液体クロマトグラフィーによるリン酸八カルシウムのタンパク質吸着特性

太田一史・門間英毅・高橋 聡・小林偉男

工学院大学工学部応用化学科, 192-0015 東京都八王子市中野町 2665-1

Adsorption Characteristics of Proteins on Octacalcium Phosphate by Liquid Chromatography

Kazushi OHTA, Hideki MONMA, Satoshi TAKAHASHI and Hideo KOBAYASHI

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kogakuin University, 2665-1, Nakano-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192-0015

Adsorption characteristics of proteins on $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (OCP) were investigated by liquid chromatography using a potassium phosphate buffer (KP) as an eluant. Proteins as sample molecules with different isoelectric point (pI) values were adsorbed on the OCP surface equilibrated with $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KP, and were desorbed with increasing KP molarity. Basic proteins with $\text{pI} > 6.8$ were eluted by using KCl or MgCl_2 linear molarity gradient, whereas acidic proteins with $\text{pI} < 6.8$ were not eluted even at $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl or MgCl_2 . Such a chromatographic behavior was similar to that of $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp). It is presumed that acidic and basic proteins were adsorbed on the Ca^{2+} ions (Ca site) with positive charge and the PO_4^{3-} ions (P site) with negative charge on the surface of OCP, respectively. The amount of Ca site on the OCP surface were considered to be more than that on the HAp surface from average elution molarities for acidic and basic proteins. As the crystal surface structure of OCP (h00) was similar to that of HAp (h00), acidic proteins were preferentially adsorbed on the (h00) of OCP crystal with a blade-shaped form.

[Received January 19, 1999; Accepted March 26, 1999]

Key-words: Octacalcium phosphate, Hydroxyapatite, Liquid chromatography, Adsorption, Protein

1. 緒 言

リン酸カルシウムを充填剤とする液体クロマトグラフィーは、その歴史が古く、各種生体高分子の精製や分離に利用されてきた^{1)~3)}。しかし、当時使用された充填剤には物質名や性状の不明なものが多い。Tiselius らは結晶性の $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (水酸アパタイト、以下 HAp と略記) を充填剤として、生体高分子の分離を行った⁴⁾。Bernardi らは HAp を充填剤として、数多くの基礎的実験を行っている^{5)~8)}。Gorbunoff らは、タンパク質の吸着機構が主にイオンの相互作用であることを明らかにした^{9)~11)}。川崎らは、陽イオン交換基と陰イオン交換基の2種類の吸着部位があり、代表的な結晶面である (h00) 面と (00l) 面に、独立に分布するとしている^{12)~14)}。また、Spencer らは各種リン酸カルシウムを充填剤として、吸着特性の比較を行った^{15), 16)}。そのほかに、HAp の一部を他の元素で置換した、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ¹⁷⁾ と $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ¹⁸⁾ のクロマト特性を検討した例も報告されている。

著者らは、HAp 類似化合物の一つである $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (リン酸八カルシウム、以下 OCP と略記) の表面化学的な性質に注目した。結晶構造中には HAp とよく似た構造を持つ HAp 類似層と、水とリン酸のシートからなる水和層があり、これらは、OCP の (h00) 面に対して交互に積層した構造を持つ^{19), 20)}。また、 $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (以下 $\alpha\text{-TCP}$ と略記) の加水分解によって合成した OCP は、合成溶液中にシカルボン酸が共存すると、インターカレーションを生じて複合体を生成することが知られている^{21)~25)}。つまり、OCP は有機成分との親和性も高く、生体高分子に対する特異的な吸着特性が期待できる。

本研究では、OCP を充填剤としたタンパク質の吸着特性を、2種類の形態の異なる HAp と比較した。溶離液にはリン酸カリウム緩衝溶液 (K_2HPO_4 と KH_2PO_4 の等モル混合溶液、以下 KP)、KCl、 MgCl_2 を使用した。20種類のタンパク質に対する溶出濃度をタンパク質の等電点 (isoelectric point, 以下

pI) により分類して、OCP の吸着機構とその表面構造について考察した。

2. 実 験

2.1 試料の調製

OCP は $\alpha\text{-TCP}$ の加水分解反応により以下のように合成した。まず、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (関東化学製、特級試薬) と CaCO_3 (関東化学製、特級試薬) をモル比 2:1 となるように混合し、 1000°C で 3 h 焼成後、粉碎、この操作を計 3 回繰り返し、 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (以下 $\beta\text{-TCP}$ と略記) を得た。 $\alpha\text{-TCP}$ は、 $\beta\text{-TCP}$ を 1300°C で 1 h 焼成し、空冷して得た。OCP は $\alpha\text{-TCP}$ を 60°C の $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 水溶液中でかくはんしながら、希 HNO_3 で pH 5.5 に 2 h 保持し、汙過後、 37°C で乾燥して調製した。形態の異なる2種類の HAp (以下 a-HAp、c-HAp と略記) は次のようにして合成した。a-HAp は、 $\alpha\text{-TCP}$ を 80°C の水溶液中でかくはんしながら NaOH 水溶液で pH 10 に 2 h 保持し、汙過、乾燥させて合成した。c-HAp は、オーブンカラム式液体クロマトグラフィー用の充填剤として利用されていた Tiselius らの報告する HAp の合成方法と類似した方法により合成した⁴⁾。すなわち、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 30 mass% NaOH 水溶液中に投入し、 $90 \sim 95^\circ\text{C}$ で 1 h 保持、数回のデカンテーションによって微細な結晶を取り除き、汙過、乾燥して得た。

各合成試料は粉末 X 線回折 (XRD) により同定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) により形態の観察を行った。比表面積は BET 吸着法により測定した。

試料分子として使用したタンパク質の種類と pI は表 1 に示す。

2.2 液体クロマトグラフィー

測定には、イオンクロマトグラフ (Dionex 製, 2000i/SP) の一部不要な部品を取り除いて使用した。カラムは PEEK (Poly Ether Ether Ketone) 製の 4 mm (内径) $\times$ 250 mm (長

Table 1. Proteins Used for Chromatography

No.	Protein (Source)	pI ^{a)}
1	Pepsin (Porcine Stomach Mucosa)	1.0
2	Lactalbumin (Milk)	4.5
3	Trypsin inhibitor (Soybean)	4.6
4	Ovalbumin (Chicken Egg Serum)	4.6
5	Albumin (Bovine Serum)	4.8
6	α -Amylase (Porcine)	4.9
7	β -Lactoglobulin A (Bovine Milk)	5.1
8	β -Lactoglobulin B (Bovine Milk)	5.1
9	Insulin (Bovine Pancreas)	5.5
10	holo-Transferrin (Bovine)	5.5
11	Catalase (Bovine Liver)	5.6
12	Conalbumin (Chicken Egg White)	6.4
13	Hemoglobin (Bovine)	7.0
14	Myoglobin (Horse Skeletal Muscle)	8.1
15	γ -Chymotrypsin (Bovine Pancreas)	8.4
16	Papain (Papaya Latex)	9.2
17	Trypsinogen (Bovine Pancreas)	9.3
18	Ribonuclease A (Bovine Pancreas)	9.5
19	Cytochrome c (Horse Heart)	10.1
20	Lysozyme (Egg White)	11.2

^{a)} Isoelectric point.

さ)を使用した。カラムへの試料の充填は、合成試料を蒸留水に懸濁し、垂直に立てたカラム内へ流入し、自然沈降させた。カラム内の充填剤は結晶表面の化学的な変化を配慮して毎日交換した。初期溶離液は、 PO_4^{3-} イオン濃度で $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ のKP (K^+ イオン濃度では、 K_2HPO_4 と KH_2PO_4 の等モル混合溶液のため、 PO_4^{3-} イオン濃度の1.5倍として計算され、 $0.015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ となる。以後KP濃度はすべて PO_4^{3-} イオン濃度で表す)を加えて、 $\text{pH} \approx 6.8$ に保持した。直線濃度勾配法による測定にはKPあるいはKCl, MgCl_2 をそれぞれ使用した。KCl, MgCl_2 を溶離液として直線濃度勾配溶出を行った場合には、 pH を一定に保つために $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KPを共存させた。KP溶離液の濃度勾配は $4.9 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (K^+ イオン濃度で表せば、 $7.4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), KCl, MgCl_2 を溶離液とした濃度勾配は、 $5.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ でそれぞれ行った。溶離液中の無機イオン濃度の測定にはアップ式の屈折計を用いた。タンパク質はそれぞれの溶解度と検出感度に合わせて、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KPで $1 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ の濃度に調製して $50 \sim 100 \mu\text{l}$ 注入した。タンパク質の検出は紫外分光検出器を用いて 280 nm で行った。流速は $0.5 \sim 2.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ となるように調整した。なお、濃度勾配法において、試料分子の溶出濃度は溶離液の流速に依存しないことが報告されている²⁶⁾。測定はすべて室温で行った。

3. 結果と考察

3.1 試料のキャラクタリゼーション

図1に、(a) OCP, (b) a-HApと(c) c-HApのXRD回折図を示す。それぞれが単一相であることを確認した。c-HApは、(001)面の回折線が相対的に強く現れ、 750°C で1 h加熱処理す

Fig. 1. XRD patterns of prepared OCP and HAp packed columns. (a) OCP, (b) a-HAp, (c) c-HAp, (d) (c) heated at 750°C for 1 h.

ると、(d)のように結晶性が向上して、その特徴はより明確になった。図2には、各試料の一次粒子と二次粒子の外形の確認できるSEM写真を示す。OCPの一次粒子はOCP特有の板状形態²⁷⁾であった。OCPの(100)面の回折強度と形態の観察から、板状表面は(h00)面であると推測された。a-HApは、原料として用いた α -TCP焼結粒子の外形をとどめて、クモの巣状に一次粒子を絡み合わせていた。OCP及びa-HApの比表面積は、それぞれ $14 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, $17 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ であった。c-HApは、出発原料である $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の外形を保ち、大きな板状表面に微細な針状結晶を緻密に集合させていた。XRD回折図との対応から、c-HApは大きな板状平面と垂直の方向にc軸を配向した凝集粒子であると推定された。比表面積は $97 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ であった。

3.2 タンパク質溶出挙動

図3は、OCP, a-HAp, c-HApを充填剤として、牛血清アルブミン ($\text{pI}=4.8$, 以下BSAと略記), ウマシトクロムc ($\text{pI}=10.1$), 卵白リゾチーム ($\text{pI}=11.2$)の混合タンパク質を試料分子として、KPにより直線濃度勾配法で測定したクロマトグラムである。これらの混合タンパク質は初期溶離液の $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KPでは溶出しなかった。しかし、溶離液中のKP濃度勾配を $4.9 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ の割合で直線的に上昇させると、OCP充填カラムでは、卵白リゾチーム (溶出濃度 (M_{elu}) = $0.06 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), BSA ($M_{\text{elu}}=0.08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), ウマシトクロムc ($M_{\text{elu}}=0.14 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)の順に溶出した。a-HAp及びc-HAp充填カラムでは、それぞれ、BSA ($M_{\text{elu}}=0.05, 0.04 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 卵白リゾチーム ($M_{\text{elu}}=0.08, 0.15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), ウマシトクロムc ($M_{\text{elu}}=0.16, 0.23 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)の溶出順位となり、OCP充填カラムの溶出順位とは異なった。個々のタンパク質のクロマトグラムピーク形状と溶出濃度は、試料分子を個別に測定した場合ともほぼ一致することを別に確認した。

図4は、OCP, a-HAp, c-HApの各充填剤において、二重濃

Fig. 2. SEM photographs of OCP and two types of HAp. (a) OCP, (b) a-HAp, (c) c-HAp.

度勾配溶出法により測定した混合タンパク質のクロマトグラムである。始めに、KClを溶離液として直線濃度勾配溶出を行い、続いて、KPによって直線濃度勾配溶出を行った。OCPを充填剤としてこの操作を行うと、塩基性タンパク質の卵白リゾチームとウマシトクロムcがKClによって溶出し、酸性タンパク質のBSAは $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以上になっても溶出しなかった。しかし、溶離液をKPに交換すると、BSAは $0.07 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ で溶出した。このような溶出挙動はc-HAp, a-HApにおいても同様であった。また、図5に示すように、 MgCl_2 とKPによって二重濃度勾配溶出を行うと、OCP, a-HAp, c-HApのいずれの充填剤においても塩基性タンパク質は MgCl_2 によって溶出し、KClを溶離液として濃度勾配溶出したよりも極端に低濃度の溶離液濃度で溶出した。しかし、酸性タンパ

Fig. 3. Chromatograms with KP molarity (○) gradient of proteins by using OCP, a-HAp and c-HAp packed columns.

ク質は $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以上の MgCl_2 によっても溶出しなかった。

3.3 タンパク質吸-脱着機構

川崎らは、HApクロマトグラフィーにおけるタンパク質の吸着に及ぼす溶離液中の無機イオンの影響を次のように解釈している。酸性タンパク質はKPによって溶出するが、KClや MgCl_2 では溶出しない。一方、塩基性タンパク質は、KP, KClや MgCl_2 いずれの溶離液によっても溶出する。つまり、酸性タンパク質の溶出には、 K^+ イオンや Cl^- イオンがほとんど影響を与えず、 PO_4^{3-} イオンののみが関与しているとした。塩基性タンパク質は、KP, KClのどちらの溶離液中でもほぼ同様に溶出し、2価の電荷を持った Mg^{2+} イオンにより、更に低濃度の溶離液で溶出することから、 K^+ や Mg^{2+} が溶出に関与しているとした。ただし、 Cl^- イオンによって酸性タンパク質が溶出しないのは、 Cl^- イオンの競合吸着力が他の分子に比べて極端に弱いためと推定した¹⁴⁾。

本実験では、各種溶離液中におけるHApとOCPのタンパク質溶出挙動が一致していることから、酸性タンパク質は負の電荷を持った吸着官能基（カルボキシル基や、リンタンパク質の場合はリン酸基も含む）を用いて、溶離液中の負電荷を持った無機イオンと競合しながら、OCPやHAp結晶表面上に存在する正電荷を持った部位（正電荷を持つ Ca^{2+} イオンに関与するので、Ca部位と仮称）とそれぞれ吸着すると推定した。一方、塩基性タンパク質は、正の電荷を持った吸着官能基（アミノ基やグアニジノ基）を利用して、溶離液中の正電荷を持った無機イオンと競合しながら、OCPやHApの結晶表面上に存在する負電荷を持った部位（負電荷を持つ PO_4^{3-} イオンに

Fig. 4. Chromatograms with KCl and KP molarities (○) double gradient for mixtures of proteins by using OCP, a-HAp and c-HAp packed columns.

Fig. 5. Chromatograms with $MgCl_2$ and KP molarities (○) double gradient for mixtures of proteins by using OCP, a-HAp and c-HAp packed columns.

関与するので、P 部位と仮称) とそれぞれ吸着すると推定した。

図 6 は、KP を溶離液として、OCP, a-HAp, c-HAp を充填剤とした、表 1 に記載する 20 種類のタンパク質の主要なクロマトグラムピーク頂点における溶出濃度と pI の関係を示す。タンパク質の種類は、表中の番号によってそれぞれ表した。前述の推定から、酸性タンパク質は Ca 部位に、塩基性タンパク質は P 部位に吸着するとして、酸性タンパク質 ($pI < 6.8$, ●) と塩基性タンパク質 ($pI > 6.8$, ○) を区別して示した。3 種類の充填剤に共通して、20 種類のタンパク質は $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以下の KP ですべて溶出した。ウシラクトアルブミンとブタイン

スリンのみが、初期溶離液濃度の $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KP によって溶出した。タンパク質の溶出順位は、酸性タンパク質 ($pI < 6.8$) と塩基性タンパク質 ($pI > 6.8$) を区分けして比較すれば、OCP, a-HAp, c-HAp の間で溶出順位に大きな変動は見られなかった。これは、タンパク質の吸着機構がこれらの充填剤間で類似していることを示している。しかし、図 3 のクロマトグラムに見られるように、OCP と a-HAp, c-HAp の間では、酸性タンパク質 (BSA) と塩基性タンパク質 (ウマシトクロム c, 卵白リゾチーム) の溶出順位が異なった。また、図 6 でも、酸性タンパク質 ($pI < 6.8$) と塩基性タンパク質 ($pI > 6.8$) の溶出濃度の比は各充填剤間で異なった。一般に、タンパク質

Fig. 6. Plots of elution molarity vs. pI for acidic (●) and basic (○) proteins by using OCP, a-HAp and c-HAp packed columns.

Table 2. Average Relative Elution Moralities of Acidic (●)/Basic (○) Proteins

OCP	a-HAp	c-HAp
0.86	0.70	0.49

は移動相（溶離液）の移動に伴った吸脱着の繰り返しによって溶出するため、カラム内での吸着部位との相互作用の多いものは遅れて溶出する。したがって、酸性タンパク質（ $pI < 6.8$ ）と塩基性タンパク質（ $pI > 6.8$ ）の溶出濃度に違いが見られたのは、充填剤表面に存在する Ca 部位と P 部位の数が各充填剤によって違うためと考えられる。

表 2 は、OCP, a-HAp, c-HAp の充填率や比表面積に依存せず、結晶表面に存在する Ca 部位と P 部位の相対的な存在比を表す数値として比較するために、図 7 より求まる各リン酸カルシウム充填剤における酸性タンパク質（ $pI < 6.8$ ）の平均溶出濃度と塩基性タンパク質（ $pI > 6.8$ ）の平均溶出濃度の比（以下●/○と略記）を計算した。●/○の値の大きさは、 $OCP > a-HAp > c-HAp$ の順であった。川崎らは、HAp の Ca 部位と P 部位は、異なる代表的な結晶面である（ $h00$ ）面と（ $00l$ ）面にそれぞれ独立に分布すると報告している^{13),14)}。本実験では、（ $00l$ ）面を配向凝集した c-HAp が、柱状の a-HAp よりも●/○の値の小さいことから、（ $h00$ ）面には Ca 部位が多く分布し、（ $00l$ ）面には P 部位の多く分布することが予想される。この結果は、川崎らの報告とも矛盾しなかった。更に、板状形態の OCP は、c-HAp や a-HAp よりも●/○の値が大きくなった。これは、c-HAp や a-HAp よりも、OCP の方が Ca 部位/P 部位の存在割合の大きいことを示している。一般に、OCP の結晶は[001]方向に成長しやすく、図 2 (a) の板状平面は（ $h00$ ）面に対応すると推測される。OCP の（ $h00$ ）面には、これと水平にして HAp 類似層と水和層が、交互に積層した構造を持つ²⁷⁾。Brown らは、OCP 結晶構造に関する考察の中で、HAp の結晶構造との類似性に着目して、HAp と水との接する界面には、OCP の水和層と類似の安定層が現れると予測している²⁰⁾。著者らは、OCP と HAp のタンパク質吸着機構が、各種溶離液中におけるタンパク質の溶出挙動と溶出順位より類似していることを示した。そして、HAp の（ $h00$ ）面に見られる結晶構造と、OCP の（ $h00$ ）面に現れる結晶構造との対応関係より、OCP の（ $h00$ ）面には Ca 部位が多く存在していると推定した。しかし、OCP の（ $0k0$ ）面と（ $00l$ ）面には、HAp 類似層と水和層が交互に配列した構造が現れる。このような結晶面がどのような吸着特性を示すかについては明らかにすることができなかった。

4. 結 論

OCP を充填剤として液体クロマトグラフィーによりタンパク質の吸着特性を調べ、吸着挙動と表面構造を HAp と比較した結果、以下の結論を得た。

(1) KP を溶離液として濃度勾配法により溶出を行うと、初期溶離液濃度の $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ でさまざまな pI を持つタンパク質が吸着し、KP 濃度の増加に伴って溶出した。

(2) KCl, MgCl_2 を溶離液に用いると、塩基性タンパク質

は溶出するが、酸性タンパク質は $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以上になっても溶出しなかった。この吸着挙動は HAp と類似しており、酸性タンパク質（ $pI < 6.8$ ）を吸着する Ca 部位と、塩基性タンパク質（ $pI > 6.8$ ）を吸着する P 部位の 2 種類の吸着部位の存在が推定された。

(3) 20種類のタンパク質の溶出順位は、酸性タンパク質と塩基性タンパク質を区分けして比較すると、HAp と大差が見られなかった。これは OCP と HAp の吸着機構が類似していることを示している。

(4) 酸性タンパク質の平均溶出濃度と塩基性タンパク質の平均溶出濃度の比は、a-HAp, c-HAp よりも OCP の方が大きくなった。これは、HAp の（ $h00$ ）面と類似の構造を持った OCP の（ $h00$ ）面が、HAp の（ $h00$ ）面に Ca 部位を多く持つのと同じように、板状に発達した OCP の（ $h00$ ）面にも Ca 部位を多く持つためと予想した。

謝 辞 本研究に当たり、適切なご助言を頂きました国際解析研究所・川崎 力博士に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) K. Agner, *Biochem. J.*, **32**, 1702-06 (1938).
- 2) B. D. Polis and H. W. Shmukler, *J. Biol. Chem.*, **201**, 475-500 (1953).
- 3) C. A. Zittle, *Advance in Enzymol.*, **14**, 319-74 (1953).
- 4) A. Tiselius, S. Hjertén and Ö. Levin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 132-55 (1956).
- 5) G. Bernardi, *Methods Enzymol.*, **21**, 95-139 (1971).
- 6) G. Bernardi, *Methods Enzymol.*, **22**, 325-39 (1971).
- 7) G. Bernardi, *Methods Enzymol.*, **27**, 471-79 (1973).
- 8) G. Bernardi, M. G. Giro and C. Gaillard, *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 409-20 (1972).
- 9) M. J. Gorbunoff, *Anal. Biochem.*, **136**, 425-32 (1984).
- 10) M. J. Gorbunoff, *Anal. Biochem.*, **136**, 433-39 (1984).
- 11) M. J. Gorbunoff and S. N. Timasheff, *Anal. Biochem.*, **136**, 440-45 (1984).
- 12) T. Kawasaki, M. Niikura and Y. Kobayashi, *J. Chromatogr.*, **515**, 91-123 (1990).
- 13) T. Kawasaki, M. Niikura and Y. Kobayashi, *J. Chromatogr.*, **515**, 125-48 (1990).
- 14) T. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **544**, 147-84 (1991).
- 15) M. Spencer and M. Grynpsas, *J. Chromatogr.*, **166**, 423-34 (1978).
- 16) M. Spencer, *J. Chromatogr.*, **166**, 435-46 (1978).
- 17) T. Sato, T. Okuyama, T. Ogawa and M. Ebihara, *Bunseki Kagaku*, **38**, 34-39 (1989) [in Japanese].
- 18) T. Kawasaki, M. Niikura, S. Takahashi and W. Kobayashi, *Biochem. Int.*, **15**, 1137-49 (1987).
- 19) M. Mathew, W. E. Brown and L. W. Schroeder, *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.*, **18**, 235-50 (1988).
- 20) W. E. Brown, M. Mathew and M. S. Tung, *Prog. Crystal Growth Charact.*, **4**, 59-87 (1981).
- 21) H. Monma and M. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 3843-44 (1983).
- 22) H. Monma, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 599-600 (1984).
- 23) M. Marković, B. O. Fowler and W. E. Brown, *Chem. Mater.*, **5**, 1401-05 (1993).
- 24) M. Marković, B. O. Fowler and W. E. Brown, *Chem. Mater.*, **5**, 1406-16 (1993).
- 25) M. Marković, B. O. Fowler and W. E. Brown, *Chem. Mater.*, **5**, 1417-23 (1993).
- 26) T. Kawasaki and M. Niikura, *Sep. Sci. Technol.*, **25**, 397-435 (1990).
- 27) J. C. Elliott, "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates," Vol. 18, Elsevier Science (1994) pp. 12-15.