

# SEPARATION REPORT

## 陽イオン交換クロマトグラフィーを用いたペプチドの分離

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. ペプチドの性質	1
3. カラム	3
4. 検出波長	4
5. 溶離液	5
6. 溶離条件の影響	5
6 - 1. カラム種類の影響	5
6 - 2. 有機溶媒濃度の影響	7
6 - 3. 有機溶媒種類の影響	9
6 - 4. 塩種類の影響	11
6 - 5. 温度の影響	12
6 - 6. 溶離液の pH の影響	13
7. 他の分離モードとの比較	15
8. まとめ	16

## 1. はじめに

ペプチド医薬品は、その分子サイズから中分子医薬品とも呼ばれ、低分子医薬品と高分子医薬品の長を兼ね備えた次世代の医薬品候補として注目されています。これまでインスリン製剤など、遺伝子工学的手法により微生物などを利用して合成されたものが主に用いられてきましたが、現在検討されているペプチド医薬品の多くは化学合成によって得られたもので、構成するアミノ酸は、天然型に加えて、非天然型を含むものもあります。さらには環状化することで生体内での酵素分解などに対する耐性を高めるとともに、構造の自由度を減少させることで標的との結合性を向上させたり、アルギニンを導入して塩基性を高める、あるいは疎水性を高める手法などにより細胞膜透過性を改善する試みもなされています。本稿では、これら合成ペプチドの陽イオン交換クロマトグラフィーによる分離について紹介します。

## 2. ペプチドの性質

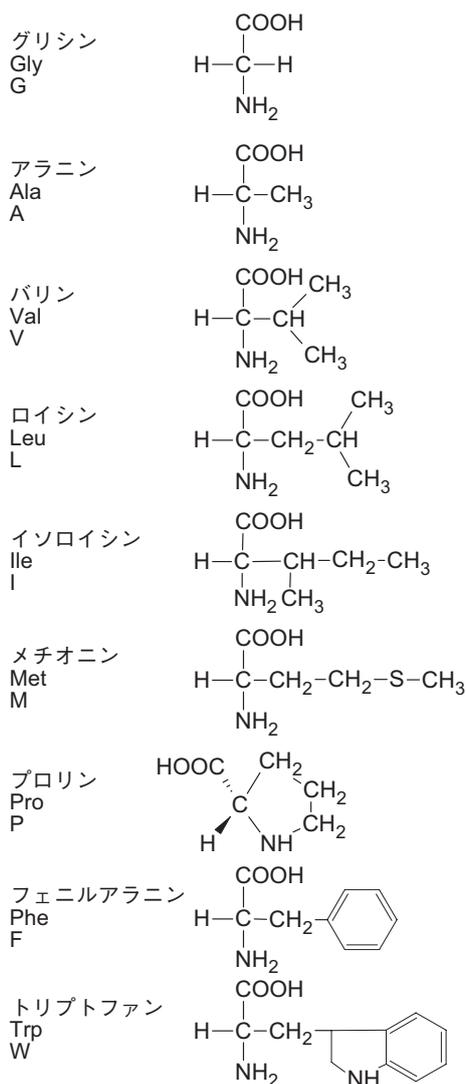
ペプチドは、 $\alpha$ -アミノ酸を基本構成要素とし、 $\alpha$ 位のアミノ基とカルボキシ基が脱水縮合により直鎖状に結合した構造を有しています（ペプチドの配列にシステインが含まれる場合には、鎖内あるいは鎖間でさらにジスルフィド結合を形成します）。**図 2-1** にペプチドを構成する主なアミノ酸の略号と構造式を示します。一般にペプチド鎖の末端には、一方にアミノ基が、他方にカルボ

キシ基がそれぞれ存在します。アミノ基側の末端はN末端、カルボキシ基側の末端はC末端と呼ばれ、それぞれ塩基性、酸性を示します。さらにペプチドを構成するアミノ酸のうち、リジン、アルギニン、ヒスチジン側鎖は塩基性を示し、アスパラギン酸、グルタミン酸側鎖は酸性を示します。複数のアミノ酸で構成されるペプチドは、アミノ酸の種類、数により総電荷が異なるため、静電的相互作用を利用して分離することができます。

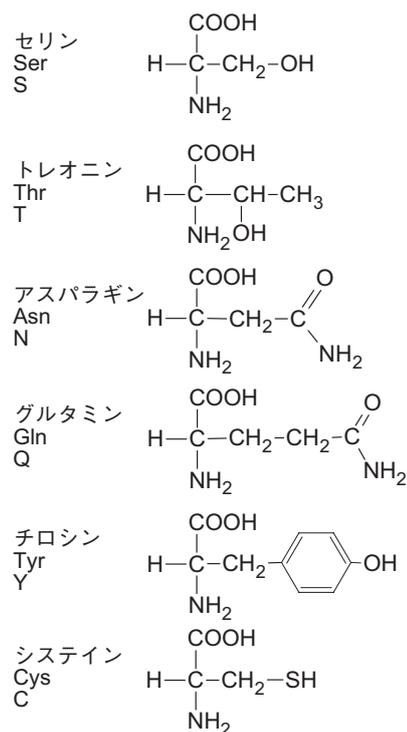
ペプチドの酸性官能基であるカルボキシ基は pH 3 以下では解離が抑制され、負電荷を失います。一方、リジン、アルギニン、ヒスチジンは同 pH では正電荷となり、さらにペプチドは N 末端にアミノ基をもつため、少なくとも 1 個以上の正電荷をもちます（N 末端のアミノ基がピログルタミル化やアセチル化などにより変性したものの、環化により N 末端がないものなどを除く）。そのため、酸性溶離条件にて陽イオン交換クロマトグラフィーを適用することで、ペプチドを吸着／分離することができます。

検討に用いたペプチド 13 種の配列、鎖長及び pH 3、5、7 における総電荷数を **表 2-1** に示します。前述のように、ペプチドは pH 3 では正電荷をもちますが、pH 5 以上ではカルボキシ基が解離し、さらに pH 7 以上ではヒスチジン側鎖も正電荷を失うため、構成するアミノ酸の種類と数に応じてその総電荷数は変化します。

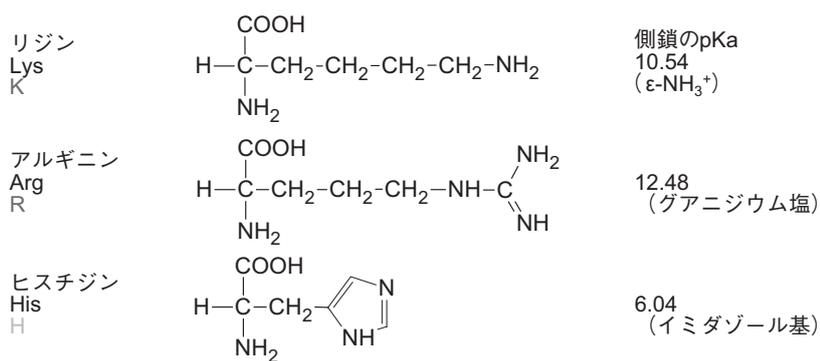
### 非極性側鎖アミノ酸



### 極性無電荷側鎖アミノ酸



### 極性電荷側鎖アミノ酸 (塩基性側鎖)



### 極性電荷側鎖アミノ酸 (酸性側鎖)

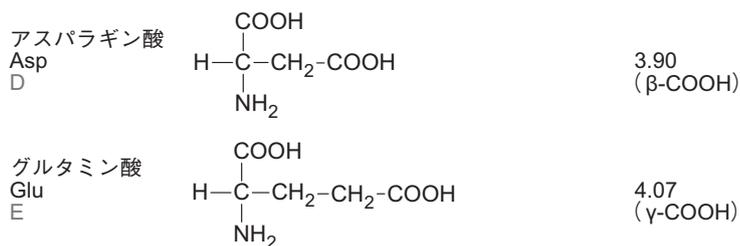


図 2-1 ペプチドを構成する主なアミノ酸の構造

表 2-1 用いたペプチドの配列と性質

番号	名称	配列	鎖長	総電荷数		
				pH 3	pH 5	pH 7
1	oxytocin	CYIQNCPLG-NH <sub>2</sub> (Cys <sup>1</sup> -Cys <sup>6</sup> 間でジスルフィドを形成)	9	+1	+1	+1
2	cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)	cyclo (RGDFV) (環状ペプチド)	5	+1	0	0
3	Gly-Gln	GQ	2	+1	0	0
4	Tyr-Ala	YA	2	+1	0	0
5	γ-endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVTL	17	+2	0	0
6	bombesin	Pyr-QRLGNQWAVGHLM-NH <sub>2</sub>	14	+2	+2	+1
7	Gly-Gly-His	GGH	3	+2	+1	0
8	Gly-His	GH	2	+2	+1	0
9	bradykinin	RPPGFSPFR	9	+3	+2	+2
10	angiotensin III (Human)	RVYIHPF	7	+3	+2	+1
11	angiotensin I (Human)	DRVYIHPFHL	10	+4	+2	0
12	CGRP (Human)	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNNFVPTNVGS KAF-NH <sub>2</sub> (Cys <sup>2</sup> -Cys <sup>7</sup> 間でジスルフィドを形成)	37	+6	+5	+4
13	ANP (Human)	SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLCNSFRY (Cys <sup>7</sup> -Cys <sup>23</sup> 間でジスルフィドを形成)	28	+6	+4	+4

注) 小文字の1文字略号 (f) はD体 (D-Phe) であることを示す

### 3. カラム

検討には、イオン交換基としてスルホプロピル基が導入された陽イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSKgel<sup>®</sup> SP-2SW、TSKgel SP-5PW、及び TSKgel SP-STAT を用いました。各カラムの特性を表 3-1 に示します。

TSKgel SP-2SW はシリカ系充填剤のカラムで、基材が硬いため、高速高分離が可能です。細孔が小さめに設定されているため、比較的分子サイズが小さい分析種の分離に適しています。

TSKgel SP-5PW はポリマー系充填剤のカラムで、基材のポリマーはアルカリ耐性があるため広い pH 範囲の溶離液が使用でき、アルカリ洗浄も可能です。大きな細

孔を有していることから、ペプチドのみならず、たんぱく質を含む生体高分子の分離にも用いられます。

TSKgel SP-STAT は非多孔性のポリマー基材にグラフトポリマー構造のイオン交換基が導入された充填剤のカラムです。細孔内部への分子拡散に起因するピークの拡がりがないため、高速高分離に適しています。また、細孔内への分析種の浸透を考慮する必要がないため、広範囲な分子サイズの分析種への適用が可能です。ペプチドやたんぱく質などの生体高分子の分離に多用されます。TSKgel SP-5PW と同様にアルカリ耐性があるため、広い pH 範囲の溶離液が使用でき、アルカリ洗浄も可能です。

表 3-1 カラムの特性

カラム	粒子径 (μm)	細孔径 (nm)	基材	pH 範囲	イオン交換容量	有機溶媒濃度の制限 <sup>(注)</sup>	カラムサイズ
TSKgel SP-2SW	5	125	シリカ	2.0 - 7.5	0.3 eq/L 以上	無	4.6 mm I.D. × 25 cm
TSKgel SP-5PW	10	100	ポリマー	2.0 - 12.0	約 0.1 eq/L	≤ 20 %	7.5 mm I.D. × 7.5 cm
TSKgel SP-STAT	7	非多孔性	ポリマー	3.0 - 10.0	23 μeq/g dry gel	≤ 50 %	4.6 mm I.D. × 10 cm

注) 水溶性有機溶媒を用い、塩が析出しない濃度であること

#### 4. 検出波長

HPLCの検出器として多用されている紫外可視吸光度検出器をペプチドの検出に適用する場合、ペプチド結合のカルボニル由来の吸収である220 nm付近を検出波長とするのが一般的です。一方、トリプトファンインドール基、チロシンのフェノール基は280 nm付近の長波長まで吸収を有しているため、280 nmを検出波長とすることで、これら2種のアミノ酸を含むペプチドのみを選択的に検出することができます。フェニルアラニンのフェニル基も254 nm付近まで吸収を有しているため、検出波長を254 nmとすることで、前2種にフェニルアラニンを加えた3種のアミノ酸を含むペプチドを選択的に検出することが可能です(なお、ヒスチジンのイミダゾイル基は芳香環の1種ですが、254 nm及び280 nmには吸収を有していません)。

芳香環をもたないGly-Gln、チロシンを含む oxytocin、

トリプトファンを含む bombesin、ヒスチジンを含む Gly-Gly-His、フェニルアラニンを含む bradykinin をそれぞれ280 nm、254 nm、220 nmで検出した際のクロマトグラムを図4-1に示します。検出波長220 nmでは5種全てのペプチドが検出されていますが、254 nmでは、oxytocin、bombesin、bradykininの3種のみが選択的に検出されています。さらに、280 nmでは、oxytocinとbombesinのみが検出されています。なお、280 nm及び254 nmでの応答強度は、芳香環側鎖をもつアミノ酸の数や種類によって大きく変化します。また、多くのペプチドは検出波長を220 nmから254 nmまたは280 nmに変更することで、感度は約1/10以下まで低下します。表4-1に天然ペプチドを構成するアミノ酸のそれぞれの波長における応答強度の違いを示します。

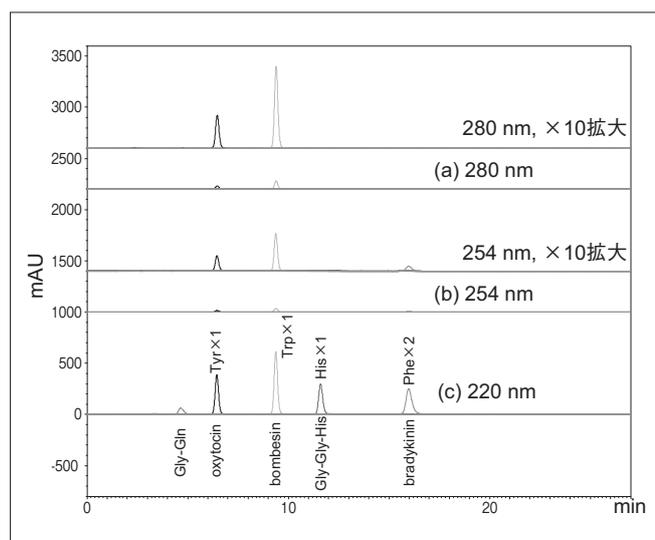


図4-1 検出波長による応答強度の違い

#### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20 / 80  
 B；アセトニトリル/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80  
 グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
 - 100 % B (32 min)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV ((a) 280 nm, (b) 254 nm, (c) 220 nm)  
 温度：25 °C  
 注入量：10 μL  
 試料：Gly-Gln, oxytocin, bombesin, Gly-Gly-His, bradykinin, 全て 0.5 g/L

表4-1 天然ペプチドに含まれるアミノ酸の検出波長による応答強度の違い

検出波長	トリプトファン	チロシン	フェニルアラニン	ヒスチジン	その他のアミノ酸
280 nm	○	○	×	×	×
254 nm	○	○	○	×	×
220 nm	◎	◎	◎	◎	◎

◎：応答強、○：応答弱、×：応答無

## 5. 溶離液

ペプチドの測定では、220 nm が一般的な検出波長として用いられるため、同波長域に吸収のないリン酸塩緩衝液が溶離液に多用されます。疎水的相互作用による溶出の遅れやピーク形状の歪を抑制するためには、水溶性有機溶媒を加えた溶離液を使用します。有機溶媒には、220 nm 付近に吸収がなく、粘性が低いアセトニトリルを用いるのが一般的です。カルボキシ基の pKa は 4 付近ですので、カルボキシ基が解離しない pH 3 以下の溶離液が多く使用されます。一方、カルボキシ基数の異なるペプチドを分離する場合には、pH 5 付近またはそれ以上の溶離液を用います。ヒスチジンは pH 6 以上で正電荷を失うため、ヒスチジンの数の違いに基づき分離する場合には、pH 7 付近の溶離液を用いることもあります。

ペプチドは、アルカリ溶液中でアスパラギンが脱アミドを受けやすく、またアスパラギン酸の一部が異性化して iso-アスパラギン酸になることが知られています。また、システインに由来するジスルフィド結合はアルカリ溶液中で SS 交換反応が促進されるため、ペプチド鎖内のジスルフィド結合の位置がずれることで、立体構造が変化する、或いはペプチド鎖間で結合を形成することにより多量体を生じることもあります。陽イオン交換クロマトグラフィーによるペプチドの分離では、酸性から中性域の緩衝液が用いられるため、これらの変性は生じにくいと考えられます。

## 6. 溶離条件の影響

### 6-1. カラム種類の影響

TSKgel SP-2SW、TSKgel SP-5PW、及び TSKgel SP-STAT を用い、表 2-1 記載のペプチド 13 種を溶出させた結果を図 6-1 に示します。ピークの付番は表 2-1 に示したペプチド成分の番号を、カッコ内の数字は測定に用

いた溶離液の pH における総電荷数と構成するアミノ酸の数 (AA は Amino Acid の略、AA の末尾に C が付加されたものは末端のアミノ基とカルボキシ基が脱水縮合してなる環状ペプチドを示す) をそれぞれ示しています。

いずれのカラムにおいても、総電荷数と溶出順の間に相関がみられ、総電荷数が多いほど溶出が遅くなる傾向を示しました。また、3 種のカラムの比較の結果、TSKgel SP-2SW 及び TSKgel SP-5PW はジペプチドなど、比較的短鎖のペプチドで良好な分離を示し、TSKgel SP-STAT は、中、長鎖のペプチドに対して良好な分離を示しました。保持力は、TSKgel SP-2SW > TSKgel SP-5PW > TSKgel SP-STAT の順となり、充填剤の有効表面積の順に一致しました。さらに、成分 1 から 4 及び成分 12 の溶出順にも大きな違いがみられました。成分 5 から 8 の溶出間隔にも差異が認められており、これらの分析種に対する選択性が異なることが分かります。

ペプチドの総電荷数ごとにグループ化したクロマトグラムを図 6-2 から図 6-4 に示します。いずれも総電荷数の増大とともに溶出が遅くなっています。また、総電荷数が同じ場合、鎖長が長いほど溶出が早くなる傾向を示しました。長鎖化するにつれ、立体障害による静電的相互作用の阻害をより強く受けるためと考えられます。特に鎖長 37 の成分 12 においては表面単純修飾型の TSKgel SP-2SW 及び TSKgel SP-5PW では、総電荷数が +6 であるにもかかわらず、総電荷数 +3 の成分 9 よりも早く溶出しています。一方、グラフトポリマー型の TSKgel SP-STAT では、総電荷数 +4 の成分 11 より遅く溶出しており、総電荷と溶出位置の相関がより強くなっています。グラフトポリマー構造をとることにより、イオン交換基の構造の自由度が高くなっており、静電的相互作用の立体障害による阻害を受けにくくなるためと考えられます。



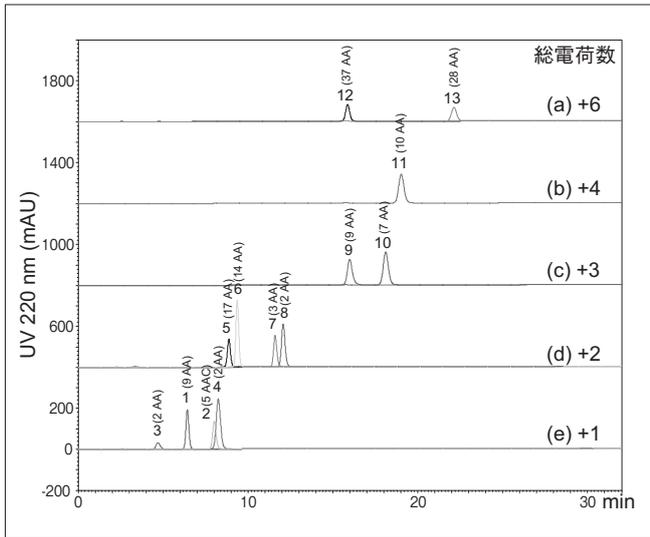


図 6-3 総電荷数と溶出位置 (TSKgel SP-5PW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル /20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80  
 B；アセトニトリル /20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80  
 グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
 - 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

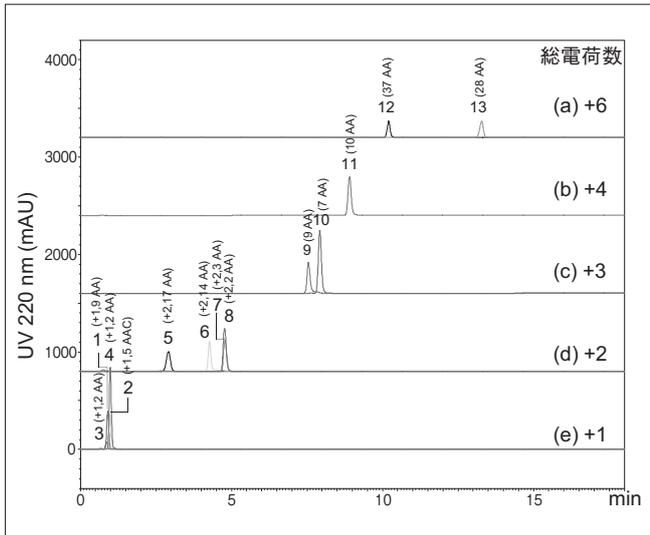


図 6-4 総電荷数と溶出位置 (TSKgel SP-STAT)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル /23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 30/70  
 B；アセトニトリル /23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaCl (pH 3.0) = 30/70  
 グラジエント：0 % B(0 min) - 0 % B(2 min)  
 - 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

## 6-2. 有機溶媒濃度の影響

ペプチドは、たんぱく質などに比較して鎖長が短く、折りたたみ構造による安定への寄与が小さいため、一定のコンフォメーションを取りにくいと考えられます。その結果、疎水性の高いアミノ酸側鎖が露出することで、充填剤との間に疎水的相互作用が生じる可能性があります。疎水的相互作用は水溶性有機溶媒を溶離液に添加することで抑制できます。そこで、アセトニトリルを加えた溶離液を用い、有機溶媒濃度が保持及び選択性に与える影響を確認しました。図 6-5 に TSKgel SP-2SW を用

いて得られたクロマトグラムを、図 6-6 に TSKgel SP-5PW を用いて得られたクロマトグラムを、図 6-7 に TSKgel SP-STAT を用いて得られたクロマトグラムをそれぞれ示します。いずれのカラムも、有機溶媒の濃度が上昇するとともに溶出が早くなり、ピークもシャープになる傾向を示しました。TSKgel SP-2SW では、有機溶媒を添加しない場合には、成分 13 の溶出が確認できませんでした。成分 1 から 8 の溶出順も有機溶媒濃度により大きく変化しました。さらに成分 9 と 12 の溶出順も逆転しています。TSKgel SP-5PW では、TSKgel SP-

2SW ほどの大きな変化はありませんでしたが、成分 2、4、5 の溶出順、成分 6 と 7 の分離、及び成分 9 と 12 の分離がそれぞれ変化しています。また、13 種のペプチド全てが有機溶媒濃度 0 % においても溶出しており、今回用いた 3 種のカラムでは疎水性相互作用が最も低い結果となりました。他方、TSKgel SP-STAT は有機溶媒濃度 0 % においては成分 5、6、12、13 が溶出しておらず、成分 11 も十分な回収率が得られていません。3 種のカラムでは最も疎水の相互作用を強く示す結果となりました。

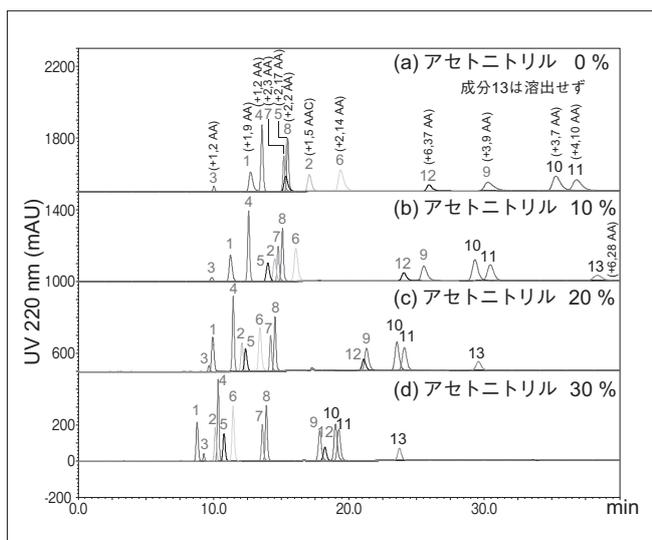


図 6-5 有機溶媒濃度が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-2SW)

た。しかしながら、有機溶媒を添加することで全てのペプチドの溶出が確認できました。ピーク形状も有機溶媒の添加により大幅に改善し、中、長鎖ペプチドにおいて最も良好な分離を示しました。有機溶媒の濃度により成分 1 から 8 および成分 12 の溶出順も変化しています。以上より、有機溶媒濃度は 3 種のカラムいずれにおいてもペプチドの選択性及び分離に影響を与えることがわかりました。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-2SW (4.6 mm I.D. × 25 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル /32 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0)/H<sub>2</sub>O = (a) 0/50/50, (b) 10/50/40, (c) 20/50/30, (d) 30/50/20,  
 B；アセトニトリル /32 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.6 mol/L NaCl (pH 3.0)/ H<sub>2</sub>O = (a) 0/50/50, (b) 10/50/40, (c) 20/50/30, (d) 30/50/20  
 グラジエント：0 % B (0 min) – 0 % B (2 min)  
 – 100 % B (32 min) – 100 % B (42 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

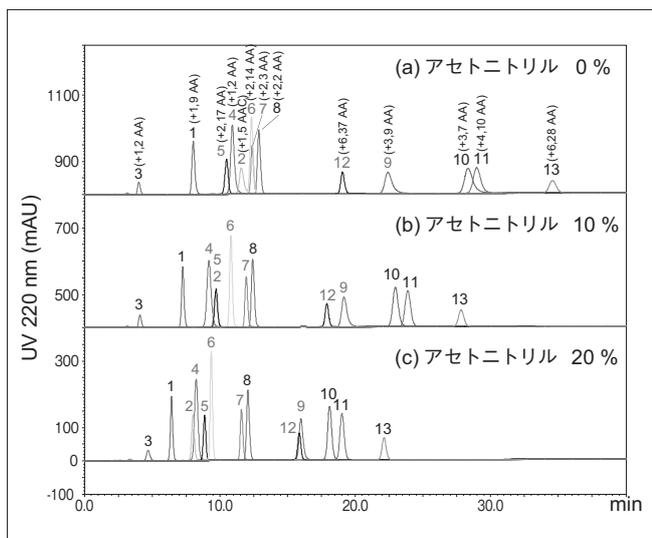


図 6-6 有機溶媒濃度が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-5PW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル /32 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0)/H<sub>2</sub>O = (a) 0/50/50, (b) 10/50/40, (c) 20/50/30  
 B；アセトニトリル /32 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.6 mol/L NaCl (pH 3.0)/H<sub>2</sub>O = (a) 0/50/50, (b) 10/50/40, (c) 20/50/30  
 グラジエント：0 % B (0 min) – 0 % B (2 min)  
 – 100 % B (32 min) – 100 % B (37 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

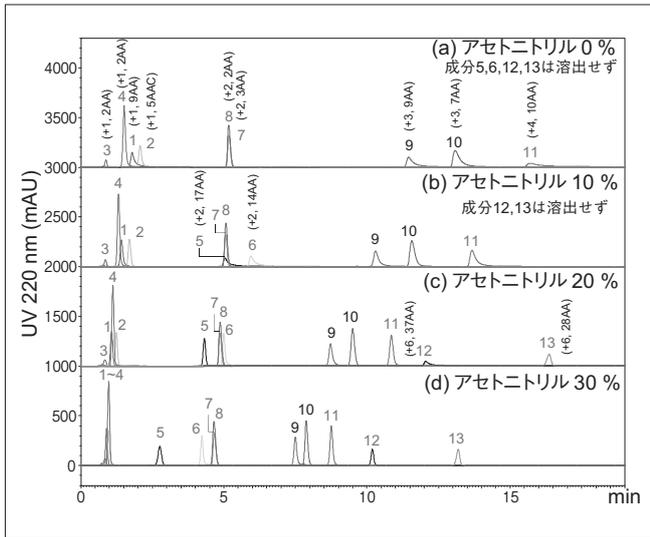


図 6-7 有機溶媒濃度が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-STAT)

### 6.3. 有機溶媒種類の影響

アセトニトリル及びエタノールを添加した溶離液を用い、有機溶媒の種類の違いが選択性に与える影響を調べました。結果を図 6-8 から図 6-10 に示します。エタノールを添加した溶離液では、粘性によりカラム圧が高くなるため、アセトニトリルを加えた溶離液の半分に相当する流速 (0.5 mL/min) に設定しています。

TSKgel SP-2SW では、有機溶媒の種類により成分 2 及び成分 5 から 8 の溶出順に違いが認められました。成分 1 と 3 の分離にも差異がみられます。TSKgel SP-5PW では、TSKgel SP-2SW ほど選択性に違いはありませんが、成分 2、

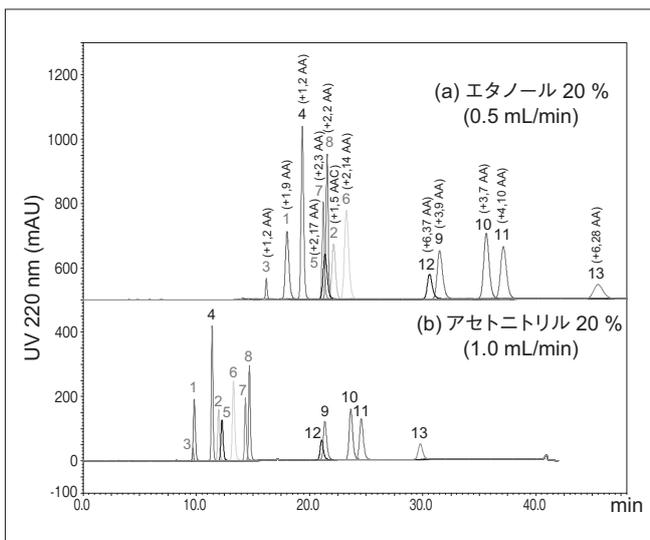


図 6-8 有機溶媒の種類が選択性に与える影響 (TSKgel SP-2SW)

#### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液：A；アセトニトリル /32 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) /H<sub>2</sub>O = (a) 0/50/50, (b) 10/50/40, (c) 20/50/30, (d) 30/50/20  
B；アセトニトリル /32 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 + 1.6 mol/L NaCl (pH 3.0) / H<sub>2</sub>O = (a) 0/50/50, (b) 10/50/40, (c) 20/50/30, (d) 30/50/20

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
- 100 % B (32 min) - 100 % B (37 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
9. bradykinin 10. angiotensin III  
11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
全て 0.5 g/L

4,5の溶出順が変化していました。TSKgel SP-STATでは、アセトニトリルを添加した溶離液ではカラムとの相互作用を示さず素通りした総電荷数 +1 の成分 1 から 4 がエタノールを添加した溶離液系を用いることで吸着され、分離が改善しています。成分 5 から 8 の溶出順も変化しました。エタノール添加系の溶離液では成分 9 及び 12 がテーリング様のピーク形状を示しています。このことは、エタノールがプロトン供与溶媒であり、アセトニトリルが非プロトン性溶媒であるため、アセトニトリルに比較してエタノールの疎水的相互作用抑制効果がやや低いものと考えられます。その結果、選択性にも違いが生じた可能性があります。

#### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-2SW (4.6 mm I.D. × 25 cm)

溶離液：(a) A；エタノール /20 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80  
B；エタノール /20 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80  
(b) A；アセトニトリル /20 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80  
B；アセトニトリル /20 mmol/L りん酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
- 100 % B (32 min)

流速：(a) 0.5 mL/min

(b) 1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
9. bradykinin 10. angiotensin III  
11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
全て 0.5 g/L

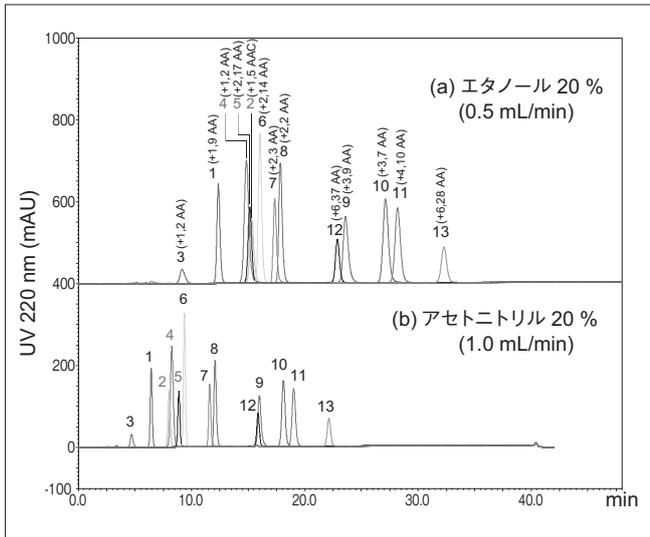


図 6-9 有機溶媒の種類が選択性に与える影響 (TSKgel SP-5PW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)

溶離液：(a) A；エタノール/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；エタノール/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

(b) A；アセトニトリル/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル/20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min) - 100 % B (32 min)

流速：(a) 0.5 mL/min

(b) 1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5  $\mu$ L

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5.  $\gamma$ -endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

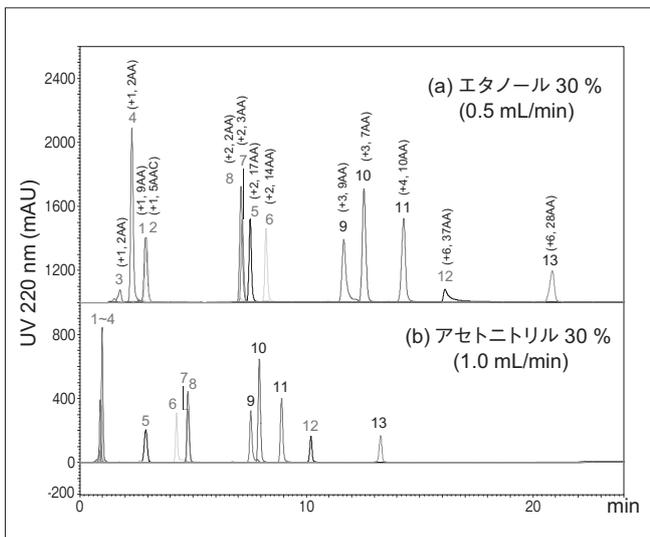


図 6-10 有機溶媒の種類が選択性に与える影響 (TSKgel SP-STAT)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液：(a) A；エタノール/23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 30/70

B；エタノール/23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaCl (pH 3.0) = 30/70

(b) A；アセトニトリル/23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 30/70

B；アセトニトリル/23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaCl (pH 3.0) = 30/70

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min) - 100 % B (32 min)

流速：(a) 0.5 mL/min

(b) 1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5  $\mu$ L

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5.  $\gamma$ -endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

## 6-4. 塩種類の影響

NaCl 及び NaClO<sub>4</sub> を用いて塩濃度グラジエントを用い、塩の種類が選択性に与える影響を確認しました。各カラムのクロマトグラムを図 6-11 から図 6-13 に示します。同一塩濃度で比較した場合、NaCl よりも NaClO<sub>4</sub> を用いた場合に溶出がわずかに早くなる傾向を示しました。また TSKgel SP-2SW では、塩の種類によって成分 2 及び成分 4 から 6 の溶出順が変化しました。成分 9 と

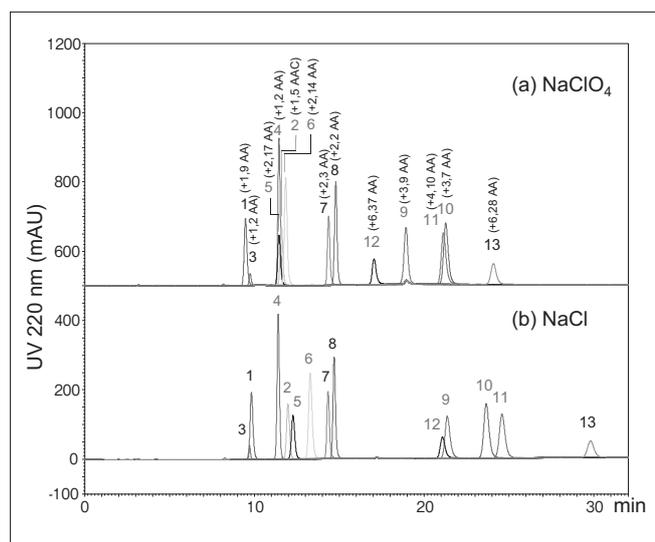


図 6-11 塩の種類が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-2SW)

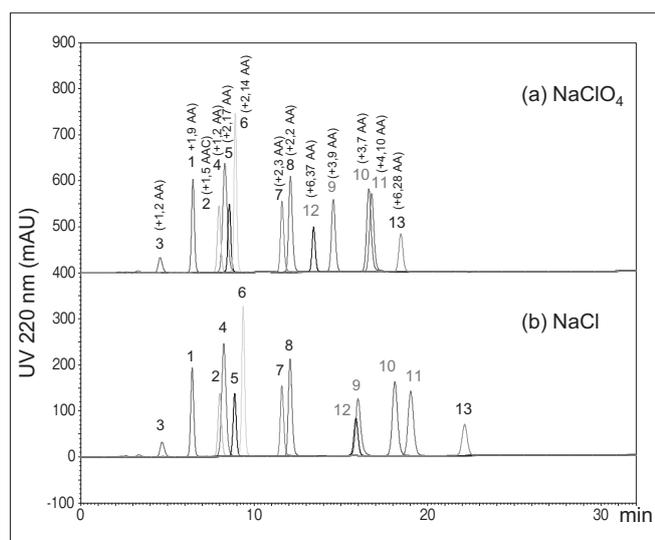


図 6-12 塩の種類が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-5PW)

12、成分 10 と 11 の分離も大きく変化しました。TSKgel SP-5PW においても成分 9 と 12、成分 10 と 11 の分離に違いが認められることから、塩の種類が両カラムの保持及び選択性に影響を与えていることがわかりました。この塩の種類の違いは、ClO<sub>4</sub> イオンによるカオトロピック効果の違いと考えられます。一方、TSKgel SP-STAT においては選択性に大きな変化は見られませんでした。

### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-2SW (4.6 mm I.D. × 25 cm)

溶離液：(a) A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) = 20/80

(b) A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
- 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)

溶離液：(a) A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) = 20/80

(b) A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
- 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

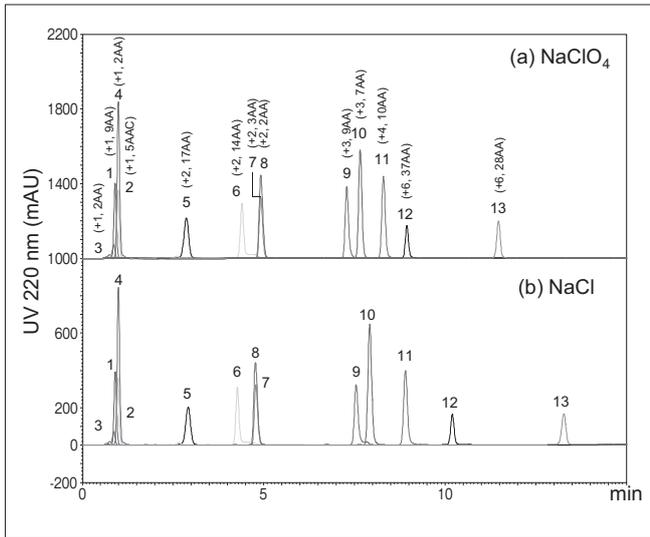


図 6-13 塩の種類が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-STAT)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液：(a) A；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 30/70

B；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaClO<sub>4</sub> (pH 3.0) = 30/70

(b) A；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 30/70

B；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaCl (pH 3.0) = 30/70

グラジエント：0 % B (0 min) – 0 % B (2 min)  
– 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

6-5. 温度の影響

カラム温度を 25、35、45 °C に設定して得られたクロマトグラムを図 6-14 から図 6-16 に示します。25 °C から 45 °C の範囲では、温度が上昇するとともに TSKgel

SP-2SW、TSKgel SP-5PW、TSKgel SP-STAT とともに溶出がわずかに早くなるものの、選択性に大きな変化はみられませんでした。

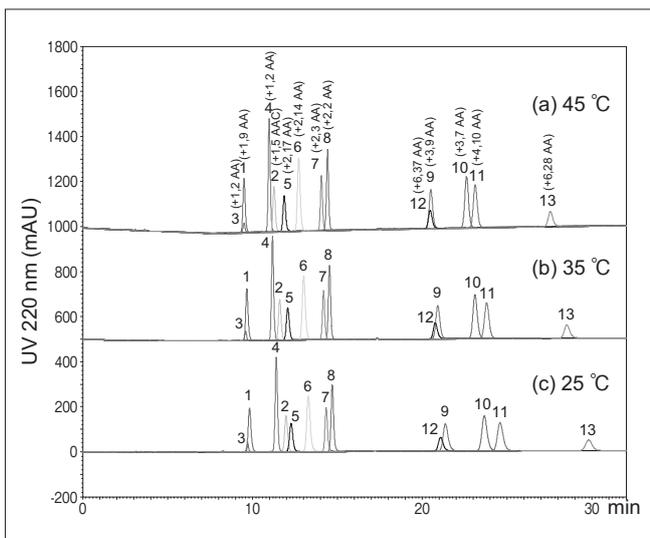


図 6-14 温度が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-2SW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-2SW (4.6 mm I.D. × 25 cm)

溶離液：A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

グラジエント：0 % B (0 min) – 0 % B (2 min)  
– 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：(a) 45 °C, (b) 35 °C, (c) 25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

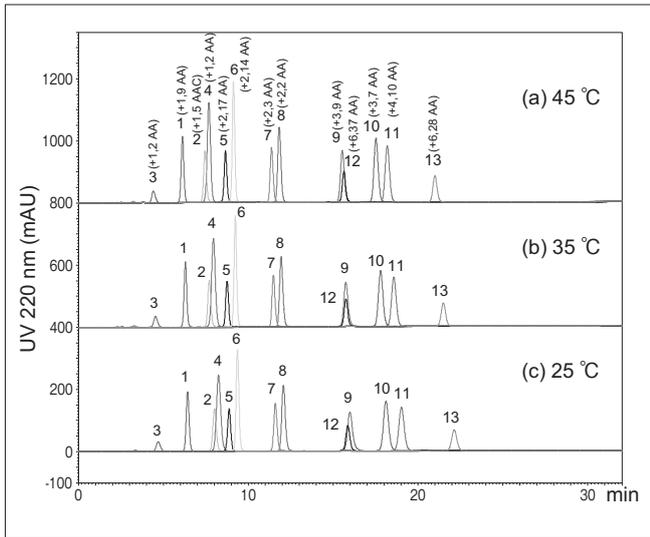


図 6-15 温度が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-5PW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)

溶離液：A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 20/80

B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl (pH 3.0) = 20/80

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)

- 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：(a) 45 °C, (b) 35 °C, (c) 25 °C

注入量：5  $\mu$ L

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5.  $\gamma$ -endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

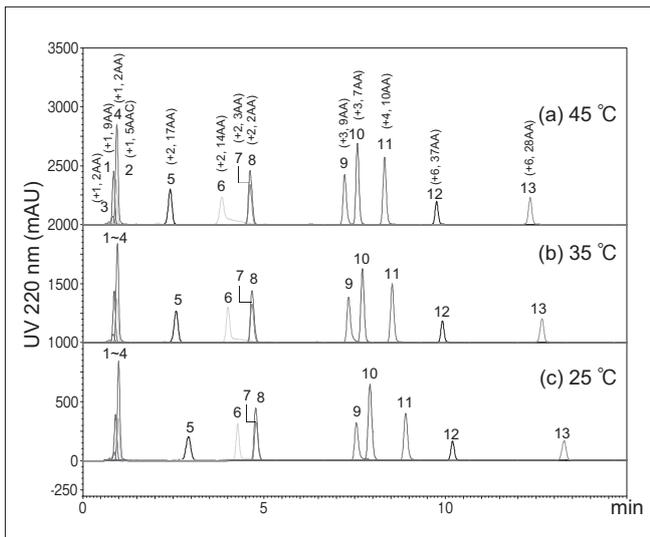


図 6-16 温度が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-STAT)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液：A；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) = 30/70

B；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaCl (pH 3.0) = 30/70

グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)

- 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：(a) 45 °C, (b) 35 °C, (c) 25 °C

注入量：5  $\mu$ L

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)

3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5.  $\gamma$ -endorphin

6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His

9. bradykinin 10. angiotensin III

11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,

全て 0.5 g/L

## 6-6. 溶離液の pH の影響

pH 3、5、及び 7 に調製した溶離液を用いて得られたクロマトグラムを図 6-17 から図 6-19 に示します。pH を 3 から 5 に変えることで、C 末端やアスパラギン酸、グルタミン酸の側鎖がもつカルボキシ基が解離するため、ペプチドの総電荷数は減少し、溶出は早くなります。それぞれのペプチドがもつカルボキシ基数の違いによっ

て総電荷の変化量が異なるため、溶出順も大きく変化します。さらに溶離液の pH を 5 から 7 に変えるとヒスチジンが正電荷を失うため、ペプチドの総電荷数はさらに減少し、溶出は早くなります。それぞれのペプチドがもつヒスチジン数の違いによって総電荷の変化量が異なるため、溶出順も大きく変化します。

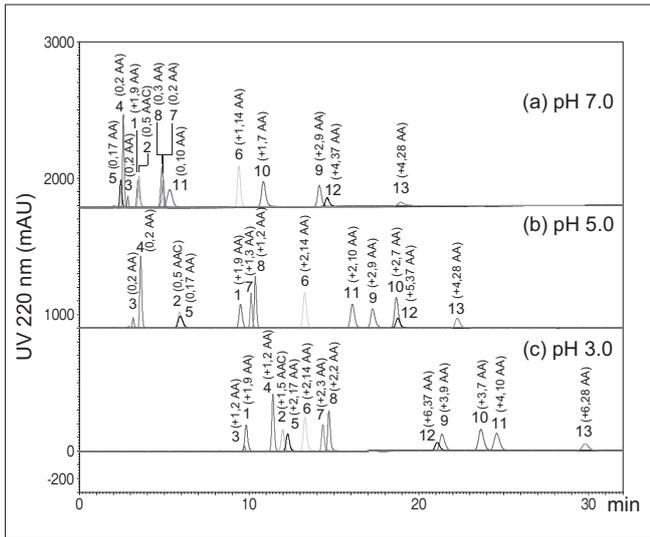


図 6-17 溶離液の pH が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-2SW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-2SW (4.6 mm I.D. × 25 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 ((a) pH 7.0, (b) pH 5.0, (c) pH 3.0) = 20/80  
 B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl ((a) pH 7.0, (b) pH 5.0, (c) pH 3.0) = 20/80  
 グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min) - 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

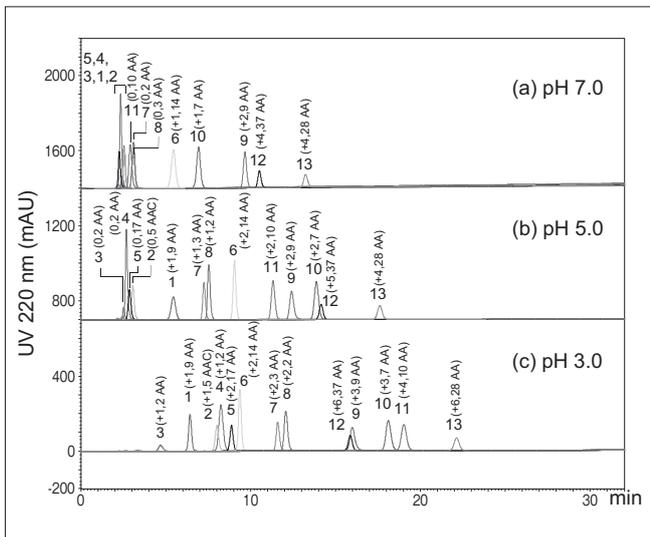


図 6-18 溶離液の pH が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-5PW)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-5PW (7.5 mm I.D. × 7.5 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 ((a) pH 7.0, (b) pH 5.0, (c) pH 3.0) = 20/80  
 B；アセトニトリル / 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1 mol/L NaCl ((a) pH 7.0, (b) pH 5.0, (c) pH 3.0) = 20/80  
 グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min) - 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

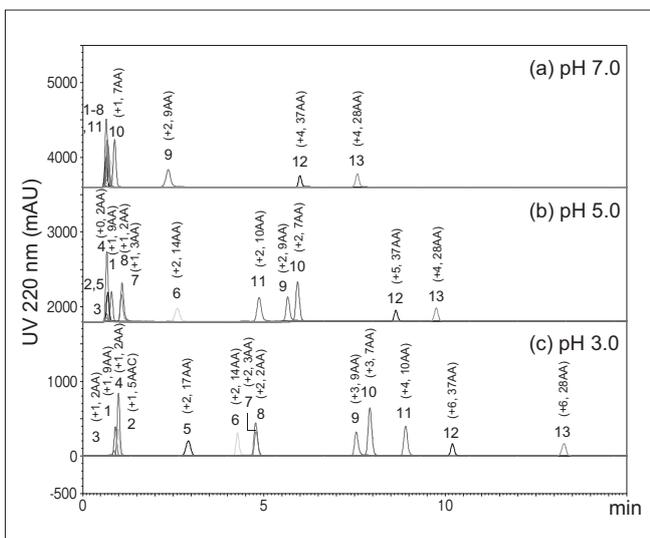


図 6-19 溶離液の pH が保持及び選択性に与える影響 (TSKgel SP-STAT)

〈測定条件〉

カラム：TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 溶離液：A；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 ((a) pH 7.0, (b) pH 5.0, (c) pH 3.0) = 30/70  
 B；アセトニトリル / 23 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.14 mol/L NaCl ((a) pH 7.0, (b) pH 5.0, (c) pH 3.0) = 30/70  
 グラジエント：0 % B (0 min) - 0 % B (2 min) - 100 % B (32 min)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 220 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
 3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5. γ-endorphin  
 6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
 9. bradykinin 10. angiotensin III  
 11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
 全て 0.5 g/L

## 7. 他の分離モードとの比較

ペプチドの分離には、陽イオン交換クロマトグラフィーの他、親水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーも広く用いられています。今回検討したペプチドを、これらの分離モードで測定した結果を図6-20に示します。分離モードにより溶出順が大きく異なることがわかります。

逆相クロマトグラフィー及び親水性相互作用クロマトグラフィーを用いたペプチドの分離では、個々のアミノ酸の充填剤への親和性の総和により、およその溶出位置が予測可能であることが知られています。また、両

モードとも、ペプチドの鎖長が長いほど溶出は遅くなる傾向を示しますが、鎖長が長くなるに従い、アミノ酸1つの違いがペプチド全体に与える影響が相対的に小さくなるため、分離は低下していきます。一方、陽イオン交換クロマトグラフィーでは、静電的性質の違いに基づき分離されるため、鎖長に大きな違いのないペプチドであってもに電荷に差異があれば、溶出位置や選択性が大きく異なることが期待できます。鎖長が長くなるほど溶出が早くなる傾向も、親水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーとは異なります。

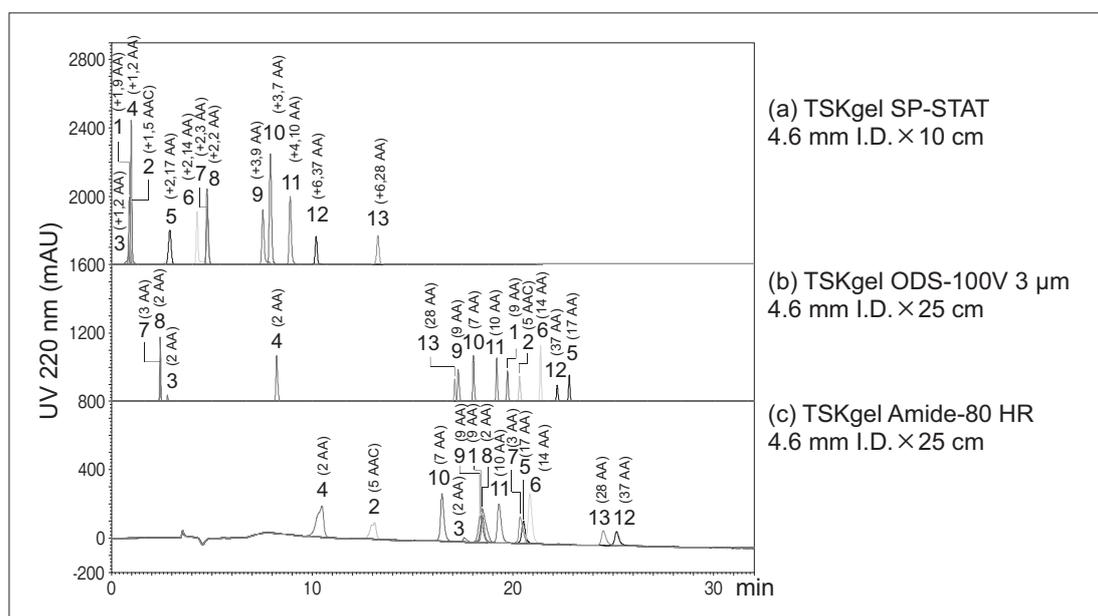


図6-20 分離モードによる選択性の違い

〈測定条件〉(a) : 図6-4と同じ

〈測定条件〉(b)

カラム : TSKgel ODS-100V 3  $\mu\text{m}$  (4.6 mm I.D.  $\times$  25 cm)

溶離液 : A ; 0.2 % りん酸

B ; アセトニトリル / 0.2 % りん酸 = 50/50

グラジエント : 5 % B (0 min) - 5 % B (2 min)  
- 100 % B (32 min)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV 220 nm

温度 : 40  $^{\circ}\text{C}$

注入量 : 2  $\mu\text{L}$

試料 : 1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5.  $\gamma$ -endorphin  
6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
9. bradykinin 10. angiotensin III  
11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
全て 0.5 g/L

〈測定条件〉(c)

カラム : TSKgel Amide-80 HR (4.6 mm I.D.  $\times$  25 cm)

溶離液 : A ; アセトニトリル /  $\text{H}_2\text{O}$  / トリフルオロ酢酸  
= 950/50/1

B ; アセトニトリル /  $\text{H}_2\text{O}$  / トリフルオロ酢酸  
= 500/500/1

グラジエント : 0 % B (0 min) - 0 % B (2 min)  
- 80 % B (32 min)

流速 : 1.0 mL/min

検出 : UV 220 nm

温度 : 40  $^{\circ}\text{C}$

注入量 : 10  $\mu\text{L}$

試料 : 1. oxytocin 2. cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)  
3. Gly-Gln 4. Tyr-Ala 5.  $\gamma$ -endorphin  
6. bombesin 7. Gly-Gly-His 8. Gly-His  
9. bradykinin 10. angiotensin III  
11. angiotensin I 12. CGRP 13. ANP,  
全て 0.5 g/L の水溶液をアセトニトリルで2倍  
希釈 (最終濃度 0.25 g/L)

## 8. まとめ

本稿では、陽イオン交換クロマトグラフィーによるペプチドの分離において、種々の条件が分離や選択性に与える影響を中心に記述しました。陽イオン交換クロマトグラフィーは、静電的相互作用の違いに基づき分析種を分離しますので、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィーなどとは選択性が大きく異なっており、特に電荷の異なる分析種の分離に対しては、良好な分離を示すことが期待できます。今回検討に用いた TSKgel SP-2SW は基材が硬く、また細孔径が小さめに設計されているため、比較的分子サイズが小さい分析種の分離に適しています。一方、非多孔性のポリマー系基材にグラフト構造のイオン交換基を導入した TSKgel SP-STAT は高速高分離を特長としており、さらに広い分子サイズ範囲の分析種への適用が可能で、低分子のペプチドの保持はやや弱いものの、中、長鎖のペプチドに対しては良好な分離を示します。TSKgel SP-5PW は3

種の中では最も疎水的相互作用の影響が少ないため、有機溶媒を含まない溶離液系でも良好な回収率が期待できます。

イオン交換クロマトグラフィーは、単位充填剤あたりの試料処理量が多いことから、分取用途にも適しています。有機溶媒を含まない、あるいは使用量を抑えたマイルドな条件での分離が可能であることから、高次構造を失うことで失活するペプチドや、さらにはたんぱく質についても活性を維持したまま分離することが可能です。弊社では、ポリマー系充填剤を中心に、種々のサイズの分取用カラムや、20、30  $\mu\text{m}$  の高速分取用充填剤、中速液体クロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL<sup>®</sup>などを豊富にラインナップしております。これらを用いることで、ラボスケールから工業スケールまで切れ目なく容易にスケールアップすることが可能です。本稿が皆様のペプチド研究の一助になれば幸いです。

※“TSKgel”、“TOYOPEARL”は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部	☎ (03) 5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオエス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエス	☎ (052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎ (092) 781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎ (022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター	☎ (0467) 76-5384	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>