



TOSOH

# SEPARATION REPORT

## TSK-GEL を用いた逆相クロマトグラフィーによる ペプチドの分離

—ODS カラムおよび樹脂系カラムについて—

	ページ
1. はじめに	1
2. TSK-GEL の特長	1
3. カラム性能の比較	2
4. 分離条件の検討	7
5. 応用例	10
6. まとめ	13

## 1. はじめに

逆相クロマトグラフィー (RPC) は、その高い分離能のため、低分子化合物から高分子物質まで幅広い分野で、分離分析手段として利用されています。RPC の利点の一つとして、溶離液に揮発性の、また単純な組成の溶離液が使用できるため、試料の濃縮や後処理が簡単なことが挙げられます。最近では、バイオテクノロジーの発展により、ペプチド、タンパク質、核酸など生体高分子の分離の要求が高まり、分離条件の設定の容易な RPC が多用されるようになってきました。生体高分子の分離に利用される RPC 用充填剤は、従来のシリカを基材とする

もののほか、樹脂 (ポリマー) 系充填剤も使用されるようになってきました。また、多孔性充填剤に対し、充填剤にポアのない非多孔性充填剤も開発されています。

本報では、RPC を用いたペプチドの分離に関して、シリカ系および樹脂系充填剤、ならびに非多孔性充填剤についての特長、使い分けについて説明いたします。なお、RPC 用充填剤 TSKgel Phenyl-5PW RP についてはセパレーションレポート No.36 に TSKgel Octadecyl-NPR については、No.63、65、66 に詳しい報告がありますのでご参照下さい。

## 2. TSK-GEL の特長

表-1にRPC用TSK-GELカラムの特長を示します。TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>は、オクタデシル基が充填剤表面に単層 (モノレイヤー) 状に導入され、TSKgel ODS-120T では、多層 (ポリレイヤー) 状に導入されています。また樹脂系充填剤に比べシリカ系充填剤の方が、官能基の導入量が多いため、試料の保持力が強くなっています。シリカ系

充填剤は、基材の強度が高いため、粒子径を小さくすることができ、高いカラム効率を得ることができます。TSKgel Octadecyl-NPRは樹脂系充填剤ですが、非多孔性のため、粒子径を充分小さくすることができます。多孔性樹脂系充填剤のポアサイズは、中～高分子量物質の分離に適するように比較的大きく設計されています。

表-1 ペプチド分離のための逆相クロマトグラフィー用カラム

カラム	基材	官能基および導入量	粒径 (μm)	ポアサイズ (Å)
TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>	シリカ	octadecyl 15%	5	80
TSKgel ODS-120T	シリカ	octadecyl 22%	5	120
TSKgel Octadecyl-4PW	ポリマー	octadecyl 1meq/ml*	7	500
TSKgel Octadecyl-NPR	ポリマー	octadecyl 1meq/ml*	2.5	非多孔性
TSKgel Phenyl-5PW RP	ポリマー	phenyl 1meq/ml*	10	1000

\*：推定値

### 3. 分離性能の比較

#### (1) 標準ペプチドの分離

標準ペプチド、タンパク質を同一条件で分離した際の試料の溶出位置の比較を、TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>とTSKgel ODS-120Tについては表-2に、TSKgel ODS-120TとTSKgel Octadecyl-4PWについては表-3に示します。全体的にTSKgel ODS-120Tは試料の吸着が若干強い傾向がありますが、TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>とTSKgel ODS-120T

では、ほとんど溶出位置に差はありません。一方、表-3に示したように、TSKgel ODS-120TとTSKgel Octadecyl-4PWを比較した場合、分子量の大きいインシュリンを除いて全ての試料の溶出が、TSKgel Octadecyl-4PWではかなり早くなっています。これは、両者の充填剤の基材の違い、および官能基の導入量の差が、試料の保持力に大きく影響しているためと考えられます。

表-2 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>およびTSKgel ODS-120Tにおける各種ペプチドの保持時間の比較

ペプチド	MW	溶出時間 (min)	
		TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>	TSKgel ODS-120T
TRH	362.4	8.27	7.97
Leu-Enkepharin	555.6	20.69	20.87
(Ala <sup>2</sup> , Leu <sup>5</sup> )-Enkepharin	569.7	23.72	23.88
Met-Enkepharin	573.7	19.00	19.03
(Ala <sup>2</sup> , Met <sup>5</sup> )-Enkepharin	587.8	20.02	20.17
Eledoisin-RP	707.0	20.67	20.94
DSIP	848.8	13.31	13.04
Angiotensin III	931.1	19.94	20.29
Oxytosin	1,007.2	18.49	18.07
Angiotensin II	1,046.2	19.87	20.16
Bradykinin	1,060.2	18.87	19.22
LH-RH	1,182.3	18.87	18.66
Lys-Bradykinin	1,188.4	18.11	18.28
(Ala <sup>6</sup> , N-Methyl-Leu <sup>7</sup> )-LH-RH	1,210.5	24.66	20.87
(Val <sup>5</sup> )-Angiotensin I	1,282.5	20.37	21.19
Angiotensin I	1,296.5	21.23	21.92
Met-Lys-Bradykinin	1,319.6	18.70	19.00
Substance P	1,347.6	22.24	22.32
(Tyr <sup>8</sup> )-Substance P	1,363.6	20.20	20.52
BAM-12P	1,424.6	17.52	17.69
Bombesin	1,619.9	21.14	21.42
Somatostatin	1,637.9	23.37	23.58
α-MSH	1,664.9	20.87	20.26
Neurotensin	1,672.9	21.01	20.99
α-Endorphin	1,746.0	20.16	19.42
γ-Endorphin	1,859.1	22.25	22.73
Gastrin I	2,098.5	28.11	27.76
Dynorphin A	2,147.5	20.82	20.53
Calcitonin	3,417.9	26.30	24.84
β-Endorphin	3,465.0	30.61	24.96
Glucagon	3,482.7	25.64	25.59
Big Gastrin	3,849.7	26.11	24.86
Insulin	5,877.6	24.28	24.34
Aprotinin	6,500	16.66	16.52
Cytochrome C	12,400	24.13	24.43
Ribonuclease A	13,700	21.24	21.81
Lysozyme	14,400	26.06	26.67
Myoglobin	16,900	29.92	29.47
Chymotrypsin A	25,000	28.79	30.72
Ovalbumin	43,000	33.66	34.67
Albumin (bovine)	67,000	28.07	28.33

カラム：TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120T 4.6mmID×15cm

溶離液：A：0.1%TFA+10%アセトニトリル

B：0.1%TFA+100%アセトニトリル

A→B リニアグラジェント(60分)

試料：各2μg

流速：1.0ml/min

検出：UV(215nm)

表-3 TSKgel ODS-120T および TSKgel Octadecyl-4PW における各種ペプチドの保持時間の比較

ペプチド	MW	溶出時間 (min)	
		TSKgel ODS-120T	TSKgel Octadecyl-4PW
Leu-Enkepharin	555.6	23.7	16.7
Met-Enkepharin	573.7	20.8	14.6
Oxytocin	1007.2	19.7	15.6
Bradykinin	1060.2	—	16.5
Angiotensin I	1296.5	—	20.1
Substance P	1363.6	24.5	20.1
Bombesin	1619.9	22.7	19.3
Somatostatin	1637.9	25.7	22.3
Neurotensin	1672.9	—	19.1
ACTH	2933.5	21.4	19.3
Glucagon	3482.7	27.8	25.5
Insulin	5877.6	22.7	24.4

カラム：TSKgel ODS-120T、TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID×15cm

溶離液：A：0.2%TFA

B：0.2%TFA+80%アセトニトリル

A→B リニアグラジエント50分

試料：各5μg

流速：1.0ml/min

検出：UV(220nm)

図-1、図-2に標準ペプチド分離のクロマトグラムの比較を示します。

TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>と TSKgel ODS-120T の比較では、分離能、選択性ピークのシャープさ等、ほぼ同等なのに

対し、TSKgel ODS-120T と TSKgel Octadecyl-4PW の比較では、充填剤の粒子径の違いから、TSKgel ODS-120Tの方がやや優れた分離性能を持っていることがわかります。

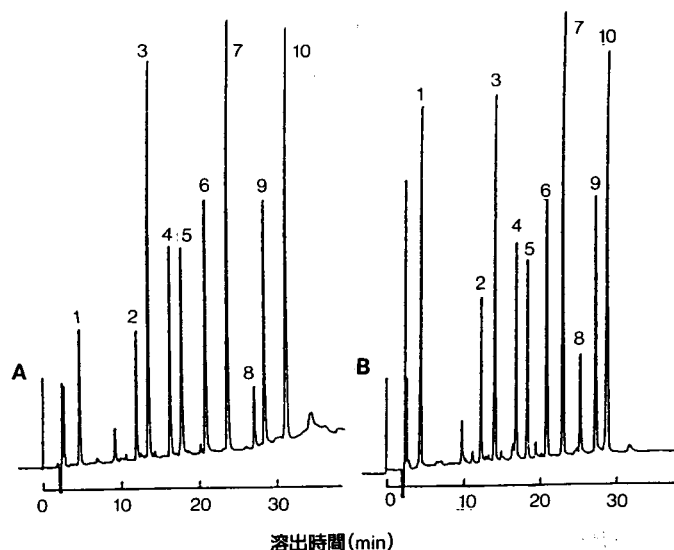


図-1 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>および TSKgel ODS-120T を用いたペプチド混合物の分離

カラム：A：TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mmID×15cm

B：TSKgel ODS-120T 4.6mmID×15cm

溶離液：A：0.1%TFA

B：A+100%アセトニトリル

A/B (85/15) → B 90分リニアグラジエント

流速：1.0ml/min

温度：25°C

検出：UV (220nm)

試料：1. DSIP 2. BAM-12P 3. Met-エンケファリン 4. アンジオテンシンII 5. (Val<sup>6</sup>)-アンジオテンシンI 6. サブスタンスP 7. ソマトスタチン 8. カルシトニン 9. グルカゴン 10. ガストリンI (各1~5μg)

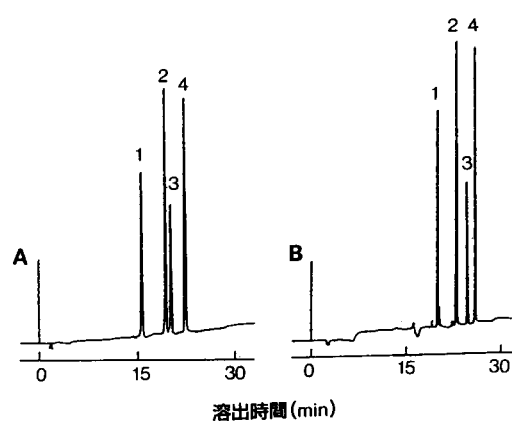


図-2 TSKgel ODS-120T および TSKgel Octadecyl-4PW を用いたペプチド混合物の分離

カラム：A：TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID×15cm

B：TSKgel ODS-120T 4.6mmID×15cm

溶離液：A：0.2%TFA

B：A+80%アセトニトリル

A→B リニアグラジエント(50分)

流速：1.0ml/min

温度：25°C

検出：UV (215nm)

試料：1. オキトシン 2. ボンベシン 3. サブスタンスP 4. ソマトスタチン (各5~10μg)

## (2) 合成ペプチドの分離

図-3、図-4に低分子量合成ペプチド（10量体精製品、MW811および1,269）の分離を示します。図-3に示すように分子量811の10量体ペプチドは、TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120Tでは、カラムに充分保持されていますが、TSKgel Octadecyl-4PWではカラムに保持されず溶出しています。これは、この合成ペプチドがカラムに

保持されるための十分な疎水性を持っていないためと考えられます。TSKgel Octadecyl-4PWでは親水性の高いペプチドの分離はむずかしいということがわかります。

一方、図-4で示した10量体合成ペプチドは、チロシン、フェニルアラニン、イソロイシンなどの疎水度の高いアミノ酸を含んでいるため、TSKgel Octadecyl-4PWにも充分吸着されています。

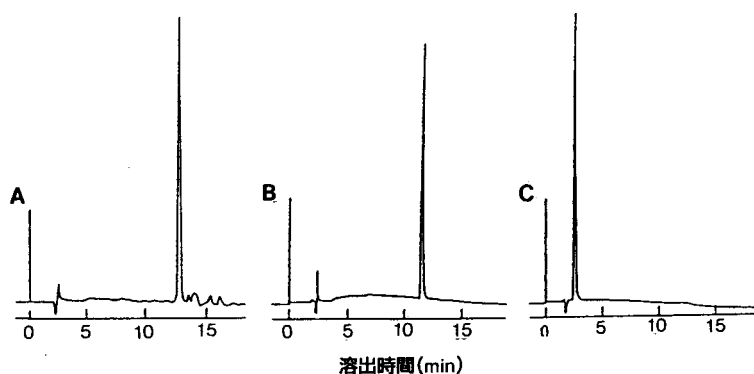


図-3 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120T および TSKgel Octadecyl-4PW を用いた合成ペプチドの分離 (1)

カラム；図-4に同じ

溶離液；A：0.1%TFA+5%アセトニトリル

B：0.1%TFA+50%アセトニトリル

A → B リニアグラジエント (60分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV (220nm)

試料；10量体 (ELGGGPGAGP, 20μg in 20μl)

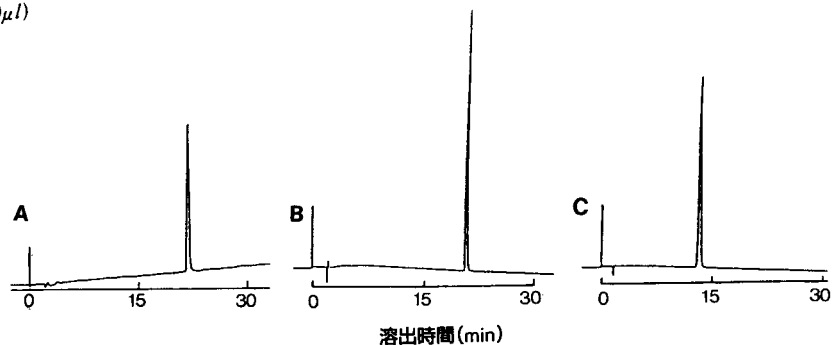


図-4 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120T および TSKgel Octadecyl-4PW を用いた合成ペプチドの分離 (2)

カラム；A：TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mmID×15cm

B：TSKgel ODS-120T 4.6mmID×15cm

C：TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID×15cm

溶離液；A：0.1%TFA+14%アセトニトリル

B：0.1%TFA+50%アセトニトリル

A → B リニアグラジエント (48分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV (220nm)

試料；10量体 (ENVYIHPFHL, 2μg in 2μl)

図-5に粗製32量体合成ペプチド(MW3,125)の分離を示します。このペプチドは、疎水度も高くなっているため、3種類の充填剤とも、目的の合成ペプチドは充分カラムに保持されています。シリカ系充填剤 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>と TSKgel ODS-120T では、目的ペプチドと副産物との分離も良好です。多孔性樹脂系充填剤の TSKgel Octadecyl-4PW では疎水度の低い成分はカラムに吸着されていませんが目的ペプチドと副産物の分離も良好で

す。このように、合成ペプチドが副産物等の不純物を多く含む場合でも、RPCにより目的ペプチドを簡単に精製することができます。図-6に非多孔性樹脂系充填剤 TSKgel Octadecyl-NPR を用いた同じ試料の分離を示します。分離能は TSKgel Octadecyl-4PW とほぼ同等ですが、分析時間は約10分と短縮されています。このように非多孔性充填剤を用いれば、合成ペプチドの迅速な純度チェックができます。

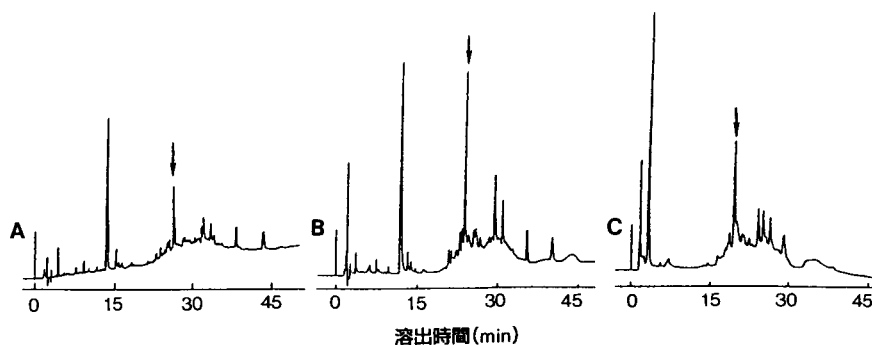


図-5 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120T および TSKgel Octadecyl-4PW を用いた合成ペプチドの分離 (3)

カラム：図-3に同じ  
 溶離液：図-3に同じ  
 流速：1.0ml/min  
 温度：25°C  
 検出：UV (220nm)  
 試料：32量体 (EAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQC, 50μg in 50μl)

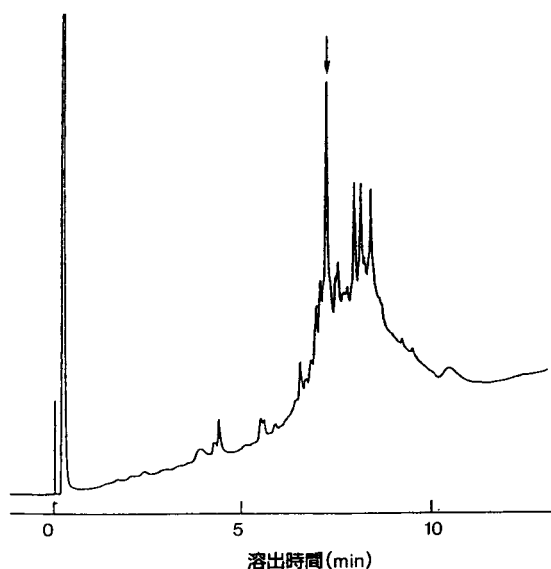


図-6 TSKgel Octadecyl-NPR を用いた合成ペプチドの分離

カラム：TSKgel Octadecyl-NPR 4.6mmID×3.5cm  
 溶離液：A：0.1%TFA  
 B：A+80%アセトニトリル  
 A→B リニアグラジエント (20分)

流速：1.5ml/min

温度：25°C

検出：UV (215nm)

試料：図-5に同じ (ただし 12μg in 12μl)

### (3) 低分子量タンパク質の分離

図-7に分子量の小さいタンパク質ヒストンf2a (MW14,000) の分離を示します。試料のカラムへの吸着は、シリカ系と樹脂系充填剤でほとんど差がなくなっており、ピークのシャープさに関しては、TSKgel Octadecyl-4PW (500 Å) の方が優れています。これは、シリカ系充填剤では、ポアサイズがそれぞれ 80 Å、120 Å と小さいためタンパク質が充填剤のポア内部へ充分侵入 (または

ポア内部から浸出) することができないためと考えられます。このように分子量の大きいペプチドや低分子量タンパク質の分離に関しては、ポアサイズの大きい (500 Å) TSKgel Octadecyl-4PW の方が優れていると言えます。ただし分子量が 30,000 以上のタンパク質の分離に関しては、さらにポアサイズの大きい (1000 Å) TSKgel Phenyl-5PW RP が優れています。

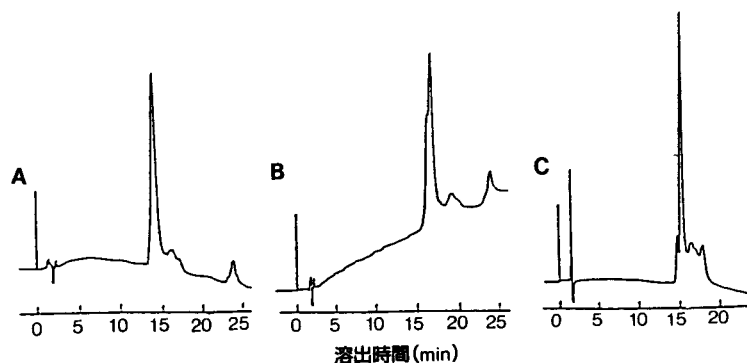


図-7 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120T および TSKgel Octadecyl-4PW を用いたヒストン f2a (タンパク質) の分離

カラム；図-3に同じ

溶離液；A：0.1%TFA+20%アセトニトリル

B：0.1%TFA+80%アセトニトリル

A→B リニアグラジエント (30分)

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；UV (215nm)

試料；仔牛胸腺ヒストン f2a (2μg in 2μl)

#### 4. 溶離条件の検討

TSKgel Octadecyl-NPR、TSKgel Phenyl-5PW RP を用いた溶離条件の検討に関しては、既に詳しい報告があります(セパレーションレポート No.36, 63)。ここでは、TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>の溶離条件の検討について述べます。

##### (1) 流速およびグラジエント時間

図-8にTSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いた Leu-エンケファリンとソマトスタチンの分離能の流速およびグラジエント時間依存性を示します。分離能は、流速が1.0ml/min以上ではほぼ一定になります。またグラジエント時間が長くなるにつれ分離能は徐々に向上していますが、実用的には60分ないし120分程度(ペプチドの溶出は20分から40分)が良いと思われます。

##### (2) イオンペア試薬

図-9にイオンペア試薬として、TFA、過塩素酸、リン酸を用いた場合のペプチド分離の比較を示します。TFAと過塩素酸では、試料の溶出順序は同じですが、リン酸を用いた場合、試料の溶出順序が変わっています。この

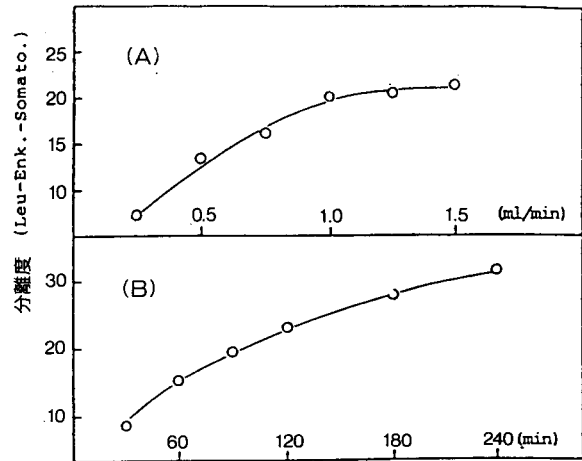


図-8 分離能の流速およびグラジエント時間依存性

カラム; TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mmID×15cm

溶離液; A: 0.1%TFA

B: 0.1%TFA+100%アセトニトリル

A→B リニアグラジエント

温度; 25°C

検出; UV (215nm)

試料; Leu-エンケファリン、ソマトスタチン

(A) 流速依存性 (90分リニアグラジエント)

(B) グラジエント時間依存性 (流速 1.0ml/min)

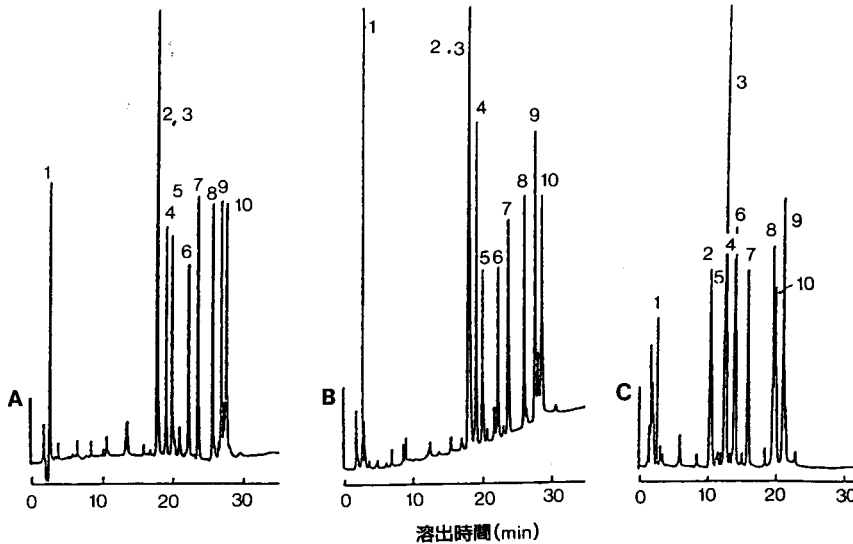


図-9 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いたペプチド混合物の分離 (イオンペア試薬の影響)

カラム; TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mmID×15cm

溶離液; (A) 0.1%TFA

(B) 5.7mM 過塩素酸

(C) 5.7mM リン酸

上記溶液中、アセトニトリル 10%→100%リニアグラジエント (90分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; UV (220nm)

試料; 1. TRH 2. ブラジキニン 3. LH-RH 4. α-エンドルフィン

5. アンジオテンシンII 6. アンジオテンシンI 7. サブスタンス

P 8. ソマトスタチン 9. インシュリン 10. β-エンドルフィン



ように、イオンペア試薬を変えることにより、選択性を変えることができます。

このほか、イオンペア試薬としては、ペプチド中のアミノ基と結合する長鎖アルキルスルホン酸塩（ブチル、オクチル、ドデシル等）や、カルボキシル基と結合するテトラブチルアンモニウム塩などもあり、溶離液中に数mM程度添加することで分離の選択性を変えることができます。

### (3) 試料負荷量

多孔性充填剤のTSKgel ODS-80T<sub>M</sub>、TSKgel ODS-120T、TSKgel Octadecyl-4PW、TSKgel Phenyl-5PW RPについて分離能を変えない最大試料負荷量は、精製品の場合20~100μg、粗製品の場合、1mg程度と考えられます。非多孔性充填剤 TSKgel Octadecyl-NPR は充填剤の表面積が非常に小さいため精製品で10~500ng、粗製品で約50μg程度です。

### (4) 有機溶媒

溶離液中の有機溶媒については、まずアセトニトリルが挙げられますが、メタノール、イソプロパノール、ジオキサンなどを用いることによって、選択性を変えるこ

とができます。溶出力は、イソプロパノール、アセトニトリル、メタノール、の順序で弱くなり、アセトニトリル50%がメタノール約70%の溶出力とほぼ同じになります。

### (5) まとめ

表-4にRPC用カラムの使い分けのまとめを示します。ペプチドの分離に関しては、まず応用範囲の広い、TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>が第一選択カラムとなります（TSKgel ODS-120Tも使用可）。しかし、高分子量ペプチドやタンパク質を分離したい、塩基性条件下で分離したい、カラムの洗浄をアルカリ溶液で簡単にやりたい、短時間で分析したい、微量試料（ナノグラム）を分離したい場合などは、表-4に示すように、その他のカラムを適切に選択することができます。

表-5に、RPCカラムを用いる際の溶離条件について示しています。溶離液の種類としては、まずTFA-アセトニトリル系が汎用的です。高感度分析を行う場合は、過塩素酸を用いれば安定なベースラインが得られます。また溶離液と有機溶媒を変えることによって試料の吸着特性を変えることができます。

表-4 RPC用カラムの使い分け

カラム	最適分画範囲	特長
TSKgel ODS-80T <sub>M</sub>	100-6,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 汎用的</li> <li>● 高分離能による厳密な分析、試料の純度検定</li> <li>● 合成ペプチドの分離分取</li> <li>● ペプチドマッピング</li> <li>● 遺伝子組替え産物等のペプチド消化物の分離分析</li> </ul>
TSKgel ODS-120T	6,000-10,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>● TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>の補完</li> </ul>
TSKgel Octadecyl-4PW	1,000-20,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 中、高分子量ペプチドの分離に適する</li> <li>● 耐アルカリ性があり、カラムの洗浄が容易</li> <li>● 吸着特性の異なる塩基性条件下での分離可能</li> </ul>
TSKgel Octadecyl-NPR	1,000-500,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 超高速分離分析(10分以内)が可能</li> <li>● 中、高分子量ペプチド、タンパク質の迅速分離に最適</li> <li>● 耐アルカリ性があり、カラムの洗浄が容易</li> <li>● 吸着特性の異なる塩基性条件下での分離可能</li> <li>● 試料負荷量が少ないが、微量試料の分離分取に最適</li> </ul>
TSKgel Phenyl-5PW RP	10,000-500,000	<ul style="list-style-type: none"> <li>● タンパク質の分離に最適</li> <li>● 耐アルカリ性があり、カラムの洗浄が容易</li> </ul>

\* TSKgel Octadecyl-NPRを除き、全て分取用カラムを準備しています。

表-5 RPC カラムを用いる際の溶離条件

	ペプチド	タンパク質
溶離液の種類*	0.05-0.2% -5 mM -5 mM	0.05-0.1% -5 mM 100-200 mM
溶離液の pH	シリカ系充填剤は pH 2-7.5 が望ましい 樹脂系充填剤は pH 2-12 で使用可能	
有機溶媒	アセトニトリル、メタノール、イソプロパノールなど	
流速	1.0ml/min (TSKgel Octadecyl-NPR : 1.0-1.5ml/min)	1.0ml/min
グラジエント アセトニトリル濃度 (TSKgel Octadecyl-NPR)	1-1.5%/min (6-8%/min)	1-2.5%/min (4-6%/min)
試料負荷量 ** 粗試料 精製品	0.5-1mg (TSKgel Octadecyl-NPR : -50μg) 20-100μg (TSKgel Octadecyl-NPR : 10-500ng)	

\* 樹脂系充填剤はリン酸、炭酸、アンモニア水等の塩基性溶液の使用可能

\*\* 分離能を変えない最大試料負荷量

## 5. 応用例

### (1) ペプチドマッピング

トリプシンやCNBrによって分解されたタンパク質消化物のRPCによる分離は、異なる生物種から得られたタンパク質の類似性を調べるのに有用であり、ペプチドマッピングと呼ばれています。最近では、本来の生物由来のタンパク質と、遺伝子組み換えによって得られた産物との類似性を調べる手段としても利用されています。

図-10にTSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いて、Protein Aの遺伝子が得られ、約70のピークが識別できます。図-11には、同(native)と遺伝子組み換え産物(図-10とは異なる)の分離が得られ、約70のピークが識別できます。図11には、同じくProtein Aの消化物に関して本来の生物由来(native)と遺伝子組み換え産物(図10とは異なる)の分離を比較した図(mirror analysis)を示します。遺伝子組み換え産物は分子量32,000で本来のもの(分子量約46,000)と異なるため、かなり異なるピークが認められます。

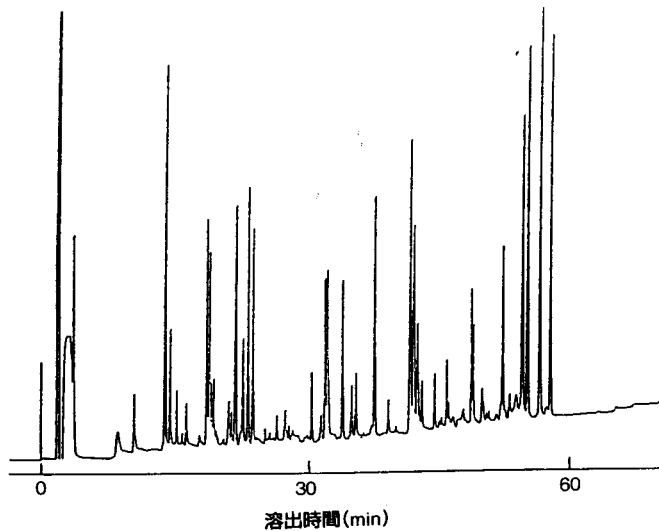


図-10 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いた遺伝子産物 (Protein A) のTPCK-トリプシン消化物のペプチドマッピング

カラム; TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mmID×15cm

溶離液; A: 0.1%TFA

B: A+50%アセトニトリル

A → B リニアグラジエント (70分)

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; UV (220nm)

試料; 遺伝子産物 (Protein A, A社製) のTPCK-トリプシン消化物 (75μg in 75μl)

図-12に同じくProtein Aの消化物をTSKgel ODS-80T<sub>M</sub>とTSKgel ODS-120Tで分離、比較した例を示します。TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>とTSKgel ODS-120Tは、全体的には非常によく似た分離を示しますが、微妙に選択性が違うことがわかります。

次に樹脂系充填剤を用いたペプチドマッピングを示します。

図-13にTSKgel Octadecyl-4PWを用いて、図-11と同様のProtein Aのトリプシン消化物を分離した例を示します。3項で示したように、樹脂系充填剤は、基材の疎水性がやや弱いこと等の影響で、分離はODS系カラムに比べ劣りますが、約40のピークを識別することができます。図-14に非多孔性樹脂系充填剤 TSKgel Octadecyl-NPRによる遺伝子産物Protein A(図-13と同様)の分離を示します。図-13のTSKgel Octadecyl-4PWに比べ分離能は若干低くなっていますが(ピーク数約30)、同様な分離特性を示しています。また分析時間は約8分と、迅速に分析することが可能です。

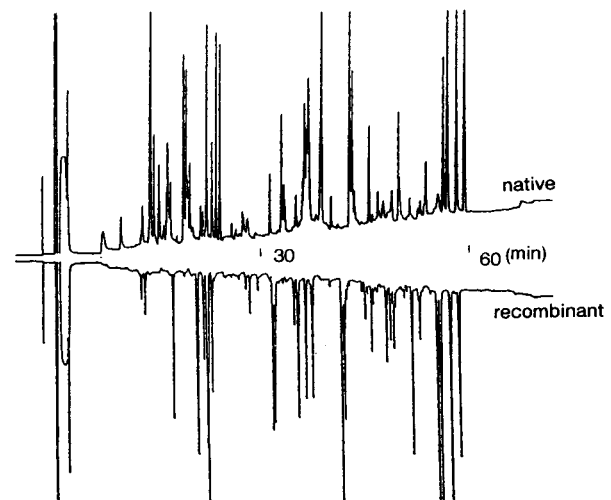


図-11 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いたProtein A-TPCK-トリプシン消化物の分離

溶離条件は図-10に同じ

試料; native (黄色ブドウ球菌由来、100μg in 100μl) recombinant (遺伝子組み換え産物、B社製、55μg in 55μl)

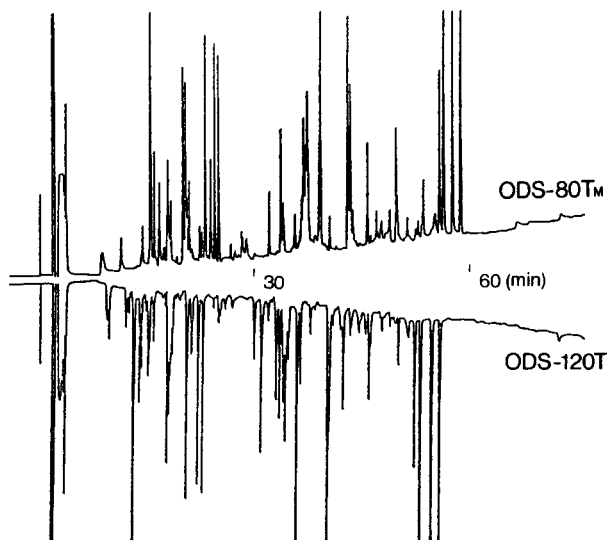


図-12 ペプチドマッピングにおける TSKgel ODS-80T<sub>m</sub>と ODS-120T の比較

カラム ; TSKgel ODS-80T<sub>m</sub> 4.6mmID×15cm  
 TSKgel ODS-120T 4.6mmID×15cm  
 溶離条件は図-10に同じ

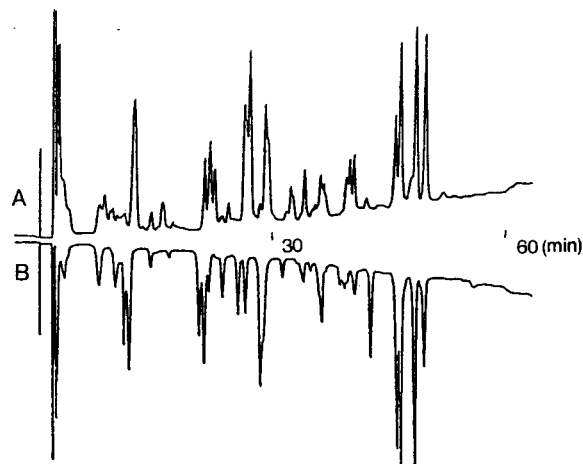


図-13 TSKgel Octadecyl-4PW を用いた Protein A-TPCK-トリプシン消化物の分離

カラム ; TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID×15cm  
 溶離液 ; A : 0.1%TFA  
 B : A+40%アセトニトリル  
 A → B リニアグラジエント (60分)  
 流速 ; 1.0ml/min  
 温度 ; 25°C  
 検出 ; UV (220nm)

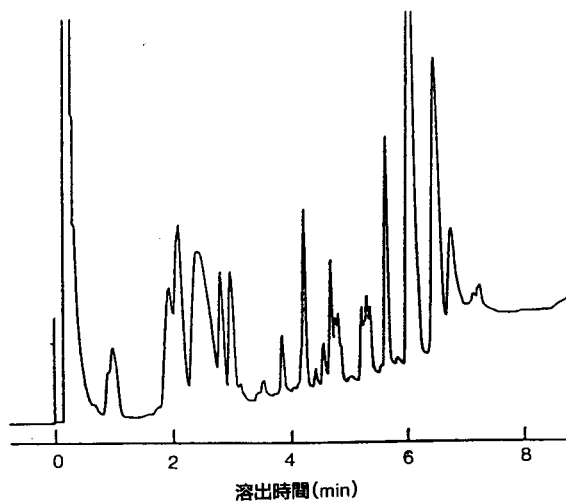


図-14 TSKgel Octadecyl-NPR を用いた遺伝子産物 (Protein A) の TPCK-トリプシン消化物のペプチドマッピング

カラム ; TSKgel Octadecyl-NPR 4.6mmID×3.5cm  
 溶離液 ; A : 0.1%TFA  
 B : A+80%アセトニトリル  
 A → A/B (50/50) リニアグラジエント 8分  
 A/B (50/50) → B リニアグラジエント 2分  
 流速 ; 1.5ml/min  
 温度 ; 25°C  
 検出 ; UV (220nm)  
 試料 ; 図-10に同じ、ただし 20μg in 20μl

## (2) 構造類似ペプチドの分離

RPC によるペプチドの分離に関しては、ペプチドのアミノ酸残基から計算される疎水度と、カラムへの吸着の強さの間に相関関係があることが知られています。した

がって類似アミノ酸配列を持つものや、疎水度の同じ試料は分離しにくくなります。図-15、16に類似構造を持つペプチドや、1残基のみ異なるペプチドをリニアグラジエントで分離した例を示します。また、リニアグラジエン

ト溶出法では分離されにくい試料をアイソクラティック  
溶出法で分離した例を図-17、図-18に示します。

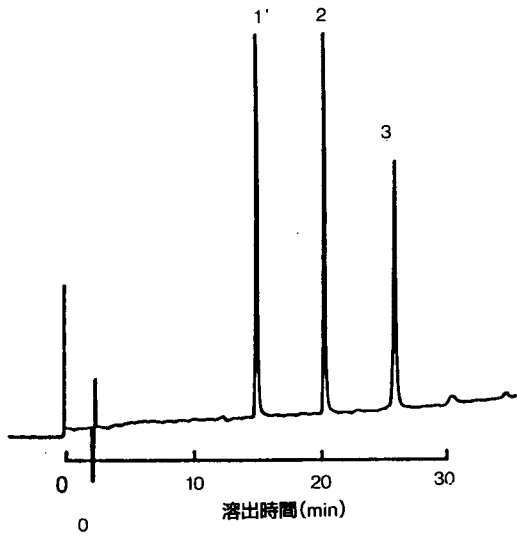


図-15 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いたエンドルフィン類の分離  
溶離条件は図-1に同じ

試料：1.  $\alpha$ -エンドルフィン  
2.  $\gamma$ -エンドルフィン  
3.  $\beta$ -エンドルフィン



図-16 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いたガストリン類の分離  
溶離条件は図-1に同じ

試料：1. ビッグ-ガストリン  
2. ガストリン

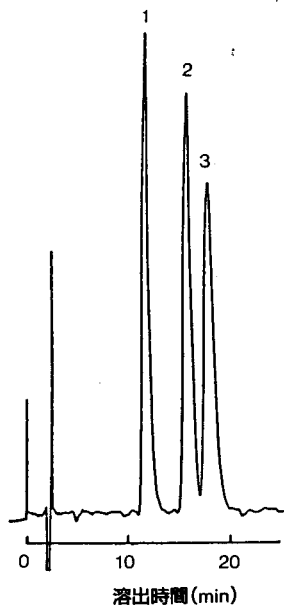


図-17 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いたブラジキニン類の分離

カラム：TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> 4.6mmID×15cm  
溶離液：0.1%TFA+18%アセトニトリル  
流速：1.0ml/min  
温度：25℃  
検出：UV (220nm)  
試料：1. Lys-ブラジキニン  
2. Met-Lys-ブラジキニン  
3. ブラジキニン

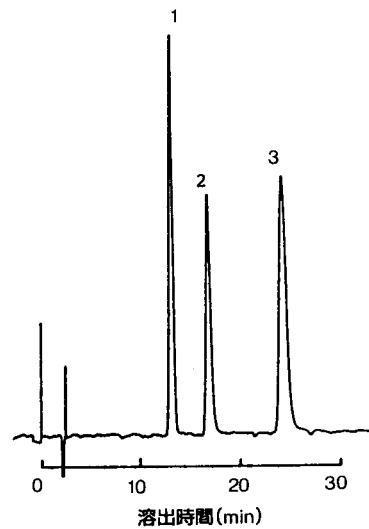


図-18 TSKgel ODS-80T<sub>M</sub>を用いたエンケファリン類の分離  
溶離条件は図-17に同じ

試料：1. Met-エンケファリン  
2. (Leu<sup>5</sup>)-エンケファリン  
3. (Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>)-エンケファリン

### (3) アルカリ条件下での分離

シリカ系充填剤は、塩基性条件下では、充填剤の耐久性の問題から使用できませんが、樹脂系充填剤は、シリカ系充填剤に比べ化学的安定性に優れており、通常 pH2~12の範囲で使用することができます。図-19に TSKgel Octadecyl-4PW を用いて種々の pH でペプチドを分離した結果を示します。中性 (pH7.1) 条件下での分離は、酸性条件下での分離に比べ、選択性が若干変わっています。さらに pH10.8 という塩基性条件下では、ペプチド分離の選択性が大幅に変わっているほか、分離帯も酸性条件に比べ広がっています。これは、アルカリ条件下でのペプチドの解離基 (特にアミノ基) の変化が分離に影響していると考えられます。このように、樹脂系充填剤を用いる塩基性条件下でのペプチドの分離は、従来の酸性条件下では分離できない試料が分離できる可能性を示唆しています。また樹脂系充填剤はタンパク質等の吸着・未回収試料によるゴーストピークの出現を、アルカリ洗浄 (NaOH) により抑えることもできます。

### 6. まとめ

表-4にRPC用カラムの使い分けのまとめを示します。ペプチドの分離に関しては、まず応用範囲の広い TSKgel ODS-80T<sub>M</sub> (あるいは TSKgel ODS-120T) が第一選択カラムとなります。しかし、高分子量ペプチドやタンパク質を分離したい場合や、アルカリ溶液を使用 (溶離液や洗浄) する場合、また迅速にかつ微量 (ナノグラム) 試料を分離したい場合などは、表-4に示すように、その他のカラムを適切に選択することができます。

表-5にRPC用カラムを用いる際の溶離条件を示します。溶離液の種類としては、まず TFA-アセトニトリル系が汎用的です。高感度分析を行う場合は、過塩素酸を用いれば、安定なベースラインが得られます。また溶出液としての有機溶媒を変えることによって試料の吸着特性を変えることができます。

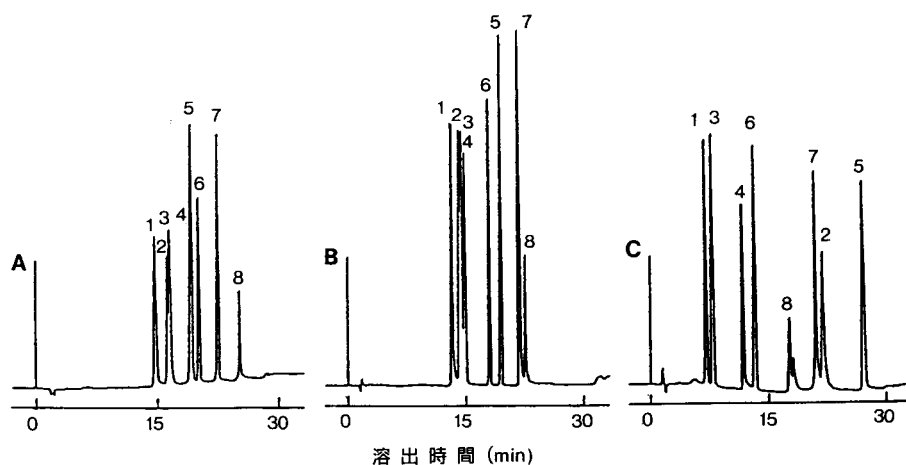


図-19 ペプチドの逆相クロマトグラフィーにおける溶離液の pH の影響

カラム: TSKgel Octadecyl-4PW 4.6mmID×15cm

溶離液: (A) 0.2%TFA (pH1.9)

(B) 50mM リン酸ナトリウム (pH7.1)

(C) 200mM アンモニア (pH10.8)

上記溶離液にてアセトニトリル0→80%リニアグラジエント(50分)

流速: 1.0ml/min

温度: 25°C

検出: UV (215nm)

試料: 1. Met-エンケファリン 2. プラジキニン 3. Leu-エンケファリン

4. ニューロテンシン 5. ボンベシン 6. アンジオテンシン

I 7. ソマトスタチン 8. インシュリン (各5-10μg)