

疎水性クロマトグラフィーによるペプチド類の分離
— 分離および回収率 —

疎水性クロマトグラフィー (HIC) は、試料と充填剤の疎水的相互作用に基づく分離モードであり、特にタンパク質の分離に利用されています。またその分離機構は、タンパク質の立体構造の表面上の疎水部 (疎水ポケットなど) と充填剤の官能基との相互作用によるものであり、HIC ではタンパク質の立体構造の違いを認識して分離することができます。ここではタンパク質より分子量の低いペプチドへの HIC の適用を試みました。表に各種ペプチドの保持時間および回収率を示します。ペプチドはタンパク質に比べ、立体構造をとりにくくアミノ酸残基の疎水部がむき出しになっていると考えられ、ペプチドの疎水度が高いほどカラムへの保持は強くなる傾向があります。しかし比較的保持力の強いもの (CCK-tetrapeptide) や弱いもの (Trypsin inhibitor) などさまざまであり、逆相クロマトグラフィーとも選択性が異なります。また充填剤の疎水度からみると、TSKgel Phenyl-5PW よりも、疎水性の弱い TSKgel Ether-5PW のほうが、保持力、回収率に関して適しているといえます。尚、最終溶離液に 20% のアセトニトリルを添加すると、どちらのカラムでも溶出できなかつたり、回収率が悪かったペプチドの分離をある程度改善できることがわかりました。代表的なペプチドのクロマトグラムを図に示します。ペプチドは細胞培養液や種々の生体試料中から主に逆相クロマトグラフィーにより分離精製されますが、ここで示したようにタンパク質と同様、疎水性クロマトグラフィーも有効であることがわかりました。

疎水性クロマトグラフィーにおける各種ペプチドの回収率

ペプチド名	Mw	Elution time (min)		Recovery (%)	
		Phenyl-5PW	Ether-5PW	Phenyl-5PW	Ether-5PW
H-Y-G-G-F-OH	442	4.3	4.4	95	100
Suc-A-A-A-pNA	451	14.0 (11.7)	11.8	87(86)	86
Leu-Enkephalin	556	7.9	7.5	126	133
CCK-Tetrapeptide	597	19.4	16.6	90	91
Pz-P-L-G-P-D-R	777	30.6 (29.6)	21.6 (23.3)	27(95)	24(87)
Angiotensin II	1046	8.4	6.1	95	93
Bradykinin	1060	6.1(6.2)	3.8	109(107)	110
CCK-Octapeptide	1063	N.D. (23.4)	27.1(19.0)	N.D.(125)	59(44)
LHRH	1182	18.6	11.6	97	94
Actinomycin C	1280	N.D.	N.D.(27.4)	N.D.(N.D.)	N.D.(92)
Angiotensin I	1297	14.8	9.7	-	-
Neurotensin	1673	10.3	6.1	-	-
Angiotensinogen	1759	31.4 (24.5)	21.1	88(90)	97
Glucagon	3485	N.D. (26.5)	24.8	N.D.(95)	85
Insulin B-chain	3494	31.5 (25.2)	20.7	89(92)	88
Insulin	5808	N.D. (24.6)	21.9	N.D.(127)	119
Trypsin inhibitor	6500	8.9 (8.1)	2.5	82(82)	102

LHRH:Lutenizing Hormone Releasing Hormone

N.D. :not detected

() :Buffer B containing 20% acetonitrile

分析条件

カラム ; TSKgel Phenyl-5PW, TSKgel Ether-5PW (7.5ml.D.×7.5cm)

溶離液 ; BufferA:0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)+1.5M硫酸アンモニウム

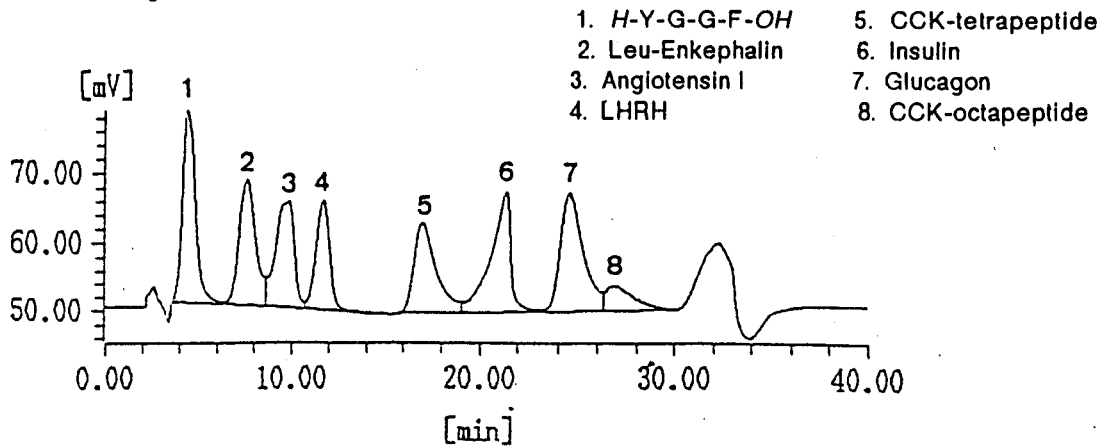
BufferB:0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)

A→B linear gradient 0min(B:0%), 30min(B:100%)

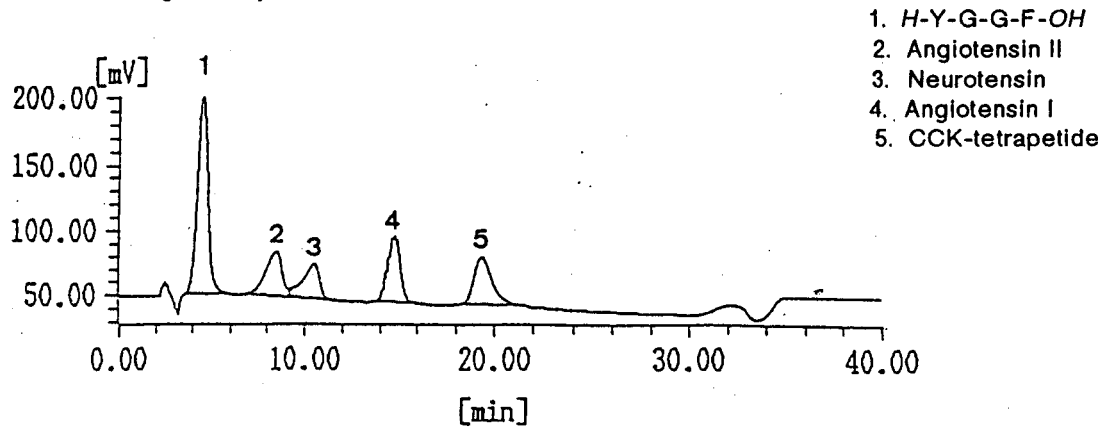
流速 ; 1.0ml/min 温度 ; 25℃ 検出 ; UV(220nm)

試料 ; 100μl (各100~1000μg/ml)

TSKgel Ether-5PW



TSKgel Phenyl-5PW



TSKgel Phenyl-5PW

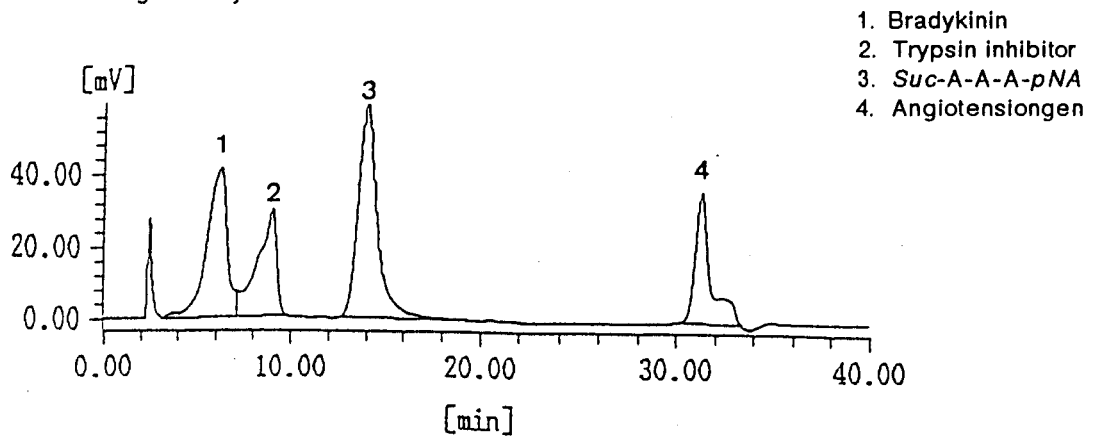


図 疎水性クロマトグラフィーによるペプチドの分離

Column; TSKgel Ether-5PW, TSKgel Phenyl-5PW (7.5 mm I.D. x 7.5 cm)
Elution; 30 min linear gradient of ammonium sulfate from 1.5 M to 0 in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)
Flow rate; 1.0 ml/min Temperature; 25 C Detection; UV(220 nm)
Sample ; 100 ul, (100-1000 ug each)