

【コラム vol.22】 等電点を利用したペプチド精製での移動相 pH の条件検討

July 22, 2020

Elizabeth Denton

等電点 (pI) は、すべてのペプチド（およびその他の化合物）の物理的特性であり、これらの化合物を取り扱う際に経験する多くの問題の原因となる可能性があります。等電点を確認することで、凝集性、溶解性などを予測でき、化合物の取り扱いを容易にするための条件を得られるかもしれません。

今回の投稿では、ペプチドの精製方法を改善する指針の一つとして、等電点をどのように利用できるかを紹介します。

合成したペプチドは、精製が難しい化合物の一つです。不純物が目的物と類似していることが多く、クロマトグラフィーによる分離が難しく、時間がかかることが予想されます。しかし、ペプチドとその不純物は、等電点 (pI) の違いを識別することで、クロマトグラフィーにおいて分離することができます。

これまでのブログで、等電点をペプチド精製に活用したこともあり、このときは特に[酸性](#)または[塩基性](#)の移動相添加剤の選択による影響について焦点を当てました。異なる移動相添加剤を使用した後、私は、ペプチドの等電点と添加剤を使用した pH の緩衝溶媒を使用したら精製を改善できるかもしれない、と考えるようになりました。

この疑問を解決するために、私は BCL-2 ファミリータンパク質 BAX に結合する [BID ペプチド](#) の短い誘導体を、マイクロウェーブ加熱できるペプチド合成装置である Biotage® Initiator+ Alstra™ を用いて、合成条件の最適化はせず、標準的な条件で合成を行いました (図 1)。

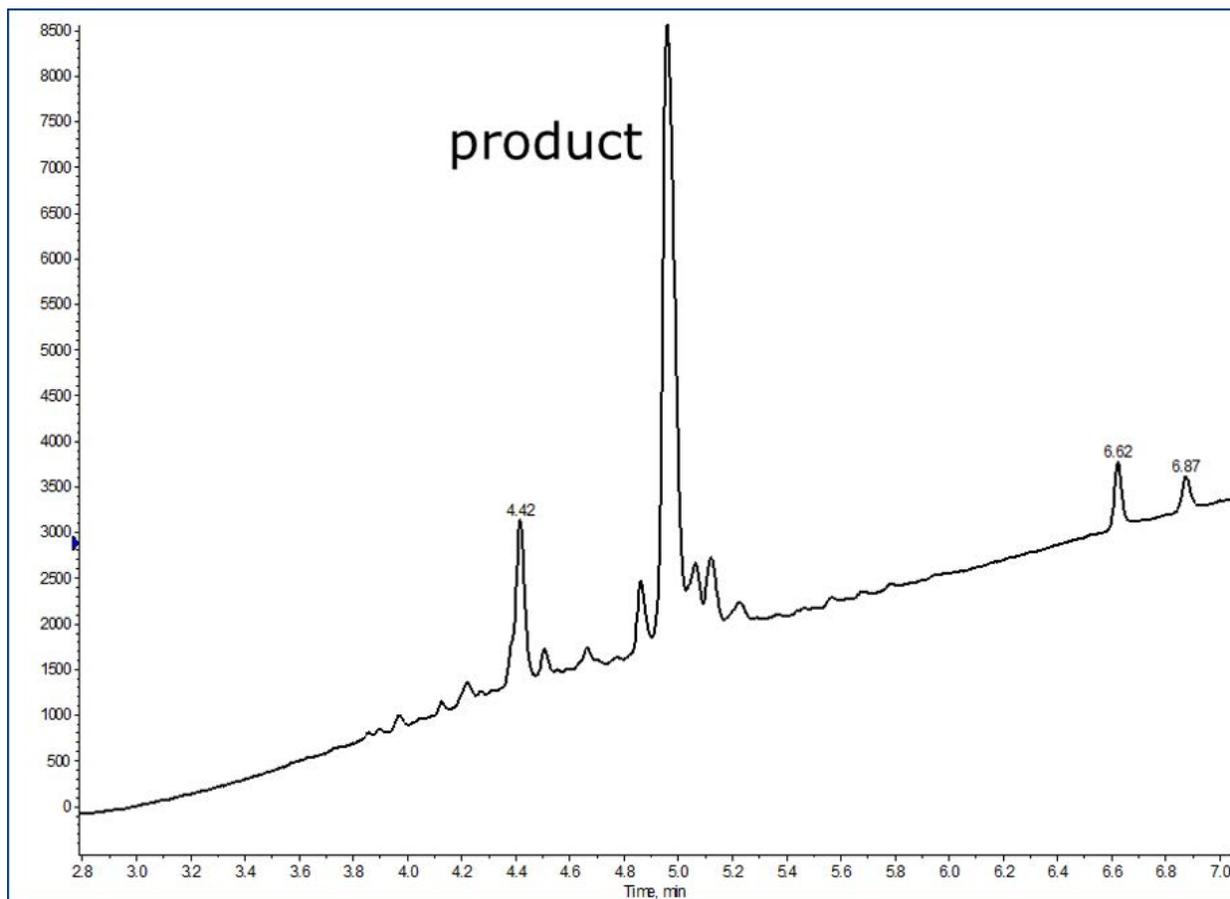


図1: BID ペプチドの粗分析HPLC のクロマトグラム。目的の生成物ピークとその付近に不純物ピークが検出されています。

幸いなことに、私の合成条件の最適化が不十分だったため、標準的なフラッシュクロマトグラフィー精製では、目的物と分離が難しい不純物がわずかに存在することがわかりました。電荷と pH の関係を見ると、電荷の状態は溶液の pH によって劇的に変化しますが、中性の pH ではほとんど中性であることがわかりました (図 2)。

Net charge vs pH

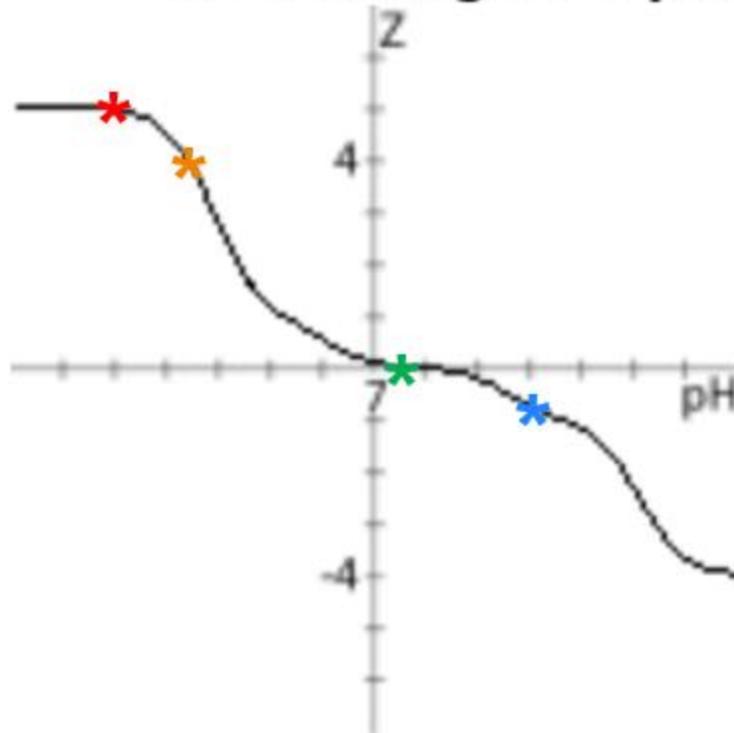


図2: 目的物である*BID* 誘導体ペプチドの電荷とpHの関係を表示。赤=pH 2 (ギ酸)、オレンジ=pH 3.4 (ギ酸アンモニウム)、緑=pH 7.4 (炭酸水素アンモニウム)、青=pH 10 (水酸化アンモニウム)のように、逆相ペプチド精製時によく使用されているpH値を色分けして示しています。

当初の仮説を検証するために、10 mM、20 mM、50 mMのいずれかのpH7.4の炭酸水素アンモニウムを使って、このペプチドを精製することにしました(図3)。この時のpHはペプチドの等電点からわずか0.4 pH単位しか離れていないので、精製中、ペプチドはほぼ中性になっていると予想していますが、移動相とのプロトン交換が急速に進み、精製効率が損なわれる可能性があります。

このペプチドやその他のペプチドの精製に pH がどのように影響するかについて、ご興味がおあり
ですか?詳しく知るには、[リンク](#)を参照してください。

Holistic Peptide Workflow

About Biotage

Biotage is a global Life Science company that develops innovative and effective solutions for separation within organic and analytical chemistry, as well as for industrial applications.

[Go To Biotage Japan Web site ...Click here](#)

