

## 高性能 HIC カラム TSKgel<sup>®</sup> HIC-ADC Phenyl について

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. TSKgel HIC-ADC Phenyl の基本特性	1
2 - 1. 充填剤、カラムの仕様	1
2 - 2. カラムの分離特性	2
2 - 3. 流速と圧力損失の関係	3
2 - 4. 試料負荷量の影響	4
2 - 5. 短いカラムによる高速分析	4
2 - 6. カラムの耐久性	5
2 - 7. 充填剤のロット間差、カラム間差	6
3. 各種測定条件の影響	6
3 - 1. グラジエント勾配の影響	6
3 - 2. グラジエント開始塩濃度の影響	7
3 - 3. 溶離液中の有機溶媒濃度の影響	7
4. 応用例	8
4 - 1. モノクローナル抗体の酸化体分析	8
4 - 2. プラスミド DNA のアイソフォーム分析	8
5. 市販 HIC カラムとの分離性能比較	9
6. おわりに	10

## 1. はじめに

疎水性相互作用クロマトグラフィー（Hydrophobic interaction chromatography、HIC）は、たんぱく質などの分析種の疎水性部分と充填剤に導入された疎水基との疎水性相互作用が試料によって異なることを利用して分離します。一般に、疎水性相互作用は高イオン強度下で強くなるため、HICでは、高塩濃度の溶離液中で試料を充填剤の疎水基に吸着させ、移動相中の塩濃度を下げることにより試料を溶出します。同様の分離機序を持つ逆相クロマトグラフィーと比べて温和な条件を用いることができるため、生体高分子（たんぱく質など）を変性させずに分離することができます。

HICは分析種を疎水性の違いで分離できるため、抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate、ADC）の重要な品質管理項目である、薬物抗体比（Drug to Antibody Ratio、DAR）の評価手法としても多用されています。ADCの疎水性は、抗体に結合したリンカーや薬物の構造、薬物の個数などにより異なるため、様々なADCのDAR分析に適用できるHICカラムが求められています。

当社ではこれまでに、たんぱく質やADCなどの分析

に適した高性能HICカラムTSKgel HIC-ADC Butylを商品化しております。今回、TSKgel HIC-ADC Butylに続き、TSKgel HIC-ADCシリーズの新たなラインナップとしてTSKgel HIC-ADC Phenylを商品化いたしました。本稿では、TSKgel HIC-ADC Phenylの基本特性と分離例を紹介いたします。

## 2. TSKgel HIC-ADC Phenylの基本特性

### 2-1. 充填剤、カラムの仕様

表1にTSKgel HIC-ADC Phenylの充填剤の特性およびカラム仕様を示します。比較として当社のHICカラムであるTSKgel HIC-ADC ButylおよびTSKgel Butyl-NPR<sup>®</sup>を示します。TSKgel HIC-ADC Phenylは、非多孔性の親水性ポリマー基材にPhenyl基を導入した充填剤を充填したHICカラムです。同一の基材にButyl基を導入した充填剤を用いたTSKgel HIC-ADC Butylと比較して、充填剤の疎水性が高いことが特徴です。また、既存のTSKgel Butyl-NPRと比較して高い分離能を有していることに加えて、最大圧力損失が向上しているため、高粘性溶媒を溶離液に用いた場合においてもより高流速で使用することが可能です。

表1 充填剤、カラムの仕様

品名	TSKgel HIC-ADC シリーズ		既存 HIC カラム
	TSKgel HIC-ADC Phenyl	TSKgel HIC-ADC Butyl	TSKgel Butyl-NPR
カラムサイズ	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
基材	親水性ポリマー		親水性ポリマー
官能基	Phenyl	Butyl	Butyl
粒子径	5 μm		2.5 μm
細孔径	非多孔性		非多孔性
最大圧力損失	30.0 MPa		20.0 MPa
適正流速	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) カラム圧力は、同一の通液流速においても、溶離液の種類（緩衝液組成、塩濃度、有機溶媒濃度）やカラム温度、グラジエント条件によって異なります。適正流速の範囲内で使用しても最大圧力損失を超える場合には、最大圧力損失以下となるように流速を下げてください。

## 2-2. カラムの分離特性

TSKgel HIC-ADC Phenyl、TSKgel HIC-ADC Butyl および TSKgel Butyl-NPR について、標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図 1 に、ADC を測定した比較を図 2、3 に示します。TSKgel HIC-ADC Phenyl は TSKgel HIC-ADC Butyl と比較していずれの試料においても溶出が遅いことから、充填剤の疎水性が高く、試料がより強く充填剤に吸着することがわかります。また、TSKgel HIC-ADC Phenyl は TSKgel HIC-ADC

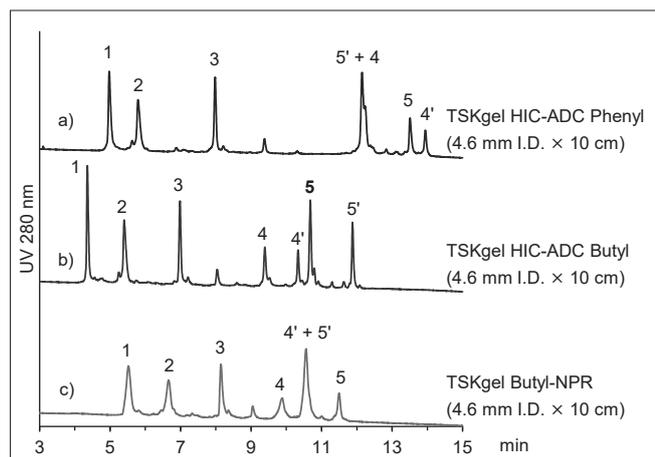


図 1 標準たんぱく質のクロマトグラム

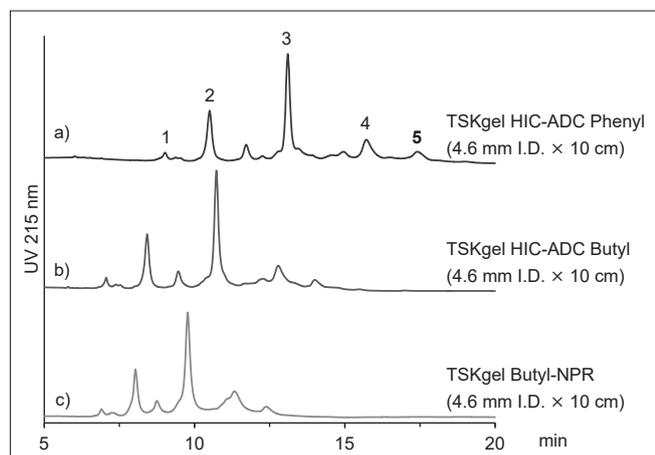


図 2 ADC のクロマトグラム 1

Butyl と同様に、既存の TSKgel Butyl-NPR と比較して、いずれの試料においても分離帯が広く、より高い分離能を持つことがわかります。特に、図 3 の比較的疎水性の低い ADC 試料においては、TSKgel HIC-ADC Butyl と比較しても分離が良好です。さらに、標準たんぱく質の測定において、TSKgel HIC-ADC Phenyl は試料の溶出順が TSKgel HIC-ADC Butyl、TSKgel Butyl-NPR と異なることから、疎水基の種類の違いにより試料の分離選択性が異なることがわかります。

### 〈測定条件〉

カラム：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)

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 2.3 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：13 μL

試料：1. ミオグロビン、2. リボスクレアーゼ A、  
 3. リゾチーム、4, 4'.  $\alpha$ -キモトリプシン、  
 5, 5'.  $\alpha$ -キモトリプシノーゲン A

### 〈測定条件〉

カラム：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)

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
 2-プロパノール = 70 / 30

グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：0.5 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：25 °C

注入量：20 μL

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

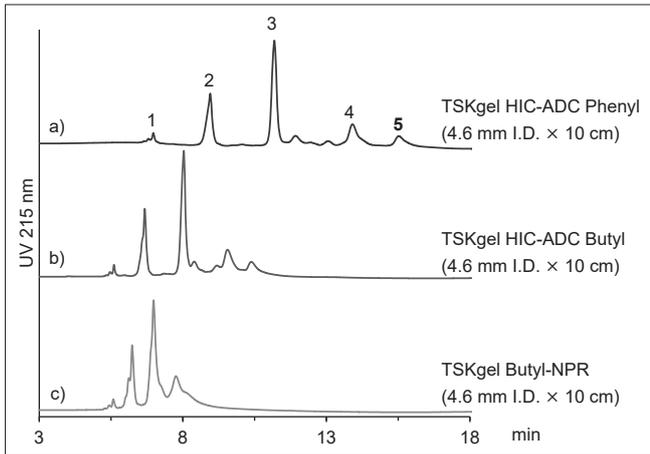


図3 ADCのクロマトグラム2 (低疎水性)

〈測定条件〉

カラム : 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)

溶離液 A : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
 2-プロパノール = 75 / 25

グラジエント : B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速 : 0.5 mL/min

検出 : UV 215 nm

温度 : 25 °C

注入量 : 20 μL

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

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

4. DAR = 6, 5. DAR = 8

### 2-3. 流速と圧力損失の関係

TSKgel HIC-ADC Phenylについて、溶離液をリン酸ナトリウム緩衝液、およびこれに2.0 mol/Lの硫酸アンモニウム、または30%の2-プロパノールを加えた溶液を通液した際の流速と圧力損失の関係を図4に示しま

す。流速が同一でも、溶離液の粘性によってカラムの圧力損失が大きく変化することがわかります。粘性が高い溶離液を使用する際は、最大圧力損失(30.0 MPa)以下となるように流速を設定してください。

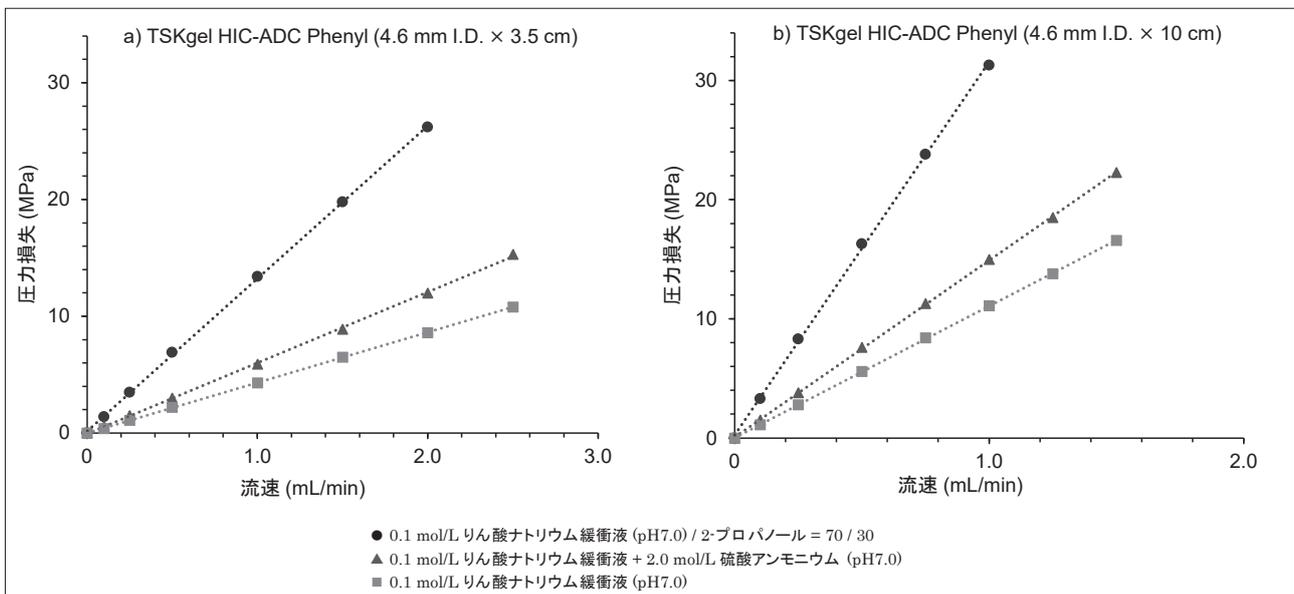


図4 通液流速と圧力損失の関係

〈測定条件〉

カラム : 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)

溶離液 : 1. 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

2. 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 2.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH7.0)

3. 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) / 2-プロパノール = 70 / 30

流速 : a) 0 ~ 2.5 mL/min, b) 0 ~ 1.5 mL/min

温度 : 25 °C

## 2-4. 試料負荷量の影響

TSKgel HIC-ADC Phenylは非多孔性の基材を使用しているため、充填剤内部への試料の拡散が起こらず、試料の拡散によるピーク幅の広がりを抑えることができます。したがって、良好な分離性能を示す一方で、多孔性の充填剤と比較して最大試料負荷量が制限されます。図

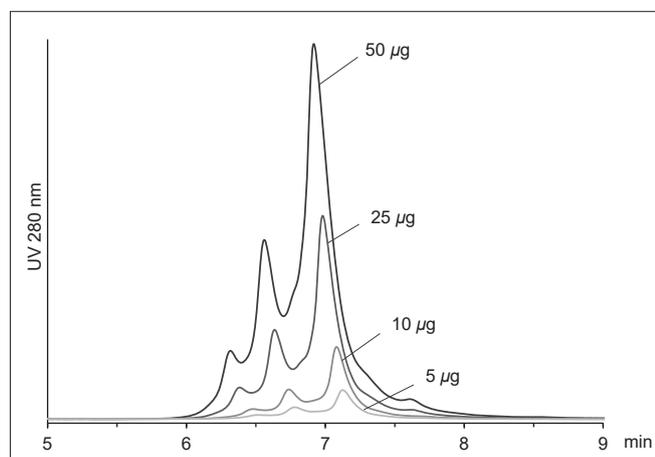


図5 試料負荷量が測定に与える影響

## 2-5. 短いカラムによる高速分析

異なるカラムサイズの TSKgel HIC-ADC Phenyl を用いて、ADC を測定したクロマトグラムを図6に示します。長さ3.5 cmのカラムは通液圧力が低いため、高流

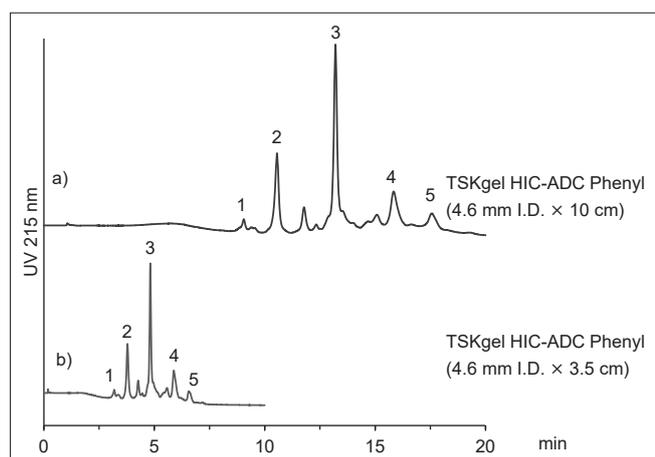


図6 ADCのクロマトグラム(カラムサイズの比較)

5にモノクローナル抗体の負荷量を変化させた際のクロマトグラムを示します。ピークの分離はいずれも同等ですが、試料負荷量の増加とともに保持力がわずかに低下しています。検出器の感度、測定する試料にもよりますが、1.0 mL/minで通液する場合は、試料負荷量は5 µgから50 µgが適します。

### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
流速：1.0 mL/min  
検出：UV 280 nm  
温度：25 °C  
注入量：10 µL  
試料：ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体

速条件下での分析が可能です。10 cmのカラムと比較して、半分以下の分析時間でDARの異なるピークを良好に分離することができ、高速分析が可能であることがわかります。

### 〈測定条件〉

カラム：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)  
溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
2-プロパノール = 70 / 30  
グラジエント：a) B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
：b) B 0 - 100 % (0 - 6 min、リニア)  
流速：a) 0.5 mL/min  
：b) 1.2 mL/min  
検出：UV 215 nm  
温度：25 °C  
注入量：10 µL  
試料：SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic  
1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,  
4. DAR = 6, 5. DAR = 8

## 2-6. カラムの耐久性

カラムサイズ 4.6 mm I.D. × 10 cm について、高疎水性試料の測定を想定した溶離液条件（溶離液 A: 硫酸アンモニウム含有、溶離液 B: 2-プロパノール含有）にて連続グラジエント通液を行いました。グラジエント通液

### 〈通液条件〉

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

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) / 2-プロパノール = 70 / 30

グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：0.5 mL/min

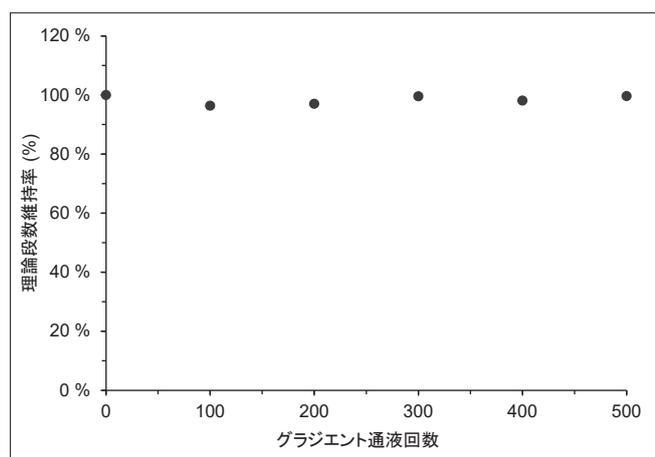


図7 連続グラジエント通液回数と理論段数の関係

100 回ごとにグリシンと標準たんぱく質を測定した結果を図7、8に示します。500回の連続グラジエント通液後もカラム性能（理論段数、試料保持時間）やピーク形状に顕著な変化は認められず、良好な耐久性を有することがわかります。

### 〈測定条件〉

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

溶離液：25 mmol/L 硫酸ナトリウム

流速：0.5 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：25 °C

注入量：5 μL

試料：グリシン

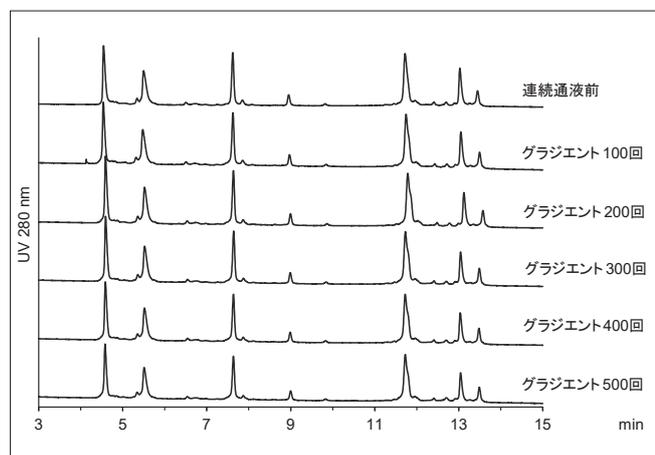


図8 連続グラジエント通液時の標準たんぱく質のクロマトグラム

### 〈測定条件〉

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

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 2.3 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：13 μL

試料：1. ミオグロビン, 2. リボヌクレアーゼ A,  
3. リゾチーム, 4, 4'. α-キモトリプシン,  
5, 5'. α-キモトリプシノーゲン A

## 2-7. 充填剤のロット間差、カラム間差

異なるロットの充填剤を充填したカラム、同一ロットの充填剤を充填したカラムについて、標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図9、10に示します。

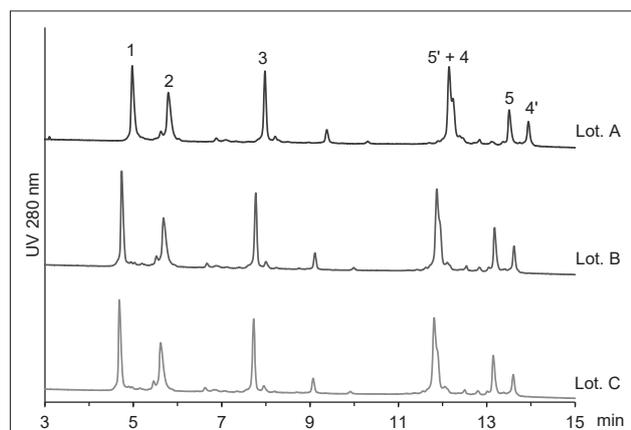


図9 標準たんぱく質のクロマトグラム (充填剤ロット間差)

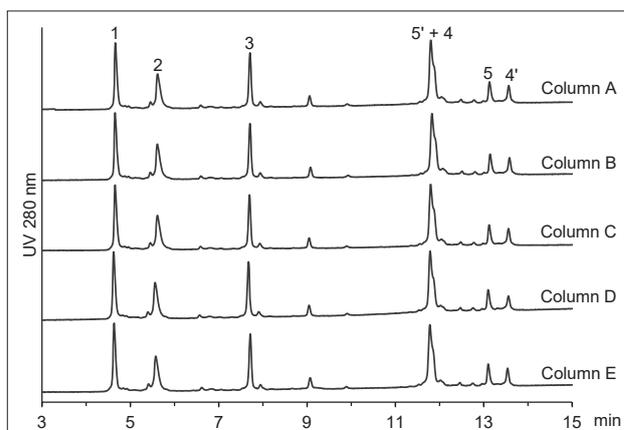


図10 標準たんぱく質のクロマトグラム (カラム間差)

### 〈測定条件〉

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

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 2.3 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：13 μL

試料：1. ミオグロビン，2. リボヌクレアーゼ A，3. リゾチーム，  
4, 4'. α-キモトリプシン，5, 5'. α-キモトリプシノーゲン A

## 3. 各種測定条件の影響

### 3-1. グラジエント勾配の影響

グラジエント勾配を変更してモノクローナル抗体を測定したクロマトグラムを図11に示します。グラジエント時間を長くすることで単位時間当たりの溶離液塩濃度

の変化が緩やかになるため、試料の溶出が遅くなり各ピーク幅は広まりますが、ピーク間の保持時間差も広がることからわかります。ピーク間の分離が十分ではない場合は、グラジエント時間を長くすることも有効です。

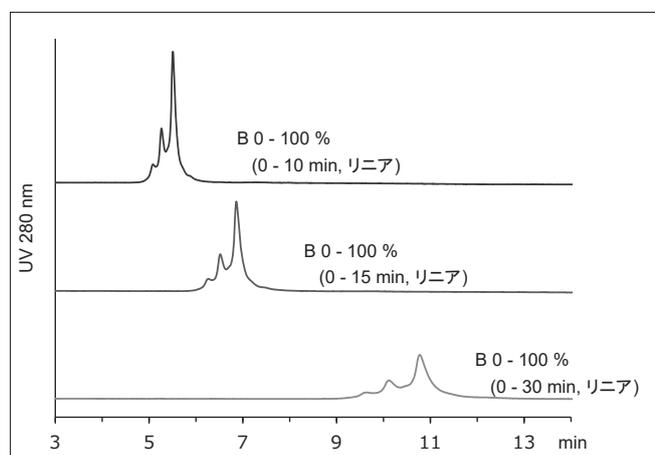


図11 モノクローナル抗体のクロマトグラム (グラジエント勾配の影響)

### 〈測定条件〉

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

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

グラジエント：B 0 - 100 % (リニア)

(グラジエント時間は図中に記載)

流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 °C

注入量：10 μL

試料：ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体

### 3-2. グラジエント開始塩濃度の影響

溶離液のグラジエント開始塩濃度を変更してモノクローナル抗体を測定したクロマトグラムを図 12 に示します。グラジエント開始時の塩濃度が高いほど、強く保持されていることがわかります。試料の疎水性が低く、充填剤への保持が十分でない場合は、グラジエント開始

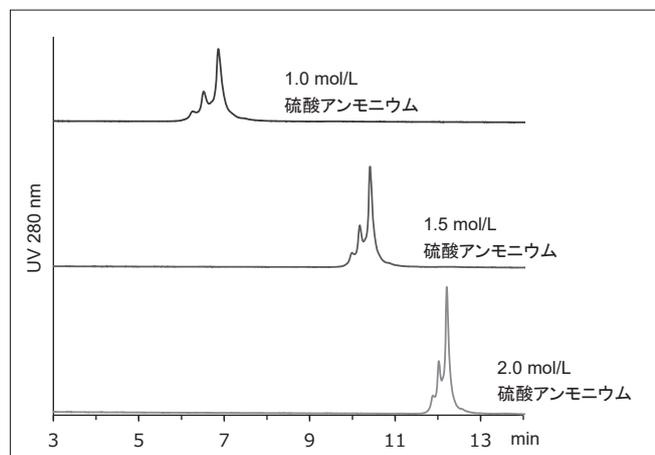


図 12 モノクローナル抗体のクロマトグラム  
(グラジエント開始塩濃度の影響)

### 3-3. 溶離液中の有機溶媒濃度の影響

ADC の DAR 分析において、高 DAR 成分の疎水性が非常に高いことから、溶離液に 2-プロパノールなどの有機溶媒を添加することが一般的です。有機溶媒濃度が異なる溶離液を用いて ADC を測定したクロマトグラムを図 13、14 に示します。有機溶媒濃度が低い場合、高

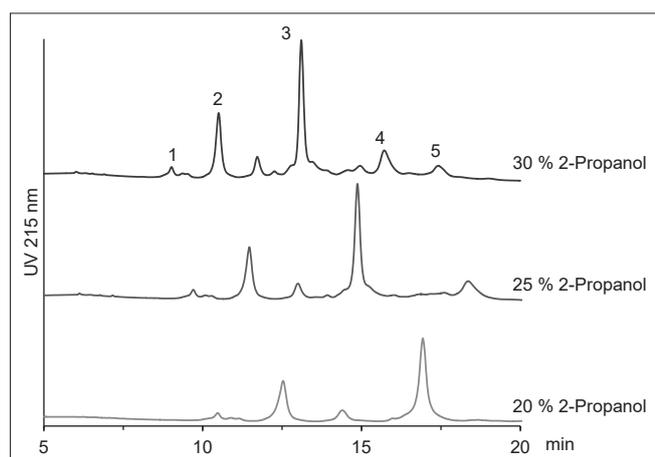


図 13 ADC のクロマトグラム  
(溶離液中の有機溶媒濃度が分離に与える影響) 1

注) 溶離液に塩を添加した有機溶媒を使用する場合は塩が析出しないことを十分確認してからご使用ください。

塩濃度を高くすることが有効です。一方で、グラジエント開始塩濃度が低いほど単位時間当たりの溶離液塩濃度の変化が緩やかになるため、分離が向上することがわかります。測定の際は、試料の疎水性や分離能に応じて、溶離液の塩濃度を調整してください。

#### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
(硫酸アンモニウム濃度は図中に記載)  
溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
流速：1.0 mL/min  
検出：UV 280 nm  
温度：25 °C  
注入量：10 μL  
試料：ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体

DAR 成分が溶出しないことがわかります。測定の際は、試料の疎水性や分離に応じて、溶離液中の有機溶媒の含有量を調整してください。また、有機溶媒を溶離液に添加する際は、2-3 項に記載の通り通液圧力の上昇にもご注意ください。

#### 〈測定条件〉

カラム：TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
2-プロパノール  
(2-プロパノールの含有割合は図中に記載)  
グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
流速：0.5 mL/min  
検出：UV 215 nm  
温度：25 °C  
注入量：20 μL  
試料：SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic  
1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,  
4. DAR = 6, 5. DAR = 8

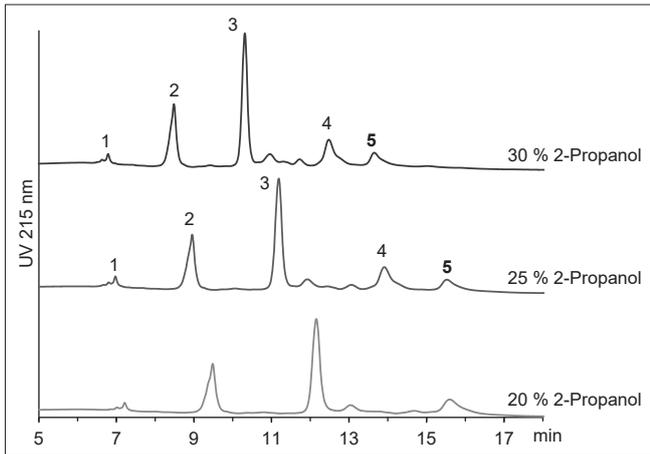


図 14 ADC のクロマトグラム  
(溶離液中の有機溶媒濃度が分離に与える影響) 2

〈測定条件〉

カラム：TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
 溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
 2-プロパノール  
 (2-プロパノールの含有割合は図中に記載)  
 グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
 流速：0.5 mL/min  
 検出：UV 215 nm  
 温度：25 °C  
 注入量：20 μL  
 試料：Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic (self made)  
 1. DAR = 0, 2. DAR = 2, 3. DAR = 4,  
 4. DAR = 6, 5. DAR = 8

4. 応用例

4-1. モノクローナル抗体の酸化体分析

バイオ医薬品は製造工程や保存中に不均一性が生じ、医薬品としての品質や機能に影響を与える可能性があります。抗体のアミノ酸残基の酸化は活性や安定性の低下につながるため、品質管理項目として分析することが重要です。TSKgel HIC-ADC Phenyl と TSKgel HIC-ADC Butyl について、モノクローナル抗体の酸化体を測定し

たクロマトグラムを図 15 に示します。酸化モノクローナル抗体は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理によりモノクローナル抗体のメチオニン残基を酸化することにより調製しました。未処理のモノクローナル抗体と比較して、酸化モノクローナル抗体では、非酸化体のピーク面積が減少し、より低疎水性側のピーク面積およびピーク数が増加したことから酸化が進行したことがわかります。

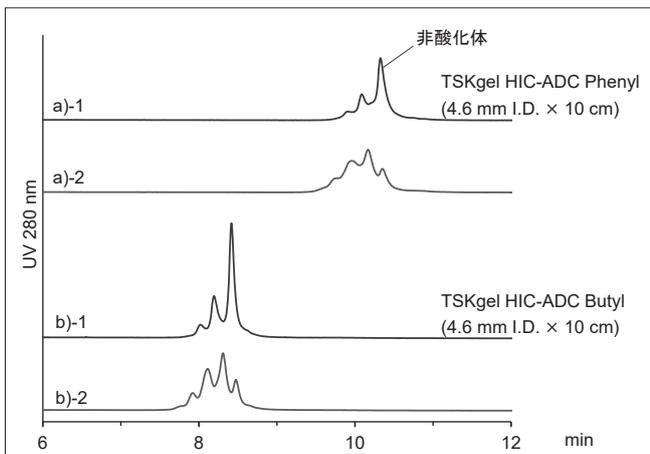


図 15 モノクローナル抗体のクロマトグラム (酸化体)

〈測定条件〉

カラム：a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : b) TSKgel HIC-ADC Butyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 1.5 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
 溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
 流速：1.0 mL/min  
 検出：UV 280 nm  
 温度：25 °C  
 注入量：10 μL  
 試料：1. ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体  
 2. 酸化ヒト化 IgG1 モノクローナル抗体 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

4-2. プラスミド DNA のアイソフォーム分析

一般に、プラスミド DNA は大腸菌培養液からの精製により得られます。培養液中には、目的とするスーパーコイル DNA (Supercoiled) の他、アイソフォームとして開環 DNA (Open circular)、直鎖 DNA (Linear) が存在します。これらは遺伝子の発現効率を低下させるため、その純度を分析することが必要です。TSKgel HIC-ADC Phenyl と TSKgel HIC-ADC Butyl を用いて、プ

ラスミド DNA のアイソフォームを測定したクロマトグラムを図 16、17 に示します。TSKgel HIC-ADC シリーズのいずれのカラムにおいてもプラスミドのアイソフォームが分離できることがわかります。今回測定したプラスミドでは、特に低疎水性側の開環 DNA と直鎖 DNA において、TSKgel HIC-ADC Phenyl の方がより高い分離能を示しました。

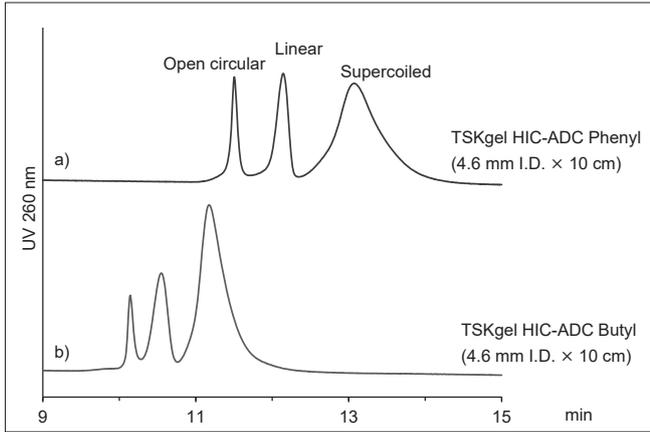


図 16 プラスミド DNA のクロマトグラム (pBR322)

〈測定条件〉

カラム : a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 : b) TSKgel HIC-ADC Butyl (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 溶離液 A : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 2.3 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
 溶離液 B : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント : B 0 - 100 % (0 - 45 min、リニア)  
 流速 : 1.0 mL/min  
 検出 : UV 260 nm  
 温度 : 25 °C  
 注入量 : 30 μL  
 試料 : pBR322 mixture  
 (Supercoiled: pBR322, Linear: pBR322/EcoR I,  
 Open circular: pBR322/Nt.BspQ I)

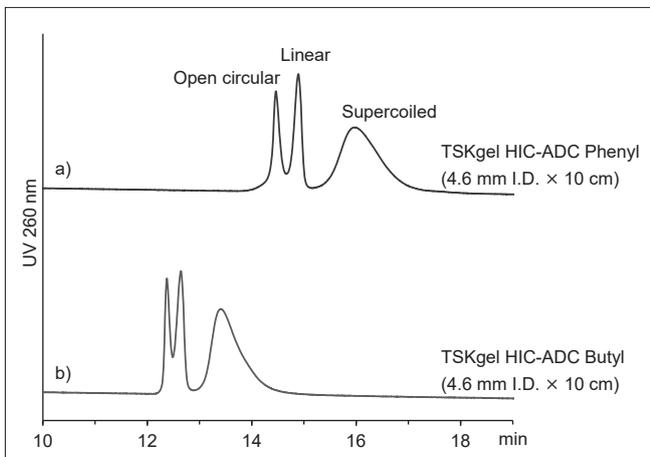


図 17 プラスミド DNA のクロマトグラム (pUC18)

〈測定条件〉

カラム : a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 : b) TSKgel HIC-ADC Butyl (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 溶離液 A : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 2.3 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
 溶離液 B : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント : B 0 - 100 % (0 - 60 min、リニア)  
 流速 : 1.0 mL/min  
 検出 : UV 260 nm  
 温度 : 25 °C  
 注入量 : 30 μL  
 試料 : pUC18 mixture  
 (Supercoiled, Open circular: pUC18,  
 Linear: pUC18/EcoR I)

5. 市販 HIC カラムとの分離性能比較

TSKgel HIC-ADC Phenyl と市販 HIC カラムについて、標準たんぱく質を測定したクロマトグラムの比較を図 18 に、ADC を測定した比較を図 19、20 に示します。

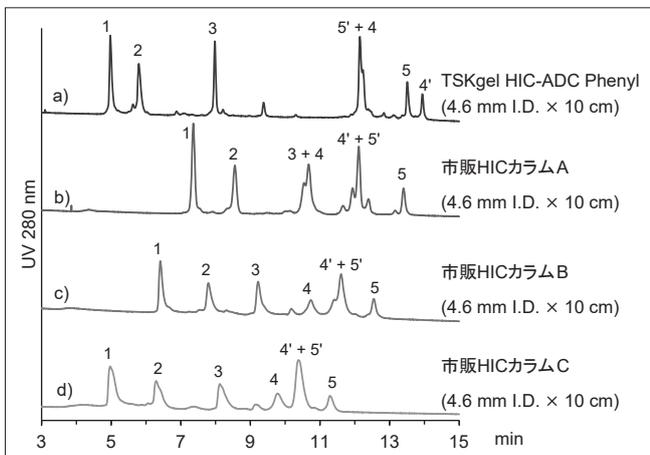


図 18 市販 HIC カラムとの比較 (標準たんぱく質)

TSKgel HIC-ADC Phenyl は、市販 HIC カラムと比較して最もピークがシャープで間隔が広いことから、高い分離能を有していることがわかります。

〈測定条件〉

カラム : a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 : b) 市販 HIC カラム A (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 : c) 市販 HIC カラム B (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 : d) 市販 HIC カラム C (4.6 mm ID. × 10 cm)  
 溶離液 A : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 2.3 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)  
 溶離液 B : 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)  
 グラジエント : B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)  
 流速 : 1.0 mL/min  
 検出 : UV 280 nm  
 温度 : 25 °C  
 注入量 : 13 μL  
 試料 : 1. ミオグロビン, 2. リボスクレアーゼ A,  
 3. リゾチーム, 4, 4'. α - キモトリプシン,  
 5, 5'. α - キモトリプシノーゲン A

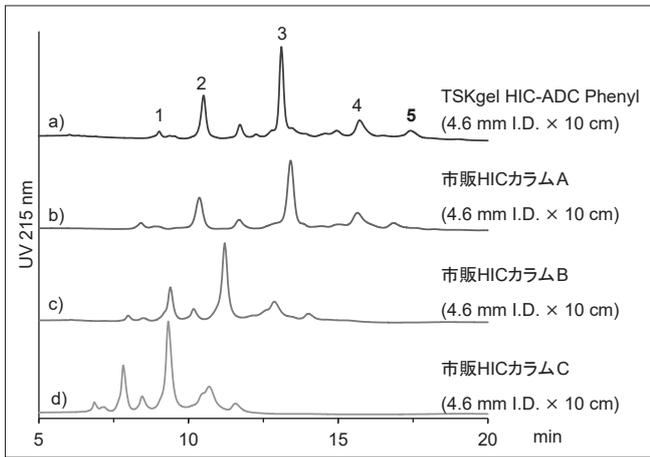


図 19 市販 HIC カラムとの比較 (ADC) 1

〈測定条件〉

カラム：a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : b) 市販 HIC カラム A (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : c) 市販 HIC カラム B (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : d) 市販 HIC カラム C (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
 2-プロパノール = 70 / 30

グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：0.5 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：25 °C

注入量：20 μL

試料：SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic

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

4. DAR = 6, 5. DAR = 8

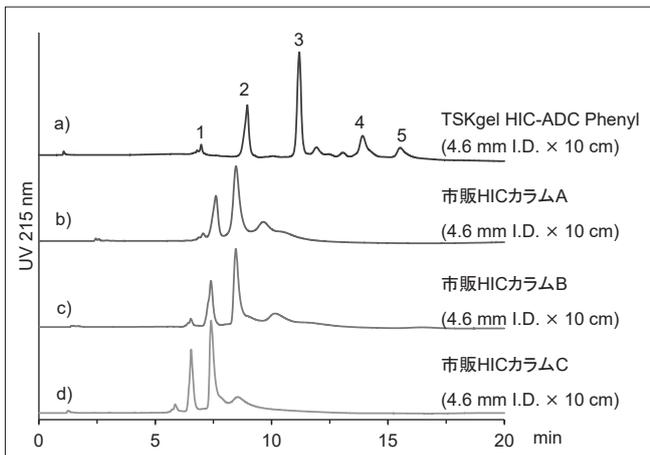


図 20 市販 HIC カラムとの比較 (ADC) 2

〈測定条件〉

カラム：a) TSKgel HIC-ADC Phenyl (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : b) 市販 HIC カラム A (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : c) 市販 HIC カラム B (4.6 mm I.D. × 10 cm)  
 : d) 市販 HIC カラム C (4.6 mm I.D. × 10 cm)

溶離液 A：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 +  
 1.0 mol/L 硫酸アンモニウム (pH 7.0)

溶離液 B：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) /  
 2-プロパノール = 75 / 25

グラジエント：B 0 - 100 % (0 - 15 min、リニア)

流速：0.5 mL/min

検出：UV 215 nm

温度：25 °C

注入量：20 μL

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

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

4. DAR = 6, 5. DAR = 8

## 6. おわりに

以上、新規 HIC カラムである TSKgel HIC-ADC Phenyl について説明しました。本カラムを含む TSKgel HIC-ADC シリーズは、汎用の HIC カラムに比べてより高分離の分析が可能です。また、短いカラムを選択することにより高速分析も可能です。非常に小さいロット間

差のため、バイオ医薬品の研究開発や品質管理にも適しています。TSKgel HIC-ADC Phenyl は TSKgel HIC-ADC Butyl と比較して充填剤の疎水性が高いため、より低疎水性の試料の分析に適しています。ご使用の用途・目的に合わせて選択することが可能です。

※“TSKgel”“NPR”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) 6636-3733	〒104-0028	東京都中央区八重洲2-2-1
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) 710-6694	〒812-0011	福岡市博多区博多駅前3-8-10
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/>