

INTACT Mass™ - 一款用于生物治疗药物快速质量数确认和纯度评估的通用waters_connect™应用程序

Henry Shion, Patrick Boyce, Scott J. Berger, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

近年来，液质联用(LC-MS)完整分子量分析已成为生物治疗药物从开发到商业化的各个阶段中，用于属性表征和监测不可或缺的工具。通过发现筛选、工艺开发和制剂/稳定性评估等功能，可以实现样品的大批量生成，而能够实现高通量完整分子量分析和杂质分析的分析解决方案有利于匹配这些要求。本文报告了一种新的通用软件应用程序的开发，该应用程序可简化生物分子的LC-MS质量数确认和定量监测，适合部署于合规的环境中。

优势

- 用于高通量质量数确认和纯度分析的自动高效工作流程
- 使用光学色谱图、总离子流色谱图(TIC)或质谱图测定纯度
- 自动确定输入和输出质量范围和去卷积参数，产生单同位素或平均去卷积质量数结果
- 相关方法现已可用作多种生物分子的平台方法

简介

完整分子量分析可以提供生物治疗药物的整体特性，有助于确认预测质量数、分析产品异质性和鉴别杂质。近年来，LC-MS完整分子量分析已成为生物治疗药物从开发到商业化的各个阶段中，用于属性表征和监测不可或缺的工具。通过发现筛选、工艺开发和制剂/稳定性评估等功能，可以实现样品的大批量生成，而能够实现高通量完整分子量分析和杂质分析的分析解决方案有利于匹配这些要求。

本文报告了一款waters_connect应用程序的开发，该应用程序可简化LC-MS数据采集、完整质量数数据处理和结果报告，适用于合规环境。INTACT Mass应用程序可用于简单的质量数确认、高通量完整质量数筛选和产品杂质分析。本应用纪要将介绍高通量靶向质量数确认工作流程的关键阶段，讨论从六种市售单克隆抗体(mAb)和NISTmAb IdeS酶解亚基获得的实验结果。



图1.搭载ACQUITY™ Premier的BioAccord™ LC-MS系统，含一台ACQUITY Premier二元UPLC™，通过可变波长紫外检测器(TUV)与ACQUITY RDa™精确质谱检测器在线联用进行检测，在waters_connect信息学平台下运行。

实验

标准物质和样品前处理

LC-MS级乙腈(ACN)购自Honeywell - Burdick & Jackson。LC-MS级甲酸购自Thermo Fisher Scientific。市售mAb曲妥珠单抗(Genentech)、英夫利昔单抗(J&J)、贝伐单抗(Abbott)、利妥昔单抗(Biogen Idec)和奥马珠单抗(Genentech)均购自Besse Medical (www.besse.com <<http://www.besse.com/>>)。所有mAb在解冻前均储存在-80°C下，然后用Milli-Q水稀释至0.5 µg/µL用于LC-MS分析。此外，本研究使用了Waters™人源化单克隆抗体(NISTmAb)质量数检查标准品（沃特世部件号=186009125 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html>>）和沃特世单克隆抗体(NISTmAb)亚基标准品（沃特世部件号=186008927 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>>）。完整NISTmAb样品分析：向含有80 µg蛋白质的样品瓶中加入160 µL Milli-Q水，制成0.5 µg/µL溶液，然后用于分析（进样2 µL）。亚基分析：向含有25 µg mAb亚基的样品瓶中加入125 µL水，制成0.2 µg/µL溶液，然后用于分析（进样2 µL）。

搭载ACQUITY Premier产品的BioAccord系统

系统：ACQUITY Premier UPLC BSM,
ACQUITY Premier UPLC FTN，带柱
温箱
ACQUITY RDa质谱检测器，
ACQUITY Premier TUV光学检测器，
waters_connect v2.1.2.4

完整分子量分析 - LC-MS方法设置

色谱柱：ACQUITY Premier BEH™ C₄蛋白分析
专用柱, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 50
mm（沃特世部件号=186010326）。

柱温：80 °C

流动相A：0.1%甲酸的水溶液

流动相B：0.1%甲酸的乙腈溶液

TUV光学检测器：UV 280 nm

完整mAb分析的液相色谱梯度表

	时间 (min)	流速 (mL/min)	组分 A (%)	组分 B (%)	曲线
1	0.00	0.40	95.0	5.0	初始
2	1.00	0.40	15.0	85.0	6
3	1.20	0.40	5.0	95.0	6
4	1.50	0.40	95.0	5.0	6
5	2.50	0.40	95.0	5.0	6

总运行时间：2.5分钟。

完整分子量分析的MS条件

采集设置

模式：全扫描

质量范围：高(400-7000 m/z)

极性：ESI+

扫描速率：2 Hz

锥孔电压：	自定义(70 V)
毛细管电压：	自定义(1.50 kV)
脱溶剂气温度：	自定义(550 °C)
智能数据捕获(IDC)：	开

亚基分子量分析的LC-MS方法设置

色谱柱：	ACQUITY Premier BEH C ₄ 蛋白分析专用柱, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm (沃特世部件号=186010326)
柱温：	80 °C
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
TUV光学检测器：	UV 280 nm

液相色谱分析梯度表

	时间 (min)	流速 (mL/min)	组分 A (%)	组分 B (%)	曲线
1	0.00	0.40	80.0	20.0	初始
2	0.25	0.40	75.0	25.0	6
3	1.75	0.40	60.0	40.0	6
4	2.00	0.40	5.0	95.0	6
5	2.25	0.40	80.0	20.0	6
6	3.00	0.40	80.0	20.0	6

总运行时间：3.0分钟。

亚基分析的MS条件

采集设置

模式：	全扫描
质量范围：	高(400-7000 m/z)
极性：	正
扫描速率：	2 Hz
锥孔电压：	自定义(50 V)
毛细管电压：	自定义(1.00 kV)
脱溶剂气温度：	自定义(450 °C)
智能数据捕获(IDC)：	开

结果与讨论

INTACT Mass应用程序搭载于waters_connect信息学平台HUB（图2）中，可用于多种生物分子的质量数确认和纯度评估。也可以进行非靶向质量数分析以支持发现研究。此外，可以使用光学色谱图、TIC或质谱图进行纯度评估。

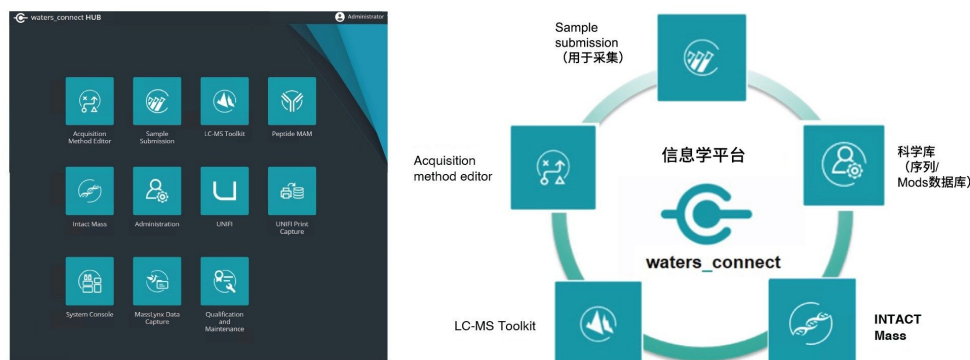


图2.waters_connect HUB包含与完整分子量分析工作流程相关的应用程序图标，例如 Acquisition Method Editor、Sample Submission、Scientific Library、INTACT Mass 和LC-MS Toolkit。

waters_connect信息学平台HUB包含用于完整分子量分析工作流程的应用程序。Acquisition Method Editor应用程序用于定义数据采集条件，例如LC梯度和MS设置。INTACT Mass应用程序运行用于数据采集、处理、查看和报告的集成式工作流程。Sample Submission应用程序可以独立启动，但当用户选择采集和处理选项时，它会在INTACT Mass应用程序中执行。Scientific Library包含针对各种生物分子类型的大量可变修饰，可选择这些修饰来搜索产品变体、杂质和MS加合物。LC-MS Toolkit应用程序可用于在需要进行结果确认或故障排除时手动检查数据。

创建采集方法

我们使用waters_connect HUB中的Acquisition Method Editor应用程序定义了一种方法，以便于采集完整质量数LC-MS数据。此采集方法包括溶剂管理器、样品管理器、柱温箱、可变波长紫外(TUV)和ACQUITY RDa MS检测器的设置。此外我们还定义了一种总运行时间为2.5分钟的快速LC脱盐方法以促进更高通量的分析，该方法包含梯度图表（图3A）和MS设置（图3B）。在本实验中，选择MS方法中的“scheduled lockmass”（预定锁定质量数

) 以缩短总采集时间, 具体做法是在每次进样的基础上减少进样间系统检查活动。在INTACT Mass应用程序中选择“scheduled lockmass”(预定锁定质量数)后, 使用2.5分钟快速LC方法运行的48个样品完成LC-MS数据采集和数据处理需要136分钟。

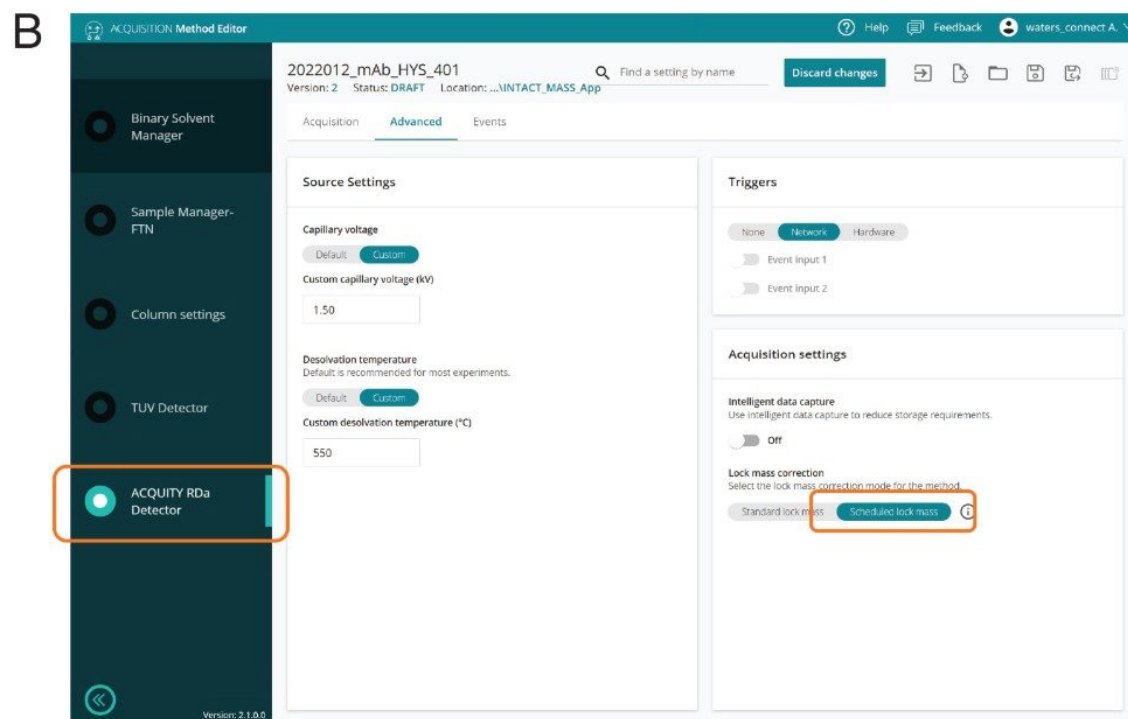
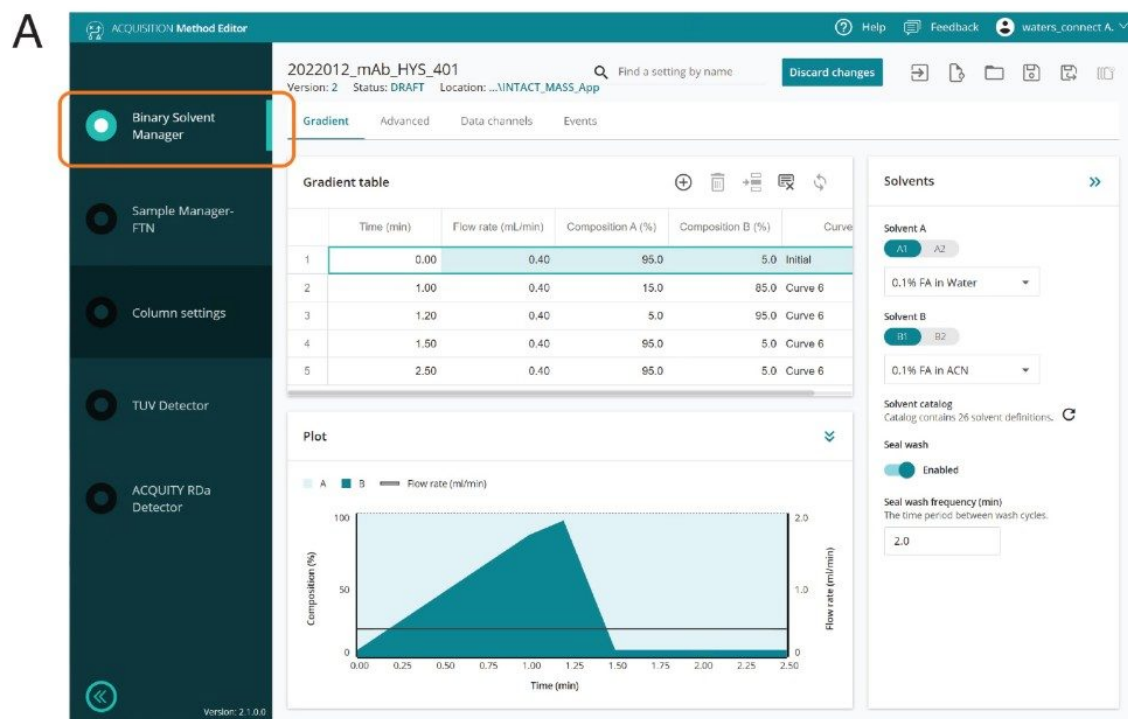


图3.使用Acquisition Method Editor生成更高通量的完整mAb LC-MS采集方法。如梯度图表(A)所示

，总运行时间为2.5分钟，并且在高级MS设置(B)下选择了“*scheduled lockmass*”（预定锁定质量数）。

创建处理方法

数据处理方法在INTACT Mass应用程序中创建，可以从现有方法复制，也可以新建。用户可以在INTACT Mass应用程序的欢迎页面（图4）为现有数据集生成“只处理”分析，或对新数据集设置“采集并处理”的组合。

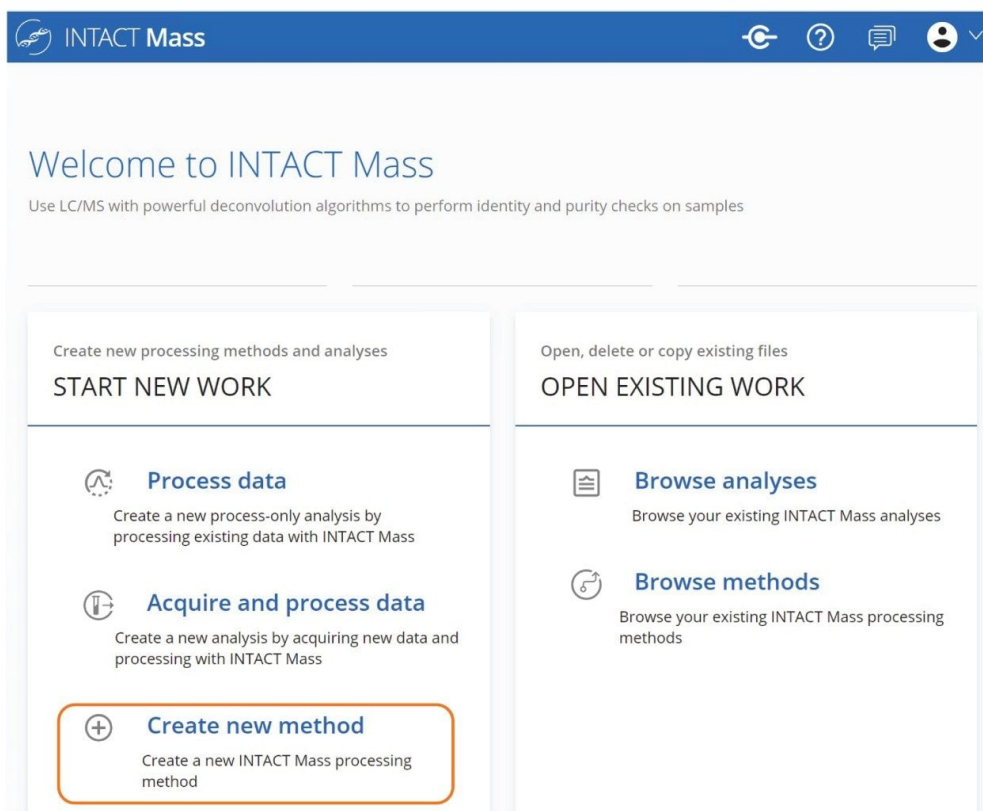
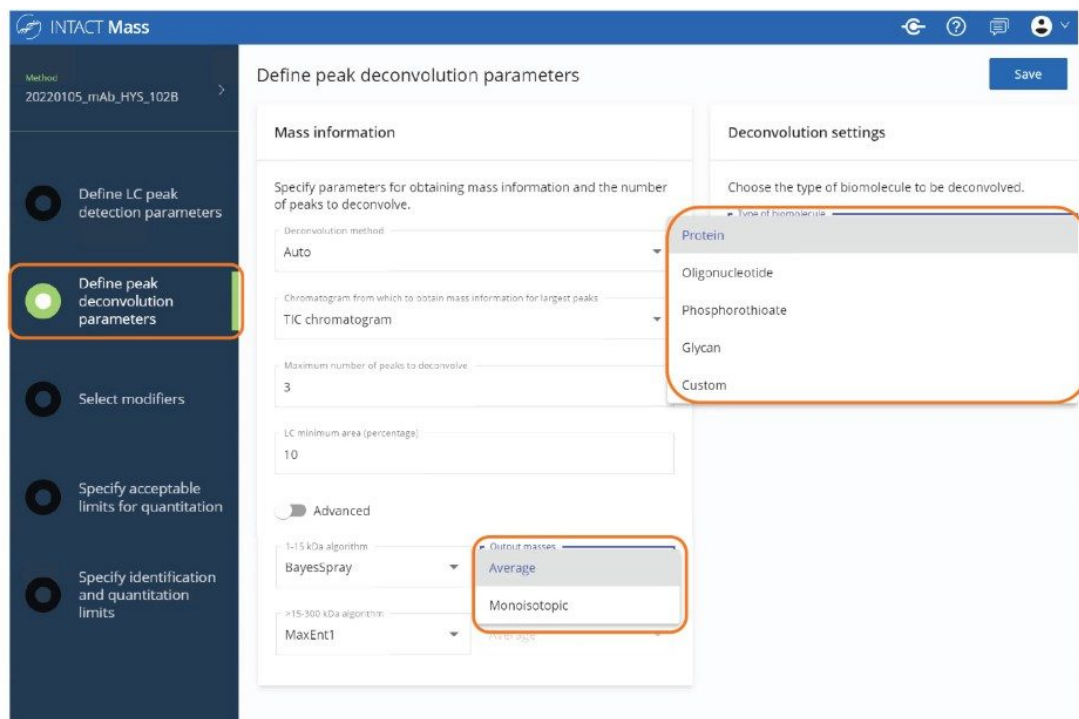


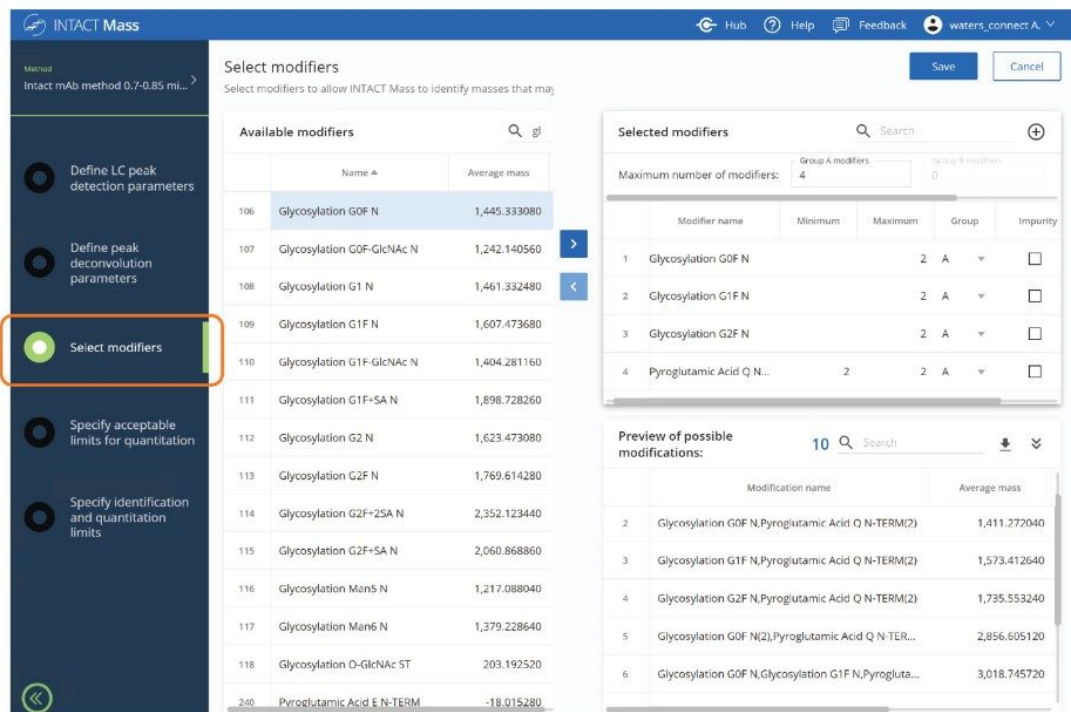
图4. INTACT Mass应用程序主页。可以对现有数据执行处理方法，作为采集和处理选择组合的一部分，也可以创建新的数据处理。

在构建完整mAb筛选的处理方法时（图5A），用户可以灵活地选择最新的BayesSpray¹或传统的MaxEnt1²算法进行数据去卷积。BayesSpray可用于生成平均或单同位素谱图，而MaxEnt1提供平均质量数³。选择自动峰去卷积

设置时，原始谱图和去卷积谱图的质量范围以及其他去卷积参数将自动优化，如果需要，此优化结果可用于锁定未来的方法。在本研究中，选择MaxEnt1去卷积算法进行处理。用户可以从下拉列表（图5B）中选择分子类型（本研究选择蛋白质），允许去卷积算法对适当的元素组成进行建模以获得最佳结果，或选择自定义元素组成以支持非典型类别的分子。此功能基本无需用户干预即可提供最佳电荷去卷积结果，并且可以创建平台方法以应用于包含各种分子的样品组。例如参考文献中列出的使用INTACT Mass应用程序进行的寡核苷酸重点分析，标题为“使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统和自动化waters_connect INTACT Mass应用程序对单向导RNA杂质进行LC-MS分析”⁴。



A



B

图5.选择处理参数。该应用程序支持BayesSpray或传统的MaxEnt1数据去卷积算法：BayesSpray可输出平均质量

数或单一同位素质量数，而*MaxEnt 1*提供平均质量数。使用默认的自动化设置可以在数据处理过程中智能地自动优化原始和去卷积谱图的质量范围以及其他去卷积设置（图5A）。此外，可以选择各种样品类型，优化元素组成模型以获得更优的电荷去卷积（图5B）。

执行分析

在选择Acquire and Process（采集并处理）选项后选择方法，此时会出现一个样品列表（图6），用户可以在其中指定样品信息，例如目标质量数、样品和分子类型、任何样品预处理（例如IdeS酶解）。

221_Franklin and more

Data Folder

Where full status in Systems Console

Henry System

System

Index a system

Henry System

Set to initial conditions

Stop flow

Reset system

20211217_HTP_HVS_001

Method

Location: [WorkflowParameters_221_Franklin.m](#)

Device

Method for data reduction

20211217_HTP_HVS_001

Edit in ACQUISITION Method Editor

Sample Trays

Intact Mass

Sample List

Queue

Real Time Data

20220105_mAb_HVS_105

Version: 9

STATUS: OKAY

Item Name

Item Description

Sample Type

Injection Volume (µL)

Sample Position

Replicates

Acquisition Method

Run Time (min)

Submitter

Processing Method

Molecule ID

Expected Masses

Molecule Type

Factor

1

Sample 201

N

Unknown

2.00

1:A.1

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

2

Sample 202

N

Unknown

2.00

1:A.2

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

3

Sample 203

N

Unknown

2.00

1:A.3

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

4

Sample 204

N

Unknown

2.00

1:A.4

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

5

Sample 205

N

Unknown

2.00

1:A.5

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

6

Sample 206

N

Unknown

2.00

1:A.6

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

7

Sample 207

N

Unknown

2.00

1:A.7

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

8

Sample 208

N

Unknown

2.00

1:A.8

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148036.5

Protein

Non

9

Sample 209

T

Unknown

2.00

1:B.1

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

10

Sample 210

T

Unknown

2.00

1:B.2

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

11

Sample 211

T

Unknown

2.00

1:B.3

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

12

Sample 212

T

Unknown

2.00

1:B.4

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

13

Sample 213

T

Unknown

2.00

1:B.5

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

14

Sample 214

T

Unknown

2.00

1:B.6

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

15

Sample 115

T

Unknown

2.00

1:B.7

1

20211217_HTP_HVS_001

2.50

HVS

Intact mAb method 0.7-6.85 mins Clone

2.50

HVS

148056.5

Protein

Non

100%

Submit 48 rows

图6. *Acquire and Process*（采集并处理）样品列表。可相应地选择仪器系统、采集方法、处理方法。此外，可以根据需要添加样品特定信息，以实现逐个样品的智能采集和处理。

自动数据采集和处理将在分析提交后开始。数据处理将与随后的数据采集并行发生，同时对一个或多个样品的多达五个峰去卷积。用户可以实时检查这些结果，以决定是否继续采集，或确定是否需要任何方法改进。

查看和报告结果

完整mAb筛选实验结果的面板视图（图7）总结了一板48次进样的结果。其中共包含六种抗体，如实验条件中所述

进行前处理，随后将每种抗体注入八个重复孔中进行分析。在处理方法中，针对适当的目标平均质量数搜索每种抗体。

样品板上显示的颜色标志反映了分析样品的状态，并反映了是否已确认目标质量数，以及是否有任何产品超过纯度规格。这些实验没有规定纯度标准。

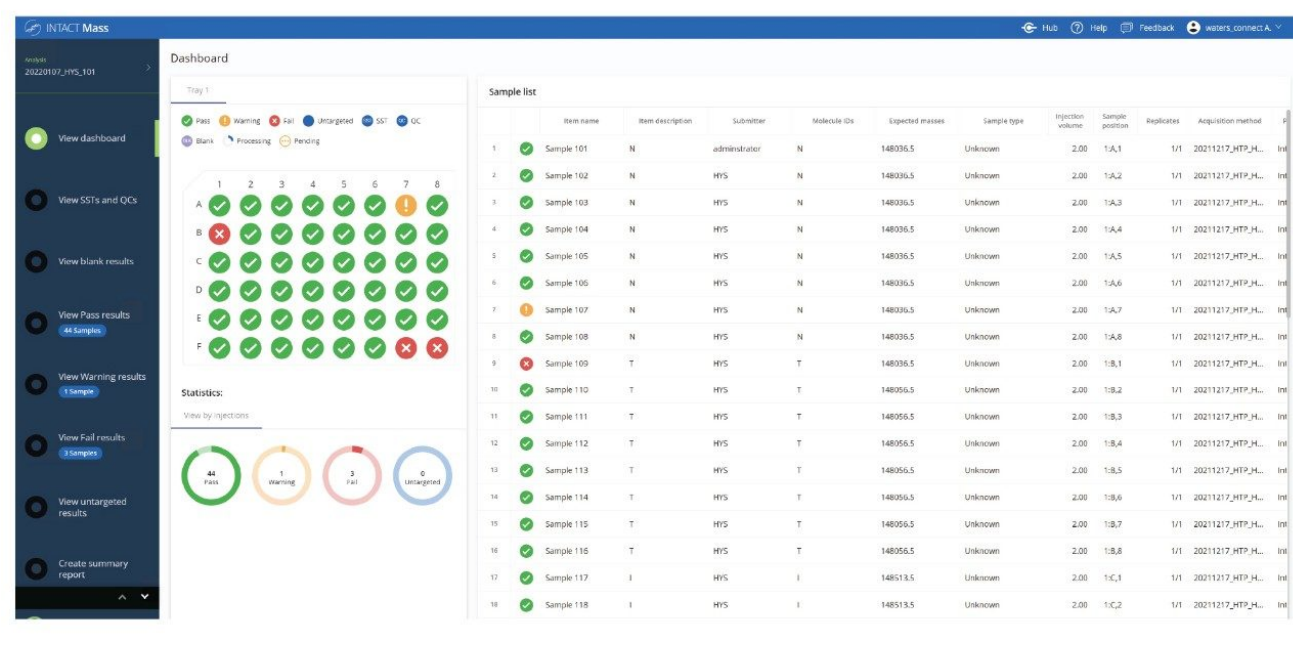
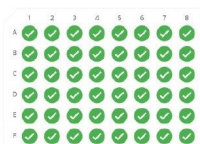


图7.控制面板结果视图。结果来自一项完整*mAb*筛选实验，48次进样代表六种抗体的八次重复进样。样品板上的颜色代码反映了分析样品的结果状态。在样品列表内单击可详细查看单个样品的结果。

当针对匹配目标质量数的质量精度的阈值设置以及样品的预期纯度进行测量时，绿色表示样品合格。橙色表示发出警告，表明质量数误差高于阈值，或样品纯度低于预期。红色表示针对目标质量数测量的质量精度太大或不匹配，和/或纯度低于阈值。

表1总结了对48次进样的预期质量数测量的质量数误差，这些进样代表六种抗体（NIST*mAb*、曲妥珠单抗、英夫利昔单抗、贝伐单抗、利妥昔单抗和奥马珠单抗）的8次重复进样。结果发现，所有进样的质量精度约为10 ppm，每种抗体重复进样的标准偏差小于5 ppm。此表中的数据表明INTACT Mass应用程序可以为快速完整质量数筛选项目提供一致且有用的结果。



mAb名称	预期 质量数 (Da)	样品质量误差(ppm)								平均 质量误差 (ppm)	质量误差 标准差 (ppm)
		1	2	3	4	5	6	7	8		
NISTmAb	148036.5	8.8	9.8	11	7.3	11.2	10.7	9.2	13.2	10.15	1.79
曲妥珠单抗	148056.5	9.7	12.1	14.5	11.9	14.8	15.7	16.3	5.0	12.5	3.75
英夫利昔单抗	148513.5	6.7	0.5	6.5	-3	3.2	4.3	10.7	7.7	4.58	4.33
贝伐单抗	149197.5	7.8	8.8	7.6	8.2	9.4	10.8	7.8	9.1	8.69	1.08
利妥昔单抗	147075.5	9.2	7.6	7.7	8.8	8.8	6.1	6.1	6.3	7.58	1.29
奥马珠单抗	149171.5	1.5	-0.6	-3.8	-2.5	-1.8	-1.5	-0.3	-1.9	-1.36	1.59

表1.48次进样的质量精度汇总，代表六种抗体，每种抗体重复进样8次。

以NISTmAb样品（概览中的样品5）为例，我们可以访问汇总的单个样品信息及其自动生成的报告（图8）。

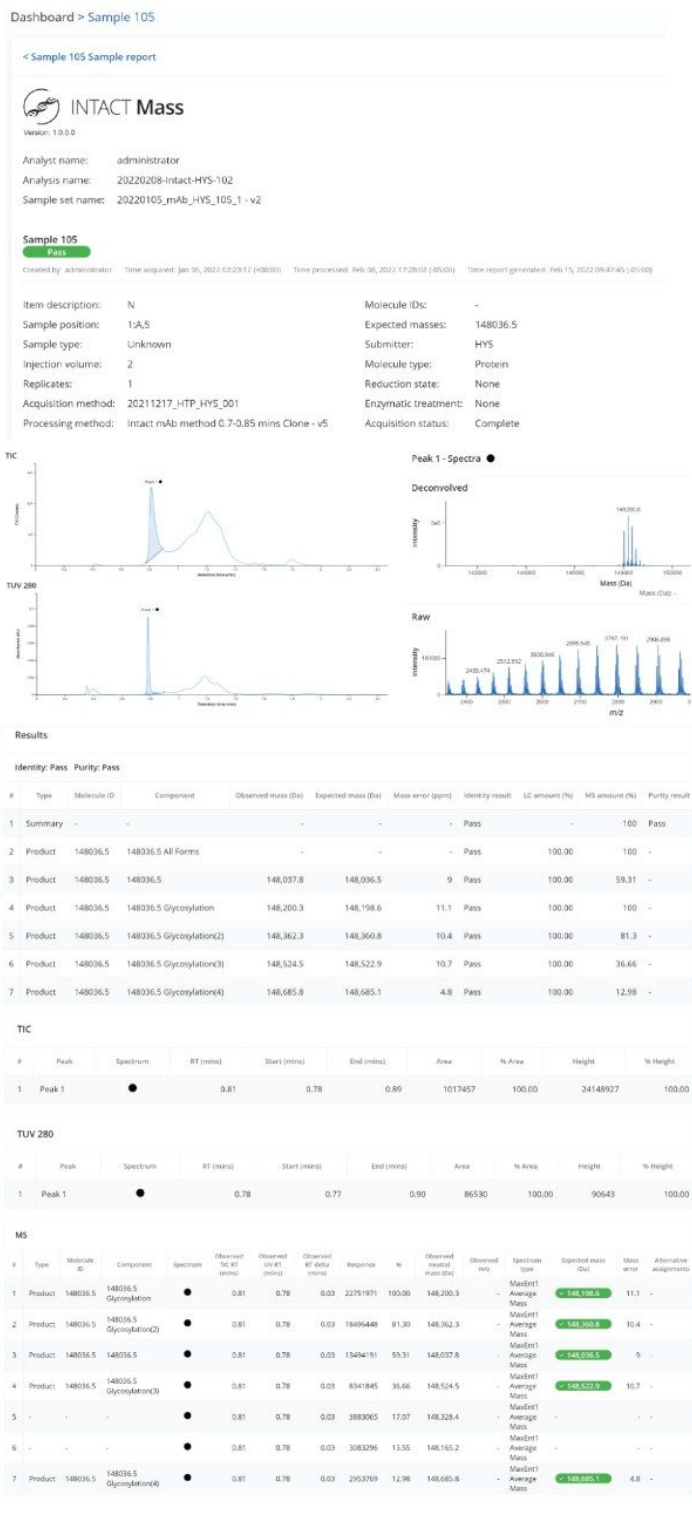


图8.48孔样品板中样品5 (NISTmAb)的报告。其中有实验信息、TIC和TUV色谱图，并注明积分峰、已鉴定组分及

其指定的修饰，以及质量精度和纯度信息的计算结果。调整好格式的报告还将提供可视化的原始和去卷积谱图数据。

48孔板样品组中样品5（NISTmAb进样）的实验结果如图8所示。这份易于阅读的标准化报告模板包含以下信息：带有积分峰TIC和TUV色谱图、已鉴定组分及其指定的修饰、质量精度和纯度信息的计算结果，以及原始和去卷积谱图等。得益于自动化MaxEnt1设置，我们可以通过单一平台的采集处理方法来分析多种样品。对于NISTmAb样品5，前5种主要糖型的测量质量精度约为10 ppm。在曲妥珠单抗、英夫利昔单抗、贝伐单抗、利妥昔单抗和奥马珠单抗样品中观察到类似的糖型质量精度（数据未显示）。

还计算了已鉴定组分的相对百分比（相对于基峰），发现重复样品的结果一致（数据未显示）。还可以在以样品为中心的报告中以表格形式查看来自TIC、TUV和MS数据的其他定量信息。

除了完整mAb高通量分析实验外，我们还使用沃特世单克隆抗体(NISTmAb)亚基标准品作为测试样品实施了IdeS酶解mAb亚基分析实验，旨在展示该应用程序在多分析物样品背景下的自动色谱峰检测和光谱去卷积功能。

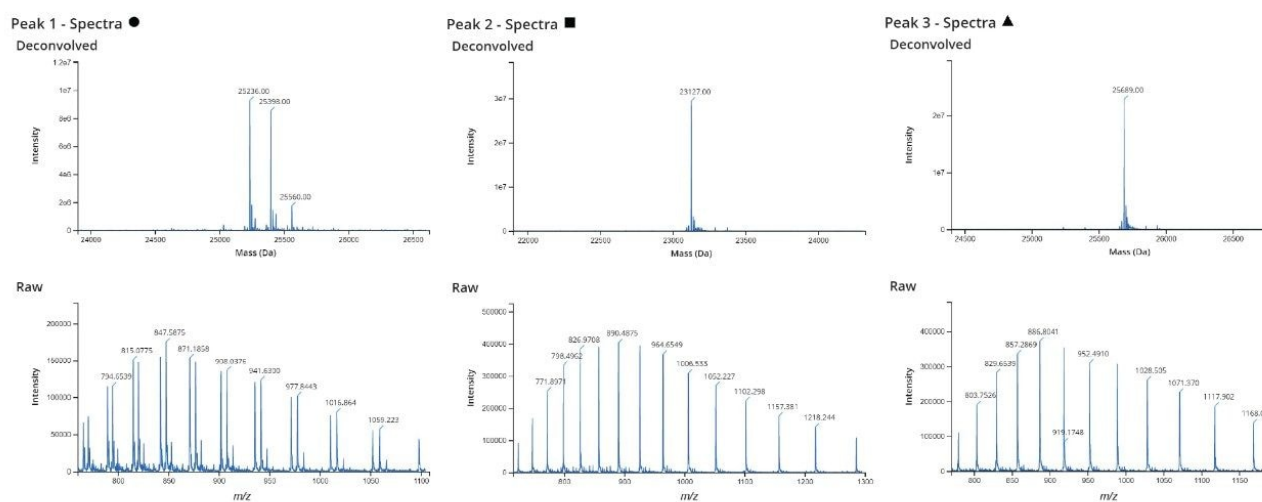
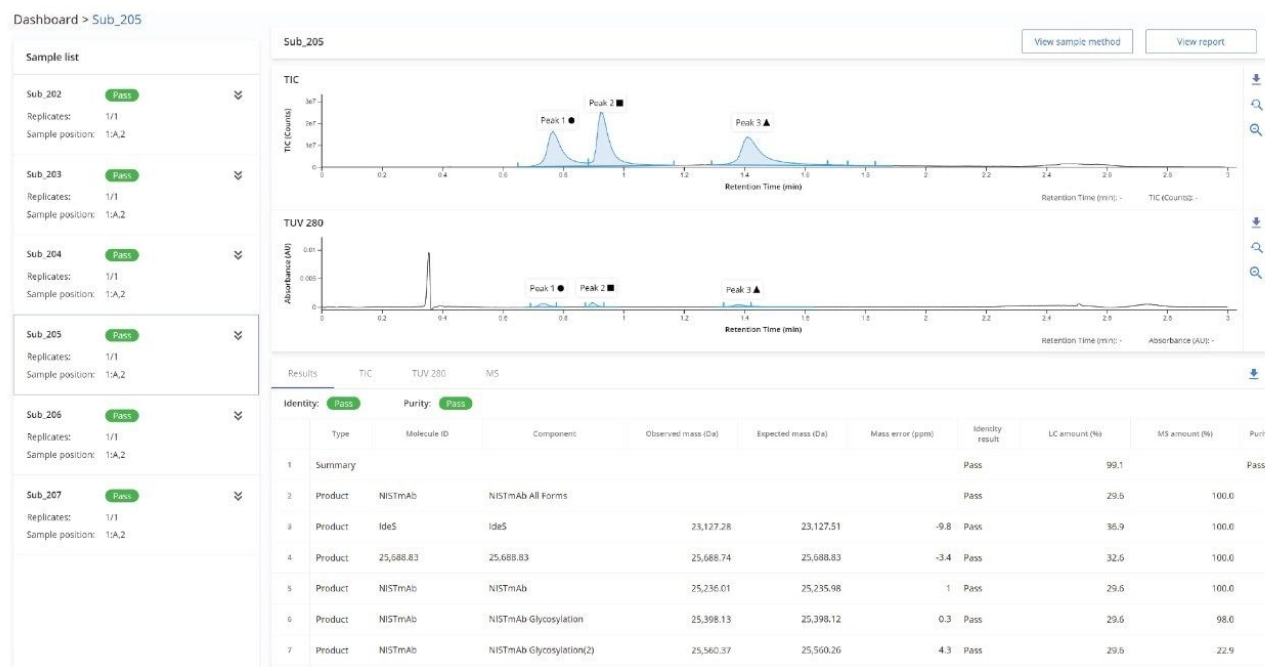


图9.沃特世单克隆抗体(NISTmAb)亚基标准品结果。TIC和TUV色谱图显示，在3分钟梯度LC-MS运行中分离出了scFc、LC和Fd亚基的三个主要峰。经测量，分配的25 kDa亚基及其修饰的质量精度约为5 ppm。结合三个亚基的TIC峰计算得到峰纯度为99.1%。原始和去卷积的亚基谱图见图9的下图。

在新推出的ACQUITY Premier BEH C4蛋白分析专用柱（300 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm，沃特世部件号：186010326）上，采用3分钟LC梯度分析了Waters NISTmAb亚基标准品。使用0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸的

乙腈溶液作为流动相分离scFc、LC和Fd亚基的三个主要峰，发现平均质量数误差约为5 ppm。结合三个亚基的TIC峰面积计算得到峰纯度为99.1%。

对于使用该方法筛选样品或监测属性的实验室，尤其是在需要开展涉及大量样品的研究时，自动化处理完整蛋白质LC-MS数据的能力是提高效率的关键。这种创建平台方法以通过单次运行实现多样品组分析的能力不仅有利于发现组织（这些组织经常面对这样的挑战），也有利于那些希望通过将大量样品分组进行批量分析以简化操作的核心实验室。通过将高效分离、强大而简单的检测器以及合规平台上的自动采集/处理相结合，这种方法有望得到更广泛的部署，特别是在以前一直苦于部署此类方法的生产质量组织中。

结论

- waters_connect INTACT Mass应用程序可简化集成式工作流程，采集、处理和报告生物治疗药物的去卷积质量数数据，并且能够部署在受法规管制和不受管制的环境中。
- 此应用程序支持的分析工作流程包括使用光学、TIC或质谱方法进行的目标质量数确认、非目标分析和纯度评估。
- 借助于色谱峰检测的自动化以及MaxEnt1和BayesSpray去卷积算法，可以开发基于平台的方法，以查看单个样品组中的多种分子，同时保留与样品特定规格进行比较的能力。
- 在本研究中，waters_connect INTACT Mass应用程序在评估使用快速脱盐LC-MS方法在48孔样品板上分析的六种市售mAb重复样品时，以及针对IdeS酶解和还原的NISTmAb亚基样品经过快速梯度分离得到的多色谱峰，提供了低ppm的质量数确认数据。

参考资料

1. Ferrige, A., *et al.* Disentangling Electrospray Spectra with Maximum Entropy, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 6(1992), pages 707–711.
2. Skilling, J., *et al.* Beyond MaxEnt Deconvolution: Increasing the Fidelity and Universal Applicability of Mass Spectral Deconvolution Routines for Biomolecules with the Application of Bayesian Probability Theory Analytical Chromatography, Waters Poster [720003756 <](#)

<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=10180413> , 2010.

3. Berger.S. Boyce, P., Beyond INTACT Mass Application within waters_connect, *Waters Vblog*, 2022.

<https://blog.waters.com/automating-intact-mass-deconvolution-its-about-time> <

<https://blog.waters.com/automating-intact-mass-deconvolution-its-about-time>>

4. Doneanu, C., *et al.*使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord系统和自动化waters_connect INTACT Mass应用程序对单向导RNA杂质进行LC-MS分析, 沃特世应用纪要, **720007546ZH**, 2022.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007547ZH, 2022年2月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私声明](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)