

国家计量技术规范
《纯度标准物质定值技术要求 蛋白质纯度标准物质》

编制说明

编制工作组

2025年6月

《纯度标准物质定值技术要求 蛋白质纯度标准物质》

编制说明

一、任务来源

本规范制定任务来源于《市场监管总局办公厅关于印发 2024 年国家计量技术规范制定、修订及宣贯计划的通知（市监计量发〔2024〕40 号）》。

二、规范编制的必要性和重要性

随着生命科学的发展和生物技术的进步，蛋白质测量被广泛的应用于生物医药、体外诊断、食品检测等领域，蛋白质标准物质的需求与日俱增。近年来国内外蛋白质纯度标准物质研制数量不断增加，研制技术日趋成熟。国际上已经开展了相关蛋白质纯度国际比对研究，定值手段日益完善。目前，正在朝大分子量蛋白、带有多个二硫键及翻译后修饰蛋白纯度表征方向发展，对蛋白质纯度标准物质研制规范的需求变得更为迫切。目前围绕纯度标准物质研制，已经发布了 JJF 1855-2020 《纯度标准物质定值计量技术规范 有机物纯度标准物质》、JJF 1961-2022 《纯度标准物质定值计量技术规范 高纯金属纯度标准物质》等技术规范，但是这些规范并不能满足蛋白质纯度标准物质研制的需求。

首先，根据国际标准 ISO 17511:2020，蛋白质纯度标准物质是量值溯源传递的源头，对于保证蛋白质检测结果的准确可比具有十分重要的意义。当前实现到 SI 单位的溯源已成为国际计量领域的发展方向，要实现溯源到 SI，必须有蛋白质纯度标准物质作为量值的源头。

第二，近年来，蛋白质纯度标准物质的研制单位正逐渐从国家计量院扩展到省市计量机构、高校、研究院所以及企业。蛋白质标准物质是目前我国已有生物类标准物质细分领域中数量最多的一类标准物质，我国已有蛋白质标准物质数量世界第一，并且待研制的蛋白质标准物质规模巨大。以体外诊断为例，常用蛋白类检测项目~500 项，现有标准物质的仅 50~70 项，同时生物医药、生物农业、生物安全、食品安全等领域也有庞大的蛋白质标准物质研制需求。蛋白类有证标准研制和复制急需规范指导和统一的研制原则。

第三，蛋白质纯度标准物质研制规范的缺乏导致评审中若干技术细节没有依据，无法把握评审尺度，例如基于氨基酸分析的同位素稀释质谱测定蛋白质纯度时至少应选取几个氨基酸的数据在 JJF 1343 等通用规范中没有规定，造成专家意见的不一致。

因此，为了保证蛋白质纯度标准物质研制的规范性与量值的准确性，有必要起草蛋白质纯度标准物质研制技术规范。

三、编制过程

1.立项批准：2024 年 6 月，中国计量科学研究院收到国家市场监督管理总局下发的市监计量发〔2024〕40 号文件，批准《纯度标准物质定值技术要求 蛋白质纯度标准物质》正式立项。

2.组建编制组：2024 年 9 月，中国计量科学研究院联合相关单位组建了《纯度标准物质定值技术要求 蛋白质纯度标准物质》编制组，包括广东省计量科学研究院、上海市计量测试技术研究院、南京市计量监督检测院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所等参与起草。

3.首次会议：2024 年 9 月 23 日，中国计量科学研究院组织召开首次会议，讨论标准包含的内容、主要技术指标等问题，商定标准起草的主要思路和起草原则。

4.第二次会议：2025 年 5 月 12 日，中国计量科学研究员组织召开第二次会议，对首次会议后完成的草稿进行讨论，对规范草案逐条进行研读推敲，形成规范征求意见稿。

四、编写依据及原则

本技术规范为首次制定，旨在规范蛋白质纯度标准物质的定值过程，以促进研制的标准物质的质量，同时为主管部门审批标准物质提供技术依据。

本技术规范的主要编制依据包括：JJF1001 通用计量术语及定义、JJF1005 标准物质常用术语和定义、JJF1343 标准物质定值的通用原则及统计学原理、JJF1059.1 测量不确定度的评定与表示、JJF1186 标准物质认定证书和标签内容编写规则、JJF1218 标准物质研制报告编写规则等。

五、规范的主要内容与技术要点

（一）主要内容

本规范共十章和一个资料性附录：1 范围、2 引用文件、3 术语和定义、4 通用要求、5 定值方法的技术要求、6 定值结果的不确定度评定。

（二）技术要点

1) 术语与计量单位的选择

术语和计量单位的选择遵照 JJF 1001—2011《通用计量术语及定义》和 JJF1265—2022《生物计量术语及定义》选择和使用，同时对规范中使用的肽、蛋白质、序列、翻译后修饰、生物学变异、纯度、质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁共振法进行了定义。

2) 范围

本规范适用于序列清晰、无复杂翻译后修饰或修饰可清晰表征、无复杂生物学变异或变异可清晰表征、无人为同位素富集、标记或修饰的肽及蛋白质固体纯品、冻干品或溶液中单一肽或蛋白质纯度的标准物质的研制。。

3) 通用要求

规范对标准物质候选物的筛选、定性分析及纯度定值方式提出了明确的通用要求。在标准物质候选物的筛选方面，规范要求候选物应具备结构明确、修饰可控的特性，优先选择序列清晰、无复杂翻译后修饰或修饰可清晰表征的肽或蛋白质，避免人为同位素富集或标记。候选物需在常用分析溶剂中具有良好的溶解性，并具备较高的纯度、均匀性和稳定性。对于重组蛋白，若保留标签，需确保标签不影响预期用途，且不成为蛋白的主体部分。此外，候选物确定后，需明确定义被测量（如纯度、修饰状态等），并确保其与预期用途一致。对于复杂修饰或非均一蛋白（如糖基化蛋白、金属蛋白等），需明确被测量是否包含修饰或配基。候选物中的其他成分（如缓冲盐、稳定剂等）不应干扰定值过程或预期用途，必要时可设定限量要求。候选物的选择还需与定值模式保持一致，例如在研制二级标准物质时，其结构应与一级标准物质一致，以确保量值溯源的可靠性。

在标准物质候选物的定性分析方面，规范对肽和蛋白质提出了具体要求。对于肽，需提供分子量、氨基酸序列、二硫键位置及交联方式等信息，若带有修饰（如磷酸化、乙酰化等），还需明确修饰位点及类型。序列测定推荐采用 Edman

降解法或质谱从头测序，且覆盖率应达到 100%。对于蛋白质，需测定分子量或分子量分布（推荐质谱技术），糖基化蛋白需补充测定去糖后的分子量。蛋白质序列覆盖度通常不低于 70%，关键位点需针对性验证，并提供可靠性说明（如置信水平）。此外，宜提供二硫键位置、翻译后修饰信息，必要时还需分析高级结构或活性，以确保目标蛋白与类似物的可靠区分。

在纯度定值方式的选择上，规范强调应采用两种或两种以上不同原理的独立方法（如质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法等），以排除单一方法的系统误差。国家一级标准物质宜优先采用基准方法或国际比对验证的方法，并避免使用类似原理或溯源至同一标准的方法组合。若仅有一种方法可用，需详细研究其系统误差，并采用多家实验室定值的方式提高可靠性。对于国家二级标准物质，可通过重量法或重量-容量法配制，但需对配制值进行核验，并确保所用仪器经过计量校准。规范还明确禁止采用逆向定值方式（如以基体标准物质为溯源标准）研制蛋白质纯度标准物质，以确保量值传递的准确性和科学性。

4) 定值方法的技术要求

蛋白质纯度标准物质的定值方法需满足高准确性和可溯源性的要求，常用的方法包括质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法等，同时新兴的潜在计量基准方法（如高效液相色谱-圆二色光谱法、单分子计数法等）也在探索中。

质量平衡法基于被测物质量分数总和为100%的原理，通过扣除非目标组分（如结构类似物、水分、无机盐等）计算纯度。该方法要求对杂质进行充分分离和鉴定，采用高效液相色谱或质谱技术定量，并根据杂质含量选择不同的计算公式。若有机纯度 $\geq 98.5\%$ 且无单一杂质超过1%，可简化计算；否则需逐一鉴定并定量主要杂质。水分、挥发性及不挥发性组分需分别采用卡尔费休法、气相色谱法和电感耦合等离子体质谱等技术测定，聚集体分析则依赖凝胶色谱法。

同位素稀释质谱法通过添加同位素标记内标，结合消解、水解或酶解，测定目标蛋白的元素、氨基酸或特异性肽段含量。该方法需特别注意杂质干扰，如杂质产生的相同降解物可能导致正偏差，因此需对杂质进行鉴定和定量修正。基于氨基酸分析时，至少使用3种稳定氨基酸定量；基于特异性肽段时，一级标准物质需每条多肽链分析2条肽段，二级标准物质需至少1条/链，且肽段需满足特异性与稳定性要求。

定量核磁共振法利用氢原子信号积分面积与数量的正比关系测定纯度，需确保定量峰无杂质干扰，可通过改变实验条件或二维核磁验证。内标法要求内标物与样品相容且纯度可溯源，外标法则需严格匹配实验条件以降低不确定度。

重量-容量法适用于二级标准物质的制备，需使用一级标准物质，并在控温环境下精确称量和溶解，最后通过分析方法验证配制值。

此外，其他潜在计量基准方法需满足特异性强、不确定度可控的要求，并在应用前充分验证。

规范起草小组

2025 年 6 月

国家标准物质计量技术委员会规范编制说明