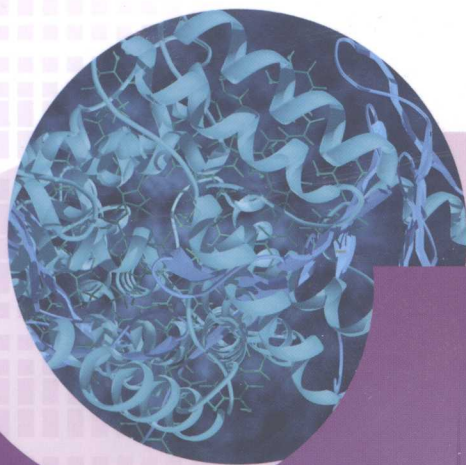


生物化学 仪器分析基础

曹成喜 等编著

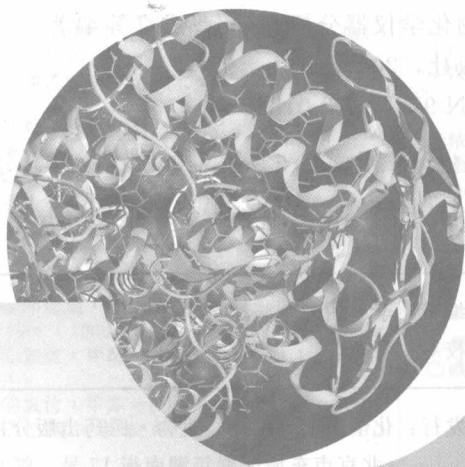
SHENGWU HUAXUE YIQI FENXI JICHU



化学工业出版社
生物·医药出版分社

生物化学 仪器分析基础

曹成喜 等编著



化学工业出版社
生物·医药出版分社

·北京·

本书是生物、医药、化工等领域从事仪器分析研究的资深专家历时多年倾心撰写的著作，力求科学、全面、新颖，本书实例丰富、分析讲解透彻，具有很强的实际指导和参考作用。由于生命科学的特殊性和内容的限制，本书的内容主要为生命科学领域应用非常广泛的仪器分析方法，包括常用的四大谱学，即紫外光谱、红外光谱、核磁共振（NMR）和生物质谱；色谱技术，包括基础理论、简便易行的薄层色谱和常用的高效液相色谱等。

适合作为生物学、生物技术、生物化工、农学和医药等生命科学相关专业的本科生、研究生教材及参考书，也可为相关科技工作者参考阅读。

生物化学仪器分析基础

图书在版编目（CIP）数据

生物化学仪器分析基础/曹成喜等编著. —北京：化学工业出版社，2008.1

ISBN 978-7-122-01834-2

I. 生… II. 曹… III. 生物化学-仪器分析 IV. Q5-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2008）第 003131 号。

责任编辑：李 丽 余晓捷

文字编辑：周 侗

责任校对：吴 静

装帧设计：关 飞

出版发行：化学工业出版社 生物·医药出版分社

（北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011）

印 装：化学工业出版社印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 13 彩插 1 字数 323 千字 2008 年 3 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：35.00 元

版权所有 违者必究

前言

仪器分析在现代生命科学研究、生物医药研发、临床生化诊断、生化产品生产等很多领域起着越来越重要的作用，甚至是不可替代的作用。比如高效液相色谱、薄层色谱、物质光谱、红外光谱、核磁共振波谱、紫外-可见分光光谱、毛细管电泳、DNA 序列分析仪、聚合酶链反应 (PCR)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和生化分析仪等已广泛应用于生物医药、临床检验和相关的工业生产等。

我国的仪器分析课程主要开设在化学、化工、药学和石化等大学本科专业，很少在生命科学有关的大学本科专业（如生物学、生物技术、生物化工、农学和医学等）开设。面对现代仪器分析技术的迅速发展，一方面，与生命科学有关的研究生亟待修学这门课程；另一方面，与生命科学有关的科技工作者也亟须进一步学习相关的科学知识。

考虑到生物科学的特殊性和内容的限制，对于本书的内容安排，主要考虑了在生命科学中应用非常广泛的仪器分析方法，包括：①在生命科学领域常用的四大谱学，包括紫外光谱、红外光谱、核磁共振和物质光谱；②色谱技术，包括基础理论、薄层色谱和高效液相色谱等。同时，将直接应用于生物科学的有关仪器分析等内容安排在《分析生物化学技术》一书中，这些内容包括：①电泳技术，包括电泳学基础、凝胶电泳和毛细管电泳；②重要生物物质的分析，包括聚合酶链反应技术、核酸序列分析和蛋白质分析等；③酶联免疫吸附测定技术。

一些单位和个人对本书的出版做出了重要贡献，借此机会表达心中久存的谢意。感谢上海交通大学为本书的出版提供的机会和资助；感谢中国科学技术大学淦五二教授撰写了第 2 章，淦教授 20 多年来一直从事于光谱学教学和研究；感谢沈阳药科大学王东援教授编著了第 7 章，王教授多年来一直从事于薄层色谱的研究，在相关领域颇有建树；感谢中国科学院上海生命科学研究院秦维华老师撰写了第 8 章；感谢上海交大学生物质谱专家李伟博士编著了第 4 章，分析化学樊柳荫博士编写了第 5 章。作为编者，我也将 5 年短暂的教学经验和我们实验室部分科研积累写进了本书，这些内容为第 1 章、第 3 章和第 6 章。感谢我的研究生张薇、邵菁、骆新俊、陈想、孟佳和陈茜等同学，他们做了很多文字和图表处理等工作。

由于编者水平有限，本书存有的疏漏和不妥之处恳请读者及时指出。

曹成喜

于上海交通大学 思源湖畔

2008 年 1 月

目 录

第1章 绪论	1
1.1 分类	2
1.2 一般步骤	4
1.2.1 检测的物理学基础	4
1.2.2 分析的一般过程	4
1.3 仪器分析的重要性	5
1.3.1 化工过程分析	5
1.3.2 生命科学研究	6
1.3.3 化学科学研究	7
1.4 可靠性的论证	7
1.4.1 专一性	7
1.4.2 精密度	8
1.4.3 准确度	9
1.4.4 灵敏度	9
1.4.5 定量限	9
1.4.6 线性范围	10
1.4.7 标准曲线	10
1.4.8 耐用性	10
1.5 仪器分析的发展	11
参考文献	12
第2章 紫外-可见吸收光谱法	14
2.1 一般介绍	15
2.2 基本原理	16
2.2.1 分子光谱的产生	16
2.2.2 光谱吸收曲线	17
2.3 物质的紫外-可见吸收光谱	18
2.3.1 电子跃迁类型	18
2.3.2 常用术语	19
2.3.3 常见有机化合物紫外吸收光谱	21
2.3.4 无机化合物紫外-可见吸收光谱	23
2.3.5 蛋白质紫外吸收光谱	24
2.3.6 核酸紫外吸收光谱	24
2.3.7 影响吸收光谱的因素	25
2.4 紫外-可见分光光度计	27

2.4.1	基本组件	27
2.4.2	常用仪器	29
2.5	应用	30
2.5.1	定性分析	30
2.5.2	有机物结构分析	30
2.5.3	定量分析	34
2.5.4	在生物医学领域中的应用	34
2.5.5	在药物分析领域中的应用	35
	参考文献	36
第3章 红外吸收光谱法		38
3.1	红外光区	39
3.1.1	远红外光区	39
3.1.2	中红外光区	39
3.1.3	近红外光区	40
3.1.4	红外光谱特点	40
3.2	红外光谱仪	40
3.2.1	基本组成	40
3.2.2	色散型红外分光光度计	42
3.2.3	傅里叶变换红外分光光度计	43
3.3	基本原理	44
3.3.1	双原子分子的振动	45
3.3.2	多原子分子的振动	46
3.3.3	吸收峰强度的影响因素	47
3.4	基团频率与特征吸收峰	48
3.4.1	官能团区	48
3.4.2	指纹区	49
3.4.3	主要基团的特征吸收峰	49
3.5	基团频率的影响因素	51
3.5.1	内部因素	51
3.5.2	外部因素	53
3.6	试样的制备	53
3.6.1	液体样品	53
3.6.2	固体样品	54
3.6.3	气体样品	55
3.7	红外光谱的应用	55
3.7.1	定性分析	55
3.7.2	标准红外图谱集	57
3.7.3	牛黄品质的鉴定	58
3.7.4	蛋白质分析	58
	参考文献	58

第4章 生物质谱	60
4.1 基本原理	61
4.2 基本概念	62
4.2.1 质量定义	62
4.2.2 质量测定范围	63
4.2.3 灵敏度	63
4.2.4 质量准确度	63
4.2.5 分辨率	63
4.2.6 质谱仪分类	64
4.3 仪器系统组成	64
4.3.1 进样系统	65
4.3.2 样品电离系统	65
4.3.3 质量分离系统	69
4.3.4 检测系统	73
4.4 质谱数据	75
4.4.1 质谱图和质谱表	75
4.4.2 分子离子峰	76
4.4.3 同位素离子峰	76
4.4.4 碎片离子峰	76
4.4.5 亚稳态离子峰	77
4.4.6 重排离子峰	77
4.4.7 多电荷离子峰	78
4.5 分子断裂方式和断裂图像	78
4.5.1 分子断裂方式	79
4.5.2 重要有机化合物的断裂图像	79
4.6 在生物医学上的应用	80
4.6.1 分子量测定	80
4.6.2 分子式推测	81
4.6.3 结构式推测	81
4.6.4 蛋白质分析	82
4.6.5 核酸分析	84
4.6.6 多糖分析	85
参考文献	88
第5章 核磁共振波谱	89
5.1 基本原理	90
5.1.1 原子核的自旋与磁矩	90
5.1.2 核磁共振	91
5.1.3 弛豫	93
5.2 化学位移	93
5.2.1 化学位移的产生	93

5.2.2	化学位移的表示方法	94
5.2.3	影响化学位移的因素	94
5.3	自旋耦合与自旋裂分	96
5.3.1	自旋耦合与自旋裂分现象	96
5.3.2	自旋裂分机制	97
5.3.3	耦合常数及耦合相互作用的一般规则	98
5.4	图谱解析	98
5.5	核磁共振波谱仪	101
5.5.1	核磁共振波谱仪基本组成	101
5.5.2	常用核磁共振波谱仪	102
5.6	核磁共振波谱法的应用	102
5.6.1	在化学中的应用	103
5.6.2	在生命科学中的应用	103
5.6.3	在药物领域的应用	106
5.6.4	在食品中的应用	107
	参考文献	108
第6章 色谱基础		111
6.1	基本组件	112
6.1.1	色谱柱	113
6.1.2	洗脱系统	113
6.1.3	检测器	113
6.1.4	进样系统	113
6.1.5	部分收集器	114
6.1.6	计算机与控制软件	114
6.2	色谱分类	114
6.2.1	按应用的目的分类	114
6.2.2	按流动相和固定相分类	114
6.2.3	按色谱展开的几何形式分类	114
6.2.4	按分离过程的原理分类	115
6.2.5	按展开程序分类	115
6.3	色谱驱动力	116
6.4	术语与参数	117
6.4.1	典型的色谱图	117
6.4.2	区域宽度	117
6.4.3	分配系数 K	118
6.4.4	保留值	119
6.4.5	容量因子 K'	120
6.4.6	阻滞因子 R_f	121
6.4.7	色谱柱柱效	121
6.4.8	分离度 R_s	122

6.5	速率理论	124
6.5.1	涡流扩散项	124
6.5.2	分子扩散项	125
6.5.3	传质阻力项	125
6.5.4	色谱柱的几何尺寸的影响	126
6.5.5	液相色谱中的速率理论	126
6.5.6	HPLC 的折合参数	128
6.5.7	其他速率理论	129
6.6	定性和定量	129
6.6.1	定性分析	129
6.6.2	定量分析	129
6.6.3	定量方法	131
	参考文献	132
第7章	薄层色谱法	133
7.1	经典 TLC 技术	134
7.1.1	薄层板	134
7.1.2	点样	137
7.1.3	展开方式	138
7.1.4	检测	141
7.2	基本理论	142
7.2.1	比移值 (R_f)	142
7.2.2	塔板数与斑点宽度	143
7.2.3	斑点压缩效应	143
7.3	影响因素	143
7.3.1	气-固平衡与液-固平衡	144
7.3.2	影响斑点宽度的因素	144
7.3.3	影响圆形展开的因素	145
7.4	流动相	146
7.4.1	分类	146
7.4.2	流动相选择原则	147
7.5	展开方法进展	148
7.5.1	水平展开与斜坡式输液分配器	148
7.5.2	中途展开与接力展开	149
7.5.3	漏斗式输液分配器	151
7.5.4	二维展开的改进	152
7.5.5	多维接力展开	153
7.5.6	下行展开的改进	154
7.6	洗脱技术及其进展	154
7.6.1	下行在线洗脱	155
7.6.2	水平在线洗脱	156

7.6.3	原位洗脱	157
7.7	在生物学上的应用	157
7.7.1	中药材成分的分离	157
7.7.2	氨基酸的分离	158
7.7.3	核酸的分离	158
7.7.4	糖类物质的分离	158
7.7.5	类脂物质的分离	158
7.7.6	激素物质的分离	158
	参考文献	158
第8章	高效液相色谱法	160
8.1	高效液相色谱仪器	161
8.1.1	高压输液系统	161
8.1.2	色谱柱系统	164
8.1.3	进样系统	165
8.1.4	检测系统	166
8.2	液-固色谱	167
8.2.1	色谱填料	167
8.2.2	流动相	168
8.2.3	分离条件选择	169
8.3	液-液色谱	170
8.3.1	固定相	171
8.3.2	流动相	171
8.3.3	应用	172
8.4	化学键合色谱	172
8.4.1	键合固定相	172
8.4.2	流动相	174
8.5	离子交换色谱	175
8.5.1	固定相	176
8.5.2	流动相	177
8.6	体积排阻色谱	178
8.6.1	固定相	178
8.6.2	流动相	179
8.7	毛细管电色谱	180
8.7.1	CEC 柱制备	180
8.7.2	梯度洗脱技术	181
8.8	基本分离模式的设计	182
8.9	在生物学上的应用	182
8.9.1	药物分析	183
8.9.2	蛋白质分析	184
8.9.3	核酸分析	184

8.9.4 多糖分析	185
参考文献	186
附录	187
附录 1 主要基团的红外特征吸收峰	187
附录 2 薄层色谱和高效液相色谱比较	193
附录 3 氨基酸薄层色谱展开条件 1	193
附录 4 氨基酸薄层色谱展开条件 2	194
附录 5 核苷酸类物质薄层色谱分离条件	195
附录 6 分离糖的流动相	195
附录 7 糖类物质在薄层板上的 R_f 值	196
附录 8 酯类化合物的薄层色谱条件	196
附录 9 甾体化合物的薄层色谱条件	197
181	198
201	198
301	198
401	198
501	198
601	198
701	198
801	198
901	198
101	198
111	198
121	198
131	198
141	198
151	198
161	198
171	198
181	198
191	198
201	198
211	198
221	198
231	198
241	198
251	198
261	198
271	198
281	198
291	198
301	198
311	198
321	198
331	198
341	198
351	198
361	198
371	198
381	198
391	198
401	198
411	198
421	198
431	198
441	198
451	198
461	198
471	198
481	198
491	198
501	198
511	198
521	198
531	198
541	198
551	198
561	198
571	198
581	198
591	198
601	198
611	198
621	198
631	198
641	198
651	198
661	198
671	198
681	198
691	198
701	198
711	198
721	198
731	198
741	198
751	198
761	198
771	198
781	198
791	198
801	198
811	198
821	198
831	198
841	198
851	198
861	198
871	198
881	198
891	198
901	198
911	198
921	198
931	198
941	198
951	198
961	198
971	198
981	198
991	198

随着科学技术的不断进步，其发展速度已超过了传统的化学分析方法，从而成为化学分析的主要方法。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。

第1章 绪论

化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。

- 1.1 分类
- 1.2 一般步骤
- 1.3 仪器分析的重要性
- 1.4 可靠性的论证
- 1.5 仪器分析的发展

化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。化学分析的发展，主要取决于分析方法的不断改进，特别是仪器分析的发展，极大地推动了化学分析的发展。

仪器分析主要从化学分析发展而来,随着仪器分析的进步及其自动化和智能化的不断提高,仪器分析越来越有别于传统意义上的以“手工操作”为主的化学分析。因此,人们将分析化学中的方法不严格地区分为化学分析和仪器分析两大类。化学分析起源于17世纪,是指借助化学反应和化学计量学的关系来确定被分析物质含量的一类分析方法,测定时需要使用化学试剂、天平和玻璃器皿等。化学分析是经典的非仪器分析方法,主要用于物质的常量测定。

仪器分析起源于19世纪,在20世纪中叶得到突飞猛进的发展。一般而言,仪器分析是指利用复杂的光电等专用设备,通过测定物质某特定物理、化学和生物学性质的参数及其变化,并与标准物质对比,来分析样品的化学成分、某成分含量、化学结构和序列信息等。每种仪器分析有其相对独立的理论基础和方法原理。如经典的紫外-可见光谱(UV-VIS)和红外光谱分析主要利用物质对不同波长电磁波的吸收特性来测定分析物质含量和结构信息。根据对分析对象的要求不同,仪器分析主要涉及结构分析、定性分析、序列分析、定量分析和半定量分析等。

结构分析(analysis of molecular structure):利用各种仪器分析手段方法(包括元素分析、紫外-可见光谱分析、红外光谱分析、拉曼光谱分析、核磁共振谱分析、质谱分析、旋光分析、X射线衍射分析等)对未知物质的分子和晶体结构(包括分子的各个基团和所有原子)进行测定、拼接、分析和表征的整个过程。

定性分析(qualitative analysis):是指分析确定样品中某物质是否存在的分析形式,即通过定性检测回答某物质有或无的关系的分析形式。

序列分析(sequence analysis):是测定某类物质连接顺序的分析形式,如蛋白质氨基酸的序列分析、DNA碱基序列分析以及多糖物质的糖链序列分析等。

定量分析(quantitative analysis):是指测定样品中某物质含量多少的分析形式,如通过仪器分析某土壤中Pb(II)的含量为 150×10^{-6} 。

半定量分析(semi-quantitative analysis):将一定范围内的定量分析分成若干等级并依次表明相对含量的多寡,是对定量分析的粗化,也是对定性分析的细化。如尿蛋白检测阳性(+)和强阳性(++).

仪器分析是多学科结合的技术,涉及范围和应用范围很广。仪器的本身包含物理化学分析的基本原理和方法,仪器的制造涉及机械和精密仪器的加工、电子电路、计算机硬件和软件等,很多仪器拥有自己的特有软件。

仪器分析有很多优点,包括自动化、智能化、准确度高、重复性好、分析时间短、检测通量高、工作强度小等,其最大的优点在于进行待测物质同步标定和定量分析。除样品的前期准备和处理之外,其他分离检测的步骤均由仪器自动完成,十分方便。有些仪器的使用已经“傻瓜”化,很多高度复杂的数据处理均由计算机和相关的软件完成,如DNA测序仪、临床大生化分析仪等。

1.1 分类

仪器分析的方法很多,但概括起来主要有光学分析、光谱分析、电化学分析、色谱分析、电泳分析、质谱分析、放射化学分析和热分析等几大类,每类又分为若干种方法。它们的原理和相关仪器分析的方法见表1.1。其中有些方法在生命科学应用非常广泛,如UV-VIS分析、红外光谱分析、质谱分析、核磁共振谱分析、薄层色谱和液相色谱等。

表 1.1 仪器分析的分类

类 型	原 理	相 关 方 法
光学分析	通过测定电磁辐射的某些基本性质(反射、折射、干涉、衍射、散射和偏振等)的变化来分析待测物质	折射法; 干涉法; 散射浊度法; 旋光法; X射线衍射法; 电子衍射法
光谱分析	以光的吸收、发射和拉曼散射等作用建立的分析方法,通过检测光谱的波长和强度来进行分析	原子发射光谱法; 原子吸收光谱法; 原子荧光光谱法; UV-VIS 光谱法; 红外吸收光谱法; 激光拉曼光谱法; 核磁共振波谱法; 荧光光谱法; 分子荧光光度法; 分子磷光光度法; 化学发光法
电化学分析	通过物质在溶液中的电化性质及其变化来进行分析的方法	电导分析法; 电位分析法; 电解分析法; 库仑分析法; 伏安法; 极谱分析法
色谱分析	利用待测物质的物理化学和生物学特性的不同在线分离待测的混合物,然后进行检测(在线)或衍生后检测的仪器分析方法	气相色谱; 薄层色谱; 高效液相色谱; 超高效液相色谱; 电动色谱
电泳分析	利用待测物质的电迁移特性的不同在线分离待测的混合物,然后进行在线检测	琼脂糖凝胶电泳; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 自由流电泳技术; 等点聚焦电泳; 高效毛细管电泳; 双向(2D)凝胶电泳; DNA 序列分析仪; 微流控芯片电泳
质谱分析	依据待测物质的质量与电荷比的不同来进行分离和分析的方法。用于定性、同位素分析、有机物的结构分析和蛋白质分析等	单聚焦质谱; 双聚焦质谱; 飞行时间质谱; 四极杆质谱
放射化学分析	利用核衰变过程中产生的放射性辐射来进行分析的方法	同位素示踪法; 放射分析法
热分析	通过测定物质的某些性质如质量、体积、热导或反应热与温度之间的动态关系,可进行成分分析,但多用在热力学、动力学和化学反应机理等方面的研究	差热分析; 差示扫描量热法; 热重量法; 测温滴定法

1.2 一般步骤

1.2.1 检测的物理学基础

仪器分析主要基于各种不同的物理学原理和性质（见表 1.2）。这些仪器分析方法包括：①基于广量性质的重量和体积分析法（如酵母和金属汞）；②基于机械性质的密度、黏度和表面张力测定法（如金属汞）；③基于光学性质的 X 射线衍射、扫描电子显微镜、透射电子显微镜、光/电子能谱和旋光性分析等（如酵母和氨基酸结晶）；④基于光谱学性质分析的吸收光谱、发射光谱、荧光光谱和浊度分析等；⑤基于物质电学性质的电导、电容、电流/电压和半电池等分析；⑥基于物质核物理特性的放射性分析等。

表 1.2 分析方法的物理学基础

可测定的物理特质	分析对象				
	酵母	青霉素	氨基酸	汞	氧气
广量性质					
重量	+	+	+	+	
体积	+	+	+	+	
机械性质					
密度	+	+	+	+	
黏度	+			+	
表面张力				+	
光学性质					
X 射线衍射		+	+	+	
扫描电子显微镜	+	+	+		
透射电子显微镜	+	+	+		
光/电子能谱	+	+	+	+	
旋光性					
光谱学性质					
吸收光谱		+	+	+	+
发射光谱				+	
荧光光谱		+	+	+	
浊度					
电学性质					
电导		+	+	+	
电流/电压		+		+	
半电池			+	+	
核物理特性					
放射性	+	+	+		

1.2.2 分析的一般过程

仪器分析的过程主要包括：样品的分离纯化、待测物的衍生化、物理学检测、信号放大与处理、结果输出等过程。

仪器分析面临的样品越来越复杂，尤其是高度复杂生物样品其化学成分极其复杂，如不

经过分离纯化等处理,干扰很重,不利于进行物理学特性的测定,因此在测定之前需进行分离纯化,甚至多级分离纯化。分离纯化处理有在线分离(online separation)和离线分离(offline separation)两类。对于高度复杂的样品,往往需要将在线分离和离线分离方法结合使用,达到更好效果。

如果待测物质有很强的物理学特性,则可直接利用此性质进行测定,如利用核酸和蛋白质的紫外吸收特性测定它们的浓度。相反,如果待测物质无特征性质或特征性质无法测定(如大多数氨基酸无紫外吸收特性),则需要将待测物质进行衍生化或其他处理,如用荧光试剂衍生氨基酸,使它们变成可检测的衍生化合物。

经过衍生化处理以后,就可以根据待测物质特有的性质进行测定,如紫外或荧光分析测定等。测量的信号经放大后,经过处理,转变成物质的含量或浓度等,最后由计算机生成分析结果的报告(见图 1.1)。

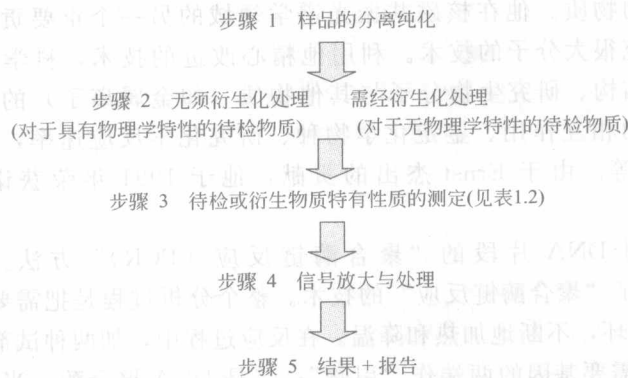


图 1.1 生物分析的一般步骤

1.3 仪器分析的重要性

仪器分析的应用极其广泛,在质检、海关、医药化工、化工生产、生命科学研究、环境检测和控制、临床检验和医药研究等众多领域具有不可替代的作用。以下结合化工过程和生命科学研究等来阐明仪器分析的重要性。

1.3.1 化工过程分析

化工过程(包括生物化工)分析是仪器分析面临较多的生产实践性问题。以柠檬酸发酵生产为例,其生物化工过程包括菌种培养、发酵、液-固化学萃取分离、反萃取分离和结晶等一系列单元操作过程。在发酵过程中,目标产物柠檬酸的含量要受很多物理化学参数的影响,并且分离的各个阶段还要了解柠檬酸的含量和回收率等。因此,在生产过程中不仅要监测目标产物的含量和纯度,而且还要监测多种化学成分及其变化,如培养阶段要测定 pH、渗透压、含氧量、各种无机盐离子、维生素和糖等。不仅如此,在分离纯化阶段要分析其他杂质是否存在,有哪些种类,从而指导下一步分离单元操作。

如果生产的是蛋白质或酶,不仅要进行常规的蛋白质和酶的活性分析(包括凝胶电泳分析、高效液相色谱分析和毛细管电泳分析等),还要进行免疫学分析、蛋白质的杂质

分析等。

1.3.2 生命科学研究

新的仪器分析原理和方法开创是强有力的工具，这一工具打开了一个又一个生物医药的重大难题。显微镜的发明导致细胞的发现和细胞学说的建立，电子显微镜和超速离心机的发明导致各种亚细胞结构“细胞器”的发现，超速离心机的发明更使人们能够测定蛋白质等生物大分子的沉降系数和分子量。以下具体实例更能说明仪器分析新方法建立对生命科学的巨大推动作用。

例 1: 傅里叶变换核磁共振分光法和二维核磁共振技术。1966 年，瑞士科学家恩斯特 (R. R. Ernst) 与美国同事合作，发现用短促的强脉冲取代核磁共振谱管用的缓慢扫描无线电波，能显著提高核磁共振技术的灵敏度。这一发现使该技术能用于分析大量更多种类的核和数量较少的物质。他在核磁共振光谱学领域的另一个重要贡献是一种能高分辨率地“二维”地研究很大分子的技术。利用他精心改进的技术，科学家们能够确定有机和无机化合物三维结构、研究生物分子与其他物质（如金属离子）的相互作用、水分子和药物分子等之间的相互作用、鉴定化学物种、研究化学反应速率，以及蛋白质等生物大分子的三维结构等。由于 Ernst 杰出的贡献，他于 1991 年荣获诺贝尔 (Nobel) 化学奖。

例 2: 高效复制 DNA 片段的“聚合酶链反应 (PCR)”方法。1985 年，穆利斯 (K. B. Mullis) 开创了“聚合酶链反应”的技术。整个分析过程是把需要扩增的 DNA 倒在试管内，通过多次循环，不断地加热和降温。在反应过程中，加两种试剂：一是一对合成的短 DNA 片段，附在需要基因的两端作“引物”；二是 DNA 聚合酶。当试管加热后，DNA 的双螺旋分为两个链，每个链出现“引物信息”，降温时“引物”能自动寻找它们的 DNA 样品的互补碱基，并把它们结合起来。反应完成后利用凝胶电泳将扩增的 DNA 片段进行电泳分离，然后进行检测。这种技术可以说是革命性的基因工程。由于这项技术的问世，能使许多专家把微量的 DNA 样品大量扩增，用以检测人体细胞中艾滋病病毒，诊断基因缺陷，可以从犯罪的现场搜集部分血和头发进行指纹图谱的鉴定。这项技术也可以从矿物质里扩增大量的 DNA 分子，方法简便，操作灵活。利用 PCR 方法，科学家已经成功对一个 2000 万年前被埋在琥珀中的昆虫的遗传物质进行了扩增。由于穆利斯巨大的贡献，他于 1993 年荣获 Nobel 化学奖。

例 3: 高效毛细管凝胶电泳与人类基因组的完成。整个人类基因组有 30 亿个碱基对 (bp)。如果按传统的桑格 (Sanger) 的厚凝胶电泳测序法检测这些碱基对，单个碱基对的检测费用高达 2~10 美元，整个人类基因组的总检测费用在 60 亿美元以上，需要 300 年以上时间完成 (见表 1.3)。在 1996~1998 年间，由于电泳分离和荧光标记技术的不断改进，单个碱基对的检测费用降低至 1 美元，总检测费用降低至 30 亿美元以下，完成时间减少到 15~30 年。然而，实际完成的时间是在 2002 年，比原计划完成的时间提前 10 多年；实际的检测费用在 10 亿美元以内，比原规划减少 20 亿美元以上。是什么检测技术使人们如此多快好省地完成人类基因组的测序？是 DNA 序列分析仪 (即毛细管凝胶电泳)，尤其是多道 (96 道) 的毛细管凝胶电泳技术的应用。由于毛细管凝胶电泳的应用，单次运行的时间小于 1h，单个碱基对的检测费用降低至 0.1~0.2 美元 (现在国内已下降到 0.1 元以下)，总检测费用减少到 6 亿美元，年检测速度 50000bp 以上，因此不到 5 年的时间完成了人类基因组剩余的检测任务。