

蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法

编制说明

(征求意见稿)

标准起草小组

2024年11月

目录

一、任务来源.....	3
二、立项目的和意义.....	3
三、标准制定过程.....	3
1、项目申报.....	3
2、立项.....	4
四、技术依据.....	4
五、标准编制原则.....	4
六、检测、验证、比对实验.....	4
七、标准中涉及专利的情况.....	9
八、预期达到的社会效益.....	9
九、与现行法律、法规、强制性国家标准及相关标准的关系.....	9
十、重大分歧意见的处理和依据.....	9
十一、标准作为强制性或推荐性国家（或行业）标准的建议.....	9
十二、贯彻标准的要求和措施建议.....	10
十三、废止现行有关标准的建议.....	10
十四、其它应予说明的事项.....	10

一、任务来源

2023年12月1日，国家标准化管理委员会下达《2023年第三批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划》（国标委发[2023]58号），批准了《蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法》（计划号：20231497-T-306）国家标准制修订的项目计划，由全国仪器分析测试标准化技术委员会（下称 TC 481）归口。项目由中国计量科学研究院，中国食品药品检定研究院，安捷伦科技有限公司，北京理工大学，上海张江生物技术有限公司，南京理工大学起草，项目周期18个月，应完成报批日期为2025年6月1日。

二、立项目的和意义

近年来，利用重组DNA技术研究和生产蛋白质在抗体、胰岛素等治疗用药物、疫苗、农业、酶工业、化妆品等领域蓬勃发展，目前国内有几千家企业或实验室进行重组蛋白的研究与开发。同时，生物技术的快速发展对质量监管和检测实验室的能力也提出了新的要求。

与小分子相比，重组蛋白结构复杂，理化性质相对不稳定，并且由于翻译后修饰或二硫键等造成天生的“非均一性”的特点，液相色谱-飞行时间质谱联用法具有分辨率高，专属性好、快速且灵敏的优势，已逐渐成为重组蛋白鉴别、结构表征和质量控制的重要手段。ICH Q6，《欧洲药典》、《美国药典》及《中国药典》均将重组蛋白的质谱分子量测量和翻译后修饰作为蛋白质药物理化特性分析的基本要求。然而，国内外药典中除了质谱法和重组蛋白的通用技术要求外，却没有相关的标准对如何进行重组蛋白的质谱分子量测量进行规范。

液相色谱-飞行时间质谱法作为一项越来越普及的分析重组蛋白理化特性的技术手段，制定标准技术要求不仅迫在眉睫，而且对于规范行业发展具有重要意义。

本标准拟对液相色谱-飞行时间质谱联用法测量重组蛋白分子量和翻译后修饰的通用技术要求进行规定，推动相关国家和行业标准规范地使用相关术语、技术名称、参数指标，推进质谱法测量重组蛋白分子量方法的标准化，促进其在重组蛋白生产和使用的相关企业实验室、检测实验室、科研单位和技术部门的推广应用，也同时推动国产质谱仪的技术发展。

三、标准制定过程

1、项目申报

2021年5月，TC 481发文《关于2021年国家标准计划项目征集的通知》，起草单位便着手对国内外的相关标准和资料开展调研收集工作，根据日常检测经验及收集到的资料，编写《蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法》

推荐性国家标准申报材料（项目申报书、项目建议书及标准草案），2021年12月初，标准负责起草单位将完成的标准申报材料提交至 TC 481 秘书处。

2021年12月，TC 481 三届三次会议暨 2021 年年会，该项目获得了全体委员的审议通过，并由 TC 481 负责申报至科技部和国家标准化管理委员会。

2、立项

2023年12月1日，国家标准化管理委员会下达《2023年第三批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划》（国标委发[2023]58号），批准了《蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法》（计划号：20231497-T-306）国家标准制修订的项目计划，由全国仪器分析测试标准化技术委员会（下称 TC 481）归口。

四、技术依据

立足于蛋白质分子量测定标准的亟需性，旨在推进质谱法测量重组蛋白分子量方法的标准化，在现有国家行业标准的基础上，提出《蛋白质分子量测定 液相色谱-飞行时间质谱联用法》推荐行国家标准。本标准制订以国内实际情况出发，体现科学性、合理性、先进性、实用性，主要依据及参考了以下文件：

《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

五、标准编制原则

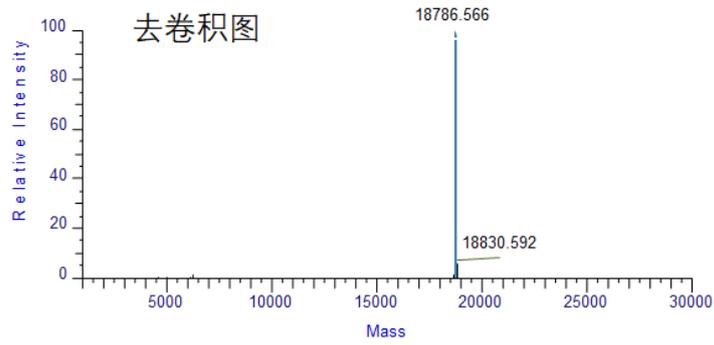
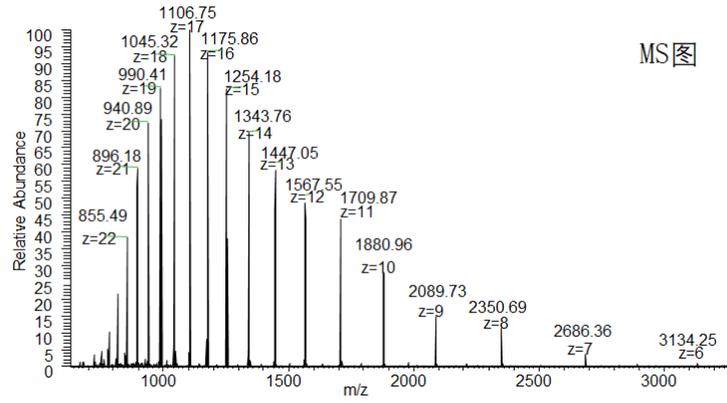
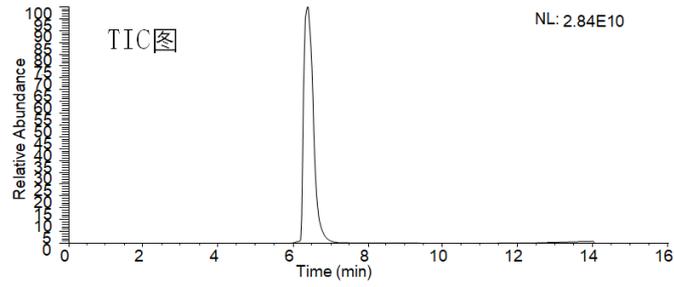
- 1、符合国家法律、法规的有关要求，不与已有标准冲突。
- 2、符合我国标准制修订管理工作规程对编制程序和工作规定和要求。
- 3、符合标准的科学性、先进性、实用性的要求。标准的测试项目操作性强。

4、符合我国当前大力提升检测技术的要求，能够满足我国对进口仪器性能指标客观评价的需求，将对国内用户依据自身需求选择最佳仪器型号提供技术参考。鉴于此，对于测试内容，没有给出具体技术指标，使用的标准仅供参考，用户完全可以根据自己的需要，参照标准，选择更合适的标准物质和方法进行测试。

六、检测、验证、比对实验

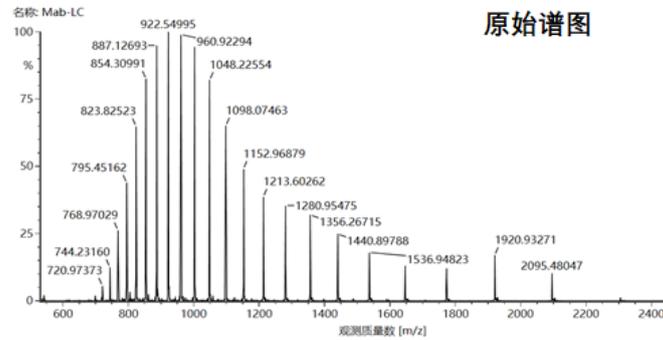
本部分采用不同仪器对几种有代表性的蛋白进行了分子量测定，结果如下：

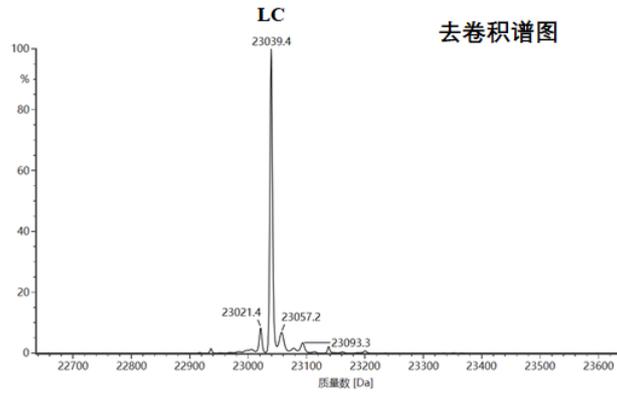
- 1、无糖基化等修饰，分子量较小的蛋白



理论分子量	分子量	可能的修饰	偏差 (ppm)
18786.566	18786.676	-	5.9

2、单抗还原处理后得到的抗体轻链

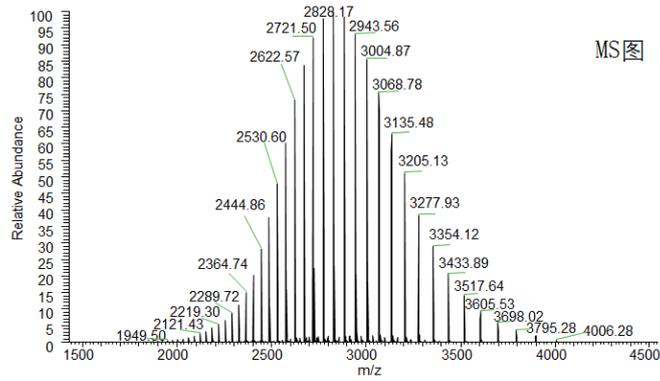
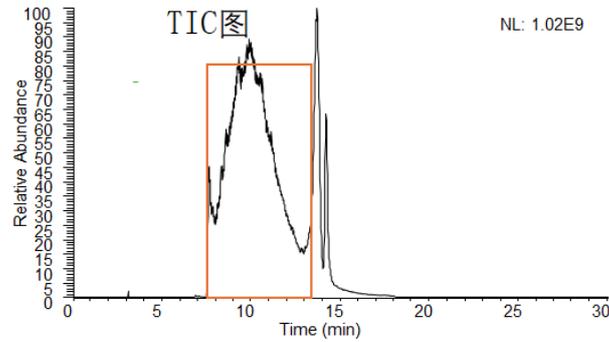




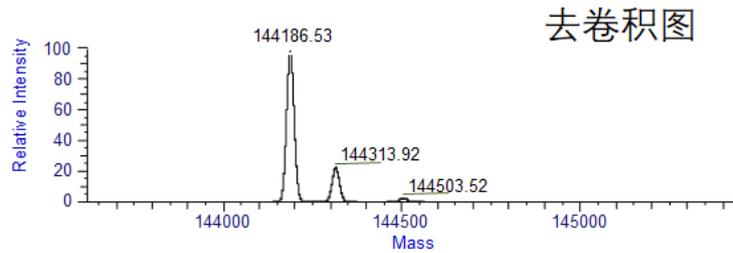
去卷积谱图

蛋白质名称	修饰	预期质量数 (Da)	观测质量数 (Da)	质量数误差 (ppm)
1 LC	Pyroglutamic Acid Q N-TERM (1)	23039.38440	23039.3873	0.1

3、切除 N 糖的完整抗体



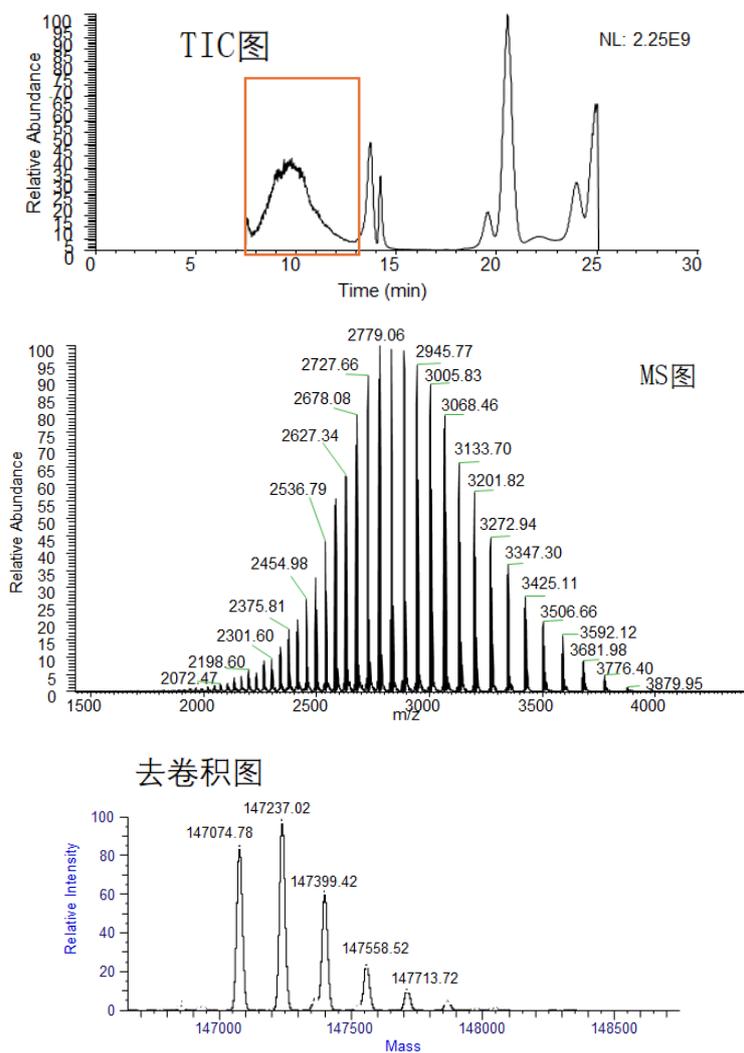
MS图



去卷积图

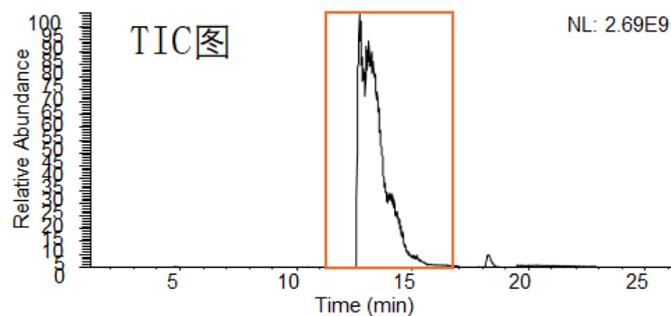
理论分子量	分子量	可能的修饰	偏差 (ppm)
144186.53	144186.64	N 糖基化位点脱酰胺	0.8

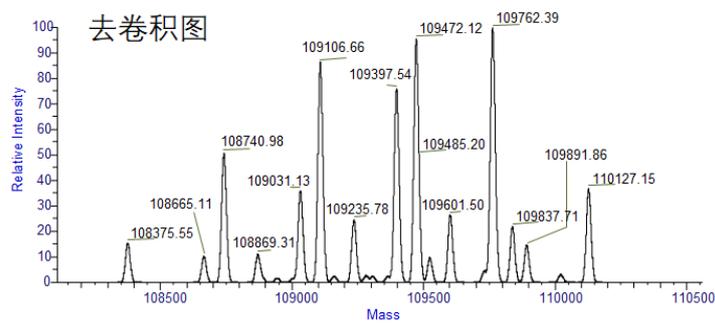
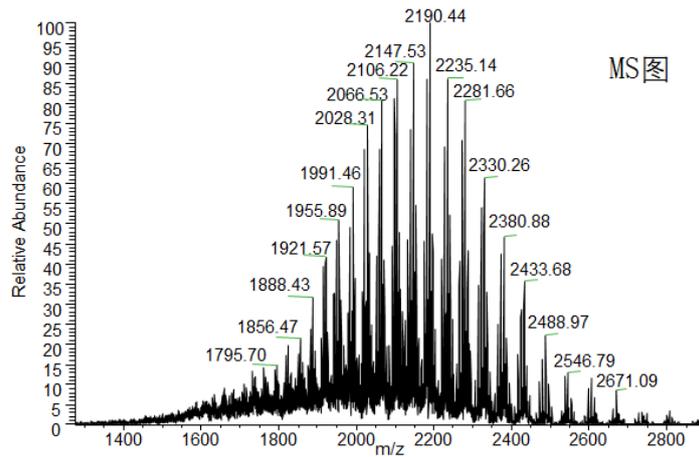
4、含糖基化修饰的完整抗体



理论分子量	分子量	可能的修饰	偏差 (ppm)
147237.02	147237.49	1x A2G0F, 1x A2G1F	3.2
147074.78	147075.35	2x A2G0F	3.9
147399.42	147399.63	2x A2G1F	1.4

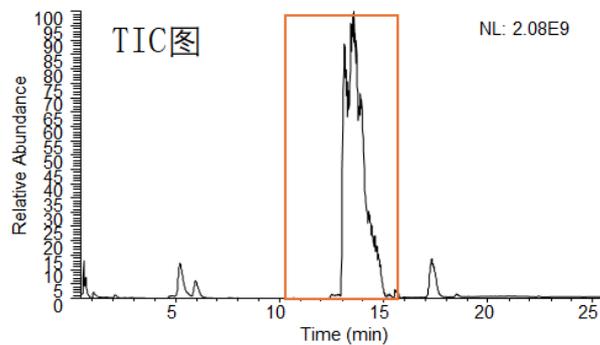
5、复杂糖蛋白切除 N 糖和末端神经氨酸

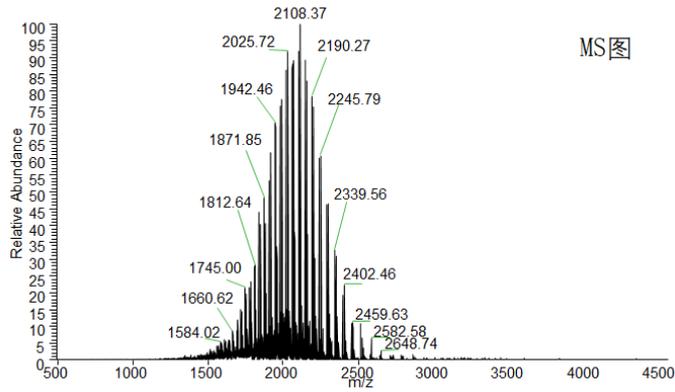




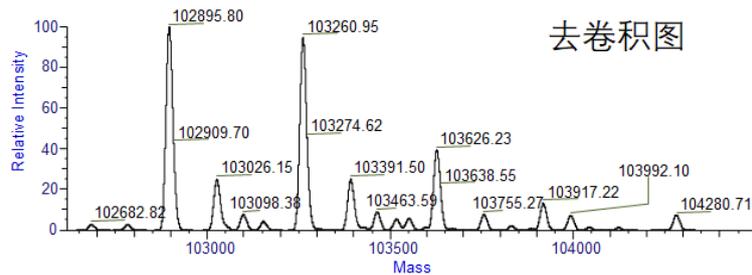
理论分子量	分子量	可能的修饰	偏差 (ppm)
108739.5	108740.98	8xGalNAc-3G,5xGalNAc-6GGn-3G	14.1
109104.8	109106.66	7xGalNAc-3G,6xGalNAc-6GGn-3G	17.2
109396	109397.54	6xGalNAc-3G,6xGalNAc-6GGn-3G,1xGalNAc-3SG	13.7
109470.1	109472.12	5xGalNAc-3G,7xGalNAc-6GGn-3G	18.4
109761.4	109762.39	19xGalNAc-3G,1xGalNAc-3SG	9.3
110126.7	110127.15	20xGalNAc-3G,1xGalNAc-3SG	4.1

6、复杂糖蛋白切除 N 糖，残留有 O 糖





MS图



去卷积图

理论分子量	实测分子量	修饰	偏差(ppm)
102894.12	102895.8	2xGalNAc-3G	16.3
103259.45	103260.95	3xGalNAc-3G	14.5
103624.78	103626.23	4xGalNAc-3G	14.0

七、标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利和知识产权问题。

八、预期达到的社会效益

本标准充分考虑了目前国内各领域生产、研发、应用和检测的蛋白质分子量检测水平。本标准颁布执行后，将在国内形成蛋白质分子量的统一的分析测试通则标准，提高蛋白质分子量分析方法的标准水平，对于增加各机构检测数据之间的可靠性和可比性，助力我国蛋白质分子量测定的发展发挥着十分重要的作用。

九、与现行法律、法规、强制性国家标准及相关标准的关系

本标准与现行法律、法规和相关标准相协调、无冲突。

十、重大分歧意见的处理和依据

无重大分歧。

十一、标准作为强制性或推荐性国家（或行业）标准的建议

建议本标准为推荐性国家标准。

十二. 贯彻标准的要求和措施建议

该标准有中文版和英文版,标准发布实施后,在一定范围内对标准培训宣贯,使得本标准得到有效实施。

十三. 废止现行有关标准的建议

本标准为首次制定,不涉及相关标准的废止。

十四. 其它应予说明的事项

无。