

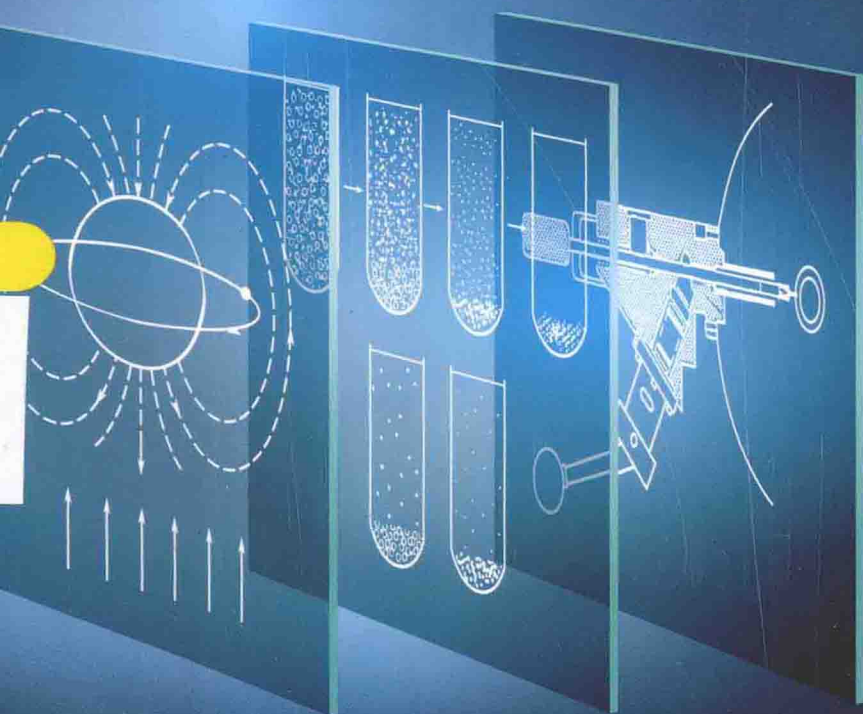


普通高等教育“十二五”规划教材

现代生物 仪器分析

聂永心 主编

Modern Biological Analysis Instruments



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

现代生物仪器分析

聂永心 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

现代生物仪器分析是一个崭新而年轻的领域,它是与生物学、电子学、计算机科学、现代信息技术科学交叉发展而产生的新领域。考虑到生命科学的特殊性和篇幅的限制,重点介绍在生物科学中应用非常广泛的仪器分析方法,全书共分16章,内容包括:在生物科学领域常用的四大谱学——紫外光谱、红外光谱、核磁共振和生物质谱;现代生物样品分离技术——离心、电泳、气相色谱、高效液相色谱和毛细管电泳等;生物材料中元素分析技术——原子发射光谱和原子吸收光谱等;生物电子显微技术——透射电子显微技术和扫描电子显微技术。另根据生物样品分析的特殊需要,专辟章节介绍生物样品前处理技术。

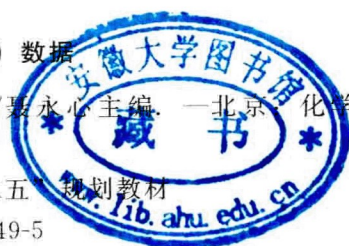
本书可作为高等农、林院校农林生物类各专业本科生教材,也可作为食品、药学、环境、医学等相关专业学生的参考教材。

图书在版编目(CIP)数据

现代生物仪器分析/聂永心主编. —北京:化学工业出版社, 2014.4

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-19849-5



I. 现… II. ①聂… III. ①生物分析-仪器分析-高等学校-教材 IV. ①Q-33②0657

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第033180号

责任编辑:赵玉清 周旭

文字编辑:魏巍

责任校对:顾淑云 王静

装帧设计:尹琳琳

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印装:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张14 字数349千字 2014年5月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:32.00元

版权所有 违者必究

《现代生物仪器分析》 编写人员名单

主 编：聂永心

副 主 编：陈长宝 林爱华 姜红霞 刘学春 张 坤

参编人员：（按姓名汉语拼音排列）

柴 委（枣庄职业学院）

陈长宝（山东农业大学）

崔英杰（泰山医学院）

冯 蕾（泰山医学院）

冀海伟（泰山医学院）

姜红霞（泰山医学院）

李 祥（山东农业大学）

林爱华（中南民族大学）

刘彬彬（山东农业大学）

刘学春（山东农业大学）

聂永心（山东农业大学）

杨冬芝（徐州医学院）

张 坤（山东农业大学）

赵燕熹（中南民族大学）

朱元娜（济南大学）

前 言

生命科学的发展总是与分析技术的进步密切相关，比如诞生于 20 世纪 80 年代的生物质谱技术，为当今功能基因组——蛋白质组的研究奠定了基础。随着科学技术的不断进步，各种高灵敏度、高选择性、自动化的分析仪器以及相关的新技术、新方法不断涌现，必将极大地加速生命科学基础研究和应用研究的发展，因此熟练掌握和使用生物仪器分析技术逐渐成为从事生命科学研究人员必备的技能。

本书从生命科学工作者的角度，简明扼要地讲授生物仪器的测定原理、基本结构及其用途。本书尽量避免一般仪器分析教程中常有的仪器发展沿革、冗长的公式推导、过细的操作步骤以及仪器运行等的介绍，突出现代分析仪器及相关技术的最新进展，强调在生物科学研究中的应用与举例，同时兼顾农林生物类专业前续课程内容的连续性和后续课程内容的延续性，避免内容重复，是一本特色鲜明的参考书。希望生物类专业的学生及相关科研人员通过本书的学习，了解现代仪器分析的基本原理和应用，特别是仪器分析技术在生命科学研究中的关键作用、所产生的重要突破以及对未来生命科学研究可能带来的影响，为其他相关学科的学习和今后的科学研究奠定基础。

本书作者由在仪器分析及生物、医学应用研究领域有较丰富经验的研究人员及长期从事本课程教学的教师组成：第一章（聂永心）；第二章（姜红霞）；第三章（姜红霞、杨冬芝）；第四章（姜红霞、崔英杰）；第五章（聂永心、冯蕾）；第六章（聂永心、冀海伟）；第七章（聂永心、刘彬彬）；第八章（陈长宝）；第九章（陈长宝、朱元娜）；第十章（林爱华、赵燕熹）；第十一章（张坤）；第十二章（张坤、柴委）；第十三章（林爱华、赵燕熹）；第十四章（聂永心、李祥）；第十五章（刘学春）；第十六章（刘学春）。

本书在编写过程中，参考了国内外出版的一些教材和著作，并引用了其中某些数据和图表，在此向有关作者表示衷心感谢。另外，本书的出版得到了山东农业大学名校工程项目的资助及生命科学学院领导的大力支持，在此表示衷心感谢。

本书由主编与副主编审稿、修改，最后由主编通读、定稿。由于编者水平有限，书中欠妥之处敬请读者批评指正。

编者

2014 年 1 月

目 录

第一章 绪论	1	第四节 高效液相色谱法的主要类型	70
第一节 仪器分析概述	1	第五节 高效液相色谱法的应用	72
第二节 现代生物仪器的发展概况	2	思考题与习题	73
第三节 定量分析方法的评价指标	4	第七章 毛细管电泳分离技术	74
思考题与习题	7	第一节 高效毛细管电泳的基本理论	74
第二章 生物样品分析前处理技术	8	第二节 毛细管电泳仪的基本结构	76
第一节 生物样品的预处理	8	第三节 影响毛细管电泳的因素	78
第二节 细胞的破碎	10	第四节 高效毛细管电泳的类型	80
第三节 生物样品的提取与纯化	12	第五节 毛细管电泳的应用	82
第四节 生物样品的浓缩、干燥和保存	20	思考题与习题	83
思考题与习题	22	第八章 原子吸收光谱法	84
第三章 离心分离技术	23	第一节 基本原理	84
第一节 离心技术的基本原理	23	第二节 原子吸收光谱仪的结构	85
第二节 离心机的主要结构和类型	25	第三节 仪器分析方法	89
第三节 制备离心的分离方法	27	第四节 生物样品的前处理	90
第四节 离心技术在生物学研究中的 应用	31	思考题与习题	90
思考题与习题	31	第九章 原子发射光谱法	92
第四章 电泳分离技术	32	第一节 概述	92
第一节 概述	32	第二节 基本原理	93
第二节 基本原理	33	第三节 原子发射光谱仪的结构	96
第三节 常用的电泳分析方法	34	第四节 仪器分析方法	100
思考题与习题	40	第五节 生物样品的前处理	101
第五章 气相色谱分离技术	41	思考题与习题	102
第一节 概述	41	第十章 红外吸收光谱法	103
第二节 色谱流出曲线及常用术语	43	第一节 红外吸收光谱基本原理	104
第三节 色谱分析的基本理论	45	第二节 红外光谱仪的基本构成	110
第四节 色谱定性和定量的方法	49	第三节 试样处理与制备	114
第五节 气相色谱仪的结构	52	第四节 红外光谱图的分析	115
第六节 气相色谱的固定相	56	第五节 红外光谱的应用	117
第七节 气相色谱分离条件的选择	58	思考题与习题	118
第八节 气相色谱法的应用	60	第十一章 紫外-可见吸收光谱法	119
思考题与习题	61	第一节 基本原理	119
第六章 高效液相色谱分离技术	62	第二节 紫外-可见吸收光谱仪的结构	123
第一节 概述	62	第三节 仪器分析方法	126
第二节 高效液相色谱仪的结构	63	第四节 生物样品的前处理	127
第三节 高效液相色谱的固定相和流 动相	67	思考题与习题	128
		第十二章 分子发光分析法	129
		第一节 分子荧光分析法	129

第二节 分子磷光分析法	135	思考题与习题	187
第三节 化学发光分析法	137	第十五章 透射电子显微技术	189
思考题与习题	139	第一节 透射电子显微镜的基本原理	189
第十三章 核磁共振波谱法	140	第二节 透射电子显微镜的结构	190
第一节 核磁共振的基本原理	140	第三节 透射电子显微镜样品前处理	193
第二节 化学位移	143	第四节 透射电子显微镜在生物科学 中的应用	202
第三节 自旋偶合和自旋裂分	147	思考题与习题	203
第四节 核磁共振波谱仪	150	第十六章 扫描电子显微技术	204
第五节 核磁共振波谱法的应用	153	第一节 扫描电子显微镜的基本原理	204
第六节 其他核的核磁共振波谱简介	156	第二节 扫描电子显微镜的结构	206
思考题与习题	160	第三节 扫描电子显微镜样品前处理	207
第十四章 质谱分析法	162	第四节 负染色技术	209
第一节 质谱仪的工作原理及性能指标	162	第五节 扫描电子显微镜在生物科学 中的应用	216
第二节 质谱仪的基本结构和分类	164	思考题与习题	217
第三节 质谱中离子峰的类型及其裂解 规律	175	参考文献	218
第四节 质谱分析的应用	181		
第五节 生物质谱技术及其应用	184		

第一章 绪 论

科学仪器是科学技术发展的重要“工具”。著名科学家王大珩院士指出，“机器是改造世界的工具，仪器是认识世界的工具”。1992年诺贝尔化学奖获得者 R. R. Ernst 指出，“现代科学的进步越来越依靠尖端仪器的发展”。人类在科学技术上的重大成就和科学研究新领域的开辟，往往是以实验仪器和技术方法的突破为先导。从宇宙世界到基本粒子、从生命起源到人类自我认识等研究的重大突破越来越依赖于先进的科学仪器。据不完全统计，一个多世纪以来，诺贝尔自然科学奖项中，有 68.4% 的物理学奖、74.6% 的化学奖和 90% 的生物医学奖的获奖成果是借助各种先进的科学仪器完成的。

生命科学的发展也总是与分析技术的进步相关联，X 射线晶体衍射对 DNA 双螺旋结构的阐述奠定了现代分子生物学的基础，使人类对微观领域的认识迈出了决定性的一步。以阵列毛细管电泳和激光荧光技术为基础的大规模、自动化基因测序技术的问世，使 20 世纪生命科学领域最宏大的研究项目——人类基因组计划得以提前完成。诞生于 20 世纪 80 年代的生物质谱技术，为当今功能基因组——蛋白质组的研究奠定了基础。随着科学技术的不断进步，各种高灵敏度、高选择性、自动化的分析仪器以及相关的新技术、新方法不断涌现，必将极大地加速生命科学基础研究和应用研究的发展。

第一节 仪器分析概述

一、分析化学和仪器分析

分析化学是研究物质的组成、状态和结构的科学，它包括化学分析和仪器分析两大部分。化学分析是指利用化学反应和它的计量关系来确定被测物质的组成和含量的一类分析方法。测定时需使用化学试剂、天平和一些玻璃器皿。仪器分析是指采用比较复杂或特殊的仪器设备，通过测量物质的某些物理或物理化学性质的参数及其变化来获取物质的化学组成、成分含量及化学结构等信息的一类方法，测定时常常需要使用比较复杂的仪器。仪器分析和化学分析是分析化学相辅相成的两个重要组成部分。化学分析主要用于测定含量大于 0.1% 的常量组分，它是分析化学的基础；仪器分析具有准确、灵敏、快速、自动化程度高等特点，常用来测定含量很低的微、痕量组分，是分析化学发展的方向。

二、仪器分析的特点

与化学分析相比，仪器分析具有以下特点。

1. 灵敏度高，检出限低。样品用量由化学分析的毫升、毫克级降低到仪器分析的微克、微升级，甚至更低，适合于微量、痕量和超痕量成分的测定。
2. 选择性好。很多的仪器分析方法可以通过选择或调整测定条件，使共存的组分在测定时，相互间不产生干扰。
3. 操作简便，分析速度快，容易实现自动化。
4. 准确度高。相对标准偏差一般较小（许多仪器分析方法为 2% 左右），测定含量 $1 \times$

$10^{-9} \sim 1 \times 10^{-6}$ 时的相对误差小于 $1\% \sim 10\%$ 。

5. 仪器分析法具有更广泛的用途。可用于成分分析, 价态、状态及结构分析, 在线分析等; 而化学分析一般只能用于离线的成分分析。

6. 需要价格比较昂贵的专用仪器。

三、仪器分析方法的分类

仪器分析的方法根据用以测量的物质性质进行分类。通常包括: 电化学分析法、光学分析法、色谱分析法、其他仪器分析法。

1. 电化学分析法 (electrochemical analysis) 电化学分析法是根据物质在溶液中的电化学性质建立的一类分析方法, 是以电讯号作为计量关系的一类方法, 主要包括: 电导分析法、电位分析法、库仑分析法、伏安分析法、极谱分析法等。

2. 光学分析法 (optical analysis) 光学分析法是根据物质发射的电磁辐射或电磁辐射与物质相互作用而建立起来的一类分析化学方法, 可分为光谱法和非光谱法。光谱法是基于物质与辐射能作用时, 测量由物质内部发生量子化的能级之间的跃迁而产生的发射、吸收或散射辐射的波长和强度进行分析的方法。非光谱法是基于物质与辐射相互作用时, 测量辐射的某些性质, 如折射、散射、干涉、衍射、偏振等变化的分析方法。

光谱法可分为原子光谱法和分子光谱法。原子光谱法是由原子外层或内层电子能级的变化产生的, 它的表现形式为线光谱。属于这类分析方法的有原子发射光谱法 (AES)、原子吸收光谱法 (AAS), 原子荧光光谱法 (AFS)、X 射线荧光光谱法 (XFS) 等。分子光谱法是由分子中电子能级、振动和转动能级的变化产生的, 表现形式为带光谱。属于这类分析方法的有紫外-可见分光光度法 (UV-Vis), 红外光谱法 (IR), 分子荧光光谱法 (MFS) 和分子磷光光谱法 (MPS) 等。

3. 色谱分析法 (chromatographic analysis) 色谱分析法是利用混合物中的各组分在互不相溶的两相 (固定相与流动相) 中的吸附、分配、离子交换等性能方面的差异进行分离分析测定的一类分析方法。色谱分析法主要包括气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、薄层色谱法 (TLC) 和离子色谱法 (IC) 等。此外, 还有新近发展起来的超临界流体色谱 (SFC) 和毛细管电泳技术 (CE), 也属色谱分析的范畴。

4. 其他分析法 除以上三类分析方法外, 还有利用热学、力学、声学、动力学等性质进行测定的仪器分析法。其中最主要的有: (1) 质谱法 (MS) 根据物质带电粒子的质荷比在电磁场作用下进行定性、定量和结构分析的方法; (2) 热分析法 依据物质的质量、体积、热导、反应热等性质与温度之间的动态关系来进行分析的方法; (3) 放射分析法 依据物质的放射性辐射来进行分析的方法, 如同位素稀释法、中子活化分析法等。

第二节 现代生物仪器的发展概况

现代生物仪器分析是一个崭新而年轻的领域, 它是与生物学、电子学、计算机科学、现代信息技术科学交叉发展而产生的新领域。现代生命科学领域的发展推动了仪器分析学科的突飞猛进, 特别是近年来新的仪器设备不断涌现, 新的仪器分析方法和技术不断产生, 熟练掌握和使用生物仪器分析技术逐渐成为当代生命科学研究人员必备技能。

一、仪器分析技术的发展过程

分析化学自产生以来, 经历了三个发展阶段, 实现了三次重大变革。

第一阶段：随着天平的出现，分析化学具有了科学的内涵；20 世纪初，依据溶液中四大反应平衡理论，形成分析化学的理论基础，分析化学由一门操作技术变成一门科学。在这个阶段，化学分析占主导地位，仪器分析种类少而且精度低。

第二阶段：20 世纪 40 年代后，仪器分析的大发展时期。仪器分析使分析速度加快，促进化学工业发展；化学分析与仪器分析并重，仪器分析自动化程度低；这一时期一系列重大科学发现，为仪器分析的建立和发展奠定基础。仪器分析的发展引发了分析化学的第二次变革。

第三阶段：20 世纪 80 年代初，以计算机应用为标志的分析化学第三次变革。计算机控制的分析数据采集与处理，实现分析过程的连续、快速、实时、智能，促进了化学计量学的建立。以计算机为基础的新仪器的出现，如傅里叶变换红外光谱仪、色谱-质谱联用仪等。

二、现代生物仪器分析的发展趋势

20 世纪 40~50 年代兴起的材料科学，20 世纪 60~70 年代发展起来的环境科学都促进了分析化学学科的发展。20 世纪 80 年代以来，生命科学的发展也促进分析化学的巨大发展。仪器分析是分析化学的重要组成部分，也随之不断发展，不断地更新自己，为科学技术提供更准确、更灵敏、专一、快速、简便的分析方法。如生命科学研究的发展，需要对多肽、蛋白质、核酸等生物大分子进行分析，对生物药物分析，对超微量生物活性物质，如单个细胞内神经传递物质的分析以及对生物活体进行分析。现代生物仪器分析技术正向智能化、数字化方向发展。基于微电子技术和计算机技术的应用实现分析仪器的自动化，通过计算机控制器和数字模型进行数据采集、运算、统计、分析、处理，提高分析仪器数据处理能力，数字图像处理系统实现了分析仪器数字图像处理功能的发展；分析仪器的联用技术向测试速度超高速化、分析试样超微量化、分析仪器超小型化的方向发展。

1. 提高灵敏度 将现代技术引入分析化学，提高分析方法的灵敏度，如激光技术的引入，促进了激光共振电离光谱、激光拉曼光谱、激光诱导荧光光谱、激光光热光谱、激光光声光谱和激光质谱的发展，提高了分析方法灵敏度，使检测单个原子或分子成为可能。

2. 解决复杂体系的分离问题及提高分析方法的选择性 新化合物快速增长，复杂体系的分离和测定已成为仪器分析所面临的艰巨任务。由液相色谱、气相色谱、超临界流体色谱和毛细管电泳等所组成的色谱学是现代分离、分析手段的主要组成部分并获得了长足的进展。联用分析技术已成为当前仪器分析的重要发展方向，将几种方法结合起来，特别是分离方法（如色谱法）和检测方法（红外光谱法、质谱法、核磁共振波谱法、原子发射光谱法等）的结合，汇集了各自的优点，弥补了各自的不足，可以更好地完成试样的分析任务。

3. 扩展时空多维信息 现代仪器分析的发展已不再局限于将待测组分分离出来进行表征和测量，而成为一门为物质提供尽可能多的化学信息的科学。例如现代核磁共振波谱、红外光谱、质谱等的发展，可提供有机物分子的精细结构、空间排列构型及瞬态等变化的信息，为人们对化学反应历程及生命过程的认识展现了光辉的前景。化学计量学的发展，更为处理和解析各种化学信息提供了重要基础。

4. 微型化及微环境的表征与测定 微型化及微环境分析是现代仪器分析认识自然从宏观到微观的延伸。电子学、光学和工程学向微型化发展，人们对生物功能的了解，促进了分析化学深入微观世界的进程。电子显微技术、电子探针 X 射线微量分析、激光微探针质谱等微束技术已成为进行微区分析的重要手段。在表面分析方面，电子能谱、次级离子质谱、脉冲激光原子探针等的发展，可检测和表征一个单原子层，因而在材料科学、催化剂、生物

学、物理学和理论化学研究中占据重要的位置。

5. 形态、状态分析及表征 在环境科学中,同一元素的不同价态和所生成的不同的有机化合物分子的不同形态都可能存在毒性上的极大差异。在材料科学中物质的晶态、结合态更是影响材料性能的重要因素。目前已报道利用诸如阳极溶出伏安法、X射线光电子能谱、X射线荧光光谱、X衍射、热分析、各种吸收光谱方法和各种联用技术来解决物质存在的形态和状态问题。

6. 生物大分子及生物活性物质的表征与测定 在欧美等国家具有战略意义的研究规划“尤利卡计划”,“人类基因组”及“人体研究新前沿”中,生物大分子的结构分析研究都占据重要地位。我国在发展高技术战略的规划中,也把生物技术列为重点领域。一方面生命科学及生物工程的发展向分析化学提出了新的挑战。另一方面仿生过程的模拟,又成为现代分析化学取之不尽的源泉。当前采用以色谱、质谱、核磁共振、荧光、磷光、化学发光和免疫分析以及化学传感器、生物传感器、化学修饰电极和生物电分析化学等为主体的各种分析手段,在生命体和有机组织及分子和细胞水平上来研究生命过程中某些大分子及生物活性物质的化学和生物本质。

7. 非破坏性检测及遥测 许多物理和物理化学分析方法都已发展为非破坏性检测。这对生产流程控制,自动分析及难取样的如生命过程等的分析是极为重要的。遥测技术应用较多的是激光雷达、激光散射和共振荧光、傅里叶变换红外光谱等,已成功地用于测定远距离的气体、某些金属的原子和分子、飞机尾气组成、炼油厂周围大气组成等,并为红外制导和反制导系统的设计提供理论和实验根据。

8. 自动化及智能化 微电子工业、大规模集成电路、微处理器和微型计算机的发展,使分析仪器进入了自动化和智能化的阶段。机器人是实现基本化学操作自动化的重要工具。专家系统是人工智能的最前沿。在分析化学中,专家系统主要用作设计实验和开发分析方法,进行谱图说明和结构解释。过程分析已使分析化学家摆脱传统的实验室操作,进入到生产过程、生态过程控制的行列。

第三节 定量分析方法的评价指标

一、仪器性能及其表征

1. 精密度 (precision) 精密度是指使用同一方法或步骤进行多次重复测量所得分析数据之间符合的程度。精密度常用测定结果的标准偏差 (SD) 或相对标准偏差 (RSD) 量度。

标准偏差 (standard deviation, SD) 也称标准离差或均方根差,是反映一组测量数据离散程度的统计指标,是指统计结果在某一个时段内误差上下波动的幅度。标准偏差计算公式如下:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

式中 S ——标准偏差, %;

N ——试样总数或测量次数;

x_i ——物料中某成分的各次测量值;

$\bar{x}$ ——物料中某成分的测量平均值。

相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 是指标准偏差与计算结果算术平均值的比值, 即: 相对标准偏差 (RSD) = 标准偏差 (SD) / 计算结果的算术平均值 (X) $\times 100\%$ 。

2. 误差 (bias) 测量值的总体平均值 x 与“真值 μ ”接近的程度。即误差 = $x - \mu$ 。通过多次测量已知浓度或含量的物质 (称为标准物质), 得到总体平均值与标准物质含量 (真实值) 比较。在建立新的分析方法时, 对标准物质的测量可找出误差的来源, 并通过空白分析和仪器校正来消除误差。

3. 灵敏度 (sensitivity) 反映了仪器或方法区别微小浓度或含量变化的能力, 也就是说, 当浓度或含量有微小变化时, 仪器或方法均可以检测出来。影响灵敏度的因素主要有: ①校正曲线的斜率; ②分析的重现性或精密度。International Union of Pure & Applied Chemists, 即 IUPAC 推荐使用“校正灵敏度”或者“校正曲线斜率”作为衡量灵敏度高低的标准。图 1-1 为仪器和方法的灵敏度描述。

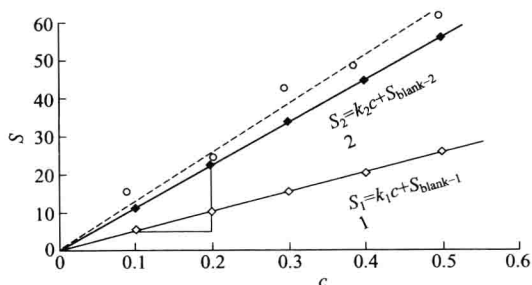


图 1-1 仪器和方法的灵敏度描述

k_1, k_2 分别为两条校正曲线的斜率, 即灵敏度, 但未考虑测定重现性的影响

4. 检测限 (detection limit, DL) 在已知置信水平, 可以检测到的待测物的最小质量或浓度。它和分析信号 (signal) 与空白信号的波动 (噪音, noise) 有关, 或者说与信噪比 (S/N) 有关。只有当有用的信号大于噪音信号时, 仪器才有可能识别有用信号, 如图 1-2 所示。

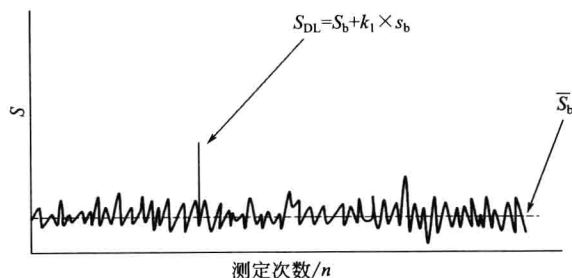


图 1-2 仪器噪音及方法检出限

检出限的计算: 测定空白样品 (或浓度接近空白值) 20~30 次, 求其平均值 S_b 及其标准偏差 s_b , 则可分辨的最小信号 $S_{DL} = S_b + k_1 \times s_b$ 。

通过校正曲线的斜率 k , 将最小待测物信号 S_{DL} 转化为浓度值 C_{DL} , 即:

$$C_{DL} = \frac{S_{DL} - S_b}{k}$$

经统计学的 t 和 z 检验, 当 $k_1 = 3$ 时, 大多数情况下, 检测结果的置信度为 95%。因此

上式可转换为：

$$C_{DL} = \frac{k_1 s_b}{k} = \frac{3s_b}{k}$$

5. 信噪比 (signal-to-noise ratio, S/N) 任何测量值均由两部分组成：信号及噪音。其中信号反映了待测物的信息，是我们所关心的，而噪音是不可避免的，它降低分析的准确度和精密度，提高检出限，是我们不希望的。多数情况下， N 是恒定的，与 S 大小无关。当测量信号较小时，测量的相对误差将增加。因此信噪比 S/N 是恒量仪器性能和分析方法好坏最为有效的指标。当 $S/N < 2 \sim 3$ 时，分析信号将很难测定。

$$\frac{S}{N} = \frac{\text{平均值}}{\text{标准偏差}} = \frac{\bar{x}}{s} = \frac{1}{RSD}$$

6. 线性范围 (linear range) 是指仪器检测系统检测信号与被测物质浓度或质量成线性关系的范围；线性范围可以用被检测物质在线性范围内的最大和最小进样量之比表示。线性范围越宽，说明在定量分析中可测定浓度范围越大。

7. 选择性 (selectivity) 样品基体中其他组分对测定待测物的干扰程度。在分析中没有哪种测定不受到诸多因素的干扰，换句话说，分析的过程就是消除或减少干扰对测定影响的过程，也就是提高分析选择性的过程。

二、仪器分析校正方法

所谓校正 (calibration) 就是将仪器分析产生的各种信号与待测物浓度联系起来的过程。除重量法和库仑法之外，所有仪器分析方法都要进行“校正”。校正方法常用的有三种：标准曲线法、标准加入法和内标法。

1. 标准曲线法 (calibration curve, working curve, analytical curve)

具体做法：①准确配制已知待测物浓度的系列溶液：0 (空白)， c_1 ， c_2 ， c_3 ， c_4 ，…；②通过仪器分别测量以上各待测物的响应值 S_0 ， S_1 ， S_2 ， S_3 ， S_4 ，…以及样品溶液中待测物的响应值 S_x ；③以响应信号 S 对浓度 c 作图得到标准曲线，然后通过测得的 S_x 从图中求得 c_x ；或者通过最小二乘法获得其线性方程，再直接进行计算。

标准曲线法的准确性与两个因素有关：①标准物浓度配制的准确性；②标准基体与样品基体的一致性。

2. 标准加入法 (standard addition method)

具体做法：①将一系列已知量待测物分别加入到几等份的样品中，配制成浓度为 $(c_x + 0)$ ， $(c_x + c_1)$ ， $(c_x + c_2)$ ， $(c_x + c_3)$ ，…，得到和样品有相同基体的标准系列 (加标，spiking)；②通过仪器分别测量以上系列的响应值 S_0 ， S_1 ， S_2 ， S_3 ， S_4 ，…；③以响应信号 S 对浓度 c 作图，再将直线外推与浓度轴相交于一点 (如图 1-3 所示)，求得样品中待测物浓度 c_x 。该法的优点是基体 (matrix) 相近，或者说基体干扰相同，因此定量结果比较准确；缺点是麻烦，适于小数量的样品分析。

3. 内标法 (internal standard method)

该法可以说是上述两种校正曲线的改进，可用于克服或减少仪器或方法的不足等引起的随机误差或系统误差。具体作法：①寻找一种物质或内标物，该内标物必须是样品中大量存在的或完全不存在的。然后，在所有样品、标准及空白中加入相同量的上述内标物；②分别测量样品及标准样品中待测物及内标物的响应值，然后以 S_x/S_i 比值对浓度 c 作图；③按前述校正方法获得 c_x 。

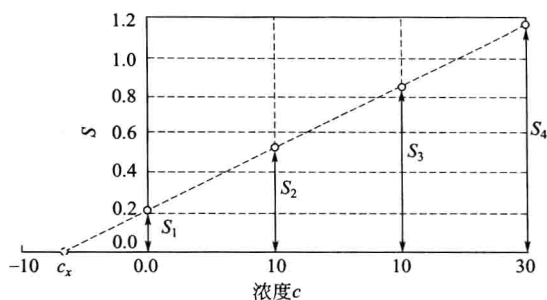


图 1-3 标准加入法定量分析示意图

当待测物与内标物的响应值的波动一致时，其比值可抵消因仪器信号的波动和操作上的不一致所引起的测定误差；例如 Li 可作为血清中 K、Na 测定的内标物（Li 与 K、Na 性质相似，但在血清中不存在）。但寻找合适的内标物（与待测物性质相似而且仪器可以识别各自的信号），或重复引入内标物往往有一定的困难。因此，寻找合适内标物是十分费时的。

思考题与习题

1. 仪器分析与化学分析的关系？
2. 仪器分析法有何特点？
3. 现代仪器分析主要包括哪些分析方法？
4. 现代仪器分析的发展方向如何？
5. 分析仪器的性能应从哪些方面进行评价？
6. 仪器分析常用的校正方法有哪些？各自有何特点？

第二章 生物样品分析前处理技术

样品前处理技术在分析方法中占有极其重要的地位，很多分析问题都可以通过样品前处理得以解决。虽然最新的分析仪器对样品处理的要求降低了，但由于分析技术涉及的样品种类繁多、样品组成及其浓度复杂多变、样品物理形态范围广泛，直接分析测定的干扰因素特别多，因此选择科学有效的前处理方法和技术是很有必要的，同时也是分析方法建立成败的关键。

生物样品的前处理主要是指从动物、植物或微生物样品中提取和纯化其新陈代谢时产生的蛋白质（包括酶类）、核酸和多糖等生物物质。生物样品较其他样品相比具有以下特征：①目标产物浓度普遍较低，悬浮液大部分是“水”，组分复杂，是含有细胞、细胞碎片、蛋白质、核酸、脂类、糖类、无机盐类等多种物质的混合物；②分离过程很容易发生失活现象，pH 值、离子强度、温度等变化常常造成产物的失活；③性质不稳定，易随时间变化，如受空气氧化，微生物污染，蛋白水解作用等。而且生物材料纷繁多样，因此前处理方法也有很大差别。生物样品前处理步骤一般包括：①选材（预处理）；②细胞的破碎；③目标产物的分离纯化；④产物的浓缩、干燥和保存。

第一节 生物样品的预处理

生物样品中往往含有大量有机物、无机物及各种微量元素等，因此对目标组分进行初步富集和分离，对干扰组分进行初步去除等工作都属于预处理。

一、生物材料的选择

植物、动物、微生物均可作为制备生物物质的原材料，例如植物的花、茎、叶、根、种子，动物的毛发、肌肉、组织器官，植物或动物细胞培养液，微生物发酵液，动物血液，乳液等。制备生物大分子，首先要选择适当的生物材料。选择的材料应含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低，尽可能保持新鲜，尽快加工处理。动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分，绞碎后在适当的溶剂中提取，如果所要求的成分在细胞内，则要先破碎细胞。植物要先去壳、除脂。微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。生物材料如暂不提取，应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存。

二、不同来源样品分离的预处理

（一）植物组织中活性物质的提取

1. 酶的提取 植物组织中所存在的酚类化合物使植物中提取酶的过程变得复杂。植物组织被破坏时，酶和酚类处混合接触状态，很易发生反应。产物苯醌和单宁酸类会继续和酶蛋白反应，使目的酶失去活性。酚类化合物与蛋白质可通过以下两种方式结合，一是可逆结合，酚类化合物的羟基与蛋白质分子形成氢键，例如肽键的—CO 端和—NH 端；二是不可逆结合，酚类化合物的两个相邻羟基被氧化为邻苯醌之后，通过共价键与蛋白质分子中的自由氨基以及巯基结合，引起蛋白质活性基团集合，导致聚集、交叉结合和沉淀（酶促褐变作

用)。为此去除酚类化合物或避免反应发生是必须进行的步骤。

酶的提取预处理时需要注意以下条件：①温度尽可能低；②提取液的量要保证“充分浸入”；③加入足量酚类吸附剂；④加入足量氧化酶抑制剂；⑤搅拌转速要恰当；⑥pH 值要控制在合适范围，一般 5.5~7。天然和合成的聚合物都可用作酚类吸附剂，如清蛋白、尼龙粉、聚乙烯吡咯烷酮-PVP（可溶）、聚乙烯聚吡咯烷酮-PVPP（不溶）、聚乙烯和聚丙烯树脂（如离子交换树脂 XAD-2、XAD-4 和 XAD-7）、聚苯乙烯的离子交换树脂（如阴离子交换树脂 Bio-Rad AG1-X8，AG2-X8 和 Dowex-1；阳离子交换树脂 Dowex-50）。常用的氧化酶抑制剂有：2-巯基乙醇，二硫苏糖醇（DTT），二硫赤藓糖醇（DTE），抗坏血酸盐等。前三种既是多酚氧化酶的抑制者又是醌的清除剂；抗坏血酸盐能阻止醌重新还原成酚，在低浓度的醌存在下就极易被消耗，因此须在相对较高的浓度条件下使用（50mmol/L）。

2. RNA 的提取 从植物组织中提取 RNA 是进行植物分子生物学方面研究的必要前提。Northern 杂交分析、纯化 mRNA 用于体外翻译或建立 cDNA 文库、RT-PCR 及差示分析等过程中需要高质量的 RNA，能否有效地去除多糖、酚类化合物、萜类化合物、RNase 和干扰 RNA 提取的其他代谢产物是提取高质量植物 RNA 成败的关键。

（1）酚类化合物的干扰及对策 酚类化合物与 RNA 不可逆结合导致 RNA 活性丧失、用苯酚或氯仿抽提时 RNA 丢失、形成不溶性复合物。常采用的对策有：①还原剂法，2-巯基乙醇（ME）、二硫苏糖醇（DTT）或半胱氨酸 Cys 来防止酚类物质被氧化，硼氢化钠（ NaBH_4 ）是可还原醌的还原剂；②螯合剂法，PVP 和 PVPP 中的 $-\text{CO}-\text{N}=\text{基}$ 有很强的结合多酚化合物的能力，其结合能力随着多酚化合物中芳环羟基数量的增加而加强；③Tris-硼酸法，硼酸可与酚类靠氢键形成复合物，抑制了酚类物质的氧化及其与 RNA 的结合；④牛血清白蛋白（BSA）法，原花色素类物质与 BSA 间可产生类似于抗原-抗体间的相互作用，形成可溶性的或不溶性的复合物，减小了原花色素类物质与 RNA 结合的机会；⑤丙酮法，用 -70°C 的丙酮抽提冷冻研磨后的植物材料，可有效从云杉、松树、山毛榉等富含酚类化合物的植物材料中分离到高质量的 RNA；⑥通过 Li^+ 或 Ca^{2+} 沉淀 RNA 的方法可以将未被氧化的酚类化合物去除。与 PVP、不溶性 PVPP 或 BSA 结合的多酚，可以直接通过离心去除掉，或在苯酚、氯仿抽提时除去。

（2）多糖的干扰及对策 植物组织往往富含多糖，而多糖的许多理化性质与 RNA 很相似，较难将它们分开。含多糖的 RNA 沉淀难溶于水，或溶解后产生黏稠状的溶液，对 RNA 提取造成较大的干扰。常采取的对策有：SDS 盐酸胍处理；高浓度 Na^+ 或 K^+ 离子下，苯酚、氯仿抽提；低浓度乙醇沉淀多糖；醋酸钾沉淀多糖。

（3）蛋白杂质的影响及对策 蛋白质是污染 RNA 样品的又一个重要因素。由于 RNase 和多酚氧化酶亦属于蛋白质，因而要获得完整的、高质量的 RNA 就必须有效地去除蛋白杂质。采取的常规方法：冷冻条件下研磨植物材料以抑制 RNase 等的活性；提取缓冲液中含有蛋白质变性剂，如苯酚、胍、SDS、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）等，这样在匀浆时可以使蛋白质变性，凝聚；利用蛋白酶 K 来降解蛋白杂质，进一步可以用苯酚、氯仿抽提去除蛋白质。

（4）次级代谢产物的影响及对策 从植物组织中提取高质量 RNA 的另一个难点是许多高等植物组织尤其是成熟组织能产生某些水溶性的次级代谢产物，这些次级代谢产物很容易与 RNA 结合并与 RNA 共同被抽提出来而阻碍具有生物活性的 RNA 的分离。由于不能确定次级代谢产物具体是什么物质，目前还没有统一的方法来解决这个问题。

3. 多糖的提取 多糖广泛存在于植物、微生物（细菌和真菌）和海藻中，来源很广。我国是中药的起源之地，而糖类是中药材中普遍存在的成分，在对各种中药材的化学成分研究的过程中，人们都少不了对其中多糖的关注。多糖提取液中除去蛋白质是一个很重要的步骤，常用的方法有 Sevag 法、三氟三氯乙烷法、三氯乙酸法、酶解法等。研究表明三氯乙酸法和 Sevag 法的脱蛋白效果相近，并且蛋白酶法与 Sevag 法相结合除蛋白的效果较好。

（二）动物组织材料的预处理

对动物组织，一般选择有效成分含量丰富的脏器组织为原材料，先进行绞碎、脱脂等处理。另外，对预处理好的材料，若不立即进行实验，应冷冻保存，对于易分解的生物大分子应选用新鲜材料制备。

动物组织材料常含有较多的脂肪，脂肪不仅容易氧化酸败，导致样品变质，还会影响提取和纯化效果。常用的脱脂方法有：手工剥去组织中的脂肪；用绞肉机将动物组织在脂溶性有机溶剂如丙酮、乙醚中脱脂；快速加热（约 50℃）和快速冷却的方法，使熔化的油脂冷却后凝聚成油块后除去；液体样品可利用油脂分离器使油脂与水溶液分离。

脱脂后的动物组织样品应进一步脱去水分，以利保存。常将脱脂后的动物样品置丙酮液中浸泡，并更换丙酮液 2~3 次，丙酮可交换出样品中的水分，然后再挥发掉样品中的丙酮，即得到干燥的样品，磨粉后贮存备用。对于耐高温的有效成分，样品可在沸水中蒸煮处理，烘干后磨粉保存。

（三）微生物材料的预处理

各种发酵产品，由于菌种不同和发酵液特性不同，其预处理方法的选择也有所不同。大多数发酵产物存在于发酵液中，也有少数产物存在于菌体中或发酵液和菌体中都有。对于胞外产物，经预处理应尽可能使目的产物转移到液相，然后经固液分离除去固相；对于胞内产物，则应首先收集菌体或细胞，经细胞破碎后，目的产物进入液相，随后再将细胞碎片分离。

第二节 细胞的破碎

细胞的破碎是指用一定方法（机械法、物理法、化学法、酶法等）打开细胞壁或膜，使细胞内含物有效地释放出来，将生物体细胞内及多细胞生物组织中的待测组分（如激素、酶、基因工程产物等）充分释放到溶液中。不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织，其细胞破碎的难易不一，使用的方法也不相同，如动物脏器的细胞膜较脆弱，容易破碎，植物和微生物由于具有较坚固的纤维素、半纤维素组成的细胞壁，要采取专门的细胞破碎方法。

一、机械法

这是一类利用机械运动产生的剪切力破碎细胞的方法，常用的机械法有：

（一）组织捣碎法

将材料配成稀糊状液，放置于筒内约 1/3 体积，盖紧筒盖，将调速器先拨至最慢处，开动开关后，逐步加速至所需速度。适用于硬度较大的动、植物组织，转速可高达 10000r/min 以上。由于旋转刀片的机械切力很大，制备一些较大分子（如核酸）时，则很少使用。

（二）高速匀浆法

高速匀浆法的原理是利用高压使细胞悬浮液通过针形阀，由于突然减压和高速冲击撞击