

高性能 HIC 色谱柱 TSKgel[®] HIC-ADC Phenyl

— 目 录 —

	页码
1. 前言	1
2. TSKgel HIC-ADC Phenyl 的基本特性	1
2 - 1. 填料、色谱柱的规格	1
2 - 2. 色谱柱的分离特性	2
2 - 3. 流速与压降的关系	3
2 - 4. 样品载量的影响	4
2 - 5. 使用短柱进行高速分析	4
2 - 6. 色谱柱的耐用性	5
2 - 7. 填料的批间差异和柱间差异	6
3. 各种测定条件的影响	6
3 - 1. 梯度斜率的影响	6
3 - 2. 梯度起始盐浓度的影响	7
3 - 3. 流动相中的有机溶剂浓度的影响	7
4. 应用示例	8
4 - 1. 单克隆抗体氧化的分析	8
4 - 2. 质粒 DNA 异构体的分析	8
5. 与市售 HIC 色谱柱的分离性能对比	9
6. 总结	10

1. 前言

疏水作用色谱（HIC: Hydrophobic interaction chromatography）是利用蛋白质等样品的疏水性部分与填料中键合的疏水基团之间的疏水性作用进行吸附的一种分离模式。一般来说，由于疏水相互作用在高离子强度下会增强，所以在使用 HIC 时，会让样品在高盐浓度的流动相里吸附到填料的疏水基团上，然后通过降低流动相中的盐浓度来洗脱样品。它与利用同样分离原理的反相色谱相比，可在温和条件下进行测定，所以不会在分离过程中使生物大分子（蛋白质等）发生变性，能在保持活性的状态下完成稳定的分离。

HIC 是利用分析样品的疏水性差异进行分离的，所以也常被用来评估抗体偶联药物（ADC: Antibody-Drug Conjugate）的关键质控属性——药物抗体比（DAR: Drug to Antibody Ratio）。由于 ADC 的疏水性取决于抗体的连接子、药物结构以及药物数量等因素，所以我们开发了适用于分析各种 ADC 的 DAR 的 HIC 色谱柱。

我司此前已经推出了适用于分析蛋白质、ADC

等样品的高性能 HIC 色谱柱 TSKgel HIC-ADC Butyl。继 TSKgel HIC-ADC Butyl 之后，作为 TSKgel HIC-ADC 系列的新成员，此次，我们又推出了 TSKgel HIC-ADC Phenyl。本报告主要介绍 TSKgel HIC-ADC Phenyl 色谱柱的基本特性及其分离示例。

2. TSKgel HIC-ADC Phenyl 的基本特性

2-1. 填料、色谱柱的规格

表 1 的内容是 TSKgel HIC-ADC Phenyl 的填料特性和色谱柱的产品规格。表中还列出了本公司的 HIC 色谱柱产品 TSKgel HIC-ADC Butyl 和 TSKgel Butyl-NPR[®] 用来进行对比。TSKgel HIC-ADC Phenyl 作为一款 HIC 色谱柱产品，填充的是在非多孔的亲水性聚合物基质中键合了 Phenyl 基团的填料。与 TSKgel HIC-ADC Butyl（填充了在相同基质中键合了 Butyl 基团的填料）相比，其特点是填料的疏水性更高。另外，与原有的 TSKgel Butyl-NPR 产品相比，不仅具备较高的分离度，还提高了最大压降，所以即使流动相使用了高粘性溶剂，也可以确保较高的流速。

表 1 填料、色谱柱的规格

产品名称	TSKgel HIC-ADC 系列		原有 HIC 色谱柱
	TSKgel HIC-ADC Phenyl	TSKgel HIC-ADC Butyl	TSKgel Butyl-NPR
色谱柱尺寸	4.6 mm I.D. × 3.5 cm 4.6 mm I.D. × 10 cm		4.6 mm I.D. × 3.5 cm 4.6 mm I.D. × 10 cm
基质	亲水性聚合物		亲水性聚合物
官能团	Phenyl	Butyl	Butyl
粒径	5 μm		2.5 μm
孔径	非多孔性		非多孔性
最大压降	30.0 MPa		20.0 MPa
推荐流速	0.5~1.0 mL/min		0.5~1.0 mL/min
最大流速	2.5 mL/min (4.6 mm I.D. × 3.5 cm) 1.5 mL/min (4.6 mm I.D. × 10 cm)		1.2 mL/min (4.6 mm I.D. × 3.5 cm) 1.0 mL/min (4.6 mm I.D. × 10 cm)

（注）即使在相同的洗脱流速下，柱压也会因流动相的种类（缓冲溶液成分、盐浓度以及有机溶剂浓度）、柱温、梯度条件而有所不同。如果在推荐流速范围内使用时超过了最大压降，请降低流速，不要超过最大压降。

2-2. 色谱柱的分离特性

图1是TSKgel HIC-ADC Phenyl、TSKgel HIC-ADC Butyl以及TSKgel Butyl-NPR测定标准蛋白质的色谱对比图，图2和图3是测定ADC时的对比图。与TSKgel HIC-ADC Butyl相比，所有样品在TSKgel HIC-ADC Phenyl中的洗脱都更慢，由此可知其填料的疏水性更高，样品能更牢固的吸附在填料上。此外，TSKgel HIC-ADC Phenyl与TSKgel HIC-ADC Butyl一样，与原有的TSKgel

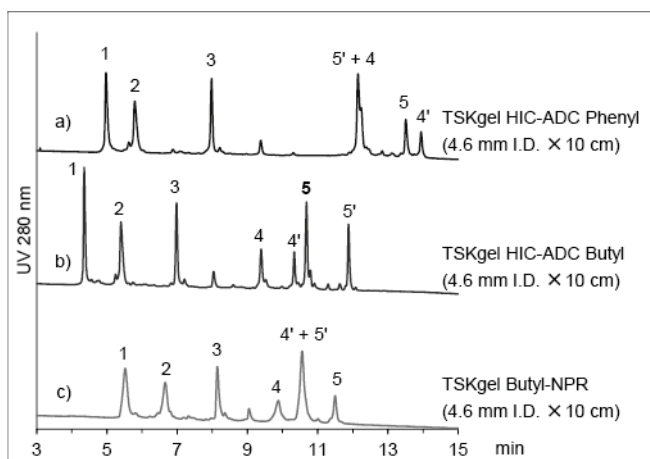


图1 蛋白标准品的分离谱图

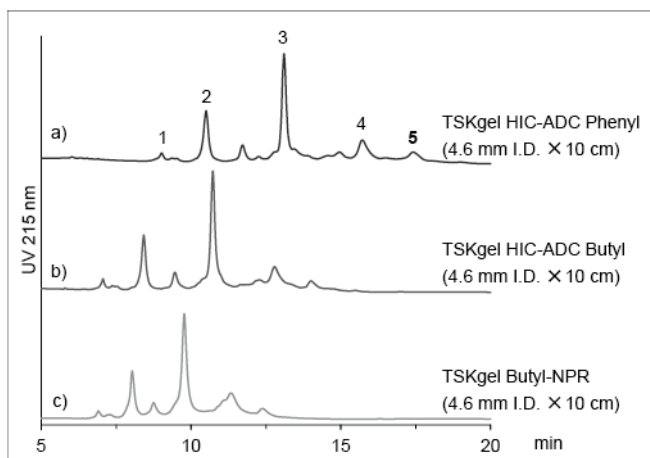


图2 ADC的色谱图1

Butyl-NPR相比，无论是哪一种样品，其峰间距都更宽，表现出更高的分离性能。特别是在使用图3所示的疏水性较低的ADC样品时，即便与TSKgel HIC-ADC Butyl相比，其分离效果也很好。此外，在测定标准蛋白质时，由于TSKgel HIC-ADC Phenyl的样品洗脱顺序与TSKgel HIC-ADC Butyl、TSKgel Butyl-NPR不同，所以可以看出，样品的分离选择性会因疏水基团种类的不同而有所差异。

〈测定条件〉

- 色谱柱：a) TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
b) TSKgel HIC-ADC Butyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
c) TSKgel Butyl-NPR
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
2.3 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

进样量: 13 μL

样品: 1. 肌红蛋白, 2. 核糖核酸酶 A, 3. 溶菌酶
4, 4'. α-糜蛋白酶, 5, 5'. α-胰凝乳蛋白酶 A

〈测定条件〉

- 色谱柱：a) TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
b) TSKgel HIC-ADC Butyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
c) TSKgel Butyl-NPR
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
异丙醇 = 70 / 30

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 0.5 mL/min

检测: UV 215 nm

温度: 25 °C

进样量: 20 μL

样品: SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic
1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,
4. DAR = 6, 5. DAR = 8

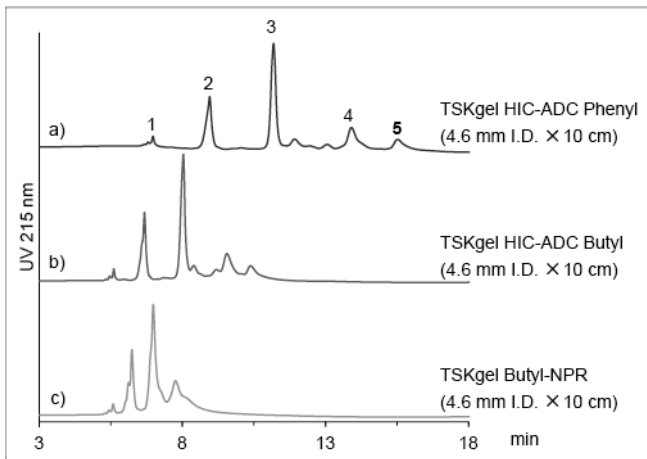


图3 ADC的色谱图(低疏水性)

〈测定条件〉

- 色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 b) TSKgel HIC-ADC Butyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 c) TSKgel Butyl-NPR (4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) / 异丙醇 = 75 / 25

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 0.5 mL/min

检测: UV 215 nm

温度: 25 °C

进样量: 20 μL

样品: Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic (self made)

1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,
 4. DAR = 6, 5. DAR = 8

2-3. 流速与压降的关系

TSKgel HIC-ADC Phenyl 的流动相在使用磷酸钠缓冲溶液、含有 2.0 mol/L 的硫酸铵的洗脱液或含有 30%异丙醇的洗脱液时, 其流速与压降的关系如图 4 所示。从图中可以看出, 即使流速相同, 压降

也会根据所用洗脱液的粘度而出现较大变化。使用粘度较大的洗脱液时, 请设置适当的流速, 确保不超过最大压降 (30.0 MPa)。

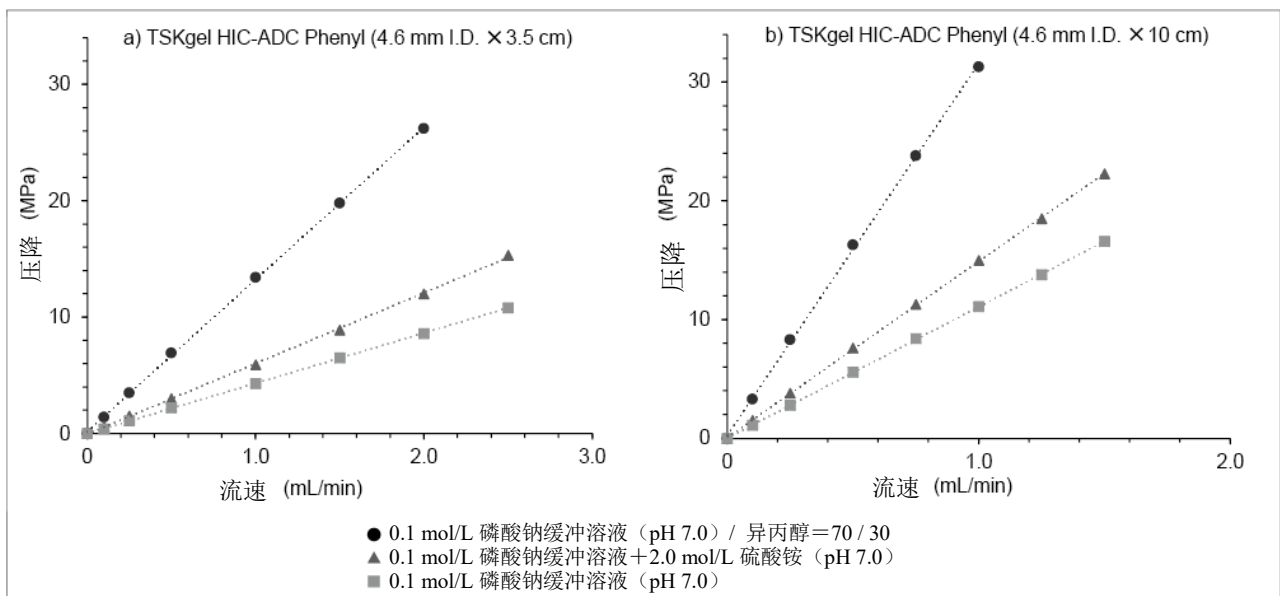


图4 洗脱流速与压降的关系

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 3.5 cm)

b) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相: 1. 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)

2. 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 2.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

3. 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) / 异丙醇 = 70 / 30

流速: a) 0~2.5 mL/min, b) 0~1.5 mL/min

温度: 25 °C

2-4. 样品载量的影响

TSKgel HIC-ADC Phenyl 使用的是非多孔性基质, 所以不会出现样品向填料内部扩散现象, 可抑制样品洗脱峰的扩散。因此, 除了表现出良好的分离性能以外, 与普通填料相比, 最大样品载量受到了一定限制。图 5 是单克隆抗体上样量发生变化时的色谱

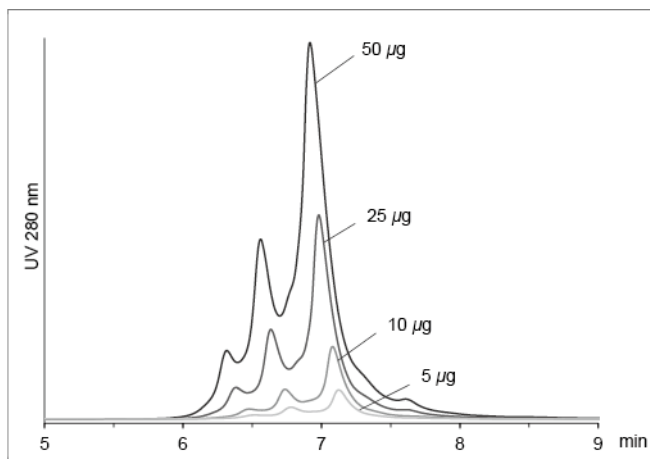


图 5 样品上样量对测定的影响

2-5. 使用短柱进行高速分析

使用不同尺寸的 TSKgel HIC-ADC Phenyl 色谱柱测定 ADC 时的色谱图如图 6 所示。3.5 cm 长的色谱柱由于洗脱压力较低, 所以可用于高流速条件下

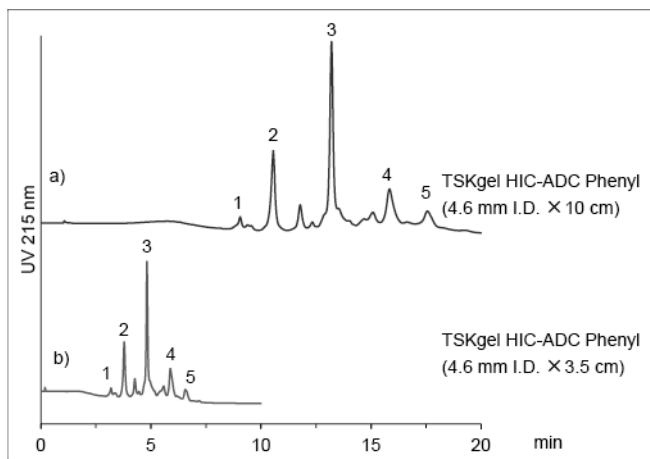


图 5 ADC 的色谱图 (色谱柱尺寸对比)

图。虽然洗脱峰的分度都相同, 但随着样品上样量的增加, 保留能力会稍微下降。虽然可能会受到检测器灵敏度、测定样品的影响, 但在 1.0 mL/min 流速下清洗时, 建议一次测定的样品上样量在 5 µg~50 µg。

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

进样量: 10 µL

样品: 人源化 IgG1 单克隆抗体

的分析。从图中可以看出, 与 10 cm 的色谱柱相比, 在不超过一半的分析时间内, 可有效分离出不同的洗脱峰, 从而实现了高速分析。

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

b) TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 3.5 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
异丙醇 = 70 / 30

梯度: a) B 0~100% (0~15 min, 线性)

b) B 0~100% (0~6 min, 线性)

流速: a) 0.5 mL/min

b) 1.2 mL/min

检测: UV 215 nm

温度: 25 °C

进样量: 10 µL

样品: SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic

1. DAR=0, 2. DAR=2, 3. DAR=4,

4. DAR=6, 5. DAR=8

2-6. 色谱柱的耐用性

使用 4.6 mm I.D.×10 cm 尺寸的色谱柱，在设想测定高疏水性样品的流动相条件下（流动相 A: 含硫酸铵，流动相 B: 含异丙醇）进行了连续梯度洗脱。每进行 100 次梯度洗脱时，甘氨酸和蛋白标准品的

测定结果如图 7 和图 8 所示。从图中可以看出，在 500 次连续梯度洗脱后，色谱柱性能（理论塔板数、样品保留时间）和洗脱峰形状无明显变化，色谱柱具备良好的耐用性。

〈清洗条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) / 异丙醇 = 70 / 30
梯 度: B 0~100 % (0~15 min, 线性)
流 速: 0.5 mL/min

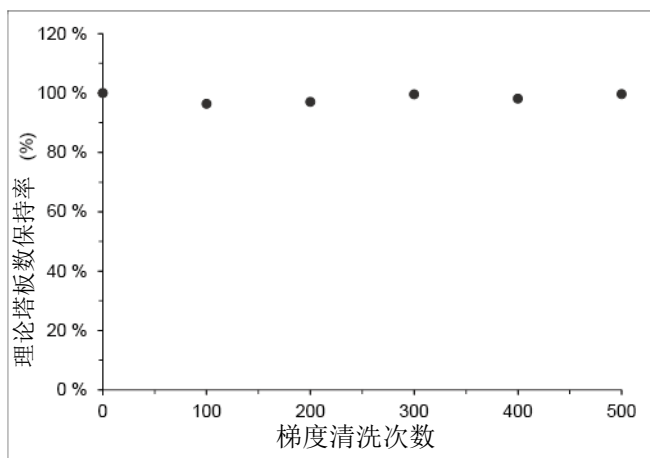


图 7 连续梯度洗脱次数与理论塔板数的关系

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
流动相: 25 mmol/L 硫酸钠
流 速: 0.5 mL/min
检 测: UV 215 nm
温 度: 25 °C
进样量: 5 μL
样 品: 甘氨酸

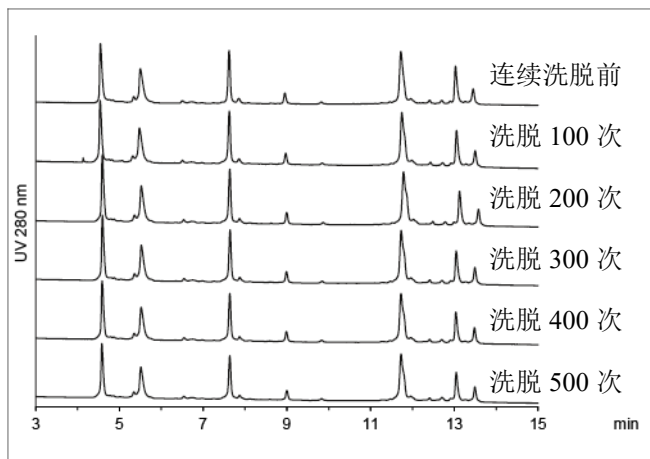


图 8 连续梯度洗脱时的蛋白标准品的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
2.3 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
梯 度: B 0~100 % (0~15 min, 线性)
流 速: 1.0 mL/min
检 测: UV 280 nm
温 度: 25 °C
进样量: 13 μL
样 品: 1. 肌红蛋白, 2. 核糖核酸酶 A, 3. 溶菌酶,
4, 4'. α-糜蛋白酶, 5, 5'. α-胰凝乳蛋白酶 A

2-7. 填料的批间差异和柱间差异

使用填充了不同批次填料的色谱柱，以及填充了同一批次填料的色谱柱，测定蛋白标准品时的色谱对比图如图 9 和图 10 所示。从图中可以看出，各

色谱柱的洗脱峰形状、洗脱位置之间的差异较小，由此可知批间差异和柱间差异都很小，是生产稳定性很高的填料/色谱柱。

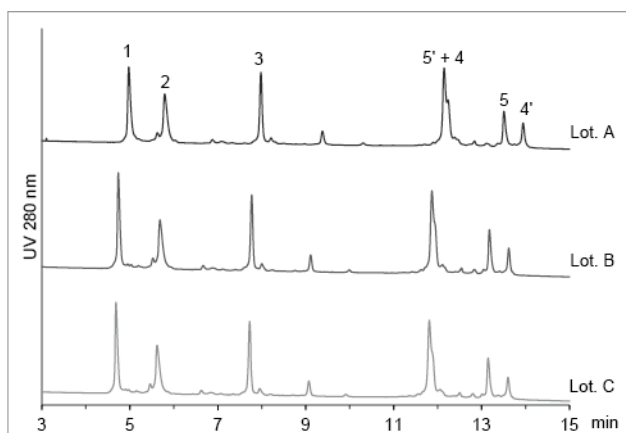


图 9 蛋白标准品的色谱图（填料批间差异）

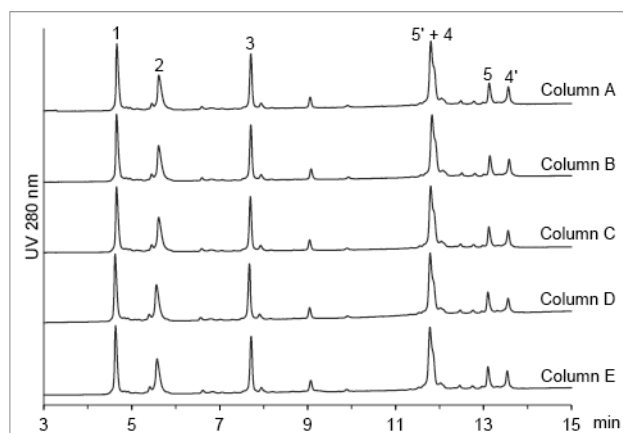


图 10 蛋白标准品的色谱图（柱间差异）

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 2.3 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)

梯度：B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速：1.0 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

进样量：13 μL

样品：1. 肌红蛋白, 2. 核糖核酸酶 A, 3. 溶菌酶, 4, 4'. α-糜蛋白酶, 5, 5'. α-胰凝乳蛋白酶 A

3. 各种测定条件的影响

3-1. 梯度斜率的影响

改变梯度斜率后测定单克隆抗体时的色谱图如图 11 所示。从图中可以看出，增长梯度时间可缓和单位时间内的流动相盐浓度变化，所以虽然样品的

洗脱变慢，各洗脱峰出现扩散，但洗脱峰之间的保留时间差也随之变大。洗脱峰之间的分离不够时，可通过延长梯度时间来改善。

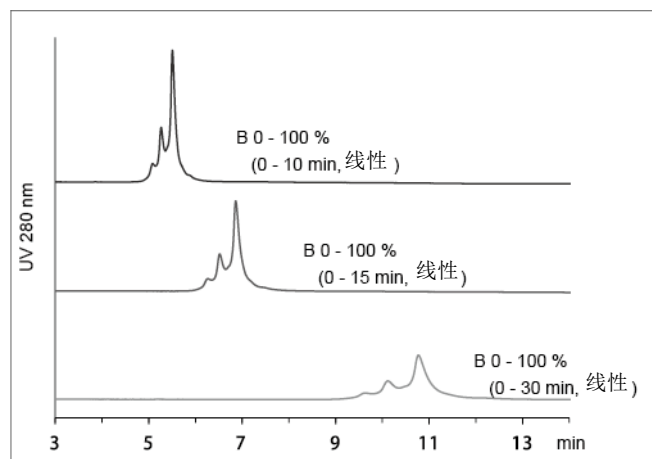


图 11 单克隆抗体的色谱图（梯度斜率的影响）

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)

梯度：B 0~100% (线性)
(梯度时间如图所示)

流速：1.0 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

进样量：10 μL

样品：人源化 IgG1 单克隆抗体

3-2. 梯度起始盐浓度的影响

改变流动相的梯度起始盐浓度后，测定单克隆抗体时的色谱图如图 12 所示。可以看出，梯度起始时的盐浓度越高，保留能力就越强。如果样品的疏水性较低，无法充分吸附至填料时，可通过提高梯度

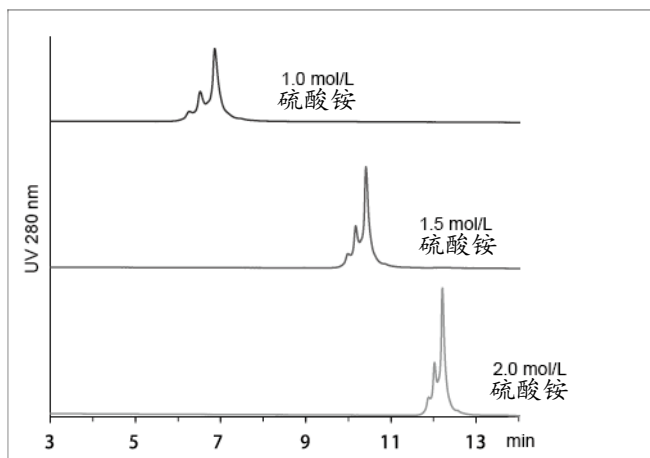


图 12 单克隆抗体的色谱图（梯度起始盐浓度的影响）

3-3. 流动相中的有机溶剂浓度的影响

在分析 ADC 的 DAR 时，由于高 DAR 成分的疏水性非常高，所以一般会在流动相中添加异丙醇等有机溶剂。使用不同有机溶剂浓度的流动相测定 ADC 时的色谱图如图 13 和图 14 所示。可以看出，

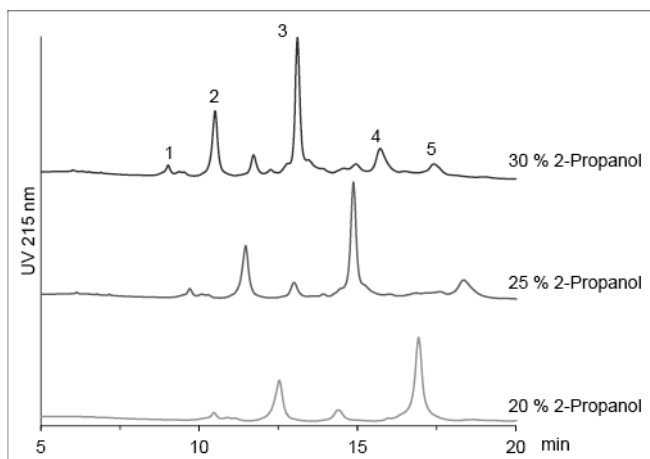


图 13 ADC 的色谱图
（流动相中的有机溶剂浓度对分离的影响）¹

注) 使用添加了盐的有机溶剂作为流动相时，请注意盐析。

起始盐浓度来改善。另一方面，从图中可以看出，梯度起始盐浓度越低，单位时间内的流动相盐浓度变化越平缓，所以可提高分离度。测定时，请根据样品的疏水性和分离度，调整流动相的盐浓度。

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 硫酸铵 (pH 7.0)
(硫酸铵浓度如图所示)
流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)
流速: 1.0 mL/min
检测: UV 280 nm
温度: 25 °C
进样量: 10 μL
样品: 人源化 IgG1 单克隆抗体

有机溶剂浓度低时，高 DAR 成分洗脱不下来。测定时，请根据样品的疏水性和分离度，调整流动相中有机溶剂的含量。另外，在向流动相添加有机溶剂时，请按照 2-3 中的说明，注意压力的上升情况。

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) / 异丙醇 = 2 / 30
(异丙醇的含有比例如图所示)
梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)
流速: 0.5 mL/min
检测: UV 215 nm
温度: 25 °C
进样量: 20 μL
样品: SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic
1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,
4. DAR = 6, 5. DAR = 8

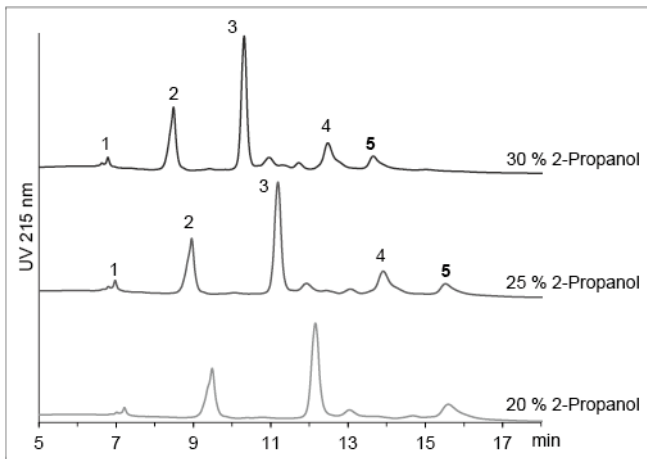


图 14 ADC 的色谱图
(流动相中的有机溶剂浓度对分离的影响) 2

〈测定条件〉

色谱柱: TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
异丙醇 (异丙醇的含有比例如图所示)

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 0.5 mL/min

检测: UV 215 nm

温度: 25 °C

进样量: 10 μL

样品: Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic (self made)

1. DAR=0, 2. DAR=2, 3. DAR=4,

4. DAR=6, 5. DAR=8

4. 应用示例

4-1. 单克隆抗体氧化的分析

生物药物在生产工艺及储存期间可能会发生不均一性现象, 进而影响其作为药物的品质和性能。由于抗体的氨基酸残基发生氧化会导致其活性和稳定性降低, 所以应将其作为质控项目进行分析。TSKgel HIC-ADC Phenyl 和 TSKgel HIC-ADC Butyl 在测定单克隆抗体氧化时的色谱图如图 15 所示。氧化

单克隆抗体是通过 H₂O₂ 处理使单克隆抗体的蛋氨酸残基发生氧化制备而成。与未经处理的单克隆抗体相比, 氧化单克隆抗体的非氧化的洗脱峰面积有所减少, 而在低疏水性一侧的洗脱峰面积和洗脱峰数量则有所增加, 由此可知已经发生了氧化反应。

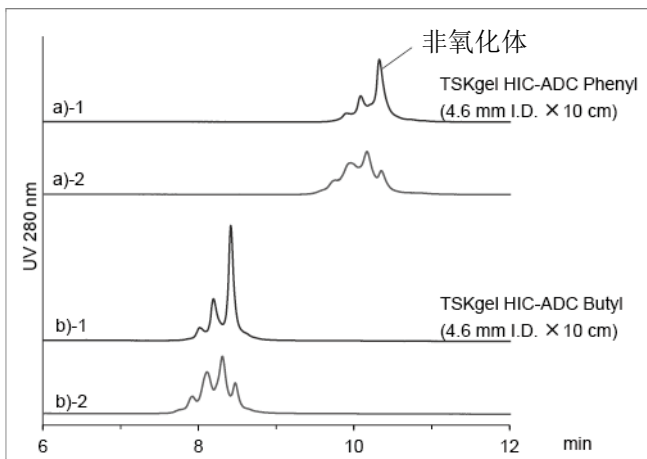


图 14 单克隆抗体的色谱图 (改变流动相的 pH 值)

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

b) TSKgel HIC-ADC Butyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.5 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 1.0 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

进样量: 10 μL

样品: 1. 人源化 IgG1 单克隆抗体

2. 氧化人源化 IgG1 单克隆抗体 (H₂O₂)

4-2. 质粒 DNA 异构体的分析

一般来说, 质粒 DNA 是对大肠杆菌培养液进行纯化而获得的。在培养液中, 除了目标超螺旋 DNA (Supercoiled) 之外, 还存在开环 DNA (Open circular) 和线状 DNA (Linear) 等的异构体。由于这些物质会降低基因的表达效率, 所以需要分析其纯度。使用 TSKgel HIC-ADC Phenyl 和 TSKgel HIC-ADC Butyl,

测定质粒 DNA 异构体时的色谱图如图 16 和图 17 所示。可以看出, 使用 TSKgel HIC-ADC 系列的任意一款色谱柱都能分离质粒的异构体。而对于本次所测定的质粒, 尤其在低疏水性一侧的开环 DNA 和线状 DNA 上, TSKgel HIC-ADC Phenyl 表现出了更高的分离性能。

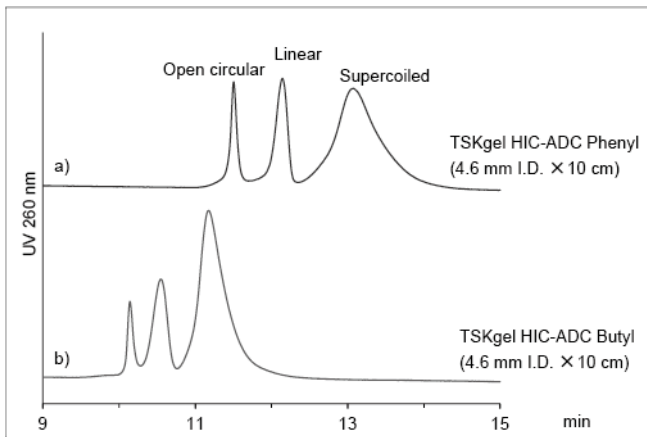


图 16 质粒 DNA 的色谱图 (pBR322)

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 b) TSKgel HIC-ADC Butyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 2.3 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
 流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
 梯度: B 0~100% (0~45 min, 线性)
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV 260 nm
 温度: 25 °C
 进样量: 30 μL
 样品: pBR322 mixture (Supercoiled: pBR322, Linear: pBR322/EcoR I, Open circular: pBR322/Nt.BspQ I)

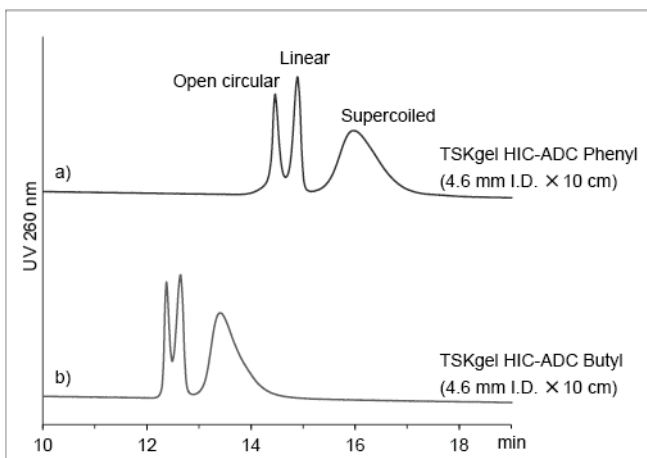


图 17 质粒 DNA 的色谱图 (pUC18)

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 b) TSKgel HIC-ADC Butyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 2.3 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
 流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
 梯度: B 0~100% (0~60 min, 线性)
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV 260 nm
 温度: 25 °C
 进样量: 30 μL
 样品: pUC18 mixture (Supercoiled, Open circular: pUC18, Linear: pUC18/EcoR I)

5. 与市售 HIC 色谱柱的分离性能对比

图 18 是 TSKgel HIC-ADC Phenyl 和市售 HIC 色谱柱测定蛋白标准品的色谱对比图, 图 19 和图 20 是测定 ADC 时的对比图。从图中可以看出,

TSKgel HIC-ADC Phenyl 与市售 HIC 色谱柱相比, 其峰形更尖锐且峰间距更宽, 因此分离性能更优秀。

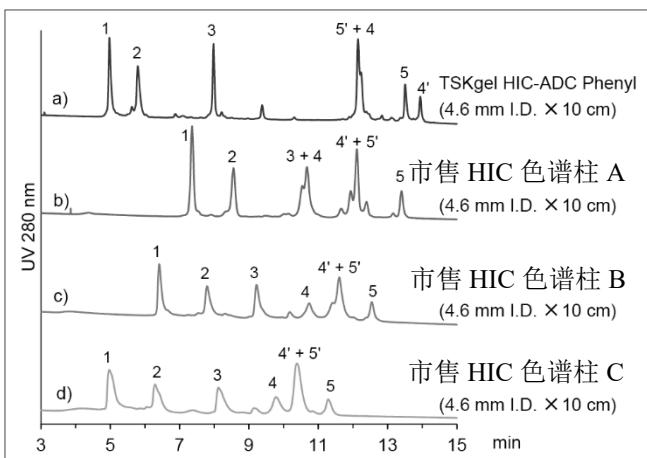


图 18 与市售 HIC 色谱柱的对比 (蛋白标准品)

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 b) 市售 HIC 色谱柱 A (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 c) 市售 HIC 色谱柱 B (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 d) 市售 HIC 色谱柱 C (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 2.3 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
 流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
 梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)
 流速: 1.0 mL/min
 检测: UV 280 nm
 温度: 25 °C
 进样量: 13 μL
 样品: 1. 肌红蛋白, 2. 核糖核酸酶 A, 3. 溶菌酶, 4, 4'. α-糜蛋白酶, 5, 5'. α-胰凝乳蛋白酶 A

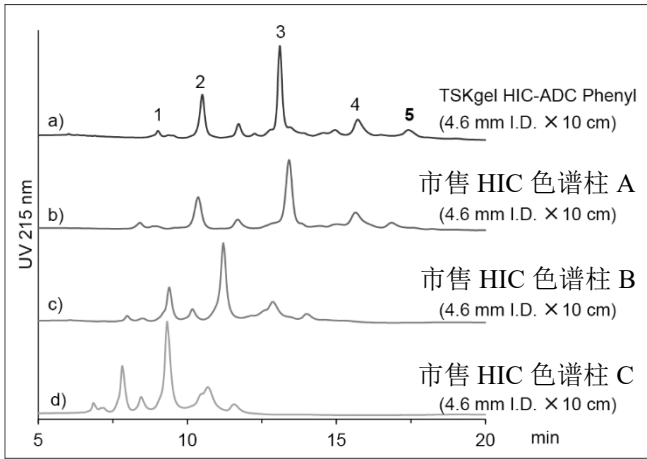


图 19 与市售 HIC 色谱柱的对比 (ADC) 1

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 b) 市售 HIC 色谱柱 A (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 c) 市售 HIC 色谱柱 B (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 d) 市售 HIC 色谱柱 C (4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +

1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
 异丙醇 = 70 / 30

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 0.5 mL/min

检测: UV 215 nm

温度: 25 °C

进样量: 20 μL

样品: SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic

1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,

4. DAR = 6, 5. DAR = 8

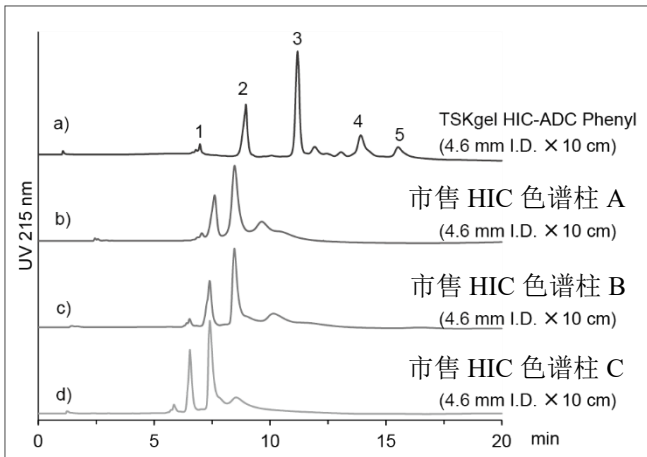


图 20 与市售 HIC 色谱柱的对比 (ADC) 2

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 b) 市售 HIC 色谱柱 A (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 c) 市售 HIC 色谱柱 B (4.6 mm I.D. × 10 cm)
 d) 市售 HIC 色谱柱 C (4.6 mm I.D. × 10 cm)

流动相 A: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +

1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

流动相 B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
 异丙醇 = 75 / 25

梯度: B 0~100% (0~15 min, 线性)

流速: 0.5 mL/min

检测: UV 215 nm

温度: 25 °C

进样量: 20 μL

样品: Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic (self made)

1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,

4. DAR = 6, 5. DAR = 8

6. 总结

以上是新产品 HIC 色谱柱 TSKgel HIC-ADC Phenyl 的说明。包括本款色谱柱在内的 TSKgel HIC-ADC 系列产品与普通 HIC 色谱柱相比, 起分离性能更高。选用短柱, 还可进行高速分析。由于批次间的差异极小, 所以也适用于生物药物的研发和质量控

制。TSKgel HIC-ADC Phenyl 与 TSKgel HIC-ADC Butyl 相比, 其填料的疏水性更高, 所以适用于低疏水性的样品分析。可根据您的使用目的选用合适的色谱柱产品。

* “TSKgel”、“NPR”是东曹株式会社的注册商标。



TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区虹梅路1801号A区凯科国际大厦1001室

电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858

邮箱：info.tbs@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com