

高性能 HIC 色谱柱 TSKgel[®] HIC-ADC Butyl

— 目 录 —

	页码
1. 前言	1
2. TSKgel HIC-ADC Butyl 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	1
2 - 3. 流速与压降的关系	2
2 - 4. 样品载量的影响	3
2 - 5. 使用短柱进行高速分析	3
2 - 6. 色谱柱的耐用性	4
2 - 7. 填料的批间差异和柱间差异	5
3. 分析示例	5
3 - 1. 梯度斜率的影响	5
3 - 2. 梯度起始盐浓度的影响	6
3 - 3. 色谱柱温度的影响	6
3 - 4. 流动相 pH 的影响	7
3 - 5. 流动相中的有机溶剂的影响	8
4. 与市售 HIC 色谱柱的分离性能对比	8
5. 总结	9

1. 前言

疏水色谱（HIC: Hydrophobic interaction chromatography）是利用在高盐浓度溶液中的蛋白质等分析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。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，由抗体和小分子药物通过偶联形成的一种生物药物）的关键质量属性——药物抗体比（DAR: Drug to Antibody Ratio）。

这次，我们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。本报告主要介绍 TSKgel HIC-ADC Butyl 色谱柱的基本特性及其分离示例。

2. TSKgel HIC-ADC Butyl 的基本特性

2-1. 填料、色谱柱的规格

表 1 的内容是 TSKgel HIC-ADC Butyl 的填料特性和色谱柱的产品规格。表中还列出了我司现有 HIC 色谱柱产品 TSKgel Butyl-NPR®用来进行对比。TSKgel HIC-ADC Butyl 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 Butyl 基团的填料。与原有的 TSKgel Butyl-NPR 产品相比，不仅具备较高的分离度，还提高了最大压降的标准值，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

	本文中的新色谱柱		原有色谱柱	
产品名称	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	Butyl		Butyl	
粒径	5 μm		2.5 μm	
孔径	非多孔性		非多孔性	
最大压降	30 MPa		20 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	1.5 mL / min	1.2 mL / min	1.0 mL / min

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 Butyl 和现有 TSKgel Butyl-NPR 在测定了标准蛋白质时的色谱对比图，图 2 是测定 ADC 时的对比图。TSKgel HIC-ADC Butyl

与 TSKgel Butyl-NPR 相比，无论是哪一种样品，其洗脱峰间隔都更大，表现出优异的分离选择性。

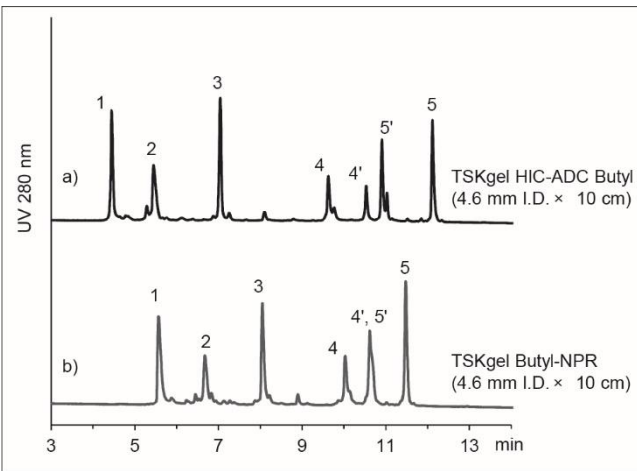


图 1 蛋白标准品的分离谱图

〈测定条件〉

色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Butyl

(4.6 mm I.D. × 10 cm)

b) 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)

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

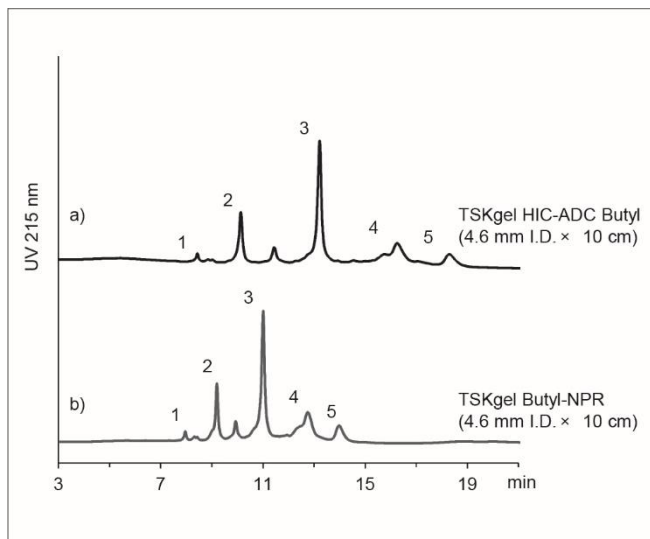


图2 ADC 的色谱图

〈测定条件〉

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

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

流动相 A: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.2 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

B: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
异丙醇=80 / 20

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: 5 µL

样品: SigmaMAb Antibody Drug Conjugate(ADC)
Mimic

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

4. DAR=6, 5. DAR=8

2-3. 流速与压降的关系

TSKgel HIC-ADC Butyl 的流动相在使用磷酸钠缓冲溶液、含有硫酸铵的洗脱液或含有 20% 的异丙醇洗脱液时, 其流速和压降的关系如图 3 所示。从图中可以看出, 即使洗脱流速相同, 压降也会根据洗

脱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 MPa)。

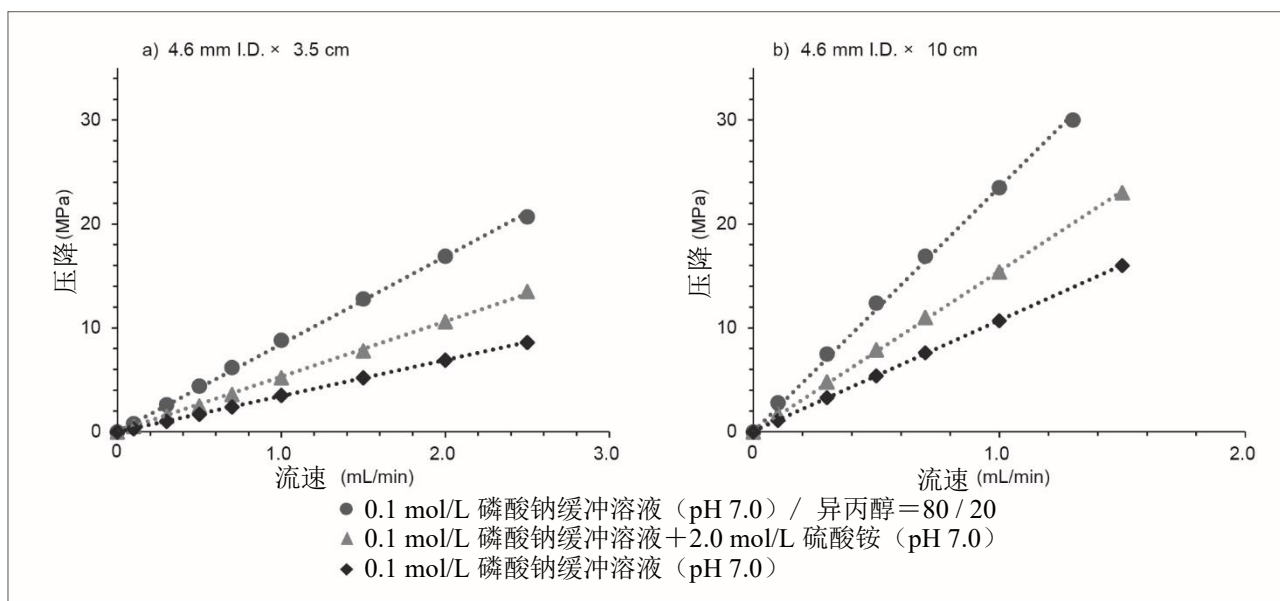


图3 洗脱流速与压降的关系

〈测定条件〉

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

b) TSKgel HIC-ADC Butyl (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=80 / 20

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 Butyl 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.虽然会受到检测器灵敏度的影响,但在流速

0.5 mL/min 下清洗时,建议一次测定的样品载量是 1 μg~50 μg.图 4 是单克隆抗体上样量发生变化时的色谱图.虽然洗脱峰的分离度都相同,但随着样品上样量的增加,保留能力会稍微下降.

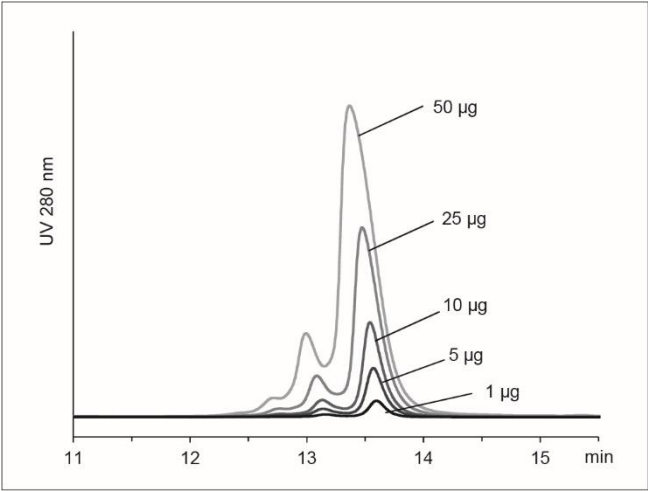


图 4 样品载量对色谱图的影响

2-5. 使用短柱进行高速分析

使用不同尺寸的 TSKgel HIC-ADC Butyl 色谱柱,测定 ADC 时的色谱图如图 5 所示.另外,图 5 中各洗脱峰的分离度如表 2 所示.3.5 cm 长度的色谱柱由于洗脱压力较低,所以可用于高流速条件下的分析.从

〈测定条件〉
色谱柱: 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 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
B: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
梯 度: B 0~100 % (0~30 min, 线性)
流 速: 0.5 mL/min
检 测: UV 280 nm
温 度: 25 °C
进样量: 10 μL
样 品: 人源化 IgG₁k 单克隆抗体

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.

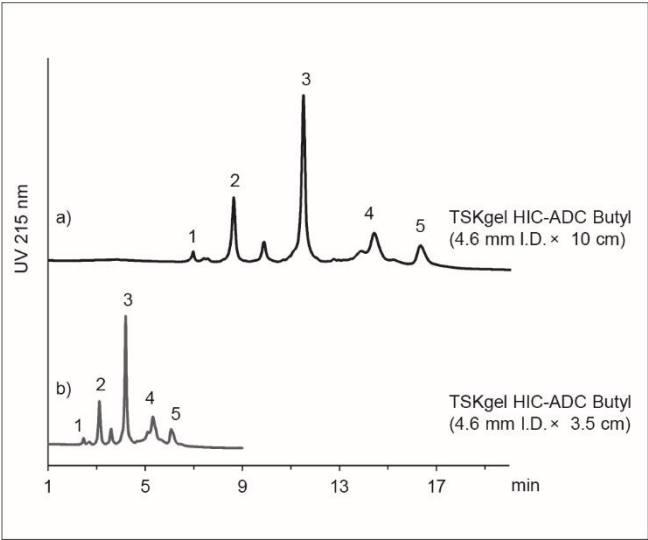


图 5 ADC 的色谱图 (色谱柱尺寸对比)

〈测定条件〉
色谱柱: a) TSKgel HIC-ADC Butyl
(4.6 mm I.D. × 10 cm)
b) TSKgel HIC-ADC Butyl
(4.6 mm I.D. × 3.5 cm)
流动相 A: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.2 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)
B: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0) /
异丙醇=80 / 20
梯 度: a) B 0~100 % (0~15 min, 线性)
b) B 0~100 % (0~6 min, 线性)
流 速: a) 0.8 mL/min b) 2.0 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

表 2 不同色谱柱尺寸的分离度对比

色谱柱	分离度			
	洗脱峰 1/2	洗脱峰 2/3	洗脱峰 3/4	洗脱峰 4/5
a) 4.6 mm I.D. × 10 cm	7.63	10.93	6.04	2.91
b) 4.6 mm I.D. × 3.5 cm	4.69	7.41	4.83	2.41

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，甘氨酸和单克隆抗体的

测定结果如图 6 和图 7 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、抗体保留时间）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 Butyl（4.6 mm I.D. × 10 cm）
流动相：A：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 + 2.0 mol/L 硫酸铵（pH 7.0）
 B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液（pH 7.0）/ 异丙醇 = 80 / 20
梯 度：B 0~100 %（0~15 min，线性）
流 速：0.5 mL/min

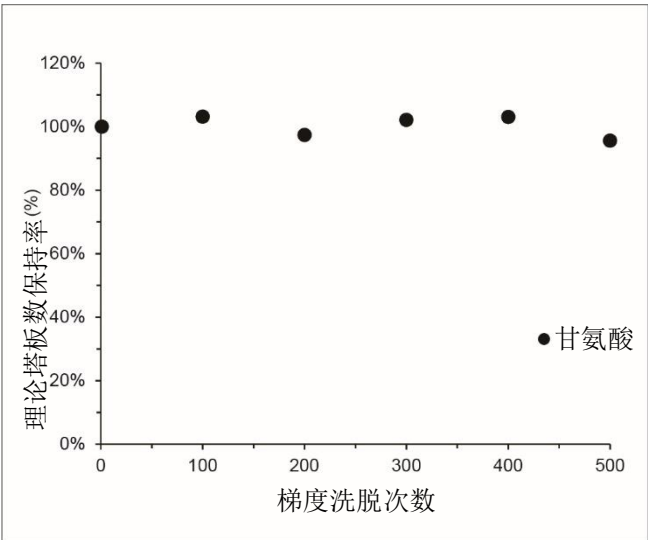


图 6 连续梯度洗脱次数与理论塔板数的关系

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel HIC-ADC Butyl（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

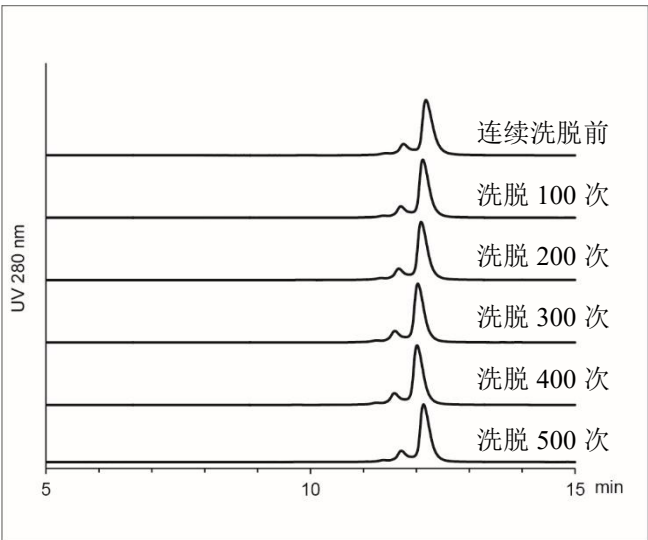


图 7 连续梯度洗脱时的单克隆抗体的色谱图

〈测定条件〉

色谱柱：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 +
 1.0 mol/L 硫酸铵（pH 7.0）
 B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液（pH 7.0）
梯 度：B 0~100 %（0~30 min，线性）
流 速：0.5 mL/min
检 测：UV 280 nm
温 度：25 °C
进样量：10 μL
样 品：人源化 IgG1k 单克隆抗体

2-7. 填料的批间差异和柱间差异

使用 5 支填充了不同批次填料的色谱柱, 以及 5 支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 8 和图 9 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。

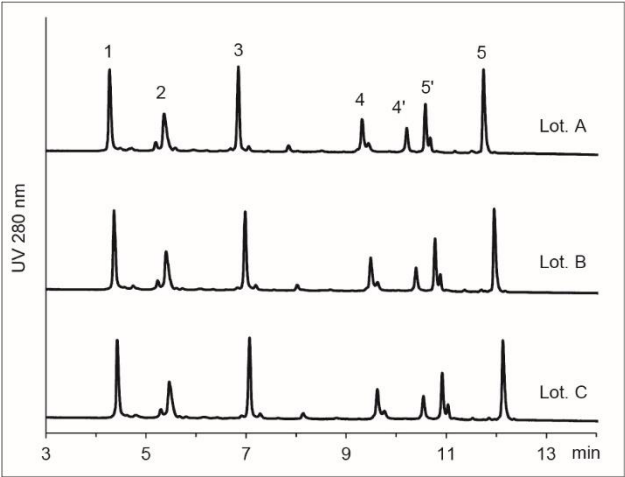


图 8 蛋白标准品的色谱图 (填料批间差异)

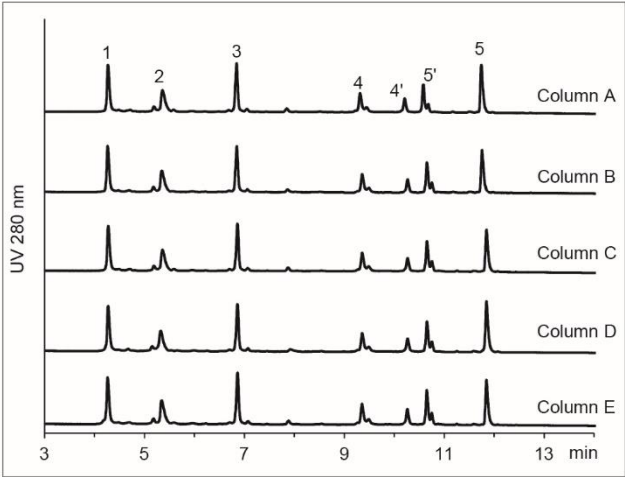


图 9 蛋白标准品的色谱图 (柱间差异)

〈测定条件〉

色谱柱: 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)

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. 分析示例

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 10 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, 所以虽然洗脱峰出现扩散, 但却提高了分离度。

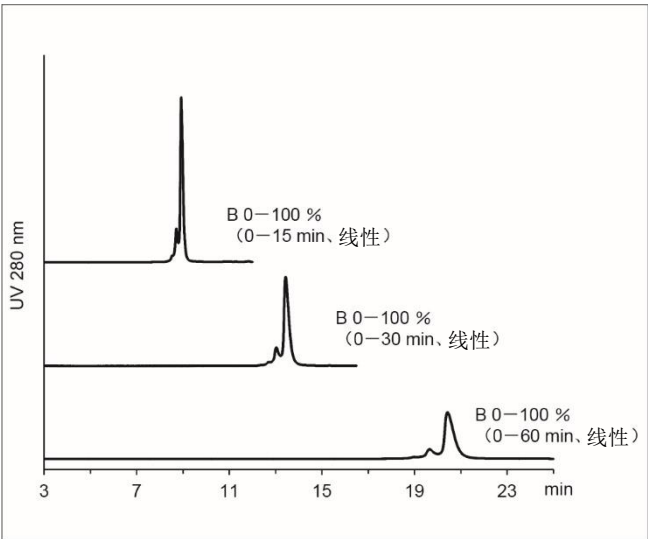


图 10 单克隆抗体的色谱图 (改变梯度斜率)

〈测定条件〉

色谱柱: 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 +
1.0 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

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: 0.5 mL/min

检测: UV 280 nm

温度: 25 °C

进样量: 10 μL

样品: 人源化 IgG₁k 单克隆抗体

3-2. 梯度起始盐浓度的影响

改变流动相的盐浓度后测定单克隆抗体时的色谱图如图 11 所示。可以看出，梯度起始时的盐浓度越高，样品的保留能力就越强。如果样品的疏水性较低，无法充分吸附至填料时，可通过提高梯度起始

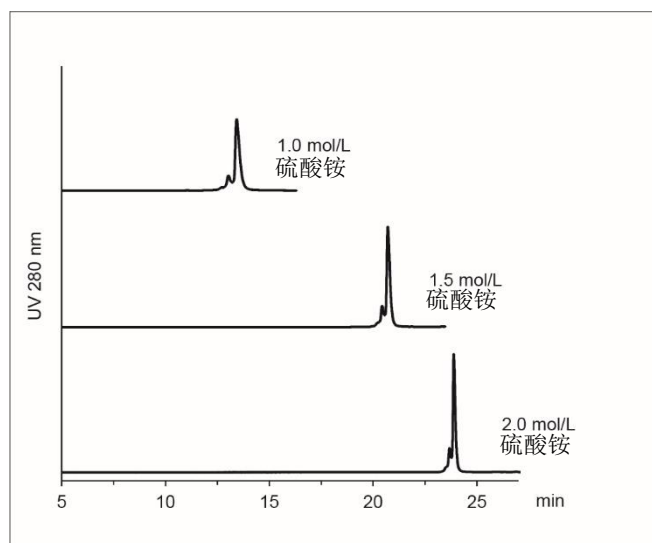


图 11 单克隆抗体的色谱图（改变梯度起始盐浓度）

3-3. 色谱柱温度的影响

改变分析时的色谱柱温度（柱温箱温度）后，测定单克隆抗体时的色谱图如图 12 所示，测定 ADC 时的色谱图如图 13 所示。可以看出，虽然随着色谱柱温度的降低，会出现样品与填料的疏水性相互作用

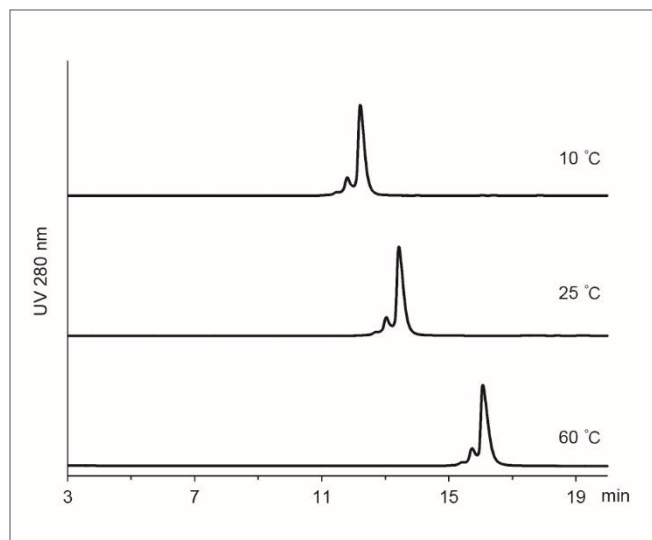


图 12 单克隆抗体的色谱图（改变色谱柱温度）

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。

〈测定条件〉

色谱柱：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 +

硫酸铵（pH 7.0）（硫酸铵浓度如图所示）

B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液（pH 7.0）

梯度：B 0~100%（0~30 min，线性）

流速：0.5 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

进样量：10 μL

样品：人源化 IgG₁k 单克隆抗体

用降低，保留能力减弱的倾向，但对洗脱峰形状和分离几乎没有影响。测定时，请在设置色谱柱温度时注意样品的稳定性。

〈测定条件〉

色谱柱：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 +

1.0 mol/L 硫酸铵（pH 7.0）

B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液（pH 7.0）

梯度：B 0~100%（0~30 min，线性）

流速：0.5 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：如图所示

进样量：10 μL

样品：人源化 IgG₁k 单克隆抗体

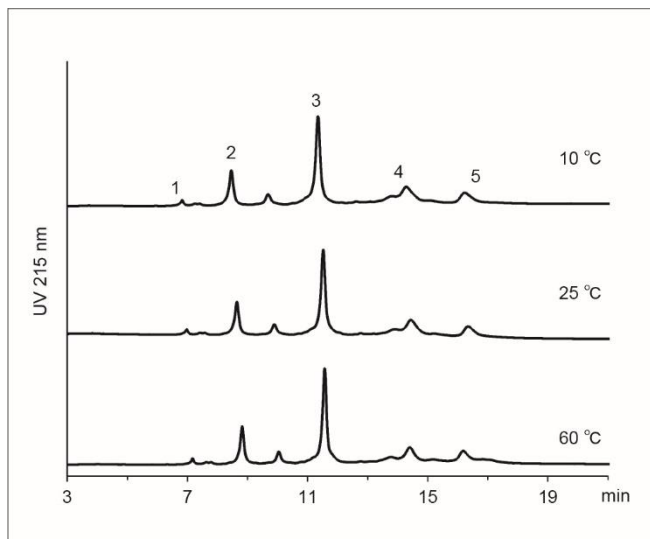


图 13 ADC 的色谱图（改变色谱柱温度）

3-4. 流动相 pH 的影响

改变流动相的 pH 值后，测定单克隆抗体时的色谱图如图 14 所示，测定 ADC 时的色谱图如图 15 所示。可以看出，测定单克隆抗体（图 14）时，虽然流动相的 pH 值越低，保留能力越弱，但对洗脱峰的形状和分离的影响却越小。

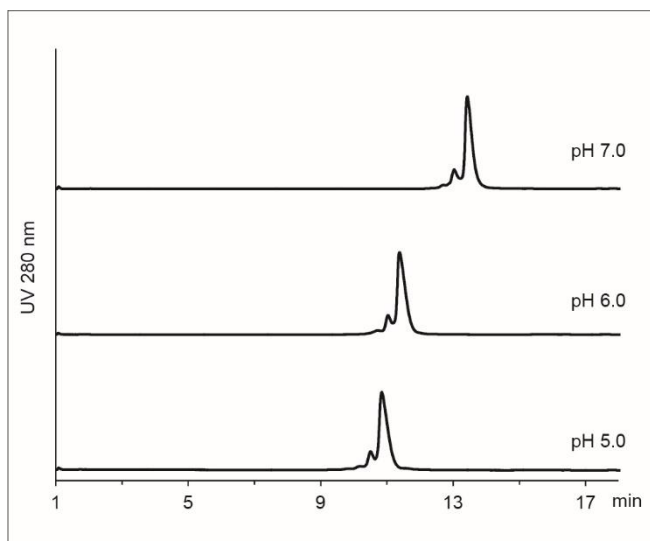


图 14 单克隆抗体的色谱图（改变流动相的 pH 值）

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel HIC-ADC Butyl

（4.6 mm I.D. × 10 cm）

流动相 A：0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.2 mol/L 硫酸铵（pH 7.0）

B：0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液（pH 7.0）/
异丙醇=80 / 20

梯度：B 0~100%（0~15 min，线性）

流速：0.8 mL/min

检测：UV 215 nm

温度：如图所示

进样量：10 μ L

样品：SigmaMAb Antibody Drug Conjugate(ADC)
Mimic

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

另一方面，在测定 ADC（图 15）时，可以看到在低 pH 值条件下的高 DAR 成分（DAR=6、DAR=8）的洗脱峰形状变化。测定时，请在设置流动相的 pH 值时注意样品的稳定性。

〈测定条件〉

色谱柱：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 +
1.0 mol/L 硫酸铵

B：0.1 mol/L 磷酸钠缓冲溶液
（各流动相的 pH 值如图所示）

梯度：B 0~100%（0~30 min，线性）

流速：0.5 mL/min

检测：UV 280 nm

温度：25 °C

进样量：10 μ L

样品：人源化 IgG₁k 单克隆抗体

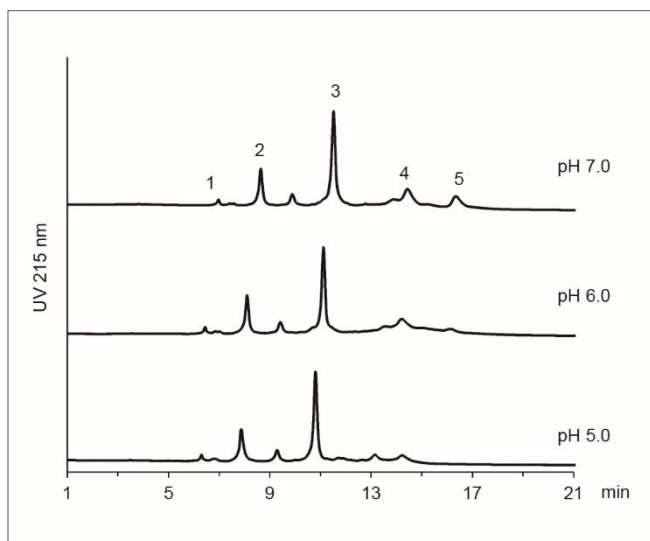


图 15 ADC 的色谱图（改变流动相的 pH 值）

3-5. 流动相中的有机溶剂的影响

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 2-丙醇等有机溶剂。改变流动相 B 中添加的有机溶剂的比例后，测定 ADC 的色谱图如图 16 所示。可以看出，有机溶剂浓度降低时，所有洗脱峰的洗脱时间都变慢，高 DAR 成分的回收率也随之降低。在本次测定

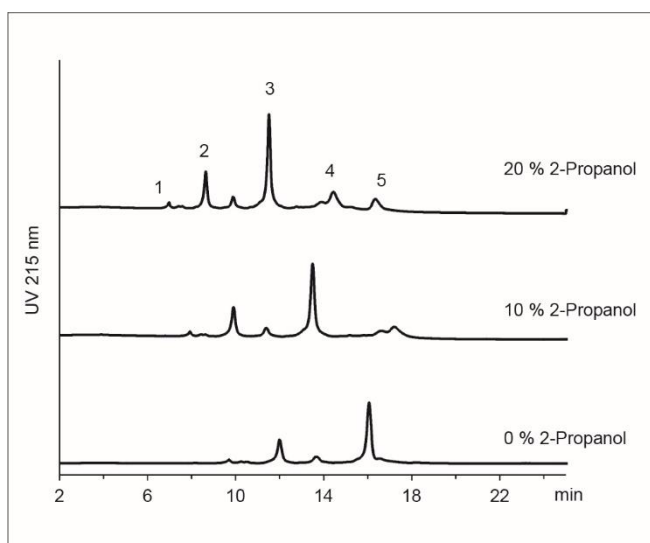


图 16 ADC 的色谱图（改变流动相中的有机溶剂含量）

4. 与市售 HIC 色谱柱的分离性能对比

图 17 是 TSKgel HIC-ADC Butyl 和市售 HIC 色谱柱在测定了标准蛋白质时的色谱对比图，图 18 是测定了 ADC 时的对比图。从图中可以看出，TSKgel HIC-ADC Butyl 与市售 HIC 色谱柱相比，其洗脱峰

〈测定条件〉

色谱柱：TSKgel HIC-ADC Butyl

（4.6 mm I.D. × 10 cm）

流动相 A：0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.2 mol/L 硫酸铵（pH 7.0）

B：0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液（pH 7.0）/
异丙醇 = 80 / 20

（各流动相的 pH 值如图所示）

梯度：B 0~100%（0~15 min，线性）

流速：0.8 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

ADC 时，向流动相 B 中添加了 20% 的异丙醇是有效的。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 Butyl

（4.6 mm I.D. × 10 cm）

流动相 A：0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.2 mol/L 硫酸铵（pH 7.0）

B：0.05 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：0.8 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

间隔更大，分离选择性更加优异。另外，在测定蛋白标准品（图 17）时，可以分离用其他色谱柱无法分离的成分（4'、5'）。

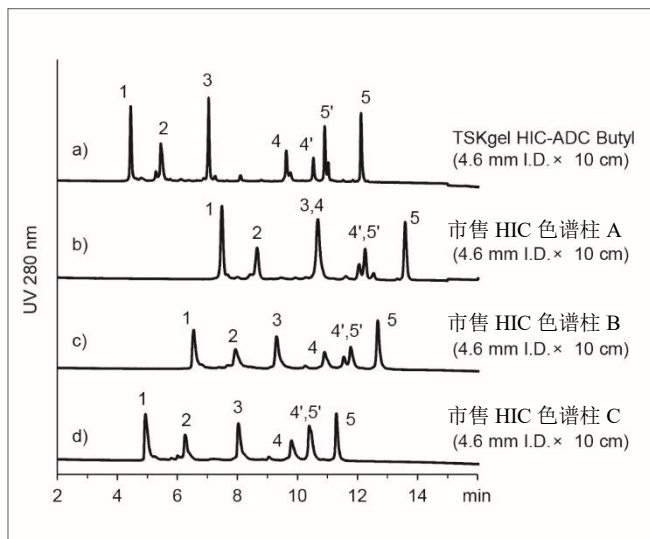


图 17 蛋白标准品的色谱图（对比市售 HIC 色谱柱）

〈测定条件〉

- 色谱柱：a) TSKgel HIC-ADC Butyl
(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)

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

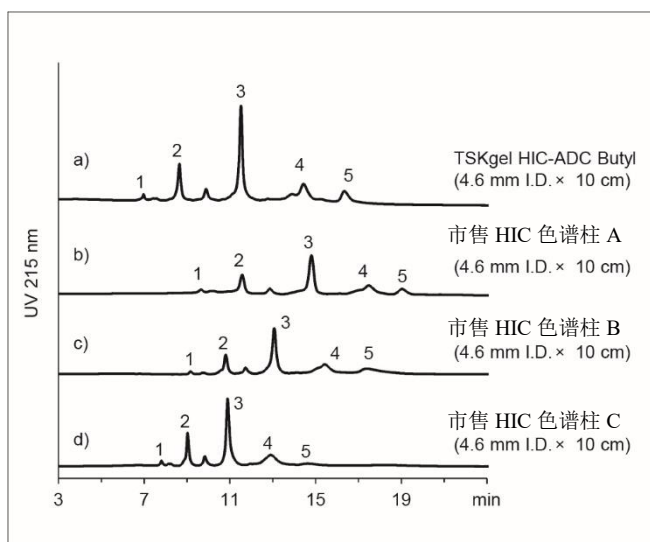


图 18 ADC 的色谱图（对比市售 HIC 色谱柱）

〈测定条件〉

- 色谱柱：a) TSKgel HIC-ADC Butyl
(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: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 +
1.2 mol/L 硫酸铵 (pH 7.0)

B: 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲溶液 (pH 7.0)
异丙醇 = 80 / 20

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: 5 μL

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

5. 总结

以上是新产品 HIC 色谱柱 TSKgel HIC-ADC Butyl 的简要说明。本款色谱柱与普通 HIC 色谱柱相比, 其分离性能更高, 还提供了短柱进行高速分析的

选择。批次间的生产稳定性也很高, 所以适用于生物药物的研发和质量控制。

* “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