

# 高等仪器分析 实验与技术

主 编 凌笑梅



北京大学医学出版社

# 高等仪器分析实验与技术

主 编 凌笑梅  
编 委 (按姓氏笔画为序)

王丽珺 (北京大学医学部基础医学院)

王映红 (中国医学科学院药物研究所)

冯德荣 (山东省科学院生物研究所山东省生物传感器重点实验室)

刘 一 (北京大学医学部药学院)

孙徐林 (北京大学医学部医药卫生分析中心)

邹霞娟 (北京大学医学部医药卫生分析中心)

陈春英 (中国科学院高能物理研究所)

姜小梅 (北京大学医学部药学院)

凌笑梅 (北京大学医学部药学院)

程 京 (清华大学医学院)

鲍 忠 (北京大学医学部药学院)

北京大学医学出版社

# GAODENG YIQI FENXI SHIYAN YU JISHU

## 图书在版编目 (CIP) 数据

高等仪器分析实验与技术/凌笑梅主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2006. 2  
ISBN 7-81071-958-0

I. 高... II. 凌... III. 仪器分析—实验—研究生—教材 IV. O657—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 001382 号

## 高等仪器分析实验与技术

---

主 编: 凌笑梅

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: [booksale@bjmu.edu.cn](mailto:booksale@bjmu.edu.cn)

印 刷: 莱芜市圣龙印务书刊有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 药 蓉 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 18 字数: 453 千字

版 次: 2006 年 2 月第 1 版 2006 年 2 月第 1 次印刷 印数: 1—2000 册

书 号: ISBN 7-81071-958-0/R·958

定 价: 39.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

# 前 言

仪器分析近年来发展非常迅速,陆续出版了适合本科教育阶段各专业使用的仪器分析理论课教材和实验课教材,但尚未见到适合研究生阶段学习的相关教材。而随着生物医药科学领域的不断发展,对仪器分析的理论与技术不断提出新的要求,许多致力于仪器分析研究领域的科学工作者们不断适应科学发展的需要,在该领域不断创新和突破,极大地推动了生物医药科学领域的发展。所以即将踏入生命科学这一神圣的研究领域的生物医药相关专业研究生们了解并掌握一定的仪器分析的理论与技术是必不可少的。

多年来“高等仪器分析”一直是生物医药相关专业研究生们的必修或选修课程,得到了很大的重视,但是这门课程却一直没有合适的教材来辅以教学和学生的学习,当然这其中有无回避的原因,最主要的一点就是仪器分析技术的日新月异,新技术、新方法层出不穷,要编写出一本能紧跟科学发展步伐的高水平的教材并非易事。本书的编写希望能突破这一点,起到抛砖引玉的作用。

本书共14章40个实验,分别由各有关专业老师执笔编写,内容包括:色谱联用技术(GC-MS、HPLC-DAD、HPLC-LIF、HPLC-MS、HPLC-NMR、HPLC-ELSD、HPLC-ECD、HPLC-CAD和HPLC-ICP-MS)、毛细管电泳技术(CE)、生物质谱技术(Bio-MS)[基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和电喷雾质谱(ESI-TOF-MS)]、表面等离子共振(SPR)技术、生物芯片技术(Biochips)、生物传感器技术(Bio-sensors)。书中涉及的实验与技术内容广泛、方法新颖,不仅介绍了每种分析技术的工作原理及应用,还分别安排了多个有代表性的实验,每个实验侧重在医药领域中的应用。由于参加编写本教材的作者均为一线教学和科研人员,因此,实验注意事项、附录中的分析仪器的使用方法以及分析软件的使用说明都非常具体和实用,特别适合于生物医药领域中研究生和科研工作者使用。

由于时间关系,加之编者水平有限,本书难免存在错误和不足之处,欢迎广大读者在使用过程中积极批评指正。

编 者

2005年11月于北京大学医学部

# 目 录

|  |      |
|--|------|
| <b>第 1 章 气相色谱-质谱联用技术</b> .....         | (1)  |
| 1.1 方法原理 .....                         | (1)  |
| 1.1.1 气相色谱法基本原理 .....                  | (1)  |
| 1.1.2 质谱法基本理论 .....                    | (2)  |
| 1.2 仪器结构与原理 .....                      | (2)  |
| 1.2.1 GC (气相色谱仪) .....                 | (3)  |
| 1.2.2 MS (质谱仪) .....                   | (3)  |
| 1.3 实验技术 .....                         | (9)  |
| 1.3.1 GC-MS 分析条件的选择 .....              | (9)  |
| 1.3.2 GC-MS 数据的采集 .....                | (9)  |
| 1.3.3 GC-MS 得到的信息 .....                | (9)  |
| 1.4 实验 .....                           | (10) |
| 实验 1: GC-MS 联用仪的检定 .....               | (10) |
| 实验 2: 用 GC-MS 分析菊花挥发油成分 .....          | (11) |
| 实验 3: 气相色谱-质谱联用法测定混合多环芳烃 .....         | (12) |
| 附录 1: TRACE 型 GC-MS 使用方法 .....         | (14) |
| 附录 2: Xcalibur GC-MS 数据处理系统使用说明 .....  | (15) |
| <b>第 2 章 高效液相色谱-二极管阵列检测器联用技术</b> ..... | (19) |
| 2.1 方法原理 .....                         | (20) |
| 2.2 仪器结构与原理 .....                      | (20) |
| 2.2.1 高压 (输液) 泵 .....                  | (20) |
| 2.2.2 梯度洗脱装置 .....                     | (22) |
| 2.2.3 流动相在线脱气装置 .....                  | (23) |
| 2.2.4 进样器 .....                        | (24) |
| 2.2.5 色谱柱 .....                        | (26) |
| 2.2.6 二极管阵列检测器 .....                   | (26) |
| 2.3 实验技术 .....                         | (27) |
| 2.3.1 高压输液系统的维护 .....                  | (27) |
| 2.3.2 色谱柱的正确使用 .....                   | (28) |
| 2.3.3 进样系统的维护 .....                    | (29) |
| 2.3.4 DAD 检测器的维护 .....                 | (29) |
| 2.3.5 HPLC 分离方式的选择 .....               | (29) |
| 2.4 实验 .....                           | (30) |
| 实验 1: 高效液相色谱法测定人血浆中扑热息痛含量 .....        | (30) |

|   |             |
|---|-------------|
| 实验 2: HPLC-DAD 法初步研究新化合物 TM208 在大鼠尿样中的<br>代谢产物 .....  | (31)        |
| 实验 3: 多波长法同时测定清开灵注射液中 3 种指标成分的含量 .....                | (33)        |
| 附录 1: DIONEX SUMMIT 高效液相色谱仪的基本操作 .....                | (34)        |
| 附录 2: DIONEX CHROMELEON 数据处理软件的使用方法 .....             | (37)        |
| <b>第 3 章 高效液相色谱-激光诱导荧光联用技术 .....</b>                  | <b>(40)</b> |
| 3.1 方法原理 .....  | (40)        |
| 3.2 仪器结构与原理 .....                                     | (41)        |
| 3.2.1 激光诱导荧光检测器的组成 .....                              | (41)        |
| 3.2.2 激光器 .....                                       | (42)        |
| 3.2.3 光学系统 .....                                      | (43)        |
| 3.2.4 检测池 .....                                       | (43)        |
| 3.2.5 光电转换系统 .....                                    | (44)        |
| 3.2.6 光学结构 .....                                      | (44)        |
| 3.3 实验技术 .....  | (45)        |
| 3.3.1 几种衍生化方式 .....                                   | (45)        |
| 3.3.2 常见荧光衍生化方法 .....                                 | (45)        |
| 3.3.3 常用荧光衍生化试剂 .....                                 | (47)        |
| 3.4 实验 .....  | (50)        |
| 实验 1: 细胞破碎物中 ADM 分析 .....                             | (50)        |
| 实验 2: FITC 柱前衍生脂肪胺分析 .....                            | (51)        |
| 附录 1: Unimicro TriSep™ 2100LIF 的基本操作 .....            | (52)        |
| 附录 2: Unimicro TriSep™ 2003 工作站的使用说明 .....            | (52)        |
| <b>第 4 章 高效液相色谱-质谱联用技术 .....</b>                      | <b>(54)</b> |
| 4.1 方法原理 .....  | (54)        |
| 4.1.1 高效液相色谱法基本原理 .....                               | (54)        |
| 4.1.2 质谱法基本原理 .....                                   | (55)        |
| 4.2 仪器结构与原理 .....                                     | (55)        |
| 4.2.1 液相系统 .....                                      | (55)        |
| 4.2.2 质谱系统 .....                                      | (56)        |
| 4.3 实验技术 .....  | (60)        |
| 4.3.1 电离源的选择 .....                                    | (60)        |
| 4.3.2 正、负离子模式的选择 .....                                | (61)        |
| 4.3.3 流动相和流量的选择 .....                                 | (61)        |
| 4.3.4 温度的选择 .....                                     | (61)        |
| 4.4 实验 .....  | (62)        |
| 实验 1: HPLC-MS 法研究新化合物 TM208 在大鼠尿样中代谢产物的<br>分子结构 ..... | (62)        |

|   |             |
|---|-------------|
| 实验 2: 高效液相色谱法测定人血浆中扑热息痛含量 .....                         | (63)        |
| 实验 3: 用 HPLC-MS 分析硝基苯甲酸位置异构体与对硝基苯甲酸<br>纯度的测定 .....      | (64)        |
| 附录: Agilent 1100 型 HPLC-MS 使用方法 .....                   | (65)        |
| <b>第 5 章 高效液相色谱与核磁共振联用技术 .....</b>                      | <b>(68)</b> |
| 5.1 方法原理 .....  | (68)        |
| 5.1.1 NMR 的灵敏度 .....                                    | (68)        |
| 5.1.2 NMR 与 HPLC 色谱的溶剂兼容问题 .....                        | (69)        |
| 5.1.3 溶剂峰压制 .....                                       | (69)        |
| 5.1.4 专用的 LC-NMR 联用探头 .....                             | (71)        |
| 5.1.5 HPLC-NMR 的灵敏度 .....                               | (72)        |
| 5.2 仪器结构与原理 .....                                       | (73)        |
| 5.3 实验技术 .....  | (73)        |
| 5.3.1 在线或连续流动方式 (on-flow) .....                         | (73)        |
| 5.3.2 停止流动模式 (stop-flow) .....                          | (75)        |
| 5.3.3 时间片模式 (time-slice) .....                          | (75)        |
| 5.3.4 环收集方式 (loop-storage) .....                        | (75)        |
| 5.4 HPLC-NMR 技术目前的应用状况及发展前景 .....                       | (75)        |
| 5.4.1 HPLC-NMR 技术的优势 .....                              | (75)        |
| 5.4.2 HPLC-NMR 的应用现状 .....                              | (76)        |
| 5.4.3 HPLC-NMR 的主要问题及改进 .....                           | (77)        |
| 5.4.4 HPLC-SPE-NMR 技术 .....                             | (77)        |
| 5.5 实验 .....  | (79)        |
| 实验 1: 学习操作 HPLC-NMR 系统连续流动工作模式 .....                    | (79)        |
| 实验 2: HPLC-NMR 技术在天然产物——买麻藤分析中的应用 .....                 | (80)        |
| 实验 3: HPLC-NMR 技术在代谢产物——藤黄酸在大鼠胆汁中<br>主要代谢产物分析中的应用 ..... | (83)        |
| 附录: Varian HPLC-NMR 系统使用方法 .....                        | (86)        |
| <b>第 6 章 高效液相色谱-蒸发光散射检测器联用技术 .....</b>                  | <b>(94)</b> |
| 6.1 方法原理 .....  | (94)        |
| 6.1.1 散射光的类型 .....                                      | (94)        |
| 6.1.2 检测器的响应 .....                                      | (94)        |
| 6.1.3 定量方法 .....  | (95)        |
| 6.2 ELSD 仪器结构与工作模式 .....                                | (97)        |
| 6.2.1 仪器结构 .....  | (97)        |
| 6.2.2 光源及检测器 .....                                      | (98)        |
| 6.3 实验技术 .....  | (98)        |
| 6.3.1 HPLC 部分 .....                                     | (98)        |

|              |  |              |
|--------------|--|--------------|
| 6.3.2        | ELSD 部分  | (99)         |
| 6.4          | 实验   | (100)        |
|              | 实验 1: ELSD 检测性能优化  | (100)        |
|              | 实验 2: UVD 和 ELSD 线性关系及重现性比较  | (102)        |
|              | 实验 3: 单糖物质的 HPLC-ELSD 检测   | (104)        |
|              | 附录 1: Alltech 2000 ELSD 型蒸发光散射检测器操作规程  | (105)        |
|              | 附录 2: Sedex 75 ELSD 的操作注意事项  | (106)        |
|              | 附录 3: Agilent 1100 HPLC 操作规程   | (106)        |
| <b>第 7 章</b> | <b>高效液相色谱-库仑阵列电化学检测器联用技术</b>   | <b>(108)</b> |
| 7.1          | 方法原理   | (108)        |
| 7.1.1        | 库仑电化学检测器的基本原理  | (109)        |
| 7.1.2        | 具有电化学活性的物质   | (109)        |
| 7.1.3        | 电化学反应所需的电势 (伏安曲线)  | (109)        |
| 7.2          | 仪器结构与原理  | (110)        |
| 7.2.1        | 电化学反应池的基本结构  | (110)        |
| 7.2.2        | 电极的灵敏度、选择性和稳定性   | (111)        |
| 7.2.3        | 库仑电极与安培电极的比较   | (112)        |
| 7.2.4        | 库仑阵列电化学检测器与二极管阵列检测器的比较   | (112)        |
| 7.2.5        | 库仑阵列电化学检测器与质谱联用  | (113)        |
| 7.3          | 实验技术   | (114)        |
| 7.3.1        | 流动相的配置方法   | (114)        |
| 7.3.2        | 处理基线噪声大或发生漂移的方法  | (114)        |
| 7.3.3        | pH 值对电化学电极响应的影响  | (114)        |
| 7.3.4        | 确定能产生最大响应最佳电势的方法   | (115)        |
| 7.4          | 实验   | (115)        |
|              | 实验 1: 用 HPLC-CoulArray 直接测定尿液中香草扁桃酸 (VMA)、5-羟<br>吲哚乙酸 (5-HIAA) 和高香草酸 (HVA) 的含量 | (115)        |
|              | 实验 2: 用 HPLC-CoulArray 同时测定复合维生素药片和婴儿乳制品中的<br>脂溶性维生素                           | (117)        |
|              | 实验 3: 用 HPLC-CoulArray 对环境水中各种雌激素的痕量测定   | (118)        |
|              | 附录 1: HPLC-CoulArray 5600A 仪的使用方法  | (119)        |
|              | 附录 2: HPLC-CoulArray 5600A 软件使用说明  | (119)        |
|              | 附录 3: 纯化液相色谱的方法  | (120)        |
| <b>第 8 章</b> | <b>高效液相色谱-电雾式检测器联用技术</b>   | <b>(122)</b> |
| 8.1          | 基本原理   | (122)        |
| 8.1.1        | 电雾式检测器的特点  | (122)        |
| 8.1.2        | 与其他检测器的比较  | (125)        |
| 8.2          | 仪器结构与原理  | (125)        |



|               |  |              |
|---------------|--|--------------|
| 8.2.1         | 雾化   | (126)        |
| 8.2.2         | 溶剂分子的蒸发  | (126)        |
| 8.2.3         | 颗粒带电   | (126)        |
| 8.2.4         | 静电计区   | (126)        |
| 8.3           | 实验技术   | (127)        |
| 8.3.1         | Corona 与其他检测器并联使用                                  | (127)        |
| 8.3.2         | 用于梯度洗脱的流动相   | (127)        |
| 8.3.3         | 样品须注意的问题   | (127)        |
| 8.3.4         | 设置滤波器  | (128)        |
| 8.4           | 实验   | (128)        |
|               | 实验 1: 采用 HPLC-Corona 电雾式检测器测定混合单糖含量                | (128)        |
|               | 实验 2: 用 HPLC-Corona 电雾式检测器评价甘油三酸酯类化合物的纯度<br>并测定其杂质 | (129)        |
|               | 附录 1: 高效液相色谱-电雾式检测器联用仪的使用方法                        | (129)        |
|               | 附录 2: Corona <sup>TM</sup> CAD 检测器的使用方法            | (130)        |
| <b>第 9 章</b>  | <b>高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术</b>                       | <b>(136)</b> |
| 9.1           | 方法原理   | (137)        |
| 9.1.1         | 用于生物样品中元素形态分析的高效液相色谱                               | (137)        |
| 9.1.2         | 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS)                                | (139)        |
| 9.2           | 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 基本结构与原理                        | (142)        |
| 9.2.1         | ICP-MS 系统  | (142)        |
| 9.2.2         | ICP-MS 的工作原理及分析特性                                  | (143)        |
| 9.3           | 实验技术   | (143)        |
| 9.3.1         | HPLC 与 ICP-MS 联用的接口技术                              | (143)        |
| 9.3.2         | HPLC-ICP-MS 联用技术展望                                 | (144)        |
| 9.4           | 实验   | (145)        |
|               | 实验 1: 人尿中微量元素硒代谢产物的 HPLC-ICP-MS 分析                 | (145)        |
|               | 实验 2: 用 HPLC-ICP-MS 法测定饮料中多种砷化合物                   | (147)        |
|               | 附录 1: HPLC-ICP-MS 联用测量操作规程以及数据处理软件的基本操作            | (149)        |
|               | 附录 2: X7 ICP-MS 操作规程以及基本操作                         | (150)        |
|               | 附录 3: HPLC 基本操作说明                                  | (155)        |
| <b>第 10 章</b> | <b>毛细管电泳技术</b>                                     | <b>(158)</b> |
| 10.1          | 方法原理   | (159)        |
| 10.1.1        | 电泳和电渗淌度  | (159)        |
| 10.1.2        | 电渗流和电渗淌度   | (160)        |
| 10.1.3        | 毛细管电泳的分析参数   | (161)        |
| 10.2          | 仪器结构及原理  | (162)        |
| 10.2.1        | 紫外检测器  | (163)        |

|         |  |       |
|---------|--|-------|
| 10.2.2  | 激光诱导荧光检测器                                      | (164) |
| 10.2.3  | 电化学检测器   | (164) |
| 10.2.4  | 质谱检测器  | (164) |
| 10.3    | 实验技术   | (167) |
| 10.3.1  | 毛细管区带电泳 (CZE)                                  | (167) |
| 10.3.2  | 胶束电动毛细管色谱 (MEKC)                               | (167) |
| 10.3.3  | 毛细管凝胶电泳 (CGE)                                  | (167) |
| 10.3.4  | 毛细管等电聚焦 (CIEF)                                 | (168) |
| 10.3.5  | 毛细管等速电泳 (CITP)                                 | (168) |
| 10.3.6  | 毛细管电色谱 (CEC)                                   | (168) |
| 10.3.7  | 微乳液毛细管电动色谱 (MEEKC)                             | (169) |
| 10.3.8  | 毛细管阵列电泳 (CAE)                                  | (169) |
| 10.3.9  | 芯片毛细管电泳 (CCE)                                  | (169) |
| 10.3.10 | 非水毛细管电泳 (NACE)                                 | (169) |
| 10.4    | 毛细管电泳应用研究进展                                    | (170) |
| 10.4.1  | 手性化合物分离  | (170) |
| 10.4.2  | 药物分析   | (170) |
| 10.4.3  | 环境分析   | (171) |
| 10.4.4  | 蛋白质和 DNA 分析                                    | (171) |
| 10.4.5  | 单细胞分析  | (171) |
| 10.5    | 实验   | (172) |
|         | 实验 1: 有机化合物的毛细管区带电泳分析                          | (172) |
|         | 实验 2: 毛细管区带电泳法分离手性药物的对映异构体                     | (173) |
|         | 实验 3: 蛋白质的毛细管区带电泳分析                            | (174) |
|         | 附录 1: P/ACE MDQ 毛细管电泳仪的基本操作                    | (175) |
|         | 附录 2: 32Karat Software Version 5.0 数据处理软件的使用方法 | (176) |

## 第 11 章 生物质谱技术 (177)

|        |  |       |
|--------|--|-------|
| 11.1   | 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 方法原理    | (177) |
| 11.2   | 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 仪器结构与原理 | (177) |
| 11.3   | 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 应用      | (179) |
| 11.3.1 | 蛋白质的质谱分析                                 | (179) |
| 11.3.2 | 核酸的质谱分析                                  | (181) |
| 11.3.3 | 糖或糖蛋白的质谱分析                               | (181) |
| 11.3.4 | 生物大分子复合物分析                               | (181) |
| 11.4   | 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 实验技术    | (182) |
| 11.4.1 | 基质的选择                                    | (182) |
| 11.4.2 | 样品的性质                                    | (182) |

|               |   |              |
|---------------|---|--------------|
| 11.4.3        | 点样方法  | (182)        |
| 11.4.4        | 仪器的校正   | (183)        |
| 11.5          | 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 实验               | (183)        |
|               | 实验 1: MALDI-TOF-MS 的应用之一——蛋白质、核酸、糖类的生物<br>质谱分析    | (183)        |
|               | 实验 2: MALDI-TOF-MS 的应用之二——肽质量指纹谱 (PMF) 鉴定<br>蛋白质  | (184)        |
|               | 实验 3: MALDI-TOF-MS 的应用之三——肽段源后衰变 (PSD) 得到<br>结构信息 | (186)        |
|               | 附录 1: MALDI-TOF-MS 的使用方法                          | (190)        |
|               | 附录 2: MALDI-TOF-MS 数据处理软件使用说明                     | (191)        |
|               | 附录 3: 校正仪器  | (197)        |
| 11.6          | 电喷雾质谱 (ESI-TOF-MS) 方法原理                           | (198)        |
| 11.7          | 电喷雾质谱 (ESI-TOF-MS) 仪器结构与原理                        | (199)        |
| 11.8          | 电喷雾质谱 (ESI-TOF-MS) 应用                             | (200)        |
|               | 11.8.1 蛋白质的质谱分析                                   | (200)        |
|               | 11.8.2 核酸的质谱分析                                    | (204)        |
|               | 11.8.3 糖或糖蛋白的质谱分析                                 | (204)        |
|               | 11.8.4 生物大分子复合物分析                                 | (204)        |
|               | 11.8.5 定量分析                                       | (205)        |
| <b>第 12 章</b> | <b>表面等离子共振技术</b>                                  | <b>(207)</b> |
| 12.1          | 表面等离子共振原理   | (207)        |
|               | 12.1.1 基本物理光学原理                                   | (207)        |
|               | 12.1.2 SPR 仪的光学原理                                 | (208)        |
| 12.2          | SPR 仪的组成及工作原理                                     | (209)        |
|               | 12.2.1 Biacore 3000 的工作单元                         | (209)        |
|               | 12.2.2 温度控制                                       | (212)        |
|               | 12.2.3 LED 状态指示器                                  | (212)        |
|               | 12.2.4 SPR 仪的传感芯片                                 | (212)        |
| 12.3          | 分子与传感芯片的偶联方法                                      | (214)        |
|               | 12.3.1 共价固定与捕获方法                                  | (214)        |
|               | 12.3.2 疏水吸附方法                                     | (218)        |
| 12.4          | SPR 技术的应用   | (219)        |
|               | 12.4.1 生物特异相互作用的动力学、结合位点及浓度分析                     | (219)        |
|               | 12.4.2 蛋白质折叠机制的研究                                 | (220)        |
|               | 12.4.3 在其他研究方面的应用                                 | (220)        |
| 12.5          | 实验  | (221)        |
|               | 实验 1: 基本操作训练——学习使用表面等离子共振仪 Biacore 3000           | (221)        |

|  |              |
|--|--------------|
| 实验 2: 使用 Biacore 3000 检测核酸与小分子化合物的相互作用<br>并做动力学分析 .....      | (223)        |
| 实验 3: 使用 Biacore 3000 检测分子与膜的相互作用 .....                      | (224)        |
| 附 录: Biacore 仪数据处理软件 (BIA Evaluation Version 4.0) 使用说明 ..... | (225)        |
| <b>第 13 章 生物芯片技术 .....</b>                                   | <b>(237)</b> |
| 13.1 方法原理 .....  | (237)        |
| 13.1.1 生物芯片分类 .....  | (237)        |
| 13.1.2 微阵列芯片检测原理 .....                                       | (238)        |
| 13.2 实验技术 .....  | (239)        |
| 13.2.1 微阵列芯片制备的一般知识 .....                                    | (239)        |
| 13.2.2 寡核苷酸芯片的制备 .....                                       | (242)        |
| 13.2.3 cDNA 芯片的制备 .....                                      | (242)        |
| 13.2.4 蛋白质芯片的制备 .....  | (243)        |
| 13.2.5 组织芯片的制备 .....   | (243)        |
| 13.3 微阵列芯片扫描仪及其工作原理 .....                                    | (244)        |
| 13.3.1 激光共焦扫描检测方法 .....                                      | (244)        |
| 13.3.2 CCD 成像扫描检测方法 .....                                    | (245)        |
| 13.3.3 博奥晶芯®EcoScan™-100 型微阵列芯片扫描仪及其主要<br>性能指标 .....         | (245)        |
| 13.4 实验 .....  | (246)        |
| 实验 1: 用基因芯片鉴定大肠杆菌 ( <i>E. coli</i> ) 和黄单胞菌 (XCC) .....       | (246)        |
| 实验 2: 用蛋白质芯片检测人自身抗体 .....                                    | (249)        |
| 实验 3: 用蛋白质芯片进行化学小分子检测实验 .....                                | (252)        |
| 附 录 1: 芯片的数据结果处理方法 (由判读软件自动完成) .....                         | (255)        |
| 附 录 2: 晶芯®EcoScan™-100 型微阵列芯片扫描仪的使用方法 .....                  | (256)        |
| <b>第 14 章 生物传感器分析技术 .....</b>                                | <b>(260)</b> |
| 14.1 方法原理 .....  | (260)        |
| 14.2 生物传感分析仪的结构 .....  | (262)        |
| 14.2.1 反应池 .....   | (262)        |
| 14.2.2 酶电极系统 .....   | (263)        |
| 14.2.3 液体系统 .....  | (264)        |
| 14.2.4 搅拌系统 .....  | (264)        |
| 14.2.5 进样系统 .....  | (264)        |
| 14.2.6 自动进样系统 .....  | (264)        |
| 14.3 实验技术 .....  | (265)        |
| 14.3.1 电极膜的安装 .....  | (265)        |
| 14.3.2 膜电极活性的重复性测定 .....                                     | (265)        |
| 14.3.3 膜电极的线性测定及校正方法 .....                                   | (266)        |

|  |       |
|--|-------|
| 14.4 实验.....                                     | (266) |
| 实验 1: 全血或血清中 L-乳酸含量的测定.....                      | (266) |
| 实验 2: 食品中葡萄糖、谷氨酸的含量测定.....                       | (267) |
| 实验 3: 使用 SBA-70 型生物传感分析仪测定纯生啤酒中的蔗糖转化<br>酶活性..... | (268) |
| 附录 1: SBA-40C 生物传感分析仪的使用方法.....                  | (270) |
| 附录 2: 生物传感分析仪配套的试剂盒.....                         | (270) |

# 第 1 章 气相色谱-质谱联用技术

气相色谱-质谱联用技术 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 起始于 20 世纪 50 年代后期。1957 年 J. C. Homlmes 和 F. A. Morrell 首先实现 GC-MS 联用, 1965 年出现第一台商品仪器, 1968 年实现与计算机联用, 使得该技术得到了长足的发展。质谱法是一种很好的定性分析手段, 它通过测定在高能电子流轰击下产生的碎片离子的种类及其相对含量, 来确定未知物的化学组成和结构, 但其对混合物的分析不理想; 气相色谱仪用来分离混合物中的化合物, GC-MS 联用分析仪综合了色谱法的分离能力和质谱法的定性长处, 可在较短的时间内对多组分混合物进行定性分析。质谱仪根据化合物碎片离子的质荷比和碎片离子的相对丰度, 利用 GC-MS 智能分析软件, 对于给出的质谱图, 进行智能解析, 从而确定分子量、分子式, 判断混合物的组成成分, 并进行定性和定量分析。在所有联用技术中, 气质联用发展得最完善, 应用最广。一般的气相色谱-质谱联用仪带有分流/不分流毛细管进样系统、电子压力控制系统、多种毛细管色谱柱, 能定量分析沸点在 350°C 以下的有机化合物, 灵敏度可达  $10^{-10} \sim 10^{-12}$  g。GC-MS 联用技术主要适用于定性定量分析沸点较低、热稳定性好的化合物, 在环保、食品、石油化工、轻工、农药、医药、法医毒品和兴奋剂等各个领域中得到广泛应用。

## 1.1 方法原理

GC-MS 利用气相色谱作为质谱的进样系统, 使复杂的化学组分得到分离; 利用质谱仪作为检测器进行定性和定量分析。

### 1.1.1 气相色谱法基本原理

气相色谱法分离的原理主要是基于组分与固定相之间的吸附或溶解作用。相邻两组分之间分离的程度, 既取决于组分在两相间的分配系数, 又取决于组分在两相间的扩散作用和传质阻力。前者与色谱过程的热力学因素有关, 后者与色谱过程的动力学因素有关。气相色谱的两大理论——塔板理论和速率理论分别从热力学和动力学的角度阐述了色谱分离效能及其影响因素。

塔板理论是在对色谱过程进行多项假设的前提下提出的。它的贡献在于借助化工中塔板理论的概念推导出流出曲线方程, 很好地解释了色谱峰图形、最大浓度位置, 还由此推导出理论塔板数和有效塔板数的计算公式, 得出了塔板数与柱效的对应关系。它的不足之处在于, 没有阐明影响柱效 ( $n$ ) 的本质, 也解释不了载气流速对理论塔板数的影响这一实验事实。

速率理论是在对色谱过程动力学因素进行研究的基础上提出的, 考虑到在色谱分离过程中影响柱效的涡流扩散、分子扩散以及气相和液相传质阻力, 建立了速率理论方程, 给出了改善柱效率的主要措施: ①选择颗粒较小的均匀填料; ②在不使固定液粘度增加太多的前提下, 应在尽可能低的柱温下操作; ③用最低实际浓度的固定液; ④用较大分子量的载气; ⑤

选择最佳的载气流速；⑥采用较小内径和较大曲率半径的柱形。速率理论对后来发展的毛细管气相色谱、高效液相色谱和毛细管电泳都有指导意义。

### 1.1.2 质谱法基本理论

质谱法主要是通过对样品离子的质荷比进行分析，实现对样品定性和定量的一种分析方法。样品进入质谱仪，在质谱仪离子源中，化合物被电子轰击，电离成分子离子和碎片离子，这些离子在质量分析器中，按质荷比大小顺序分开，经电子倍增器检测，即可得到化合物的质谱图，一般质谱图的横坐标是质荷比，纵坐标为离子的强度。离子的绝对强度取决于样品量和仪器的灵敏度；离子的相对强度和样品分子结构有关。同一样品，在一定的电离条件下得到的质谱图是相同的，这是质谱进行有机物定性分析的基础。通常 GC-MS 联用仪的数据系统都附带一个谱库，存有十几万到几十万个化合物的标准 EI 质谱图。得到一个未知物的质谱图后，可以通过计算机进行库检索，查得该质谱图所对应的化合物，这种方法方便、快捷、省力。但是，如果质谱库中没有这种化合物或得到的质谱图有其他组分干扰，检索常常会给出错误结果，因此还必须辅以其他定性方式才能确定。

如果使用快原子轰击或电喷雾等其他电离源，则得不到可供检索的标准质谱图，不能进行库检索定性，只能提供分子量信息，可通过采用串联质谱仪获取碎片信息，用来推断化合物结构。

高分辨率质谱仪，可以精确测定分子离子或碎片离子的质量，依靠计算机可以计算出化合物的组成式，对化合物的定性很有帮助。

## 1.2 仪器结构与原理

气相色谱仪是很好的分离设备，但不能对化合物定性，质谱仪是很好的定性分析仪器，但限于纯样品，将 GC-MS 联用，就可以使分离和鉴定同时进行，对于混合物分析是一种比较理想的仪器。GC-MS 联用仪分析过程如图 1-1 所示，主要由 GC（气相色谱）、质谱和数据处理系统组成。

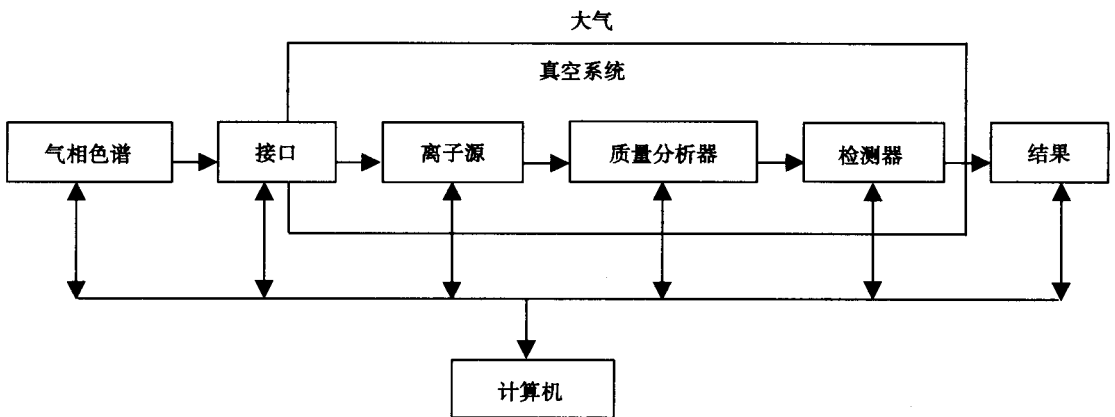


图 1-1 GC-MS 联用仪结构示意图

### 1.2.1 GC (气相色谱仪)

气相色谱仪是利用分子与固定相之间的作用力(分配和吸附)而分离混合物的。典型的气相色谱仪具有稳定流量的载气,将气化的样品由气化室带入色谱柱,在色谱柱中不同组分得到分离,先后从色谱柱中流出,经过检测器和记录器,这些被分开的组分成为一个一个的色谱峰。气相色谱仪通常由下列5个部分组成:①载气系统;②进样系统;③分离系统;④检测、记录系统;⑤辅助系统(包括温控系统、数据处理系统等)(图1-2),在此不作详述。

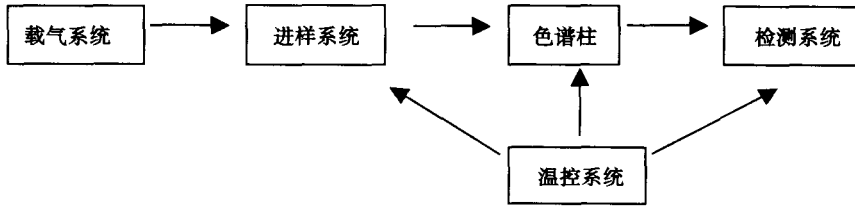


图 1-2 气相色谱仪流程示意图

### 1.2.2 MS (质谱仪)

质谱仪(mass spectrometry, MS)是用多种离子化技术,将有机化合物变为带电离子,把生成的离子按质荷比( $m/z$ )大小进行分离、记录的分析方法。利用质谱所提供的信息可以对有机化合物和无机物进行定性和定量分析、复杂化合物的结构分析、样品中各种同位素比的测定,以及固体表面的结构和组成分析。

质谱仪通常由下列6个部分组成(图1-3):①真空系统;②进样系统;③离子源;④质量分析器;⑤检测器;⑥数据处理系统等。

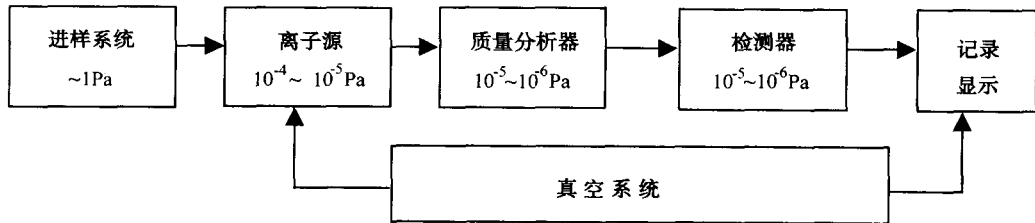


图 1-3 质谱仪的结构示意图

#### 1.2.2.1 真空系统

质谱仪除了记录和显示系统外,其他各部分都必须不同的高真空度下工作。真空系统是由低真空的机械泵和效率高的扩散泵组成的二级真空系统。若真空度不够,会造成离子源灯丝损坏,本底增高,电离室中加速及发生火花放电等一系列问题,从而使图谱复杂化。

#### 1.2.2.2 进样系统

常用进样系统有3种类型:间歇式进样系统、直接探针进样及色谱进样系统。间歇式进样系统主要用于气体、低沸点液体和较高蒸气压的固体样品进样。样品通过可拆卸式的试样管被引入试样储存器中气化,气化的样品分子通过分子漏隙以分子流的形式扩散进入离子源中。对高沸点液体、固体则通过进样杆直接送入离子源中气化和电离。气相色谱仪可以通过



接口作质谱仪的进样系统。

### 1.2.2.3 电离源

电离源的作用是将进样系统引入的样品分子转化为离子。常用电离源有电子轰击离子源 (electron impact ionization, EI)、化学电离源 (chemical ionization; CI)、大气压化学电离源 (atmospheric pressure chemical ionization; APCI)、电喷雾电离源 (electrospray ionization, ESI)、基质辅助激光解吸电离源 (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)、电感耦合等离子体源 (inductively coupled plasma, ICP) 和快原子轰击源 (fast atom bombardment, FAB) 等。由于各种电离源能量大小不同, 应用的对象也不同, 在气相色谱-质谱联用仪中, EI 和 CI 是最主要的电离方式, 其他电离源将在相应章节中讨论。

1. 电子轰击电离源 (EI) 把试样蒸气导入真空度为  $1.33 \times 10^{-3} \sim 1.33 \times 10^{-5}$  Pa 的离子源, 如图 1-4 所示, 用灯丝阴极和对面阳极间产生的  $10 \sim 100$  eV 能量的电子束轰击气态试样分子, 使分子丢掉一个电子而成为分子离子,  $e + ABCD \rightarrow ABCD^+(M^+) + 2e$  (A、B、C、D 代表不同的原子、原子团、官能团)。若电子束能量超过有机化合物的电离电压 (约 15 eV 左右) 时, 最初形成的分子离子将进一步碎裂成碎片离子 (图 1-5), 这些碎片离子能反映分子的结构信息。

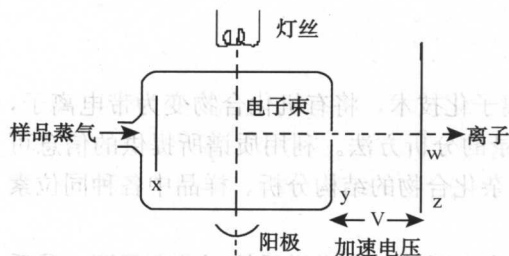


图 1-4 EI 离子源

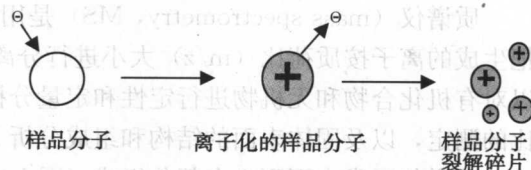


图 1-5 EI 电离示意图

离子由一个小的排斥电压 (加于 x, y 间) 推出离子源, 而后被加速电压加速, 送入质量分析器。大约 70 eV 的能量能给出再现性很好的碎片离子, 电子束能量超过 70 eV 时, 常导致分子失去两个电子, 使形成双电荷离子  $M^{2+}$  和碎片离子的数目增加。

EI 离子化法发展较早, 有成熟的离子开裂理论, 灵敏度较高, 有丰富的碎片离子信息, 是进行有机化合物结构分析、鉴定的有力手段。EI 谱重现性好, 有大量的标准图谱 (在约 70 eV 条件下获得), 便于库检索。它的缺点是样品必须加热气化后才可进行离子化; EI 源产生的 70 eV 能量的电子束在轰击有机化合物分子时, 产生的离子具有过剩的内能 (有机化合物的电离能为  $5 \sim 15$  eV), 分子离子寿命很短, 在离子源中约  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  s 内很快裂分为碎片, 像醇、胺、羧酸类化合物, 以及热不稳定、难挥发的天然有机化合物糖类、氨基酸等, 往往分子离子峰较弱或观察不到分子离子峰。

2. 化学电离源 (CI) 有些化合物稳定性差, 用 EI 方式不易得到分子离子, 因而也就得不到分子量。为了得到分子量可以采用 CI 电离方式。CI 和 EI 在结构上部件是共用的, 其主要差别是 CI 源工作过程中要引进一种反应气体。反应气体可以是甲烷、异丁烷、氨等。反应气的量比样品气要大得多。灯丝发出的电子首先将反应气电离, 然后反应气离子与样品分子进行离子-分子反应, 并使样品气电离。反应机理如下:

在电子轰击下, 甲烷首先被电离: