

疏水相互作用 色谱（HIC） 的流动相

客户面临的挑战

- ▶ 需要开发一种HIC方法。
- ▶ 需要知道哪些参数会影响分离以及如何影响分离。

东曹的解决方案

TSKgel® HIC-ADC Butyl色谱柱

- ▶ 疏水性普适、多功能HIC色谱柱

做了什么？

- ▶ 通过系统地改变流动相，研究流动相对mAb和ADC分离的影响。

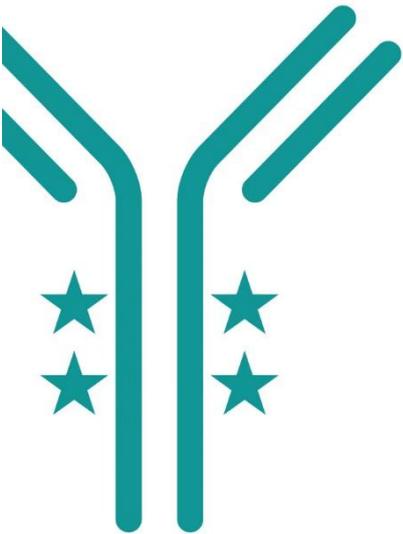
结果如何？

- ▶ 通过微调流动相，可对疏水性不同的分子进行有效的HIC分离和洗脱。

pH值、有机溶剂、盐浓度和梯度混合速率均会影响HIC分离。了解这些因素，有助于在TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱上有效分离mAb和ADC。

客户权益

适用于各种分子的色谱柱 -
了解如何优化HIC分离效果



mAb和ADC分析





疏水相互作用色谱中流动相改变对IgG和ADC分离的影响

简介

在分析生物分子，特别是免疫球蛋白（IgG）和抗体药物偶联物（ADC）时，保持这些复杂结构的天然状态至关重要。疏水相互作用色谱（HIC）通过对生物分子功能完整性得以保持的条件下实现分离来应对这一挑战。HIC使用高盐浓度的流动相结合生物分子，并通过逐渐降低盐浓度来实现洗脱。这一过程的结果是亲水性较强的分子较早洗脱，而疏水性较强的分子较晚洗脱。

本应用介绍了如何通过改变流动相的变量（特别是pH值、有机溶剂加入量、盐浓度和梯度混合速率），以显著提高TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱的HIC分离效果。了解每个变量对ADC和单克隆抗体等复杂生物分子的精细分离所带来的影响。

实验条件

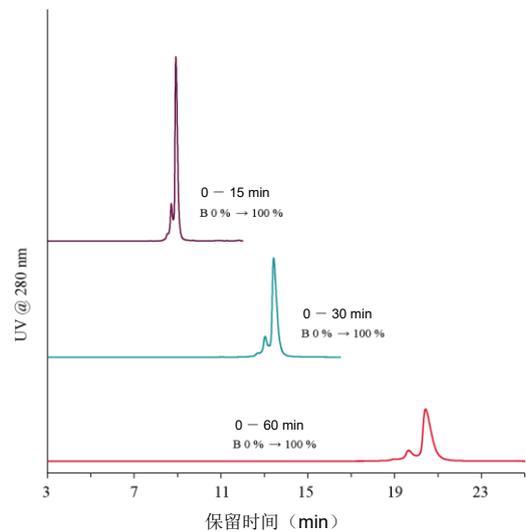
色谱柱: TSKgel® HIC-ADC Butyl (4.6 mm ID × 10 cm L)
流动相: 通过系统性地改变pH值、有机溶剂、盐浓度和梯度斜率，探索其对单克隆抗体和ADC模拟物洗脱曲线的影响。每种梯度洗脱的细节详见相应图例。
梯度: 10 - 35% B, 线性, 20 min,
 100% B, 5 min, 10% B, 5 min
流速: 0.5 mL/min (样品A);
 0.8 mL/min (样品B)
温度: 25 °C
检测: UV @ 280 nm (样品A);
 UV @ 215 nm (样品B)
进样量: 10 μL
样品: A: 人IgG1 (1 mg/mL)
 B: ADC模拟物 (1 mg/mL)

结果和讨论

改变梯度斜率

通过在15、30和60 min内将1 mol/L硫酸铵的盐浓度降至0 mol/L，对IgG1抗体（样品A）进行不同线性混合梯度的测试。在这些条件下，梯度越平缓，洗脱时间越晚，因为洗脱盐浓度是在较晚的运行时间达到的（图1）。然而，由于需要更长的时间来达到洗脱每个峰所需的临界盐浓度，肩峰与主峰之间的分离度会随着梯度的增加而提高。分离度提高的同时，灵敏度会有所损失，这是在梯度较平缓的情况下谱带扩张所致。因此，最优梯度斜率是运行时间、分离度和灵敏度三者的折中。

图1 梯度斜率对mAb HIC分离的影响

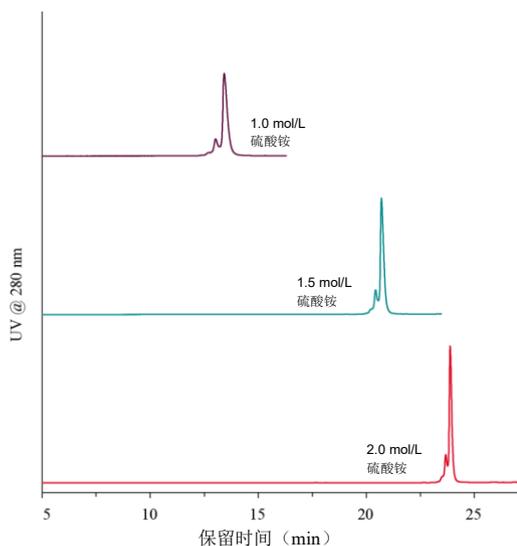


缓冲溶液A: 0.1 mol/L磷酸钠(pH 7) + 1.0 mol/L硫酸铵;
 缓冲溶液B: 0.1 mol/L磷酸钠(pH 7);
 梯度: B 0 - 100% (线性, 时间如图所示)

盐浓度的影响

在IgG1抗体（样品A）上测试了以1 mol/L、1.5 mol/L和2 mol/L硫酸铵为起始浓度的流动相，研究其对保留时间和分离度的影响（图2）。硫酸铵浓度在30 min内线性下降至0 mol/L。实际上，起始盐浓度越高，梯度越陡。

图2 盐浓度对mAb HIC分离的影响



缓冲溶液A: 0.1 mol/L磷酸钠(pH 7) + 硫酸铵, 如图所示;
缓冲溶液B: 0.1 mol/L磷酸钠(pH 7);
梯度: B 0 - 100% (0-30 min, 线性)

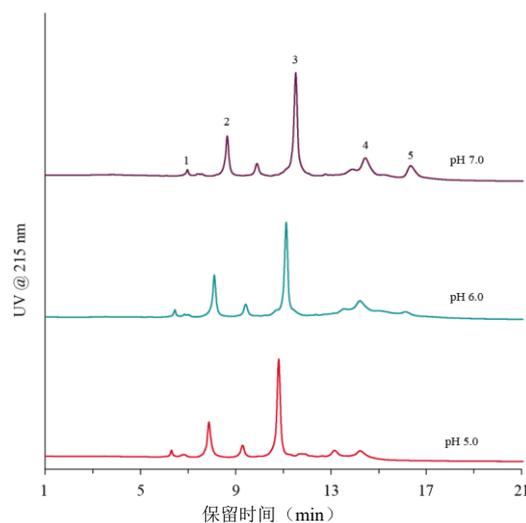
与使用较高初始盐浓度的分离相比，以1 mol/L硫酸铵开始的分离在较早的保留时间洗脱，并能更有效地从mAb主峰中分离出肩峰。尽管在较低的盐浓度下分离效果得到改善，但峰高随着弱流动相中盐浓度的上升而增加。这提高了灵敏度，反映了如图1所示的更陡混合梯度的效果。

调节pH值

流动相的pH值会严重影响蛋白质和抗体等电点附近的表面电荷，从而改变溶液中电荷变体的分布。由于带电残基的局部pKA会受到非天然分子内相互作用的影响，用于ADC的共价连接的药物偶联物会进一步加剧这些影响。因此，可以使用HIC来分离可变疏水性ADC变体。

通过分析pH 5-7的缓冲流动相，确定pH值对ADC模拟物（样品B）分离的影响。在pH 5时，ADC模拟物的低DAR变体（DAR = 0、2和4）洗脱较早，高DAR的峰的保留比pH 6和7时较弱（图3）。在低pH值条件下分析高DAR组分（DAR = 6和8）的峰会呈现峰形展宽和灵敏度降低的现象。随着pH值的升高，高DAR组分的色谱效率显著提高，这一点可从更尖锐的峰形上观察到。当分子接近ADC模拟物的 pI（接近7）时，分子的带电量减少，疏水性增强，从而可以观察到更高的保留。

图3 -pH值对ADC模拟物HIC分离的影响



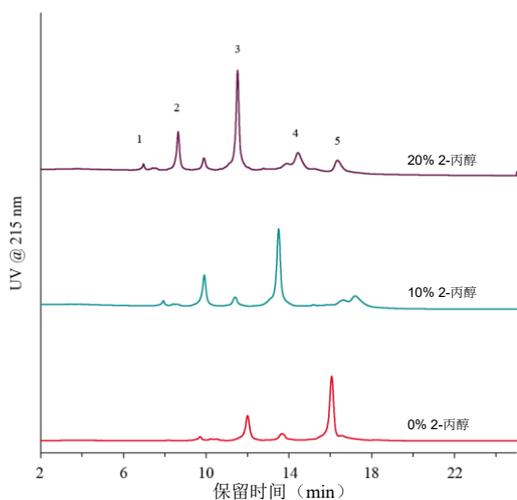
缓冲溶液A: 0.05 mol/L磷酸钠 + 1.2 mol/L硫酸铵;
缓冲溶液B: 0.05 mol/L磷酸钠 + 20% 2-丙醇;
梯度: B 0 - 100% (0-15 min, 线性);
pH值如图所示。1.DAR = 0; 2.DAR = 2; 3.DAR = 4; 4.DAR = 6;
5.DAR = 8

使用有机溶剂

TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱具有更高的配体密度，可用于分离各种DAR偶联异构体。添加有机溶剂可改变分析物与固定相之间的疏水相互作用，这是疏水相互作用分离的主要驱动因素。因此，有机溶剂可用于优化HIC分析。

为了测试有机溶剂对ADC模拟物分离的影响，在强洗脱流动相中添加了不同浓度的异丙醇（IPA）（0%、10%、20% v/v），并进行HPLC分析（图4）。通过比较加入和不加入有机改性剂IPA时的分离效果可看出，在分析过程中添加IPA时的洗脱速度更快、更彻底，而不添加IPA时，高DAR组分（DAR=6、DAR=8）不会从色谱柱中洗脱出来。在异丙醇浓度较高的情况下，高DAR变体以尖锐峰的形式洗脱。相比之下，如果在洗脱缓冲溶液中只添加少量或不添加IPA，亲水性变体的峰形展宽，仅部分DAR组分洗脱出来。

图4 有机溶剂添加量对ADC模拟物HIC分离的影响



缓冲溶液A: 0.05 mol/L磷酸钠(pH 7) + 1.2 mol/L硫酸铵(pH 7);
缓冲溶液B: 0.05 mol/L磷酸钠(pH 7) + 2-丙醇(如图所示);
梯度: B 0 – 100% (0-15 min, 线性) 1.DAR = 0; 2.DAR = 2;
3.DAR = 4; 4.DAR = 6; 5.DAR = 8

20% IPA能够减少固定相与保留在色谱柱上的DAR变体之间的疏水相互作用，这解释了为什么在存在20% IPA的情况下会出现早期洗脱和完全洗脱。尽管疏水相互作用是HIC保留的主要机制，但高疏水分子与高疏水性固定相结合会导致疏水分析物的过度保留行为和不洗脱。正如本文所示，克服洗脱不足的方法之一是在流动相中加入低有机溶剂成分。

结论

我们展示了各种疏水性不同的分子（如：ADCs和单克隆抗体）在TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱上可有效分离。通过调整流动相的弱和强条件，我们能够微调分离参数以获得最佳结果。

综上，pH值、有机溶剂成分、盐浓度和梯度混合速率在疏水相互作用色谱法（HIC）分离中均起着至关重要的作用。全面了解这些因素之间的相互作用，可系统性地优化HIC方法，从而实现更高效和有效的分离。

产品信息

货号	产品描述	色谱柱尺寸
0023539	TSKgel HIC-ADC-Butyl	4.6 mm ID × 10 cm L

Tosoh Bioscience和TSKgel是Tosoh Corporation的注册商标。