



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法

Determination of protein molecular weight by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 分析方法原理	4
5 试剂和材料	4
6 仪器	5
7 样品处理	5
8 分析步骤及方法	5
9 数据质量的保证	6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由全国仪器分析测试标准化技术委员会（SAC/TC 481）提出并归口。

本文件主要起草单位：

本文件主要起草人：

蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法

1 范围

本文件规定了使用液相色谱-飞行时间质谱联用法进行蛋白质分子量的测量以及对测量数据进行分析的通用规则。

本文件适用于重组蛋白质、组织提取蛋白质以及合成蛋白质及高分子量多肽的分子量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。

《中国药典》三部 - 人用重组 DNA 蛋白制品总论

《中国药典》三部 - 人用重组单克隆抗体制品总论

《中国药典》0431 质谱法

European Pharmacopeia 2.2.43. MASS SPECTROMETRY

USP 736 Mass spectrometry

GB/T 6041-2020 质谱分析方法通则

GB/T 37849-2019 液相色谱飞行时间质谱联用仪性能测定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 重组蛋白质 recombinant proteins

重组蛋白质是采用重组 DNA 技术，利用质粒或病毒载体，将编码所需蛋白质的基因导入适当的宿主细胞，通过宿主细胞表达，并经过提取纯化等步骤获得的蛋白质。

3.2 平均分子量 average molecular mass

根据分子式，按组成元素的平均原子量计算所得的分子量。如碳元素按 12.0107 计算，氢元素按 1.0079 计算。

3.3 单同位素分子量 isotope molecular mass

根据分子式，按组成元素的最低同位素原子量计算所得的分子量。如碳元素按 12.0000 计算，氢元素按 1.0078 计算。

3.4 质荷比 mass to charge ratio, m/z

质荷比指带电离子的质量与所带电荷之比值，以 m/z 表示。

3.5 电喷雾离子化 ESI, electrospray ionization

在高电压电场作用下，样品溶液由毛细管中喷出，形成带电雾滴；雾滴中溶剂蒸发，雾滴变小，库仑力增大，发生分裂；该过程多次重复，带电雾滴的尺寸达到纳米级别，液相中离子转变为气相离子，从而进入质谱仪被检测。

3.6 飞行时间质谱仪 time-of-flight mass spectrometer

飞行时间质谱仪采用飞行时间质量分析器进行离子质荷比分离。由离子源产生的离子在加速电场作用后以恒定速度经过高真空无场离子漂移管到达离子接收器。离子的速度与离子的质荷比平方根成反比，离子质量越大，到达接收器所用时间越长；反之，质量越小，到达接收器所用时间越短。因此可以根据离子到达接收器所用时间把不同质量的离子按质荷比大小进行分离。

3.7 离子阱质谱仪 ion trap mass spectrometer

以离子阱作为质量分析器的质谱分析仪器。离子阱质量分析器是基于四极场理论对带电粒子进行捕获，囚禁，储存，筛选以及分离的质量分析装置。

3.8 质量轴校准 calibration

使用校准溶液调整质谱仪的质量轴，将实测质荷比与校准溶液中已知的一系列质荷比进行匹配。

3.9 扫描范围 scan range

质谱仪采集数据时扫描的质荷比范围，测定时应根据待测蛋白质的分子量大小及离子化特性选择合适的扫描范围。

3.10 总离子流图 total ion chromatogram, TIC

在色谱-质谱联用分析中，质谱检测器的总离子流强度随时间的变化曲线。又称总离子流色谱图。

3.11 原始质谱图 raw spectrum

采用电喷雾离子化检测时，待测蛋白的质谱采集数据加合在一起得到质谱图，由一系列连续的多价态带正电荷的峰组成，相邻峰所带电荷数差值为 1。

3.12 解卷积 deconvolution

蛋白的原始质谱图通过软件算法，将一系列连续多价态带正电荷的质谱数据转换成不带电荷的蛋白分子量数据的过程。

4 分析方法原理

待测蛋白根据其性质在液相色谱中进行分离，然后进入质谱仪的离子源区域，通过电喷雾离子化成为带电离子，带电离子经过一系列离子透镜聚焦后进入飞行时间或离子阱等质量分析器，由检测器检测并记录各带电离子的飞行时间及离子丰度数据，分析软件自动根据离子的飞行参数计算其 m/z ，最终得到蛋白的多价态质谱数据，并经解卷积化处理后获得蛋白的分子量。

5 试剂和材料

5.1 水

符合 GB/T 6682 中实验用水一级水规格。

5.2 气体

氮气需干燥、无油，纯度不低于 95%，出口压力需与相应质谱仪适配，通常由氮气发生器提供；如使用氩气应符合 GB/T 4842 中纯氩的标准。

5.3 试剂

甲酸、乙腈等试剂使用质谱级。质量轴校准试剂需与相应型号质谱仪适配。

5.4 标准物质

系统适用性标准品用于评估仪器的性能，需与相应型号质谱仪适配。

5.5 色谱柱

色谱柱所适用的流动相及流速需与质谱仪的离子源适配。

6 仪器

6.1 液相色谱仪

液相色谱仪由流动相传输系统、样品管理系统、带温控的色谱柱管理器组成。流动相传输系统可以是四元混合或者二元混合；样品管理系统带温控并配备进样针清洗程序以避免交叉污染。

6.2 质谱仪

质谱仪包括离子源、离子聚焦系统、量分析器、检测器、真空系统和数据处理系统组成。

6.3 安装环境及仪器性能

为保证仪器测量结果稳定，安装环境温度应控制在 15-28℃，温度波动在 2℃ 以内；相对湿度必须在 20%至 80%范围内，无冷凝。仪器在投入使用前，需使用校准试剂对质量轴进行校正，并使用系统适用性标准品评估仪器的性能，确定仪器的灵敏度、分辨率及质量检测范围等指标。

7 样品处理

样品一般为水溶液，如其中含无机盐、变性剂等对质谱有干扰的物质，应采用适宜的方式去除，如超滤、透析、脱盐柱等；如样品为多个亚基通过二硫键等共价键形成的多聚体，可根据实验目的进行还原等前处理，以测定不同亚基的分子量；如样品含有糖基化等结构修饰，可采用糖苷酶酶切去除糖基，以去除糖基异质性的干扰，获得准确的蛋白分子量。处理过程应避免对蛋白的结构产生影响。如对样品中的蛋白组分进行相对定量分析，还需避免处理过程对不同组分蛋白相对含量的影响。

8 分析步骤及方法

8.1 分析条件的选择

8.1.1 仪器开机

按照仪器操作说明书对仪器进行开机预热，确认仪器各模块与电脑操作软件连接成功，确认液相色谱仪的管路与质谱仪离子源连接正确。根据仪器类型及实验要求进行实验前的准备，如液相色谱仪的管路冲洗、进样针冲洗以及质谱仪抽真空等。

8.1.2 仪器参数的选择

根据实验需求选择合适的色谱柱类型，并配制适宜的流动相，设置柱温箱及样品池温度。液相一般选择反相分离模式，应根据蛋白性质选择合适的色谱柱，如大分子蛋白可选择 C4 色谱柱，小分子蛋白或多肽可采用 C18 色谱柱；色谱柱的流速范围应与质谱仪的离子源相匹配；柱温可选择室温至 80℃ 范围内。将质谱仪调节至运行模式，根据分析需求设置离子源的电压、温度以及气体流速。

8.2 测试前准备

8.2.1 液相色谱仪准备

按液相操作要求对液相进行灌注、平衡系统等操作。

8.2.2 质谱仪准备

按质谱仪操作要求进行质谱质量轴校正。

8.3 进样

根据实验需求，可先进一针空白样品以确认仪器、软件等各系统运行正常，并确定检测基线正常，无残留干扰物的影响。由于不同仪器灵敏度的差异，以及不同蛋白离子化效率的差异，应根据实际情况选择合适的进样量，一般进样量为 1~10 μ g。为避免多余样品对质谱仪的污染，原则上应在可获得理想数据的情况下，尽量减小进样量。

8.4 数据分析

样品采集结束后，可对原始数据进行初步评价，确定得到正常的质谱数据，并用数据处理软件进行解卷积化等处理，获得蛋白的实测分子量（单同位素分子量或平均分子量）。

应将蛋白的实测分子量与理论值进行比对，如测定误差在所用仪器检测误差范围内，可认为实测分子量与理论值一致。如测定误差超出所用仪器的检测误差，可进一步采取措施确定误差的来源：可对已知分子量的类似蛋白质参照物进行分子量测定以排除仪器可能存在的问题；还可结合相关研究数据评估待测蛋白可能存在的结构修饰，并分析其对分子量的影响。

9 数据质量的保证

9.1 仪器性能的检查与确认

正式测定前可根据具体情况使用系统适用性标准品对质谱仪进行性能检查，并保留检查记录。

9.2 数据质量的控制

9.2.1 原始数据

9.2.1.1 TIC 图

在色谱分离有效梯度时间内，有与背景明显区别的色谱峰，如下图：

9.2.1.2 原始质谱图

有与背景有明显区别的、且有一系列多簇代表样品不同电荷状态的 m/z 值，如下图：

9.2.1.3 解卷积数据处理:

在解卷积软件中设置合理的参数进行数据处理,将解卷积后的数据与原始数据进行对比,峰的数目和相对强度一致则参数设置合理。

9.2.2 测量准确度

如有已知理论分子量的标准物质,可计算分子量测定的准确度,通常以 ppm 为单位,计算公式如下:

$$\text{测量准确度} = \frac{\text{测量的分子量} - \text{理论分子量}}{\text{理论分子量}} \times 10^6$$

附录

1 液相色谱-质谱仪操作条件（建议条件，比较常用）

1) 样品准备

样品进行脱盐处理，将其浓度调节为 1 mg/mL。

2) 液相色谱仪参数：

色谱柱：C4，粒径 1.7 μ m，2.1mm \times 50mm，或类似色谱柱，柱温：60 $^{\circ}$ C。

流动相 A：0.1%甲酸水溶液，流动相 B：0.1%甲酸乙腈溶液。

流速：0.2mL/min

梯度如下表：

时间 (min)	A (%)	B (%)	曲线
0.00	95	5	初始
1.00	95	5	6
6.00	15	85	6
7.00	0	100	6
7.50	0	100	6
8.00	95	5	6
10.00	95	95	6

3) 质谱仪参数（电喷雾-飞行时间质谱仪）：

采集模式：正离子，全扫描

扫描质量范围：500-3000 m/z

扫描速率：2 Hz

锥孔电压：70 V

毛细管电压：3 KV

脱溶剂气温度：550 $^{\circ}$ C