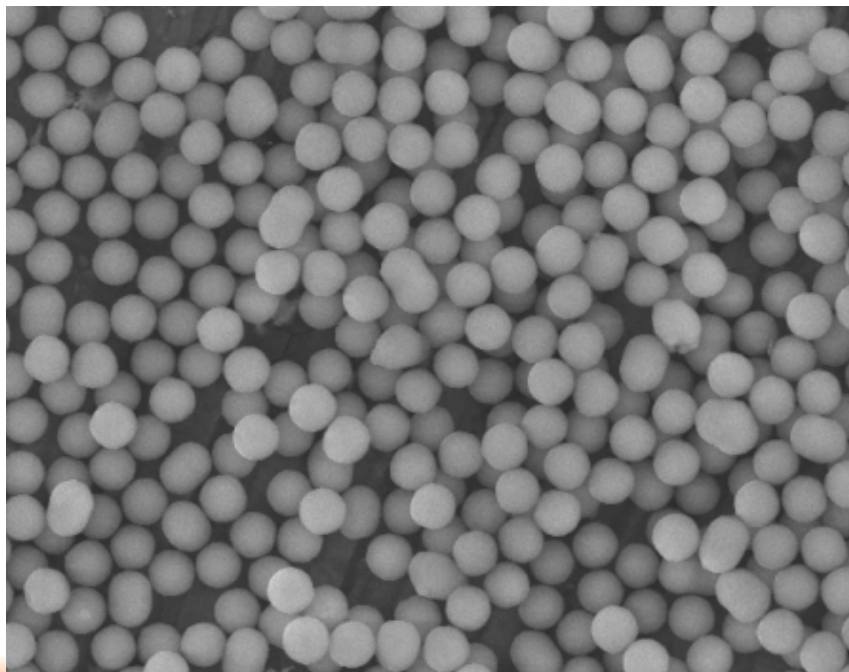
モノレイヤー（単層）多孔質構造

A社コアシェル粒子の粒度分布

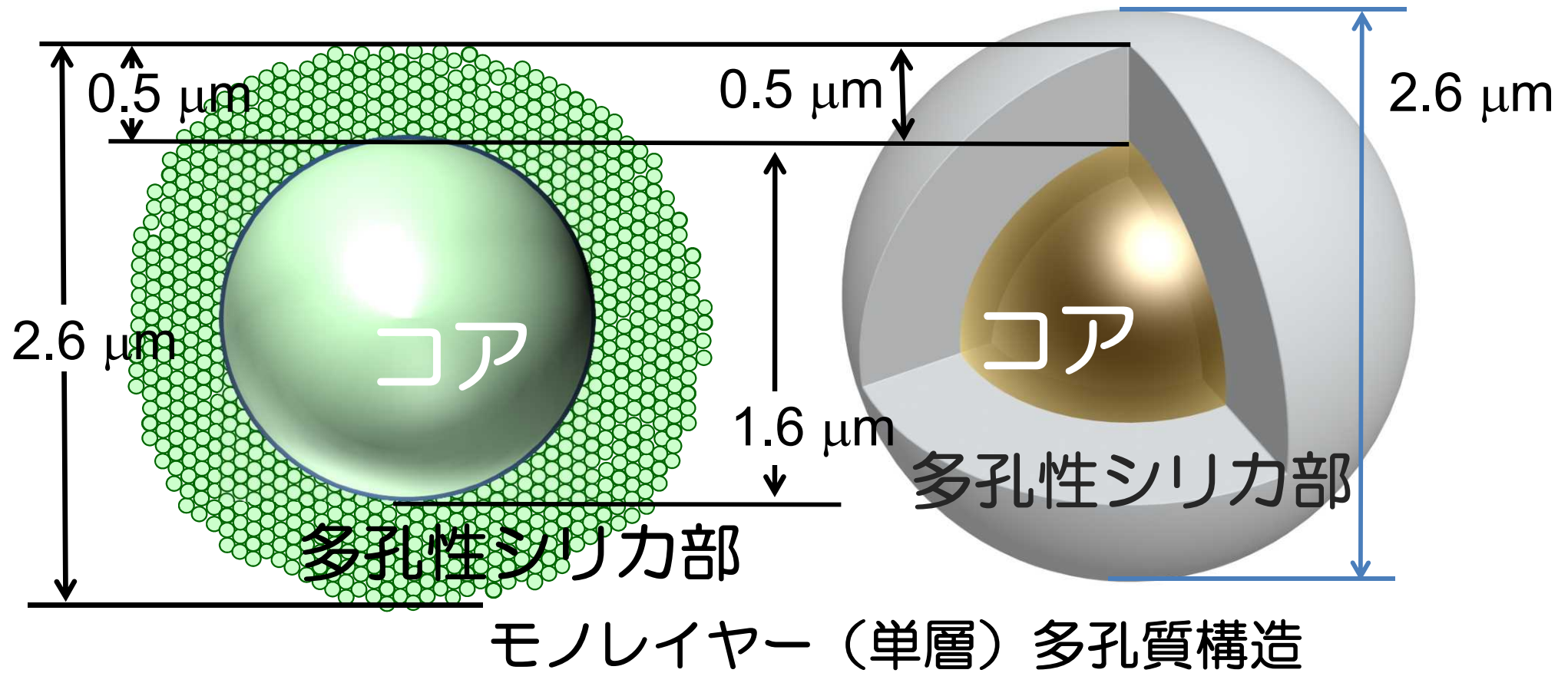


Coulter counter

$$D_{90}/D_{10}=1.12$$

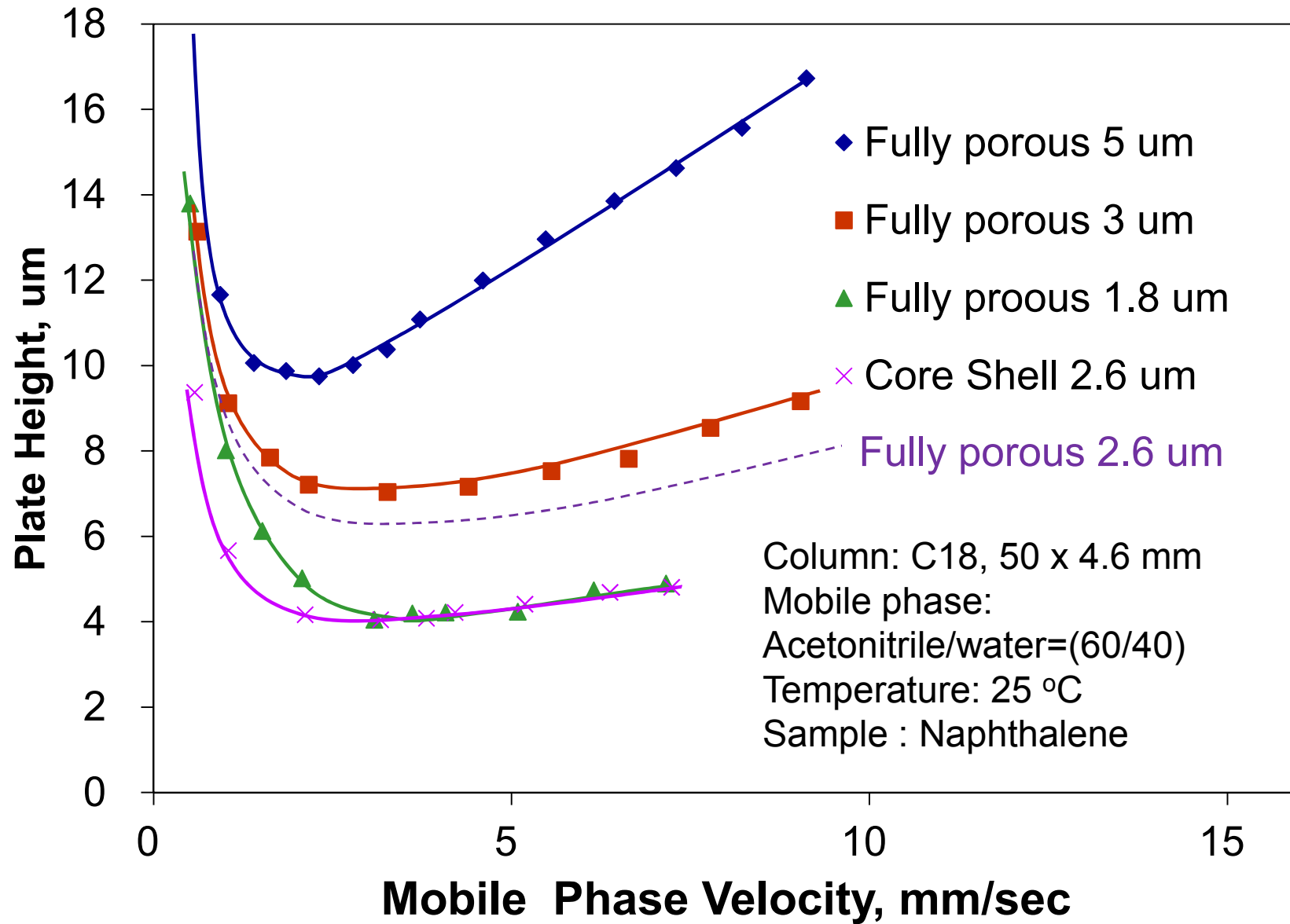


Amplusシリカのコアシェル構造の概略図

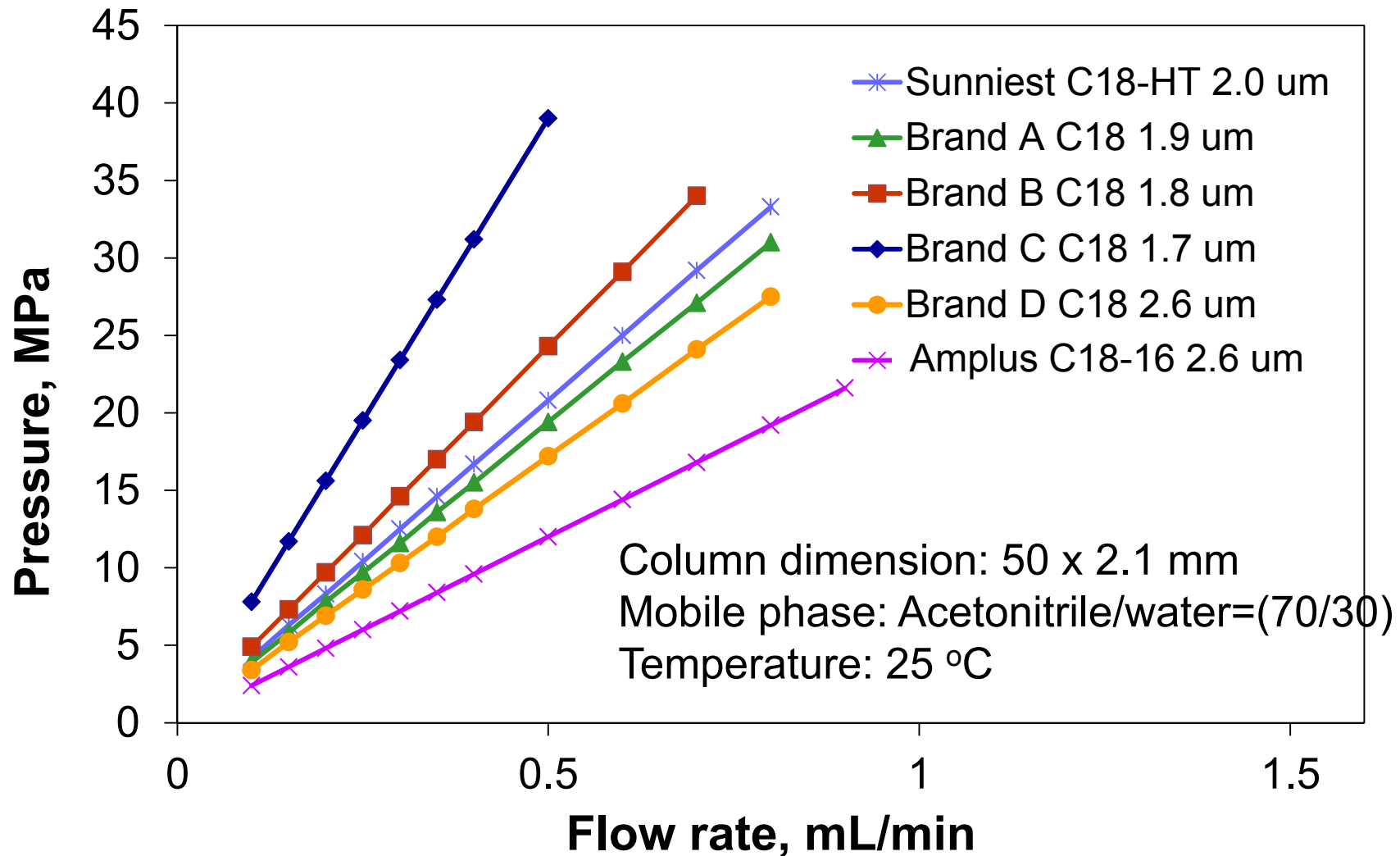


粒子径：2.6 μm ，コア径：1.6 μm ，多孔質層の厚さ：0.5 μm
 細孔容積：0.30 mL/g，比表面積：90, 40 m^2/g ，細孔径：16 nm, 30 nm，
 多孔性シリカの体積の割合：77%

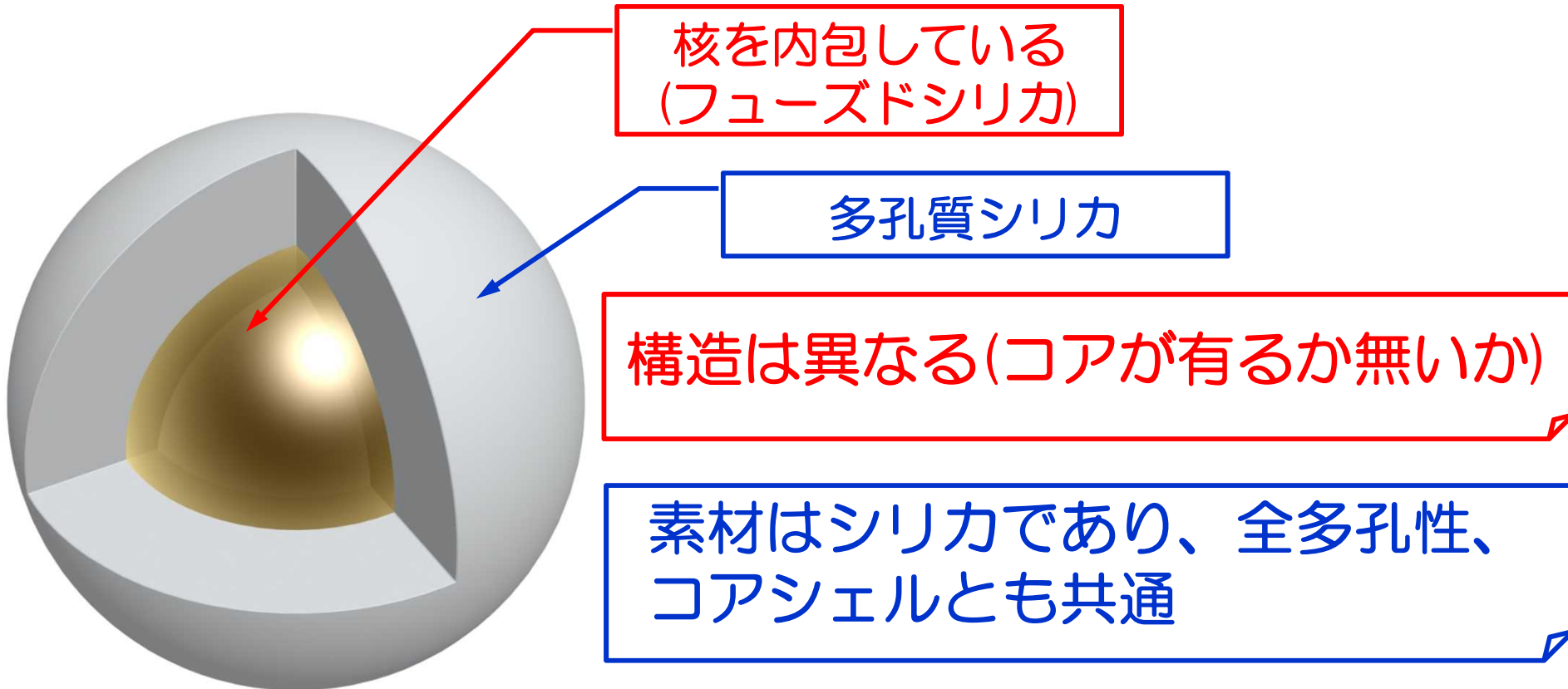
全多孔性とコアシェル型の理論段高さの比較



Sub2 μ mカラムとコアシェル型カラムとの圧力比較

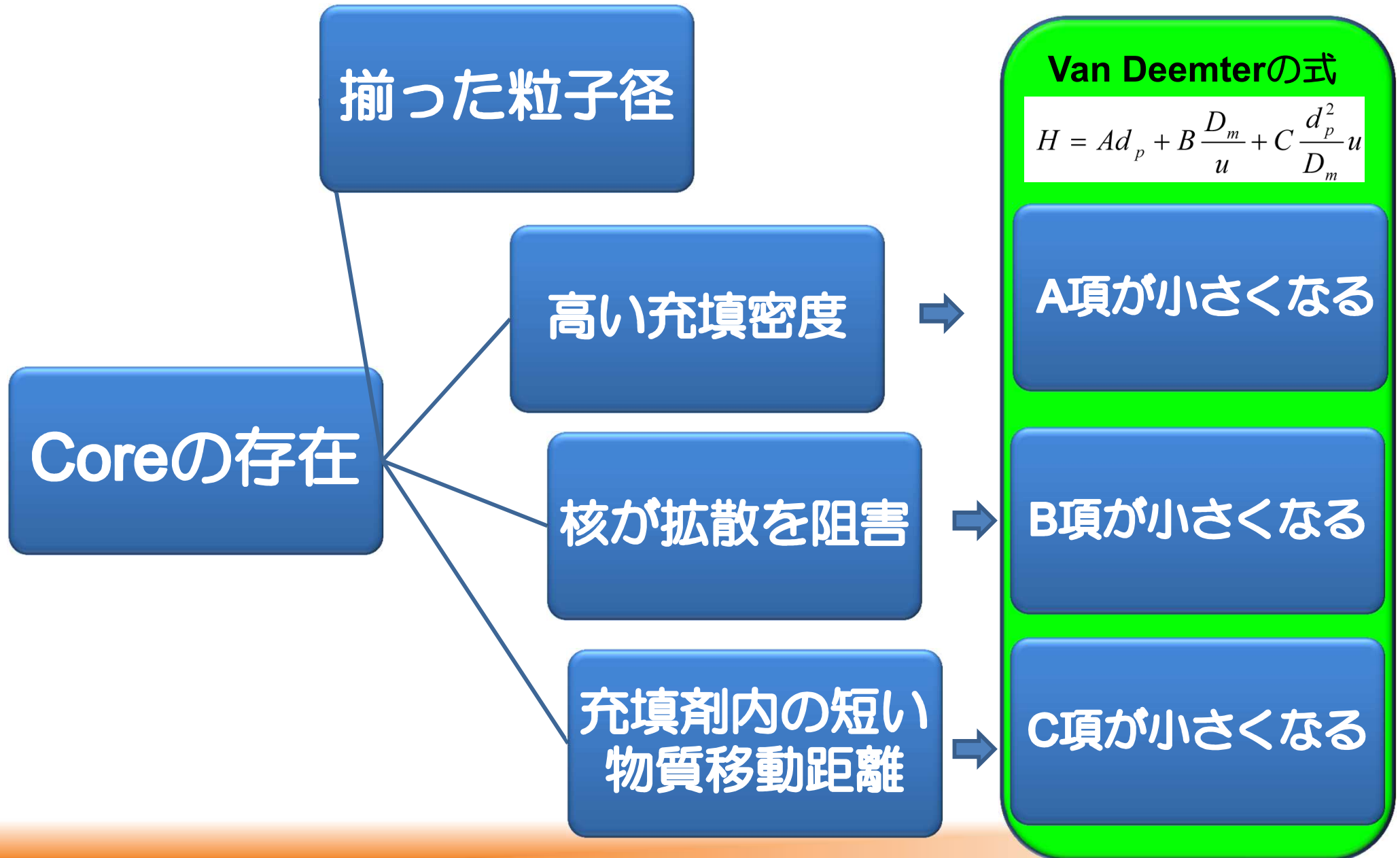


全多孔性シリカ粒子と何が違う，何が一緒？

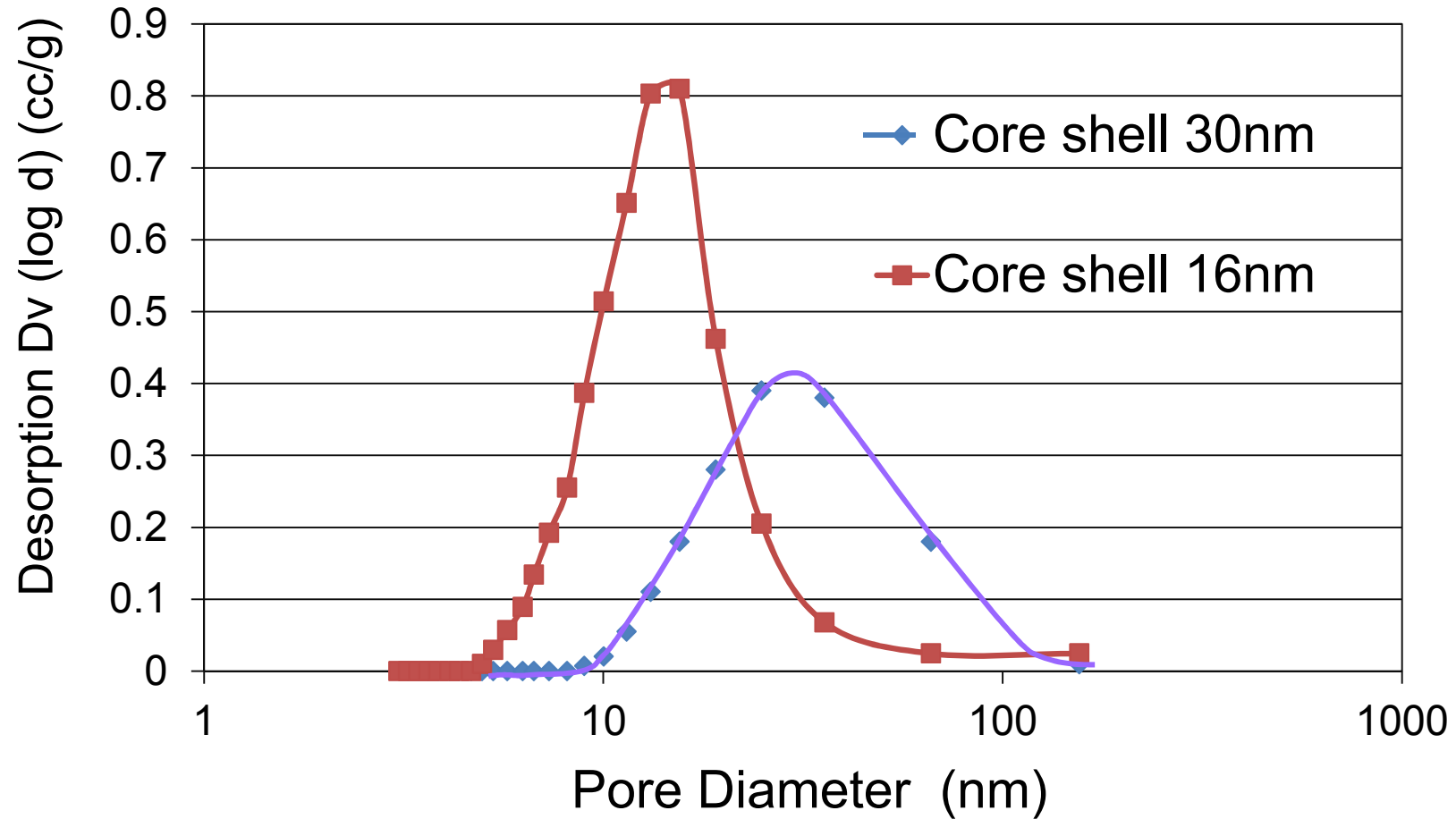


化学的特徴は
全多孔性シリカと同じ

コアシェル構造なぜいいの？



コアシェルシリカの細孔分布



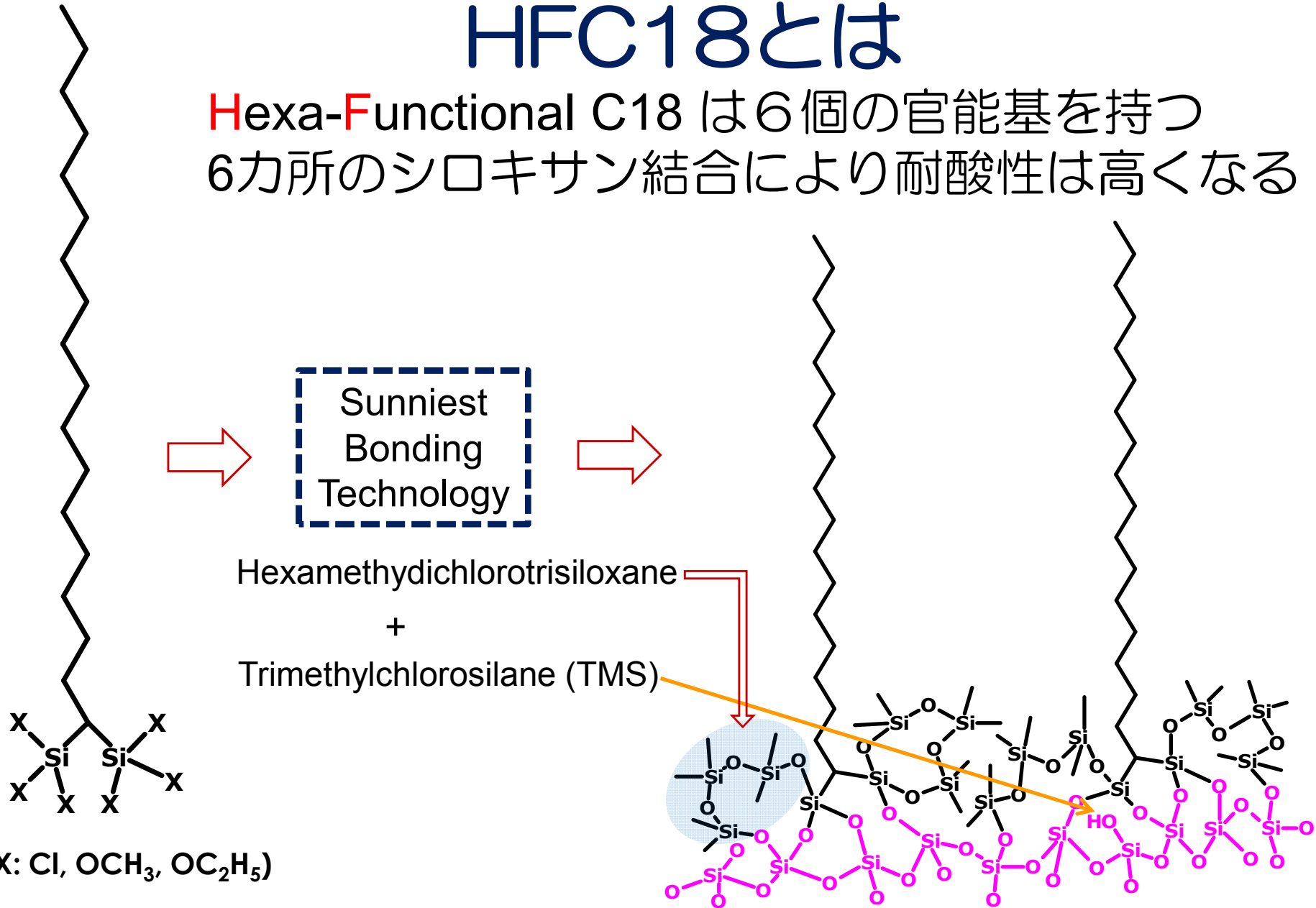
高分子分離用コアシェルカラム

	Particle size	Pore diameter	Surface area	Carbon loading	C18 Surface coverage	End-capping
SunShell C18-WP	2.6 μm	16 nm	90 m^2/g	5%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell HFC18-16	2.6 μm	16 nm	90 m^2/g	2.5%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
SunShell HFC18-30	2.6 μm	30 nm	40 m^2/g	1.3%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
Amplus C18-16	2.6 μm	16 nm	90 m^2/g	2.5%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
Aumplus C18-30	2.6 μm	30 nm	40 m^2/g	1.3%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
Amplus C8-30	2.6 μm	30 nm	40 m^2/g	1.2%	2.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes
Amplus C4-30	2.6 μm	30 nm	40 m^2/g	0.9%	3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	Yes

カラムサイズ：内径2.1mm,30mm,4.6mm, 長さ50mm,100mm,150mm

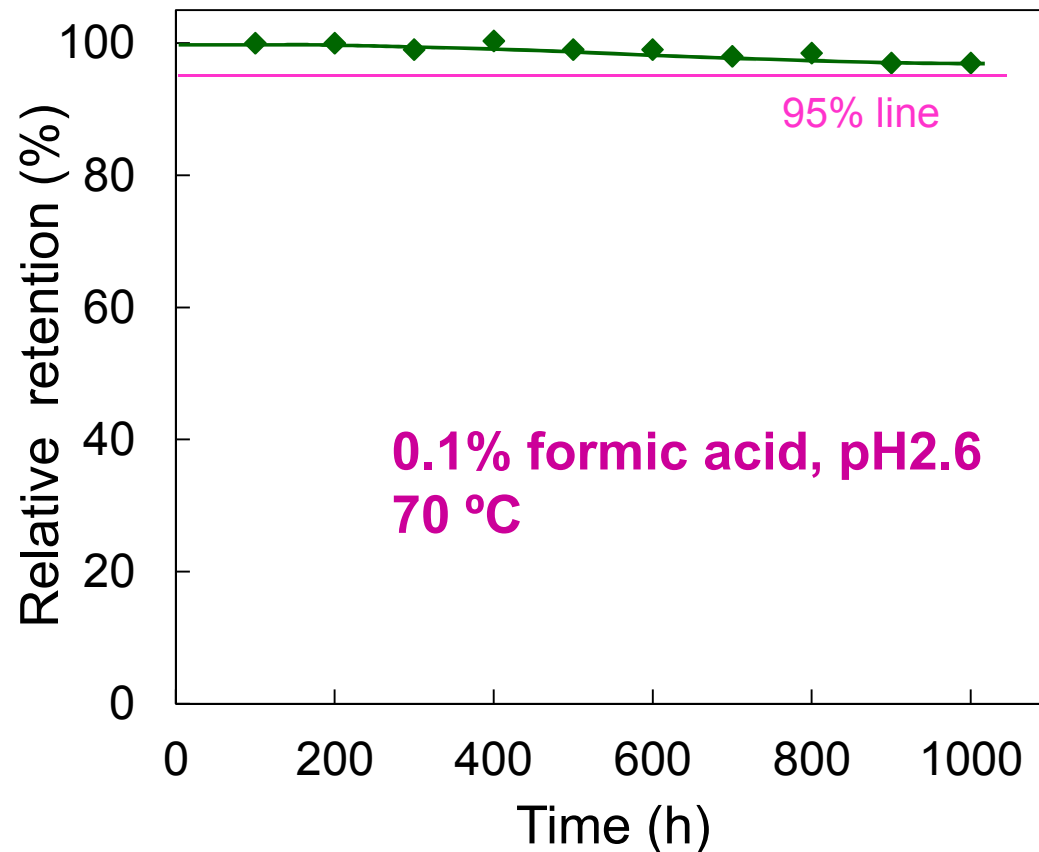
HFC18とは

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の耐酸性 LC/MS用の移動相条件



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

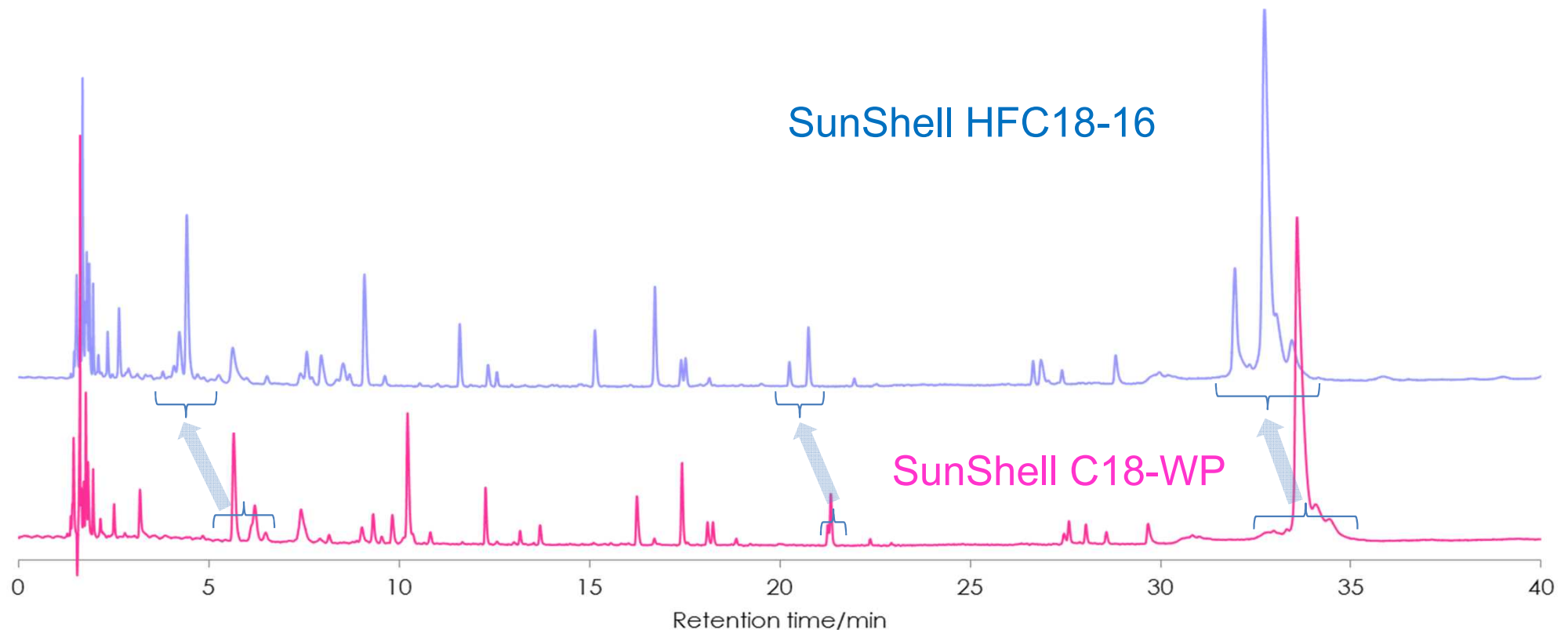
Flow rate: 0.4 mL/min

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

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

B) 0.1 % TFA in Acetonitrile

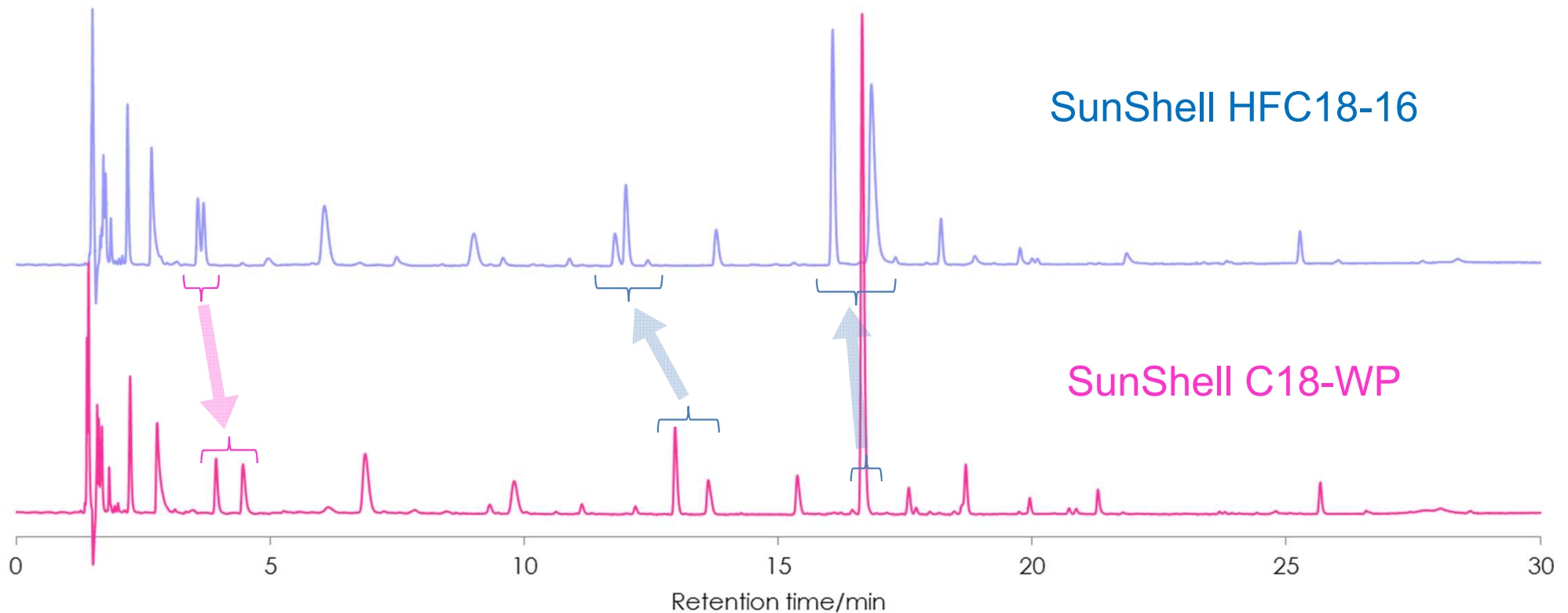
Gradient program:

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

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

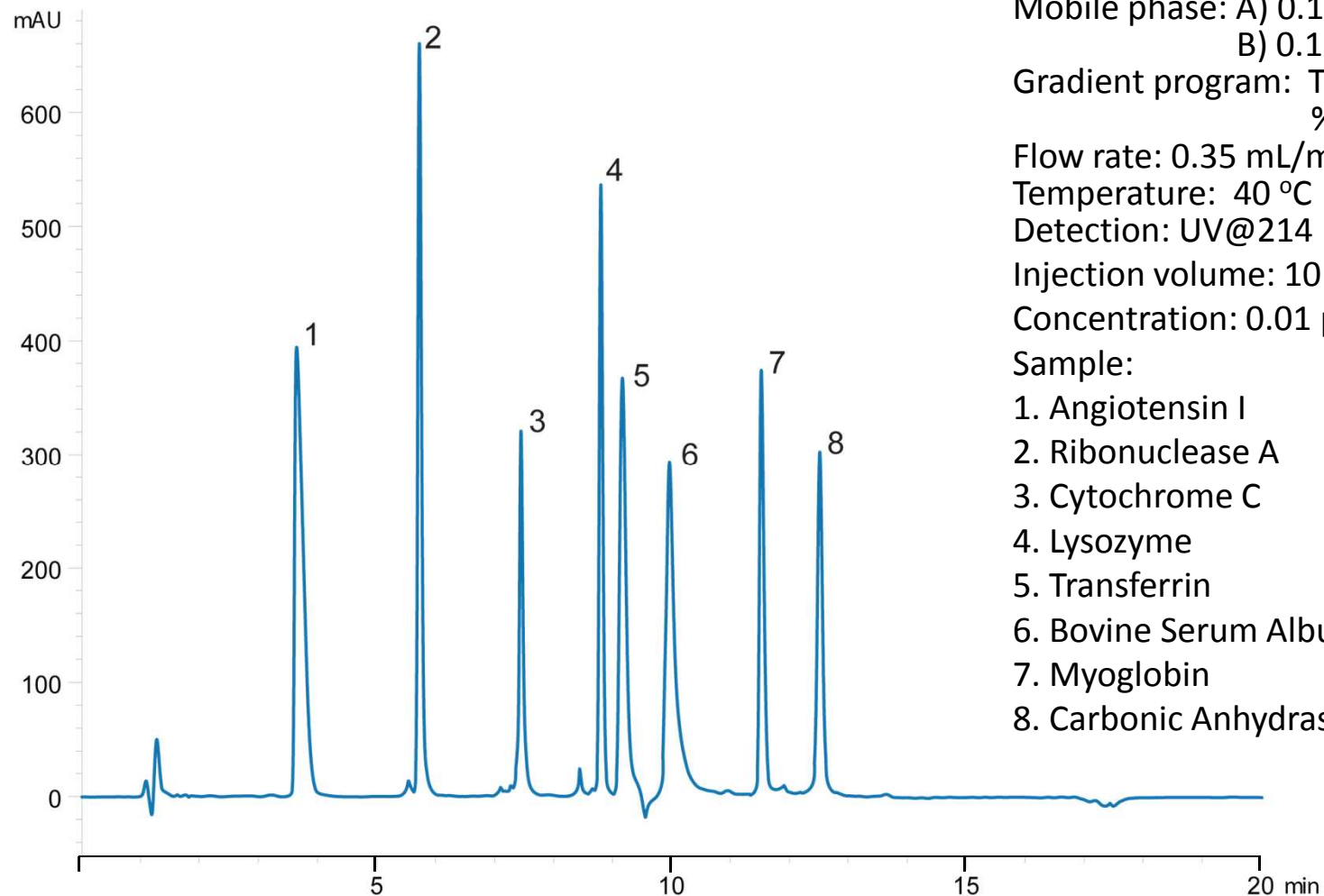
Time	0 min	5 min	40 min
%B	5%	5%	50%

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

Sample: Tryptic digest of cytochrome C

標準タンパク質の分離

Amplus C8-30



Column:

Amplus C8-30, 2.6 μm (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 °C

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10 μL ,

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

Sample:

1. Angiotensin I

2. Ribonuclease A

3. Cytochrome C

4. Lysozyme

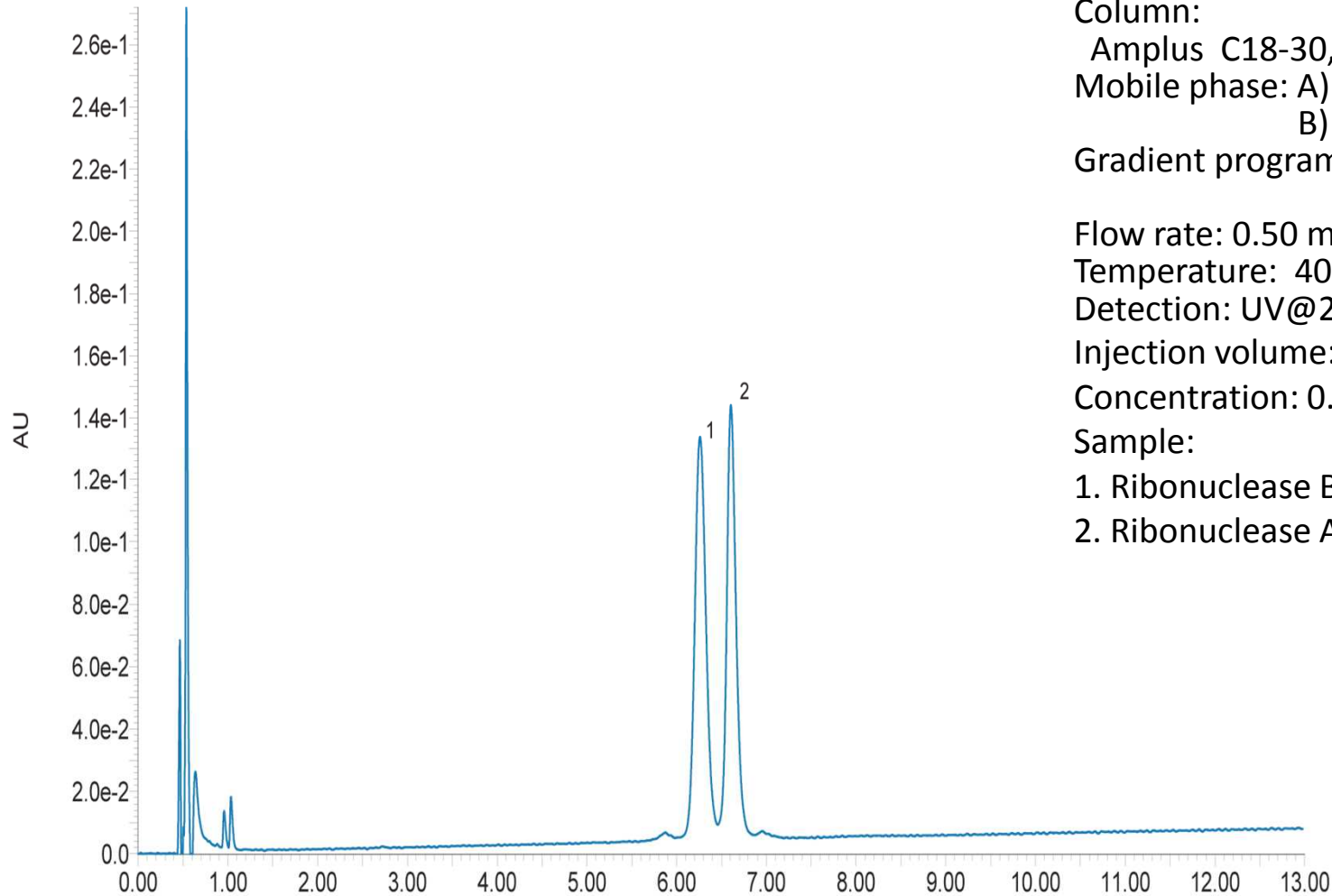
5. Transferrin

6. Bovine Serum Albumin

7. Myoglobin

8. Carbonic Anhydrase

Ribonuclease A/Bの分離 Amplus C18-30



Column:

Amplus C18-30, 2.6 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 20 min

%B 22% 70.5%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

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

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10 μL ,

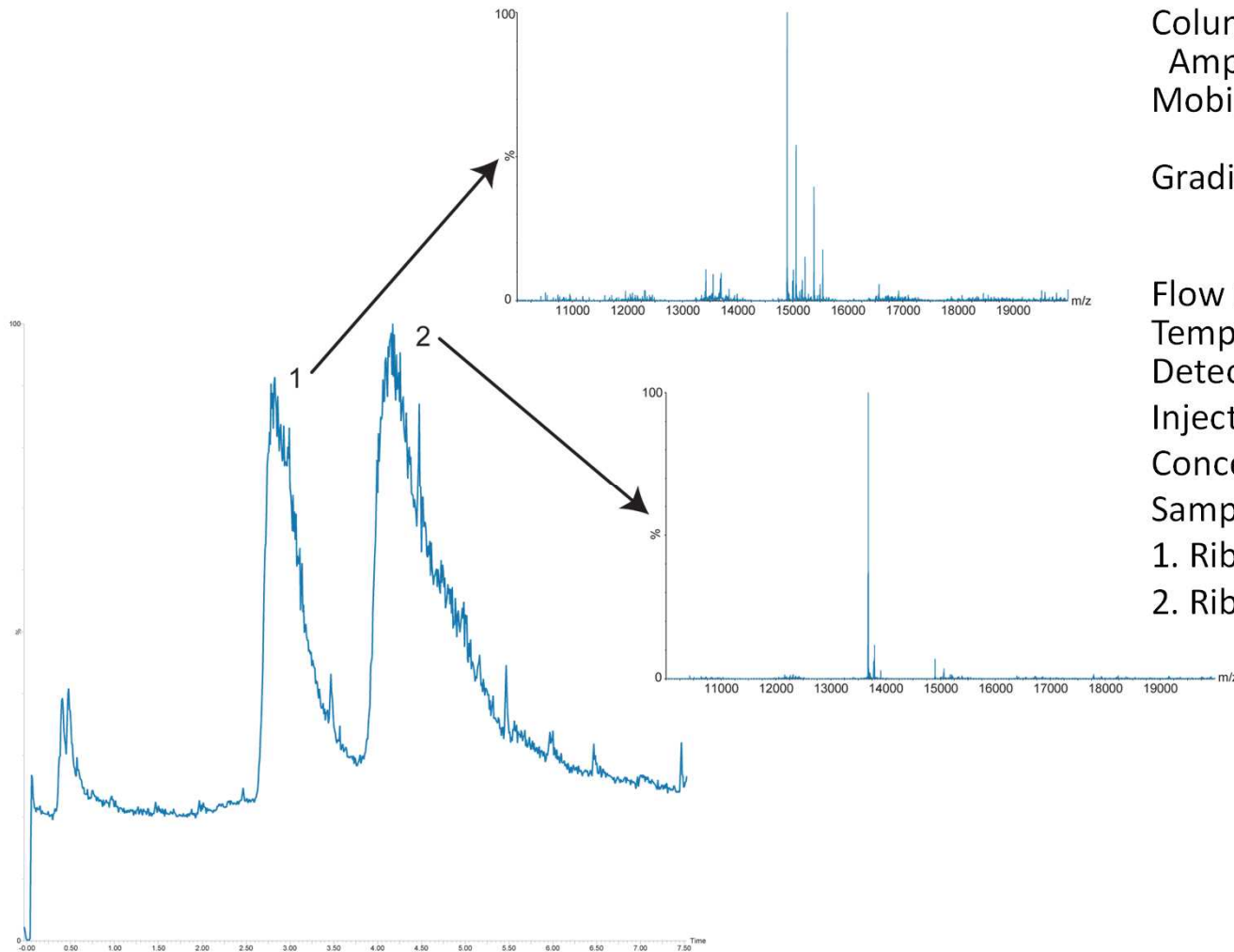
Concentration: 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ each protein,

Sample:

1. Ribonuclease B

2. Ribonuclease A

Ribonuclease A/Bの分離 Amplus C8-30 MS検出



Column:

Amplus 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 17.5% 17.5%
Isocratic separation

Flow rate: 0.50 mL/min ,

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

Detection: MS,

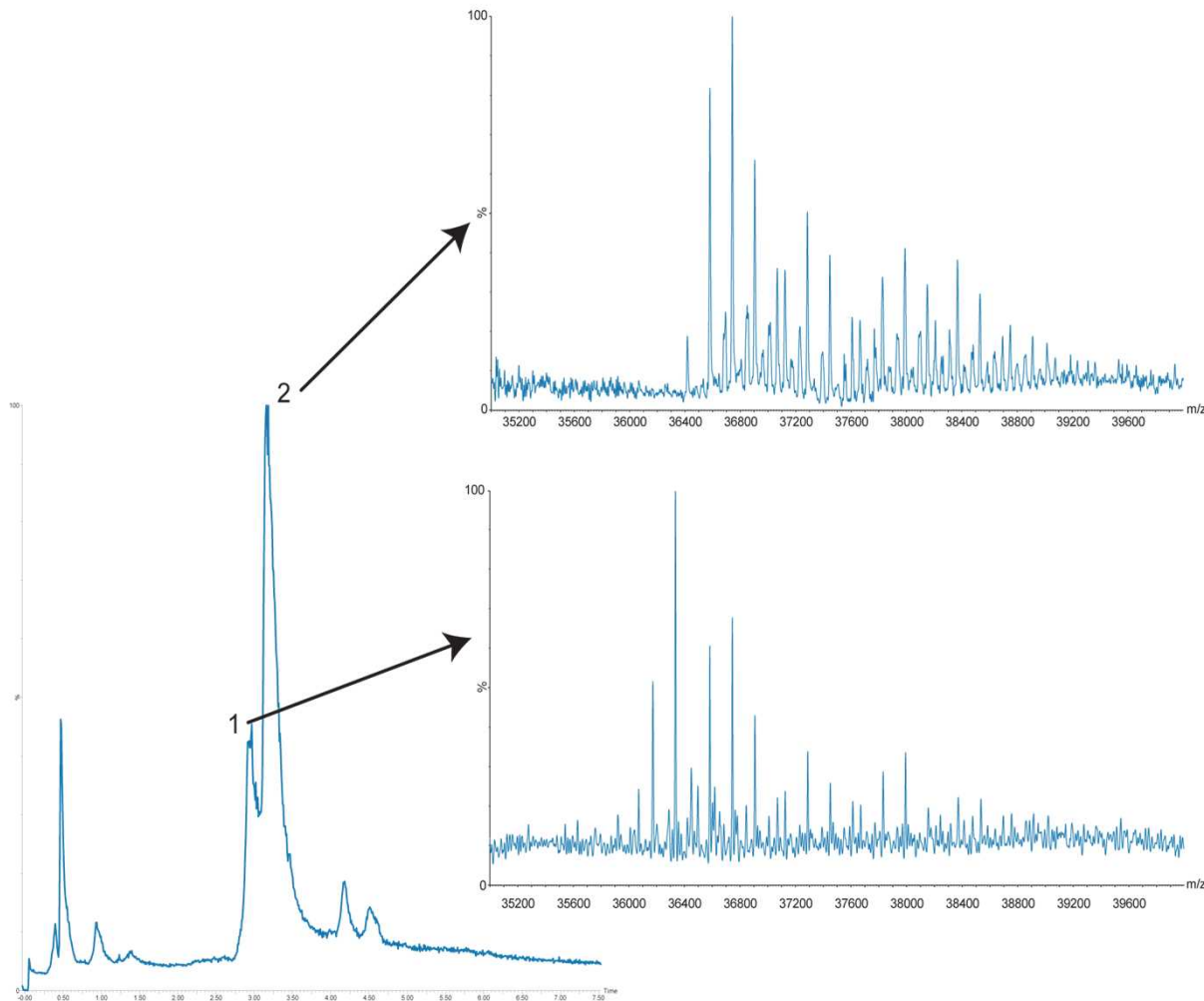
Injection volume: 10 μL ,

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

Sample:

1. Ribonuclease B
2. Ribonuclease A

Lipaseの分離 Amplus C8-30 MS検出



Column:

Amplus 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

BSA 消化物の分離 Amplus C18-16

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 ,

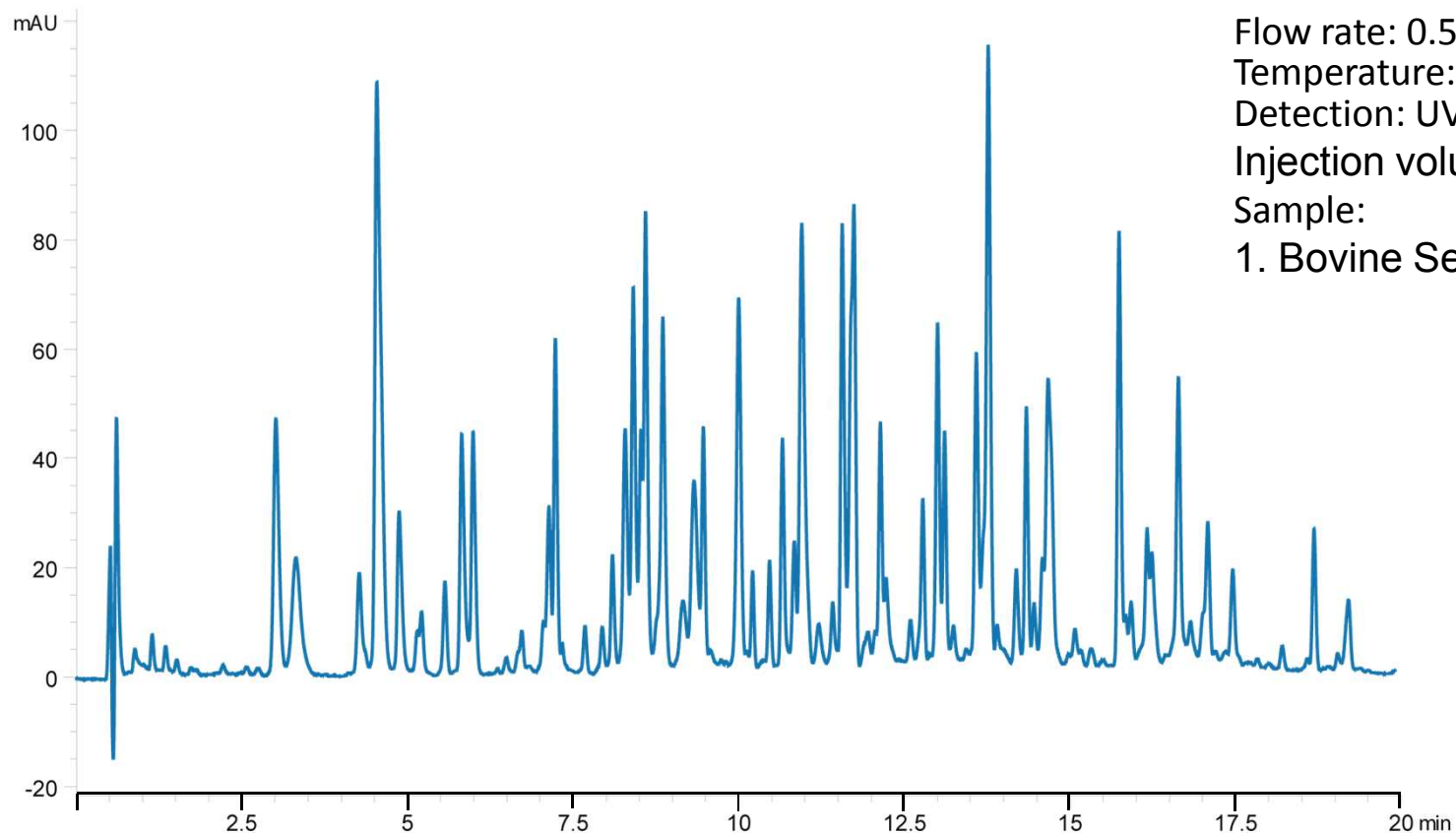
Temperature: 40 °C

Detection: UV@214 nm,

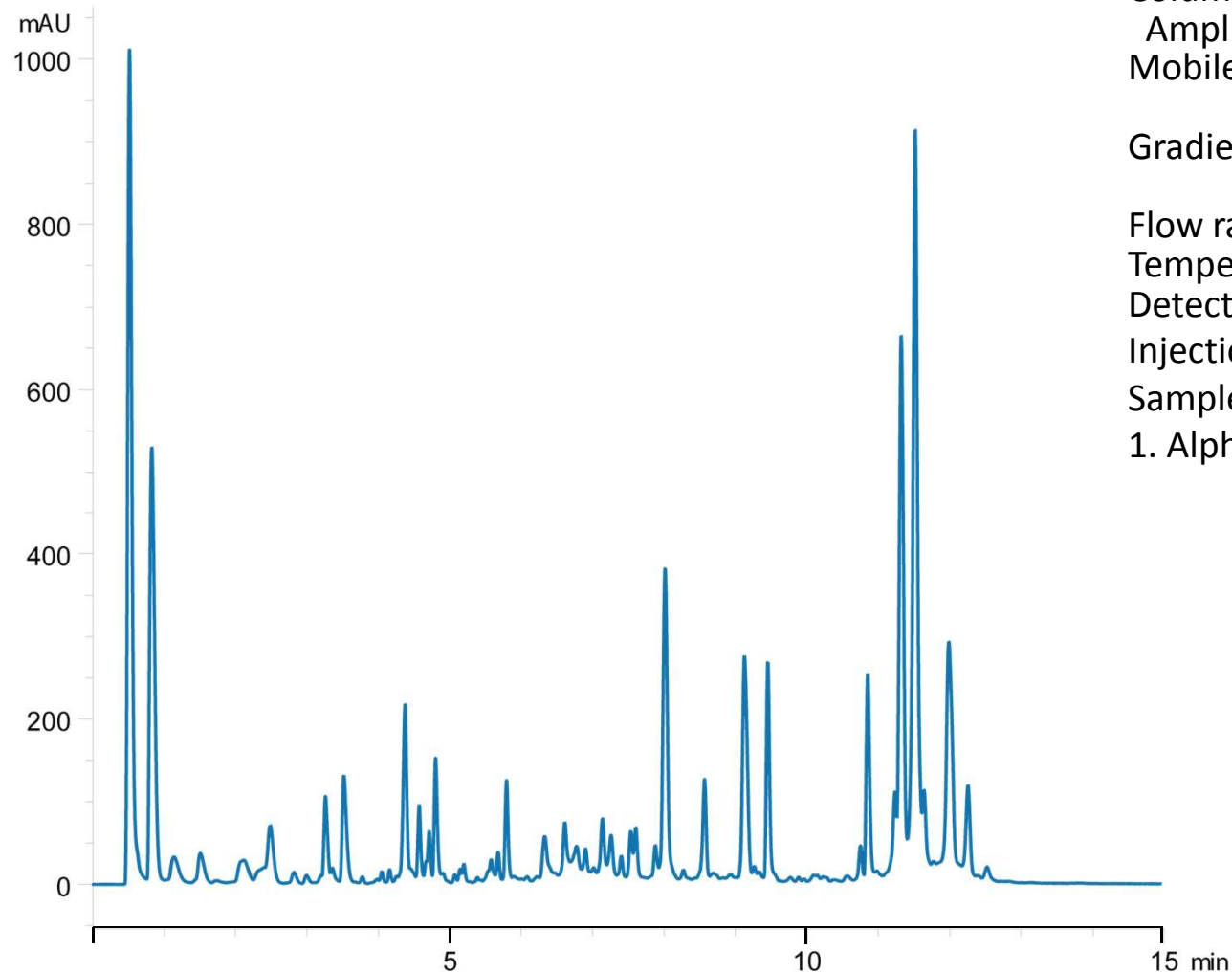
Injection volume: 10 μL ,

Sample:

1. Bovine Serum Albumin Digest



Alpha Casein消化物の分離 Amplus C18-16



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 10 min 14 min
%B 10% 36.4% 36.4%

Flow rate: 0.50 mL/min ,

Temperature: 40 °C

Detection: UV@214 nm,

Injection volume: 10 μL ,

Sample:

1. Alpha Casein Digest

まとめ

- ◆Amplus (SunShell)は30nmの平均細孔径を持つ初めてのコアシェル充填剤
- ◆HFC18固定相は最高で6本の共有結合でシリカ表面に結合できるため、耐酸性が高くなり、LC/MSで多用される0.1%ギ酸の移動相で1000時間以上の耐久性が示された
- ◆HFC18は結合密度が通常のお半分であり、ペプチド等の分離選択性が変わる

Amplus の価格

	内径(mm)	2.1		3.0		4.6	
	長さ(mm)	型番	価格	型番	価格	型番	価格
Amplus C18-16	50	A16941	¥66,000	A16341	¥66,000	A16441	¥66,000
	100	A16961	¥79,000	A16361	¥79,000	A16461	¥79,000
	150	A16971	¥84,000	A16371	¥84,000	A16471	¥84,000
Amplus C18-30	50	A46941	¥66,000	A46341	¥66,000	A46441	¥66,000
	100	A46961	¥79,000	A46361	¥79,000	A46461	¥79,000
	150	A46971	¥84,000	A46371	¥84,000	A46471	¥84,000
Amplus C8-30	50	A36941	¥66,000	A36341	¥66,000	A36441	¥66,000
	100	A36961	¥79,000	A36361	¥79,000	A36461	¥79,000
	150	A36971	¥84,000	A36371	¥84,000	A36471	¥84,000
Amplus C4-30	50	A26941	¥66,000	A26341	¥66,000	A26441	¥66,000
	100	A26961	¥79,000	A26361	¥79,000	A26461	¥79,000
	150	A26971	¥84,000	A26371	¥84,000	A26471	¥84,000