

イオン交換クロマトグラフィーによる 生体分子の分析：メソッド開発と トラブルシューティングのヒント

概要

イオン交換（IEX）クロマトグラフィーは、密接に関係する生体分子を分離する際に特に強力な分析ツールとなります。しかし、pH や塩濃度の違いに影響を受けやすいため、メソッドの詳細やカラムの選択には十分に注意する必要があります。この技術概要では、カラムの選択、メソッド開発、および IEX クロマトグラフィー メソッドで一般的に発生する問題の解決策について、ユーザーを支援するためのガイドラインを提供します。

はじめに

イオン交換（IEX）クロマトグラフィーは、タンパク質、ペプチド、核酸、およびその他の帯電した生体分子を、その正味の表面電荷に基づいて分析または精製するために用いられる、強力な分離技術です。この技術は、帯電した分析対象物と、樹脂または固定相上の反対に帯電した官能基との間の静電相互作用を利用することにより機能します。

IEX クロマトグラフィーは、密接に関係する生体分子の分離に最適であり、特に分取スケールの逆相クロマトグラフィーと比較して、完全にスケールアップでコスト効率に優れています。ただし、最適な分離を実現するには、pH とイオン強度を慎重に制御する必要があるため、IEX クロマトグラフィーのメソッド開発やトラブルシューティングには課題が伴う場合があります。この技術概要では、IEX クロマトグラフィーの原理、メソッド開発、カラム選択のガイドライン、およびトラブルシューティングのヒントについて紹介します。

IEX クロマトグラフィーについて

IEX クロマトグラフィーは、イオン電荷の違いに基づいて生体分子を分離するために広く使用されています。一般的に、高電荷のイオンは固定相への結合強度が高く、低電荷のイオンよりも遅れて溶出します。これは、有機溶媒を必要としない、穏やかな非変性的テクニックです。IEX クロマトグラフィーの一般的なアプリケーションとして、タンパク質の電荷変異体の分析や、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチドの精製があります。

分子の総電荷は周囲の溶液の pH に左右され、その相互作用に応じて使用可能なイオン交換メソッドも変わってきます。IEX メソッドでは一般的に塩グラジエントが使用されており、分離全体を通して移動相の pH を一定に維持する必要があります。そのため、溶出液として水溶性バッファが使用されます。塩グラジエントの間は、カラムへの結合強度が高くなる順序でタンパク質を溶出させるために、移動相のイオン強度を上げます（図 1）。pH グラジエントでは、pH グラジエントが完了した後に、カラムを洗浄するために塩が使用される場合がありますが、グラジエント自体には塩は含まれていません。この場合、タンパク質は正味の電荷がゼロになる pH、つまり等電点で溶出します。

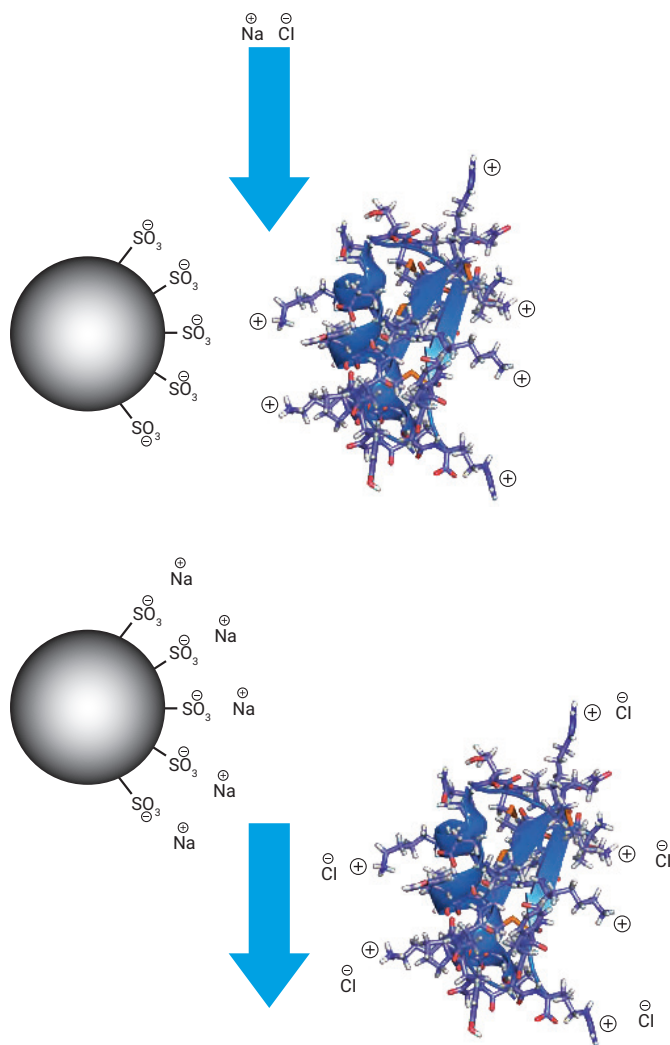


図 1. IEX の分離メカニズム

カラムの選択

カチオンとアニオンおよび強交換と弱交換

多くのクロマトグラフィー テクニックと同様に、イオン交換カラムにも幅広い選択肢があります。IEX クロマトグラフィーにおける最初の考慮事項は、アニオン交換カラムまたはカチオン交換カラムのいずれを選択するかです。強カチオン交換カラムの官能基はスルホン酸であるため、酸性度のきわめて高い移動相以外では固定相が負に帯電します。カチオン交換クロマトグラフィーは、一般的に塩基性ペプチドやタンパク質に用いられます（図 2）。逆に、強アニオン交換カラムの官能基は 4 級アミン基であるため、塩基性度のきわめて高い移動相以外では正に帯電します。アニオン交換クロマトグラフィーは、一般的に酸性ペプチド、タンパク質、およびオリゴヌクレオチドに用いられます（図 2）。

2 つ目の考慮事項は、強イオン交換カラムまたは弱イオン交換カラムのいずれを選択するかです。強イオン交換カラムは、動作範囲が最も広いいため、最初の選択肢として適しています。弱イオン交換カラムは、移動相条件の影響を受けやすいですが、明確な選択性を示すため、分離の微調整に有用です。したがって、このカラムは、強イオン交換カラムを補完するものであり、動作パラメータを慎重に最適化することにより、分離能を調整することが可能です。

ポアサイズ

容量よりもメソッドの分離能が重要になる場合は、非多孔質の Agilent Bio IEX HPLC カラムが推奨されます。分子量の大きい生体分子を分析する場合、または最大限の速度が求められる場合は、Agilent バイオモノリスイオン交換カラムが最適です。Agilent PL-SCX および Agilent PL-SAX カラムの粒子は、1,000 Å または 4,000 Å のポアを持つ全多孔質です。生体分子が、妨げられることなく粒子内に完全に流入するのに十分なポアサイズを選択することが重要です。全多孔質粒子は表面積が大きく、保持容量が高いため、分取分離に適しています。

粒子径

粒子径はカラムを選択するうえで重要な考慮事項です。粒子径が小さいほど効率的に分離できますが、動作圧力が高くなります。生体分子は比較的大きく、拡散速度が遅いため、粒子径が小さいカラムを使用しても、必ずしも低分子と同じように分離能が向上するわけではありません。Agilent Bio MAb および Bio IEX カラムは、粒子径によって圧力定格が異なりますが、最適な結果を得るためには、いずれのカラムも 20 MPa 以下で動作させる必要があります。

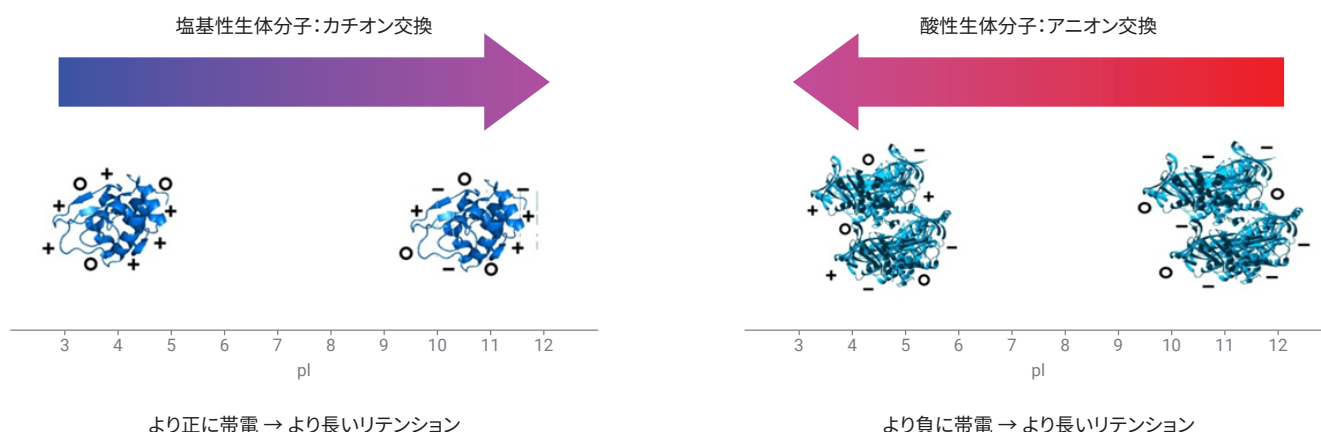


図 2. カチオン交換クロマトグラフィーとアニオン交換クロマトグラフィーの比較

カラムハードウェア

Bio MAb および Bio IEX カラムは、PEEK 製またはステンレス製のハードウェアで提供されています。塩グラジエントがステンレスと長時間接触すると、腐食につながる可能性があります。PEEK 製カラムは、より低い背圧で動作させる必要がありますが、塩による腐食を受けることがなく、金属に反応しやすい分子の分析に適しています。金属を含まないサンプル流路を実現するには、PEEK 製カラムを、Agilent 1260 Infinity III バイオイナート LC や Agilent 1290 Infinity III Bio LC などのバイオイナートまたは生体適合性のある液体クロマトグラフィー システムと組み合わせる必要があります。

カラムの直径と長さ

IEX クロマトグラフィー メソッドでは、内径 (id) 4.6 mm のカラムが一般的に使用されます。限られた量のサンプルしか使用できない場合は、内径 2.1 mm のカラムが適しています。内径の小さいカラムを使用する際に、過度な拡散や分離能の低下を防止するには、カラムと検出器との間のシステムボリュームを最小限に抑えることが重要になります。生体分子のイオン交換分離においては、必ずしも長さ 250 mm のカラムを使用する必要はありません。それにもかかわらず、カラムを長くすると、分離能が向上する場合があります。ただし、カラムが長くなると背圧が高くなるため、より大きな粒子径が必要になる場合があります。速度とスループットを向上させるには、より小さい粒子径で充填された短いカラムを使用します。これにより、分離能が向上し、分離時間を最大 5 倍短縮することができます。表 1 は、一般的なアプリケーションで推奨されるカラムの概要を示しています。

表 1. アプリケーションごとに推奨されるカラム

アプリケーション	アジレントのカラム	注意事項
モノクローナル抗体	Bio MAb	Bio MAb HPLC 弱カチオン交換カラムには、電荷の違いをもとに mAb を高分離能分離するために専用に設計された独自の樹脂が充填されています。
ペプチドおよびタンパク質	Bio IEX	Bio IEX カラムには、高分離能、高回収率で効率的に分離できるように設計された、ポリマー性非多孔質イオン交換粒子が含まれています。
タンパク質、ペプチド、および脱保護合成オリゴヌクレオチド	PL-SAX	PL-SAX 材料は、強力なアニオン交換基を持つ、全多孔質のポリスチレンジビニルベンゼン (PS/DVB) 粒子を提供します。
– 球状タンパク質およびペプチド	ポアサイズ 1000 Å	
– 非常に大きい生体分子/高速分離	ポアサイズ 4000 Å	
小さいペプチドから高分子量のタンパク質	PL-SCX	PL-SCX 材料は、非常に親水性の高いコーティングと強カチオン交換基を持つ、全多孔質の PS/DVB 粒子を提供します。
– 球状タンパク質	ポアサイズ 1000 Å	
– 非常に大きい生体分子/高速分離	ポアサイズ 4000 Å	
抗体 (IgG、IgM)、プラスミド DNA、ウイルス、ファージ、その他のマクロ生体分子	バイオモノリス	バイオモノリス HPLC カラムは、高速分離に最適です。
– ウイルス、DNA、高分子量のタンパク質	バイオモノリス QA	強アニオン交換相
– プラスミド DNA、バクテリオファージ	バイオモノリス DEAE	弱アニオン交換相
– タンパク質、抗体	バイオモノリス S03	強カチオン交換相

メソッド開発のヒント：開始条件と移動相

サンプル調製

理想的には、サンプルを移動相の開始条件で溶解させる必要があります。また、バッファ溶液中では細菌が急速に繁殖する可能性があるため、サンプルは新しく調製したものを可能な限り即座に分析する必要があります。サンプルが濁っている場合は、移動相条件の調整か、サンプルのろ過が必要になる場合があります。粒子径がより小さい (1.7 µm または 3 µm) カラムを使用する場合は、[サンプルをろ過する](#)ことがきわめて重要になります。

流量

内径 2.1 mm および 4.6 mm のカラムにおける代表的な流量範囲は、それぞれ 0.2 ~ 0.4 mL/min と 0.5 ~ 1.0 mL/min です。一部のアプリケーションでは、分析の速度が重要になります。例えば、150 mm や 250 mm ではなく、50 mm の短いカラムを使用することにより、分析時間を短縮することができます。また、流量を増加させることによっても、分析時間を短縮することが可能です。この際にはカラム圧力の制限を超えないように注意します。

移動相の選択とバッファの調製

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、pH や塩グラジエントを高速かつ簡単に作成できるため、移動相の選択で最初に使用すると効果的で効率が良く、クオリティ・バイ・デザインをサポートすることができます。IEX クロマトグラフィーで一般的に使用されるバッファを図 3 に示します。

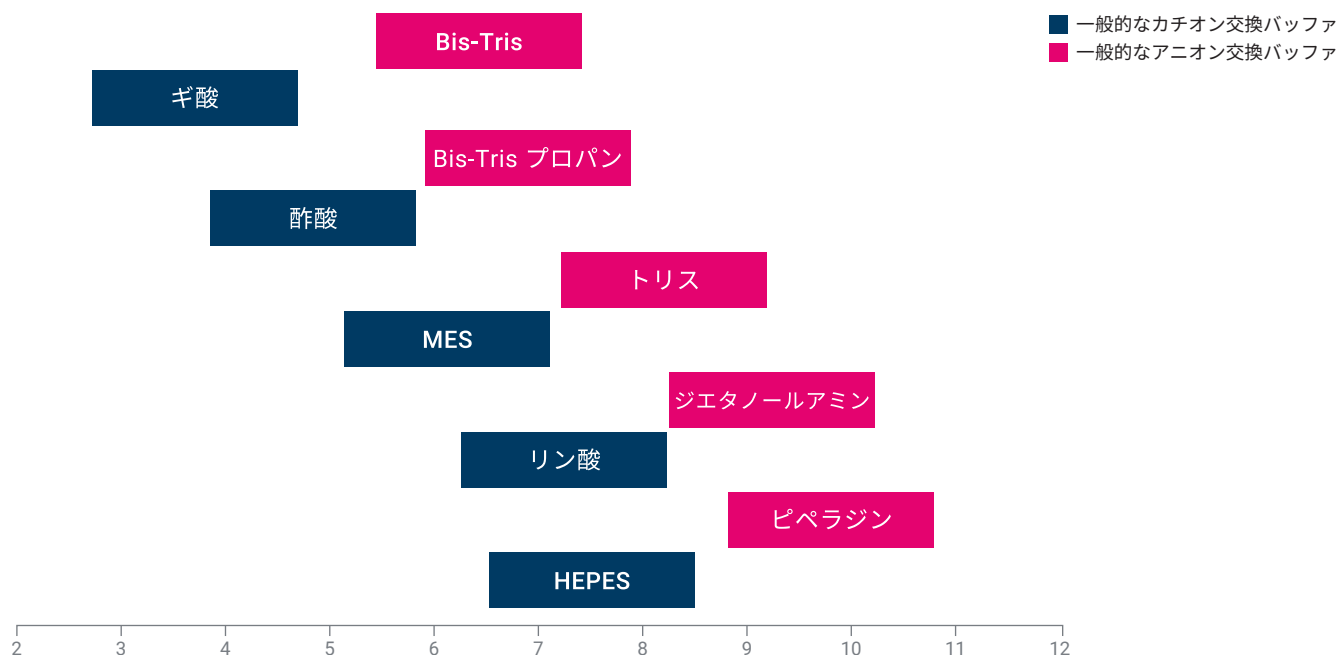


図 3. イオン交換クロマトグラフィーで使用される一般的なバッファ

目的とする動作 pH を保つため、移動相にはバッファを混合する必要があります (通常は 20 mM)。移動相は、使用時に調製して、即座に使用する必要があります。これは、室温で保管すると、希釈したバッファ内で細菌が急速に繁殖するためです。移動相の消費期限は、非冷蔵状態で 7 日未満です。移動相は「補充」せずに、新たに調製した溶液と交換します。特に、バッファ塩には微粒子が存在する可能性があるため、使用前に、**移動相をろ過する必要があります**。新しいカラムを初めて使用する際には、**ユーザーガイドに従って、慎重にコンディショニングを実施します**。

塩グラジエントでは、バッファは、分離が終了するまで pH の変化をコントロールし、分析対象化合物の電荷を一定に維持する役割を担っています。移動相 B には、移動相 A と同じ濃度のバッファが含まれており、塩化ナトリウムなどの塩の濃度が高くなっています。移動相に塩化ナトリウムを添加すると pH が変化するため、必要に応じて pH を調整する必要があります。温度も pH に影響を与えるため、バッファが目的の動作温度に平衡化した後に、pH 値を調整する必要があります。

ヒント： バッファは、一定の手順に従って正確に調製することが重要です。これは、イオン強度や pH のわずかな違いが、分析対象物のリテンションタイムに影響を及ぼし、分離能の低下やクロマトグラフィープロファイルのばらつきをもたらす可能性があるためです。

また、移動相の pH を選択する際には、必ず分析対象物の等電点 (pI) を考慮します。塩基性ペプチドやタンパク質の場合、pH が pI より小さいと、タンパク質は正電荷を持ちます。開始時のバッファの pH は、pI より 0.5 ~ 1 pH 単位低くする必要があります。pI が不明の場合は、pH 6 で開始します。カチオン交換用の代表的なバッファとして、pH 4 ~ 7 の範囲で、ギ酸、酢酸、MES、リン酸、HEPES があります。

注： リン酸バッファを調製する際には、リン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムでは、水和形態が異なることに注意してください。これらの違いは式量に影響を与えるため、それに応じて調製する必要があります。

酸性ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチドについては、移動相の pH を選択する際に、分析対象物の pI も考慮します。pH が pI より大きいと、タンパク質は負電荷を持ちます。開始時のバッファの pH は、pI より 0.5 ~ 1 pH 単位高くする必要があります。pI が不明の場合は、pH 8 で開始します。アニオン交換用の代表的なバッファとして、pH 7 ~ 10 の範囲で、Bis-Tris、トリス、ジエタノールアミン、酢酸トリエチルアンモニウム、ピペラジンがあります。

注： トリスには 2 種類の形態があります。トリス HCl とトリス塩基です。これらは式量が異なるため、それに応じて調製する必要があります。トリス HCl は、NaOH を用いて目的の pH まで滴定する必要があり、トリス塩基は、HCl を用いて目的の pH まで滴定する必要があります。

メソッド開発のヒント - グラジエント

塩グラジエント

塩グラジエントは、通常直線的であり、500 mM ~ 1 M の範囲の塩濃度で終了します。緩やかなグラジエントは、困難な分離の最適化に役に立ちますが、溶媒を正確に混合して、グラジエントを正確かつ精密に指定する必要がありますため、バイナリポンプが適しています。ただし、グラジエントが緩やかすぎると、ピークの広がりが発生します。アプリケーションノート『Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる mAb 電荷変異体分析のグラジエント勾配と分離条件の最適化』では、1 分あたり 0.66 % の移動相 B のグラジエントにより、ピーク形状を損なうことなく分離能が最適化されました (図 4)。

pH グラジエント

pH グラジエントは、一般的に塩グラジエントよりも使用される頻度は低いですが、質量分析 (MS) 検出にはより適しており、カラムや LC システムの腐食を防止することができます。pH グラジエントは、開始バッファと溶出バッファで構成されます。開始バッファでは、分析対象物は、イオン交換樹脂の官能基と効果的に相互作用することが可能な正味の表面電荷を有している必要があります。例えば、カチオン交換の場合、バッファシステム

の開始 pH は低くなっています。その後、pH が直線的に増加することにより、タンパク質のアミノ酸が脱プロトン化され、タンパク質の pI と移動相の pH が一致した後に溶出します。同時に、バッファはカラム全体に pH グラジエントを形成します。一方、アニオン交換クロマトグラフィーでは、開始条件は高 pH であり、クロマトグラフィー分析の間は pH が酸性状態へと低下していきます。pH グラジエントを使用するメソッドの例については、アプリケーションノート 5994-3257EN をご覧ください。

表 2. 塩グラジエントと pH グラジエントの利点と欠点のまとめ

	利点	欠点
塩グラジエント	スカウティングメソッド/ジェネリックグラジエントの実行が容易	LC およびカラム内のステンレス製部品に腐食を引き起こす可能性あり
pH グラジエント	- 揮発性移動相を用いた MS 検出が可能 - メソッドの微調整が可能 - より高い分離能を実現可能	移動相を pH およびイオン強度が一定になるようにバッファ処理することが困難な場合あり

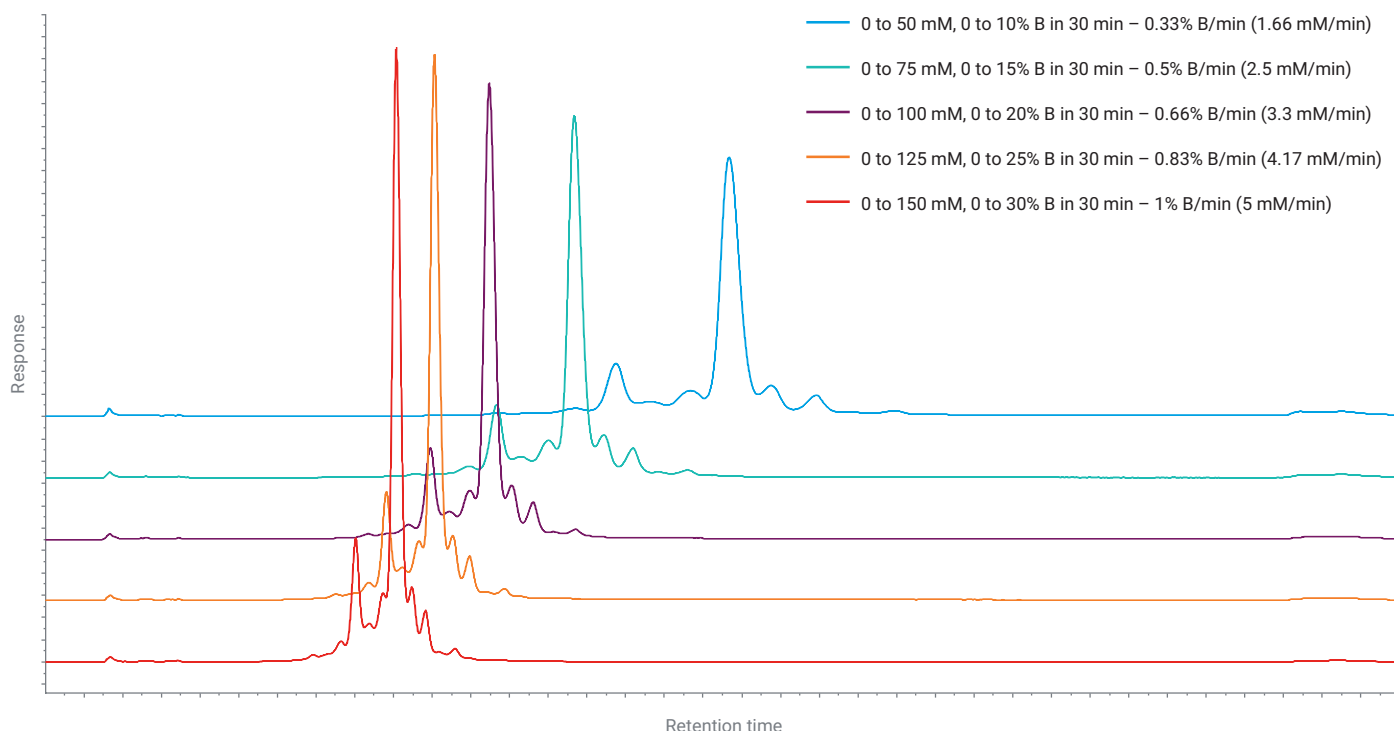


図 4. 1 分あたり 0.66 % 増加する移動相 B のグラジエントにより、シャープなピークを維持しながら、電荷変異体の分離能を最適化しました。

メソッド開発のヒント - カラムのコンディショニングと平衡化

ヒント：イオン交換分離の再現性を確保するためには、グラジエントにカラムの平衡化およびクリーンアップステップを設けることが不可欠です。分析対象物は、イオン強度を高くするか、溶出液の pH を変更するか、またはその両方を実施することにより溶出させます。各分析の終了時には、5 ～ 10 カラム容量の移動相を用いて、イオン強度や pH など、カラムを完全に平衡化させて開始条件まで戻す必要があります。参考のために、表 3 にカラム寸法と対応するカラム容量を示します。平衡化を慎重に実施しないと、次の分析時に分析対象物とカラムの相互作用が変化し、同じプロファイルが得られなくなります。

表 3.カラム寸法と対応するカラム容量のリスト。イオン交換カラムを平衡化する際には、完全に平衡化させるために、表内のすべての容量に 5 ～ 10 を乗じる必要があります。

カラム寸法 (mm)	カラム容量 (mL)
2.1 × 50	0.17
2.1 × 150	0.52
2.1 × 250	0.87
4.0 × 10	0.13
4.95 × 5.2	0.10
4.6 × 50	0.83
4.6 × 150	2.49
4.6 × 250	4.2
7.5 × 50	2.2
7.5 × 150	6.6
10 × 250	19.6
21.2 × 250	88.3
25 × 50	24.5
25 × 150	73.6
50 × 150	294.5
100 × 300	2356.2

オリゴに関する考慮事項

- 移動相 A および B に対して、0.1 % Agilent InfinityLab 不活性化添加剤を添加し、金属製流路の非特異的な結合を除去することにより、アバンドンスが増加し、シャープなピークを得ることができます。
- イオン交換分離は、オリゴの長さ、配列組成（特に GC 含有量）、および二次構造の影響を受けます。
- ヘアピンや二本鎖などの二次構造は、リン酸基を遮蔽したり曝露させたりする場合があります。これによりオリゴの実効電荷密度が変化し、結果としてリテンションや分離能に影響を与える可能性があります。温度を上げるか、有機物の量を減らす（約 10 %）ことにより、二次構造を低減できる場合があります。

検出のオプション

UV 検出：UV 検出は、MS 検出よりも塩に対する耐性が高く、さまざまな分析対象物を検出するために波長を調整することができるため、IEX クロマトグラフィーで特に一般的に用いられています。

注：一部のバッファは低波長の UV を吸収するため、検出に 210 ～ 230 nm の波長を使用できない可能性があります。

分析対象物の種類別に推奨される波長

- ペプチド：214 nm または 280 nm
- タンパク質：220 nm または 280 nm
- オリゴヌクレオチド：260 nm または 270 nm

質量分析検出：MS 検出器は、特異性と感度に優れていますが、塩に対する耐性はそれほど高くありません。MS 検出を選択した場合は、pH グラジエントを使用することができます。塩グラジエントを使用する場合は、不揮発性塩が質量分析計に流入するのを防ぐために、オフラインクリーンアップまたは 2D-LC メソッドを使用する必要があります。

トラブルシューティング

このセクションでは、IEX クロマトグラフィーで一般的に発生する問題点を特定し、実用的な解決策を提示します。

問題点：リテンションタイムのシフトや分離能のばらつきによる再現性の低下

根本原因	- 一貫性のないバッファ調製 - カラム洗浄や平衡化時間が不十分
解決策	塩濃度と pH が一定になるようにバッファを調製し、再現性の高い結 保するためには、グラジエントにおいて、高塩での適切な洗浄を実施し、平衡化時間を長く設定する（少なくとも 5 ～ 10 カラム容量）必要があります。

問題点：高圧

根本原因	- 粒子間の隙間が狭い - 高流量での粘度の高い（メタノール/水または高塩）溶媒 - 充填剤やフリットへの分析対象物の吸着 - 藻類の増殖
解決策	- Bio IEX/Bio MAb 1.7 µm 粒子の間隙径はわずか 0.263 µm であり、詰まりやすいため、移動相およびサンプルを 0.22 µm フィルタでろ過することが重要になります。 - 水溶性バッファは、かなり粘度が高い場合があります。低流量（約 0.1 mL/min）で %A を高くしてから、%B を高くし、圧力が安定するまでカラムをフラッシングします。流量を徐々に増加させ、必要に応じてメソッドの流量を調整します。 - カラムに付着している可能性のあるタンパク質やオリゴヌクレオチドを除去するために、カラムをクリーニングします。手順については、このユーザーマニュアルの 3 ～ 4 ページを参照してください。 - 水系溶媒では、藻類による汚染が容易に発生します。次のテクニカルノートのクリーニングプロトコルを参照してください。『Best Practices for Using an Agilent LC System』。 - カラムおよび LC システムをクリーニングまたはフラッシングしても問題が解決しない場合は、カラムの交換が必要になる場合があります。

問題点：ゴーストピーク

根本原因	バッファの汚染物質
解決策	移動相には高純度のバッファ塩を使用し、ボトルが清潔で洗剤が残っていないことを確認します。

問題点：ピークの広がりやピークの割れ

根本原因	カラムに過度な圧力を印加したことによる、粒子圧縮やカラムボイド。カラムからキャピラリーへの接続が不適切な場合も、カラムボイドが発生する可能性があります。
解決策	- IEX カラムを使用する際には、必ず流量を徐々に増加させます。圧力が安定するまで、流量を増加させないでください。 - Bio IEX および Bio MAb カラムは圧力上限が異なりますが、粒子径に関係なく、すべてのカラムは 20 MPa 未満で動作させる必要があります。 - PL-SCX、PL-SAX、およびバイオモノリスカラムは、圧力上限がそれぞれ 20.7 MPa および 15 MPa と低いため、背圧を慎重にモニタリングします。 - カラムの性能証明書を確認して、流量および背圧の動作範囲を把握します。 - カラムの交換が必要になる場合があります。

問題点：時間の経過に伴う分離能およびピーク効率の低下

根本原因	- LC の問題 - カラムの汚れ - 粒子圧縮またはカラムボイド
解決策	- キャピラリーの交換やリークなど、LC システムに変更箇所がないか確認します。また、LC ポンプが正常に動作しているか確認します。 - カラムが汚れている場合は、イオン交換カラムのユーザーマニュアルの手順に従ってクリーニングします。 - カラムボイドまたは粒子圧縮が発生している場合は、背圧が高くなりすぎていないことを確認するために、メソッドを評価します。 - カラムの交換が必要です。 - その他のトラブルシューティングのヒントについては、トラブルシューティング項目の "Issue: Broad or split peaks" セクションを参照してください。

結論

IEX クロマトグラフィーは、特に密接に関係する生体分子を分離する際に強力な分析ツールとなりますが、pH や塩濃度の違いに影響を受けやすいため、導入するには十分に注意する必要があります。

重要ポイント

- バッファは、pH と塩濃度が一定になるように慎重に調製する必要があります。pH メーターは定期的にキャリブレーションして、電極は毎年交換する必要があります。バッファは、使用しないときは冷蔵保存して、室温で分析を実施する場合は、数日ごとに交換する必要があります。

- 塩や藻類の堆積を防止するために、LC を毎週フラッシングします。有機溶媒は、塩を沈殿させる可能性があるため、最初にシステムに水を通します。
- 移動相 A の開始 pH は、適切な分離を確保するためにきわめて重要であり、分析対象物の pI から 0.5 ～ 1 単位の範囲に設定する必要があります。カチオン交換バッファは、分析対象物よりも低い pH に設定する必要があります。アニオン交換バッファは、分析対象物の pI よりも高い pH に設定する必要があります。
- 再現性の高い分離を確保するためには、グラジエントにおいて、高塩での適切な洗浄を実施し、少なくとも 5 ～ 10 カラム容量の移動相により平衡化時間を長く設定する必要があります。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-009885

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, November 11, 2025

5994-8708JAJP