中 国 科 学 院 化 学 研 究 所
INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

分析测试中心通讯

第2期



分析测试中心 主办

2012 年 6 月 25 日

目　　录

评述

单晶结构求解方法的进展评述.....1

典型应用案例

内有荧光但不透光微球的结构分析.....3

扩散序谱(Diffusion Ordered Spectroscopy, DOSY)及其应用.....4

PEG 修饰蛋白药物的 ESI Q-TOF 质谱分析方法.....5

同分异构体结构的核磁证明.....7

数据处理技巧

Image pro plus（IPP）图像处理软件的应用.....10

测试技术及技巧

固体粉末样品压片制备法在 XPS 分析中应用.....13

石英比色皿对 CD 测试的影响.....15

直接观察液体样品的原位电镜技术.....15

浓度对氢谱的影响.....21

仪器及功能介绍

微透析与质谱.....23

有机元素分析方法介绍.....35

分析测试中心动态

分析测试中心网页改版完成.....37

分析测试中心拟推出 2011 年新购仪器及附件介绍汇编.....37

评 述

单晶结构求解方法的进展评述

▶ 郝项

(分析测试中心 X 射线衍射组 Tel:010-62658187 Email: haoxiang@iccas.ac.cn)

单晶结构分析主要由以下四个步骤构成：（1）单晶样品的培养，（2）单晶样品的前期筛选和随后的数据采集，（3）结构求解，（4）结构精修。其中，步骤（1）由合成人员完成，余下的三步一般由晶体学工作者完成。在余下的三步中，最难的就是结构求解了，其深层的原因在于相角信息的丢失。因此，有关结构求解方法的研究一直就是晶体学的核心问题之一。本文简单评述结构求解方法的发展历程及最新进展。

在 20 世纪初叶，也就是 X-射线晶体学诞生之初，结构求解尚无成熟的方法，主要是研究人员靠知识、经验和科学知觉采用所谓的“试错法”进行尝试求解。到 1934 年 Patterson 提出了 F^2 函数法（即后来所谓的 Patterson 函数法），随后在此基础上衍生出来的“重原子方法”一度成为结构求解的最有效方法。到 20 世纪 50 年代，又发展出了所谓的“直接法”（Direct Methods），但由于计算技术在当时尚不强大，导致该方法直到 20 世纪 70 年代，随着计算机技术的发展，才逐步成功普及，并展示出了强大的结构求解能力，因此 1985 年的诺贝尔化学奖授予了发展直接法的科学家。截至到 20 世纪 90 年代，直接法和 Patterson 函数法成为小分子单晶结构求解的两大主要方法，其中直接法成为最常用的结构求解方法，这在很大程度上得益于计算机技术的飞速发展，因为直接法强烈地依赖计算能力。目前大多数小分子单晶结构求解程序都基于以上两种求解方法[1]。

随着计算机技术的发展，到 90 年代后，特别是进入 21 世纪后，人类拥有了越来越强大的计算能力，这为新方法的产生奠定了技术基础。双空间循环（dual-space recycling）求解方法[2]就是 90 年代新方法的代表，基于此方法的比较著名程序是 SHELXD[3]。所谓双空间循环，指的就是通过 Fourier 变换，在倒易空间和正空间之间交替循环变换，有关具体的原理，超出了本文讨论的范围，有兴趣可以参看相关文献。我组曾成功采用 SHELXD 求解了一个拥有 342 个独立非氢原子的结构，这种尺度的结构已经接近小分子晶体的上限，采用直接法通常不易成功，相关工作将在本期或后期的《分析测试中心通讯》中报道。

进入 21 世纪后，又有人提出了新的结构求解方法，即所谓的 Charge Flipping[4]。这种方法需要首先随机产生一套初始相角，然后再通过 Fourier 变换，在倒易空间和正空间之间交替变换，也就是在结构因子 F 和电子密度ρ之间交替变换，在变换中，根据数据情况，程序会计算并设置一个阈值δ，对于 $\rho \geq \delta$ 的区域，ρ保持不变；对于 $\rho < \delta$ 的区域，把ρ的符号反转一下，即把ρ变为$-\rho$（这就是 Charge Flipping 的得名），然后再进入交替变换中。由于 Charge Flipping 不要求对称性的信息，因此原则上比较适合低对称性空间群的结构求解。另外，从实际工作中的使用情况看，Charge Flipping 的求解成功率低于直接法，但该方法要么解不出来，一旦解出，通常就是正确解，不会像直接法那样有时会得出错误解。评价 Charge Flipping 可以用如下八个字：“要么解对，要么无解”。关于使用 Charge Flipping 求解的例子，我组将在本期或后期的《分析测试中心通讯》中报道。

在实际工作中，大多数小分子晶体结构都可以采用直接法或 Patterson 函数法成功求解。因此，我们使用求解方法的顺序一般先用直接法或 Patterson 函数法，如果这两种方法都无法求解时，接下来，我们会使用基于双空间循环的求解方法 SHELXD，如果 SHELXD 也不成功，最后，我们再采用 Charge Flipping 求解。一般来说，通过上述四种求解方法的联合使用，99%以上的小分子晶体结构都可成功解出。因此 SHELXD 和 Charge Flipping 可以作为直接法和 Patterson 函数法这两种主流方法的重要补充。

参考文献：

1．Giacovazzo, C., Monaco, H. L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G., Catti, M. (1992). *Fundamentals of Crystallography*, edited by C. Giacovazzo, IUCr Texts on Crystallography, No. 2, Oxford University Press: New York, NY.

2．Miller, R., DeTitta, G. T., Jones, R., Langs, D. A., Weeks, C. M. & Hauptman, H. A. (1993). *Science*, **259**, 1430-1433.

3．Sheldrick, G. M. (1998). *Direct Methods for Solving Macromolecular Structures*, edited by S. Fortier, pp. 401-411. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

4．Oszlányi, G. & Sütő, A. (2004). *Acta Cryst*. A**60**, 134-141.

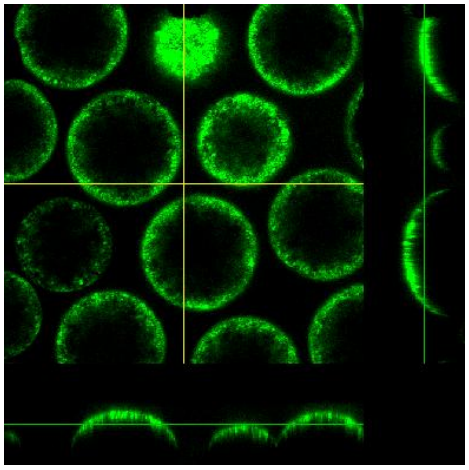
典型应用案例

内有荧光但不透光微球的结构分析

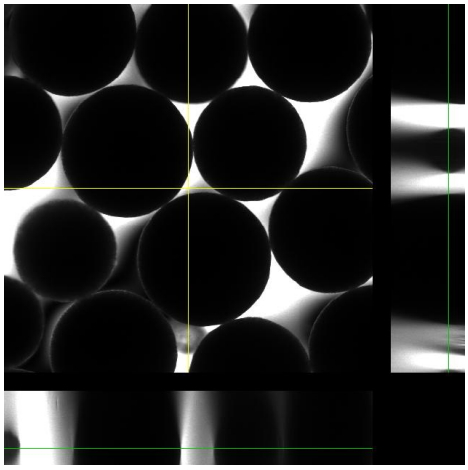
▶刘美蓉

(分析测试中心光谱组 Tel:010-82613026 Email: mrliu@iccas.ac.cn)

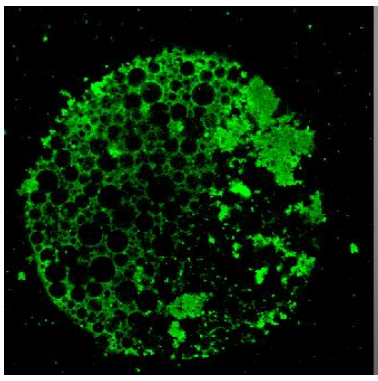
表面和内部都有荧光但不透光的微球，直接用共聚焦无法观察微球内部的荧光。因为微球不透光，激光进不去微球里面，自然也就产生不了荧光。因此，我们建议将微球切成薄片，这样就可以检测微球里面的荧光。



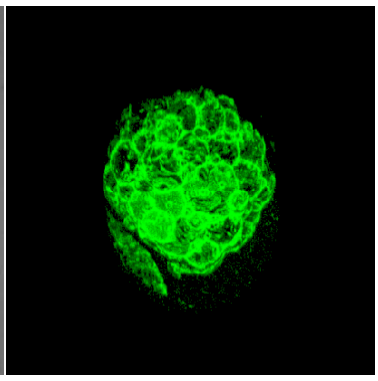
a 微球的三维荧光图



b 微球的三维 DIC 图



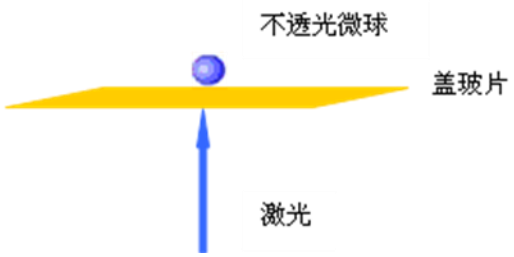
c 微球切成薄片后的二维荧光和 DIC 图



d 微球切成薄片后的三维荧光图

图 a 为表面和内部都有荧光但不透光的微球的三维荧光图，左上角的正方形图为 XY 面，下方的长方形图为 XZ 剖面，右方的长方形图为 YZ 剖面。XY 面显示微球内部无荧光，只边缘有荧光，这与事实相矛盾，因为微球内部应该是有荧光的。而 XZ 剖面和 YZ 剖面只显示半个圆。为什么会是这样呢？

从图 b 我们知道，微球是不透光的。因此分析如下：激光从下面照射微球，微球不透光，激光进不到微球里面，只可照到微球直径最大部分的下半球表面，就像太阳照射地球一样，照不到地球内部，一半是白天，一半是晚上。光切平面只是垂直于激光的一个空心圆。因此，XY 面内部没有荧光，只边缘有荧光；XZ 和 YZ 剖面只有半个空心圆。



e 激光照射样品示意图

图 c 为微球切成薄片后的二维荧光和 DIC 图，可以看出微球内部有荧光，呈网状结构。荧光图和 DIC 图都可看出微球内部的网状结构。图 d 为微球切成薄片后的三维荧光图。图 e 激光照射样品示意图，激光从下面照射不透光微球。

扩散序谱(Diffusion Ordered Spectroscopy, DOSY)及其应用

▶向俊锋

(分析测试中心核磁组 Tel:010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn)

扩散序谱是一种利用脉冲梯度场核磁共振对溶液中具有不同扩散系数(D)的成分进行虚拟分离的一种核磁共振技术。其根据的基本原则是 Stokes-Einstein 公式

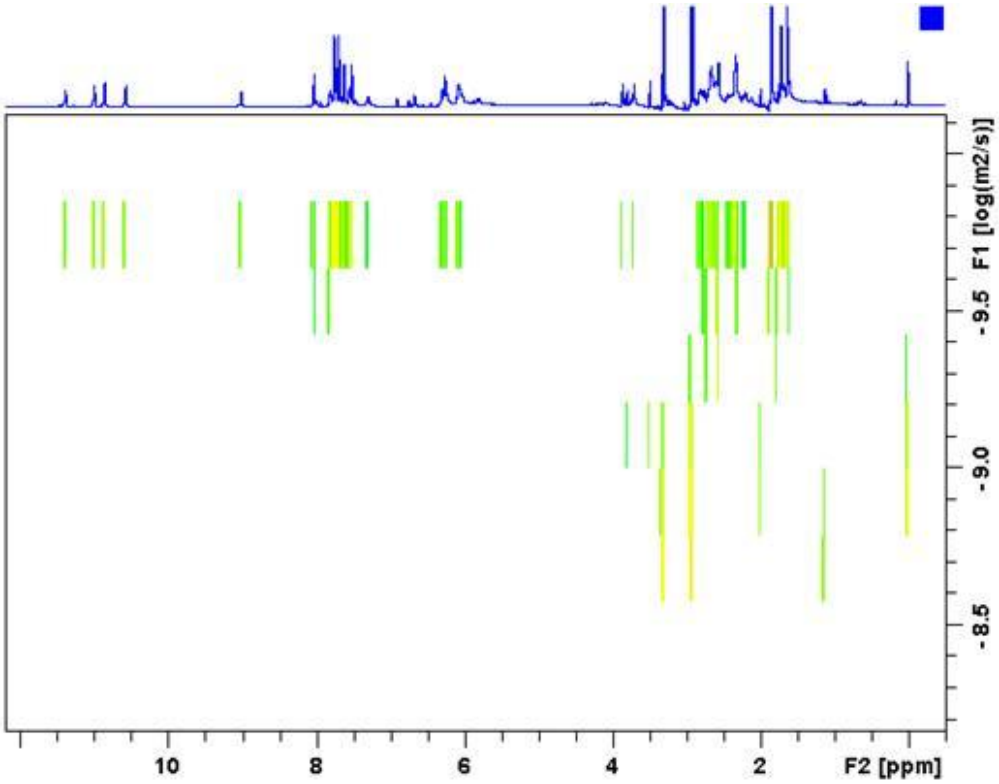
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}$$

其中 k 为波耳兹曼常数，T 为温度，η为溶剂粘度，r_s 为溶质分子的热力学半径。

这种方法可以用于：混合物分析、药物筛选、络合平衡研究和 NMR 信号编辑等方面。详细内容可以参考文献 Angew Chem Int Ed. 2005, 44, 520-554。

下面是化学所内利用 DOSY 和其它核磁技术开展的天然产物中的抗肿瘤活

性成分筛选的例子（Angew Chem Int Ed. 2008, 47, 5590-5592）。



从上图可以看出，活性小分子与靶分子相互作用后，活性小分子在 DOSY 的扩散维上具有和靶分子一样的扩散系数，因此也就从天然产物混合物中分离出活性小分子。再根据其特征信号与其它骨架原子之间的共价键连接，即可确定活性小分子的结构。借助与 DOSY 和其它核磁技术，实现了混合物中活性成分的快速筛选和结构鉴定。

PEG 修饰蛋白药物的 ESI Q-TOF 质谱分析方法

▶熊少祥

（分析测试中心质谱组 Tel:010-62554495 Email: mscbj@iccas.ac.cn）

PEG 修饰蛋白及多肽类药物后，可在不产生毒性、不损害药效的情况下，通过增加蛋白类药物的溶解性、减少免疫原性、增加稳定性、延长体内药物半衰期等功效增强大分子药物的疗效。PEG 的这种功效在 1970 年代后期被发现，到了 1990 年 PEG 修饰的 Adagen 被美国 FDA 批准，至今已有若干个 PEG 修饰的

大分子药物上市销售，这些药物在癌症、肝炎、痛风、糖尿病等疾病治疗中为患者带来了福音。

明确 PEG 修饰位点、确定修饰位点的数量、以及表征 PEG 的聚合度分布性是 PEG 化大分子药物运用于临床前以及药品质量监控必须且非常重要的工作。由于 PEG 的高分子聚合物性质，由 PEG 修饰后的蛋白及多肽的结构变得极为复杂。在早期对其进行质谱分析，特别是对 PEG 的聚合度分布性分析方面，多使用 MALDI 离子源类型的质谱。这是因为 MALDI 源离子化的样品，所带电荷数较少（单电荷离子居多），因此其质谱图相对简单；而通过 ESI 源离子化的样品将携带多个电荷，这使离子信号复杂，致使其质谱图谱较难解析。随着 LC-ESI 技术的发展， 美国 Indiana 大学的 Lihua Huang 等学者通过在色谱分析柱后加胺的技术，使样品的 ESI 离子化时的荷电数适当减少，从而使 PEG 化样品的 ESI 图谱得到高效的解析[1]。而 MALDI TOF 类质谱由于质谱分辨率的限制（目前 MALDI TOF 分辨率在 8 万内），面对分子量动辄十几万甚至更高的 PEG 化蛋白，其可获得的数据质量较差，因而 MALDI 方法可得到的 PEG 化蛋白的有效结构信息非常有限。

Lihua Huang 等学者进一步开发了 ESI Q-TOF 分析 P EG 化蛋白的修饰位点的质谱方法[2]。这种方法包括源内裂解（ISF，In Source Fragmentation）与二级质谱（MS/MS）两个步骤。在第一步 ISF 过程中，PEG 化多肽的 PEG 部分被裂解而变短；在第二步 MS/MS 过程中，多肽被打碎产生 b、y 离子碎片。通过分析携带缩短的 PEG 链的 b、y 离子信息，最终得出确切的 PEG 化修饰位点。ISF 与 MS/MS 为什么可以分别 “选择”碎裂 PEG 化多肽的 PEG 与多肽两个部分呢？推测与 PEG 化多肽的电荷分布有关。在 PEG 化多肽的离子化过程中，PEG 的醚键附着了大量的 H+，并在 ISF 下完全断裂，而使冗长的 P EG 链缩短到一两个单位大小。之后的 MS/MS 过程中，由于缩短的 PEG 链已无 H+附着不再断裂。而多肽在 MS/MS 中获得了碎裂的机会，并产生携带“PEG 短标签”的 b、y 离子碎片。论文中，研究人员运用此方法成功地分析了 IgG4 与胰高血糖素的 PEG 修饰位点。

参考文献

(1) Huang L, Gough PC, Defelippis MR. Characterization of Poly(ethylene glycol) and PEGylated Products by LC/MS with Postcolumn Addition of Amines. Anal Chem. 2009, 81, 567-577.

(2) Lu X, Gough PC, DeFelippis MR, Huang L. Elucidation of PEGylation site with a combined approach of in-source fragmentation and CID MS/MS. J Am Soc Mass Spectrom. 2010, 21, 810-818

同分异构体结构的核磁证明

▶向俊锋

(分析测试中心核磁组 Tel:010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn)

同分异构体为分子量相同、结构不同的分子，在有机合成中较为常见。有机反应中，由于多个反应活性位点，增加的官能团有可能接到母体化合物的不同位置，从而形成同分异构体。一般而言，用 TLC 能够区分这些异构体，但是质谱上表现结果相同，且同分异构体的核磁图谱结果相差不大，如何利用适合的方法来确认到底得到哪种化合物就是合成工作者需要了解的知识。下面就给出一个例子供大家参考：

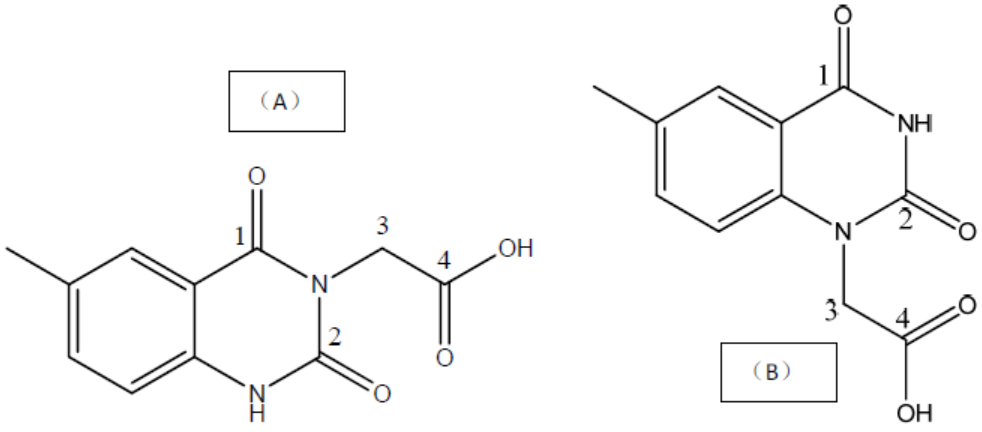


图 1 推测的两种分子结构式（A）和（B）。二者的区别是乙酸基接在不同的 N 原子上。

图 1 为合成工作者根据合成路线和质谱结果推测出的两个同分异构体分子

结构，求助于核磁方法，希望利用核磁技术确认这两个化合物的确切结构。从结构来看，结构式 A 中 3 位上的亚甲基距离 1、2 和 4 位上的 CO 基团只有一到二键的距离，但是结构 B 中 3 位的亚甲基离 2 和 4 位上的 CO 基团有一到二键的距离，但是 3 位亚甲基距离 1 位上的 CO 基团就很远，有四键距离，从氢碳远程相关的角度来讲，亚甲基上的氢质子信号很难通过远程氢碳偶合，传递到 1 位上的 CO 基团上去，但是对于结构 A 来讲，亚甲基上的氢质子应该与 1、2 和 4 位上的 CO 基团有氢碳远程相关信号（见图 2）。

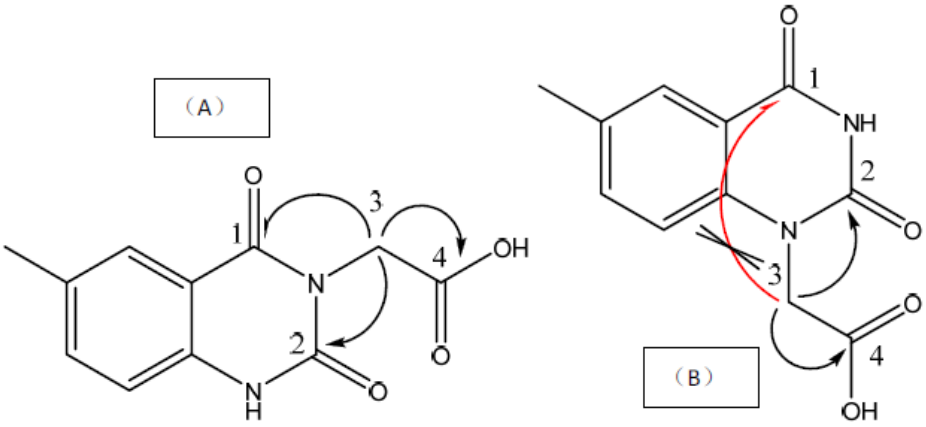


图 2 两种异构体 A 和 B 上 3 位上的亚甲基可能与周围的 CO 基团远程相关的示意图。其中异构体中 B 上的红线和 X 标识表示 3 位上的亚甲基与 1 位上的 CO 基团应该无氢碳远程相关信号。

根据前面的分析，我们利用氢谱、碳谱、dept135 和 HSQC 指认了各个官能团，再测试 HMBC 谱来看 3 位亚甲基上的氢质子和 3 个 CO 基团的远程相关峰，结果见下图。

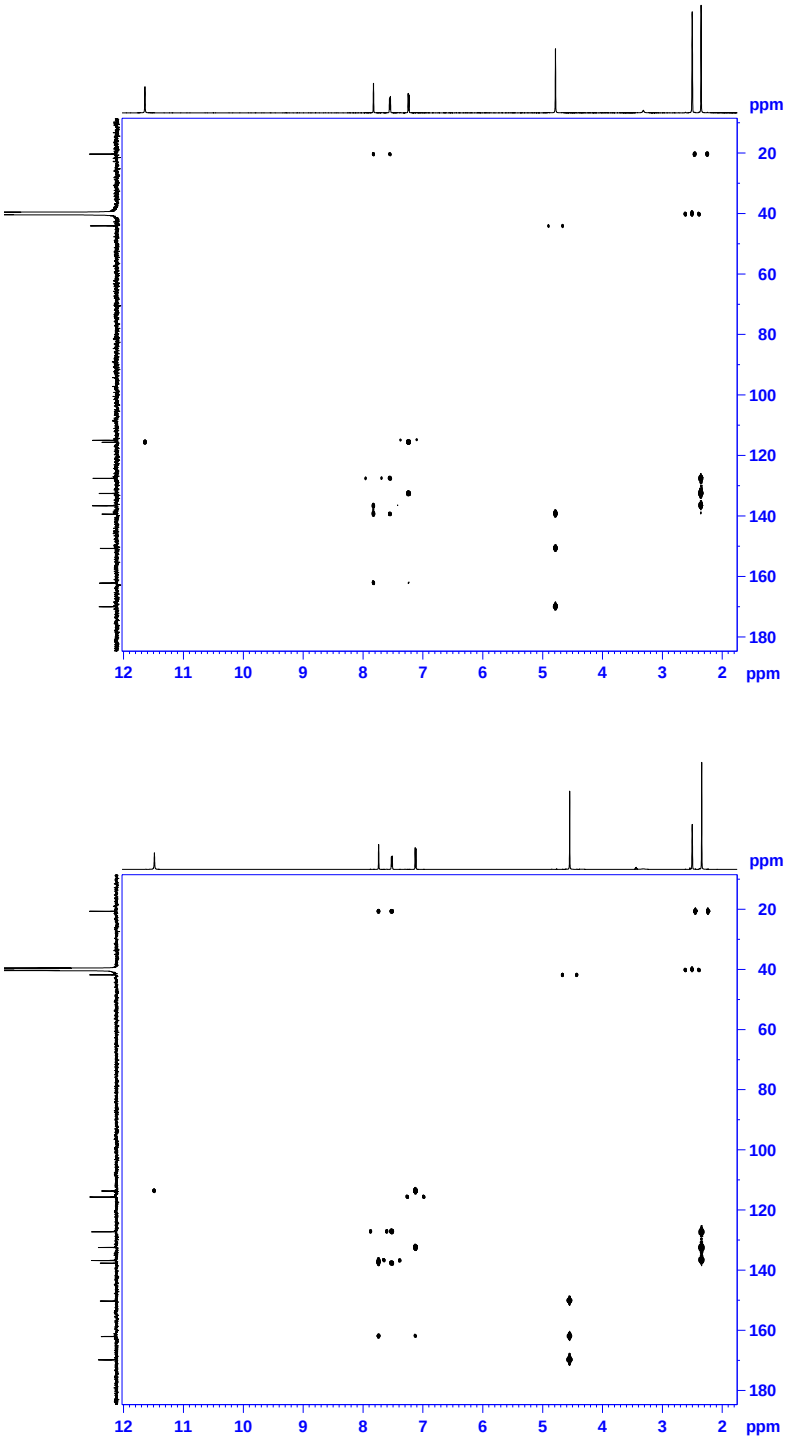


图 3 两种同分异构体的氢碳远程相关谱，图中出现的黑圈表示对应的氢和碳有远程相关，红线标示的 3 位上的亚甲基氢质子与 CO 基团之间的相关。

由图 3 结果可以看出，上图中 3 位亚甲基质子只与 2 和 4 位 CO 基团有远程相关信号，而下图中 3 位亚甲基质子只与 1、2 和 4 位 CO 基团都有远程相关信

号，由此可以判断同分异构体 A 对应的是图 3b 的图谱，而 B 对应的是图 3a 的图谱。

数据处理技巧

Image pro plus（IPP）图像处理软件的应用

▶刘美蓉

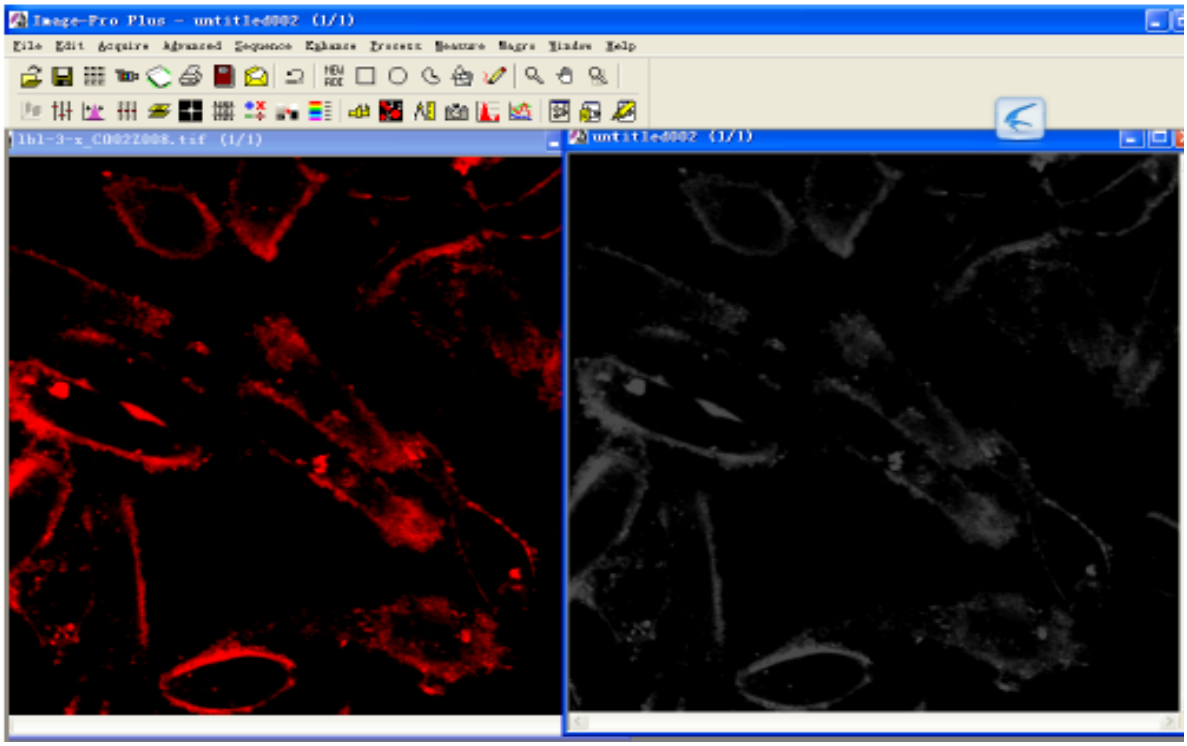
（分析测试中心光谱组 Tel:010-82613026 Email: mrliu@iccas.ac.cn）

一、 分析整幅图片或感兴趣区域（ROI）的荧光强度

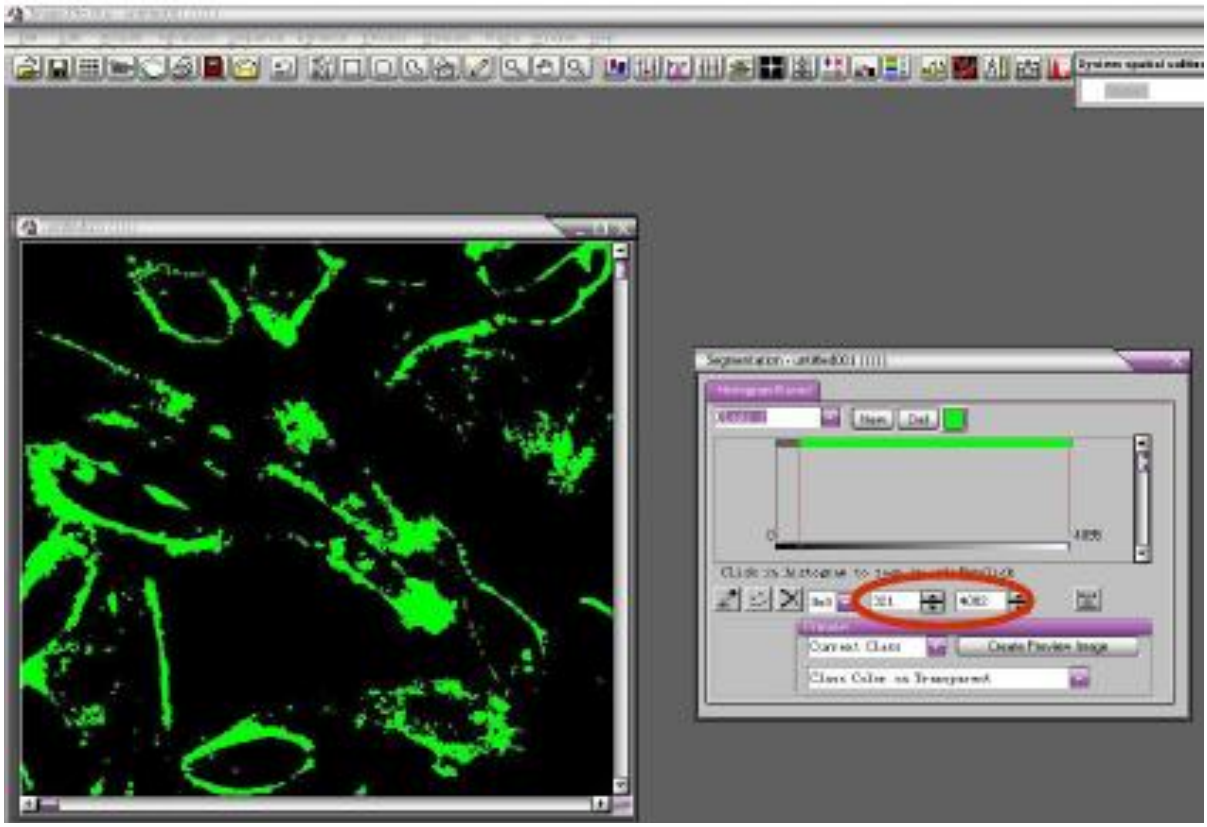
共聚焦自带的软件可以进行荧光强度的测量，可测量一个点，一条线，或一个区域的强度。但要比较两幅图的平均荧光强度，手动操作起来就非常不方便。IPP 软件通过荧光强度阈值范围的选择，可自动测量一幅图的平均荧光强度。

先将一幅图（TIFF 格式）转化为灰度格式。因为共聚焦图像颜色是 12 位的，也就是最大强度值为 4095（2^{12}-1），因此将原图转化成 12 位的灰度格式。然后通过选择荧光强度的阈值范围，定义我们要进行荧光强度计算的对象的范围；然后选择测量对象为 area 和 IOD。通过选择合适的面积范围，可缩小要计算的对象范围，可把一些小的杂质，或太大的不是我们想要的东西除掉。然后通过统计就可以得到 SUM(area)和 SUM(IOD)，SUM(IOD)除以 SUM(area)就可得我们定义对象的平均荧光强度。

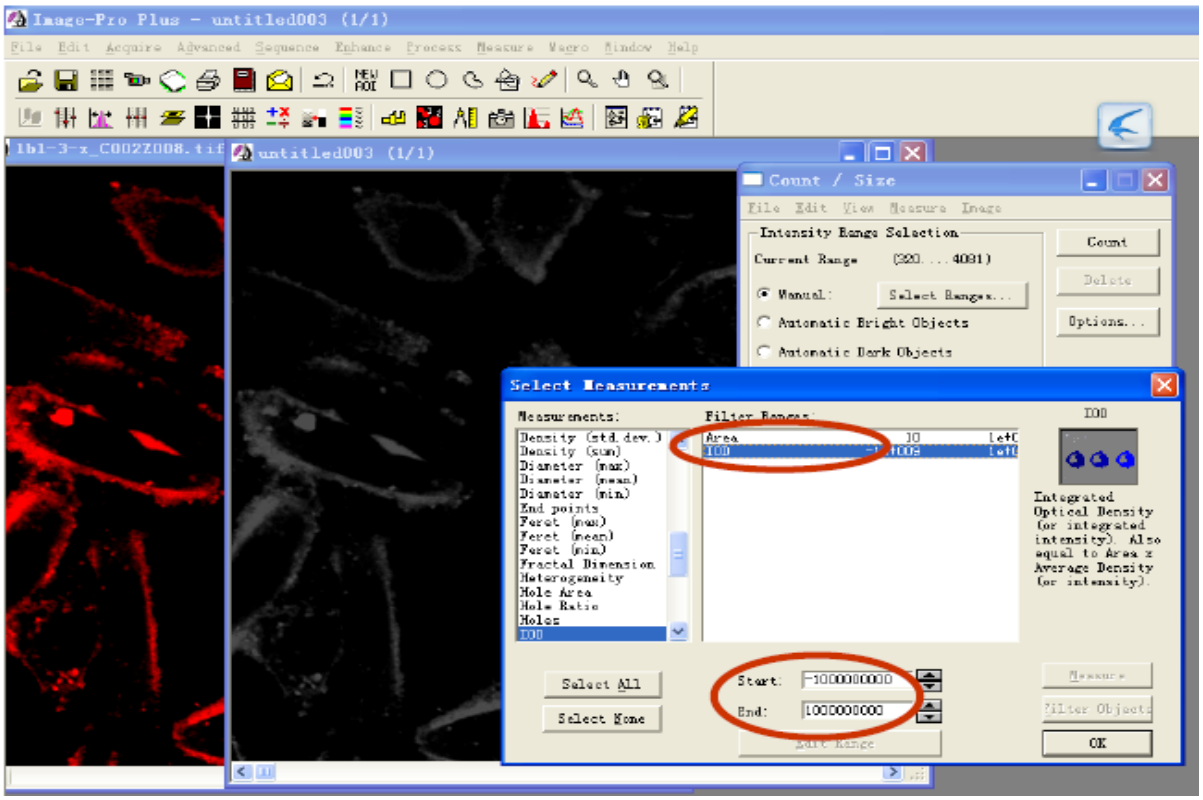
1. 将原图转化为 12 位的灰度图



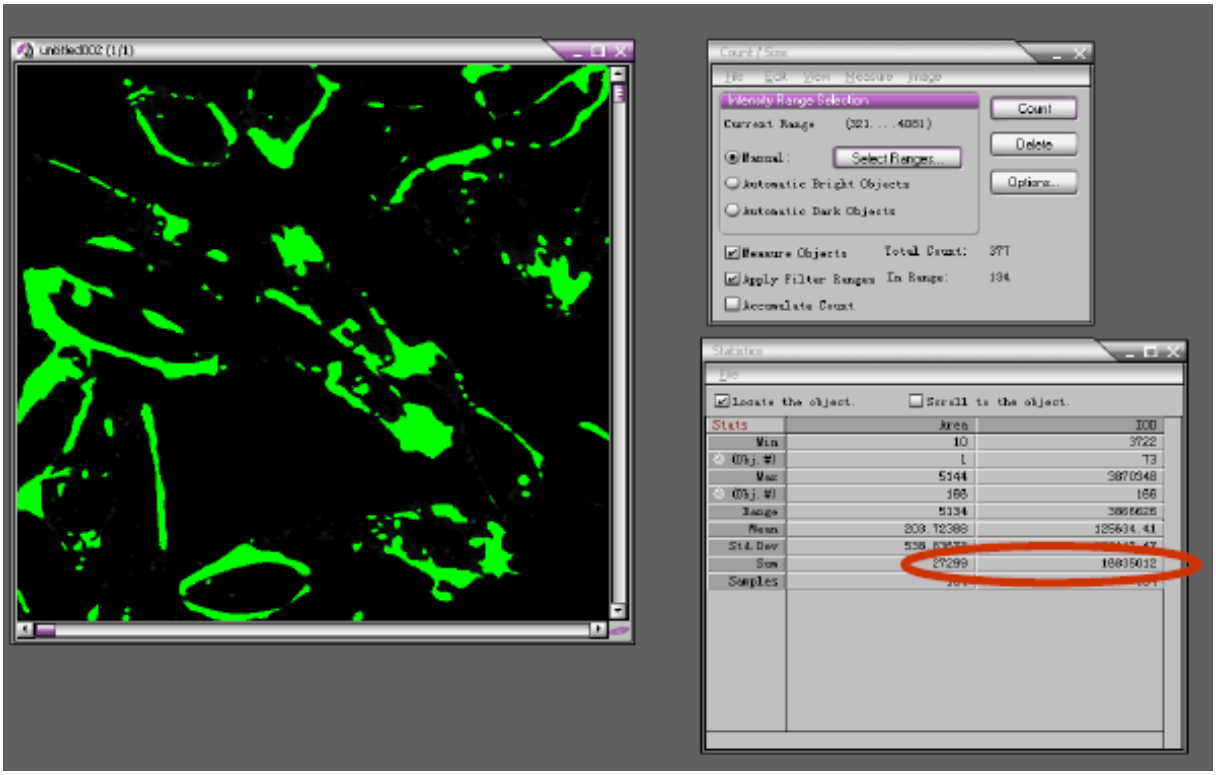
2. 选择合适的荧光强度阈值定义要计算荧光强度的对象



3. 选择测量对象为 area 和 IOD，可选择 area 的范围，进一步定义操作对象的范围



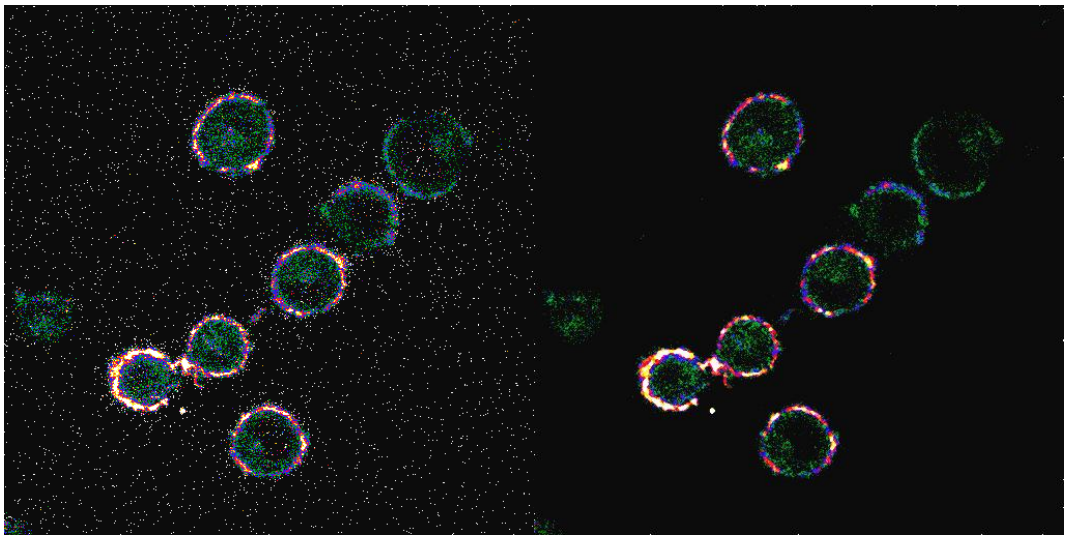
4. 统计得到 SUM(area)和 SUM(IOD)，计算平均荧光强度 SUM(IOD)/SUM(area)



二、图像的处理

IPP 软件中有很多滤镜可以处理图像,process — filters —(enhancement, edge, morphological, kernels, special）每一种滤镜有其具体的作用。

下面图中，左图为处理前的一 ratio 图片，背景部分白色斑点很多。用 enhancement 下面的 Despeckle 可将斑点去除，右图为处理后的图片。



IPP 软件还有很多非常有用的功能，ftp 上有 IPP 软件安装文件及使用说明。详情可见所 ftp://incoming1/分析测试中心资料/光谱组/共聚焦。

测试技术及技巧

固体粉末样品压片制备法在 XPS 分析中应用

► 刘芬

（分析测试中心光电子能谱组 Tel:010-62553516 Email: xps@iccas.ac.cn）

用 X 射线光电子能谱（XPS）分析固体粉末样品时，通常是将粉末样品撒在双面胶带的一面上，另一面贴在样品托上。这种方法存在诸多缺点：首先，粉末样品粘在胶带上并不牢固，当样品从谱仪的样品室向分析室转移时粉末容易脱落，不仅污染了谱仪内部，而且极易落在样品室与分析室之间的超高真空阀门上，造成后者密封性能不好甚至失效；此外，脱落的粉末也容易被抽入谱仪的分子泵，大大缩短分子泵的寿命。对于在超高真空条件下运转的仪器而言这些都是严重的问题。其次，因为胶带上的粉末比较疏松，部分胶带覆盖不严，导致胶带成分（通常含 C、O 和少量 Si 或 N）干扰样品分析。第三，由于胶带上的粉末不紧密，造成分析灵敏度和分辨率较低。所以，样品制备方法看似小问题，实际上是关系到

分析测试质量和仪器寿命的重要问题。为了克服上述缺点，我们使用了一种胶带粘贴与加压结合的方法，将粉末样品压制成薄片（以下简称压片法），再进行 XPS 测试，收到了很好的效果。压片法详见“双阳极 XPS 粉末样品压片制样步骤”。表 1 显示了粉末样品 XPS 分析时用压片和简单粘附两种制样方法所测得的各样品元素的峰强度和峰半宽度比较。结果表明，与简单粘附比较，无论是简单化合物或粉末样品实例，采用压片法测得的谱峰都明显增强，而峰半宽度则明显变小。这意味着采用压片法可以提高 XPS 分析的灵敏度和分辨率，其原因是压片以后增加了样品原子的密度，改变了表面的疏松不平的状态。

表 1 粉末样品 XPS 分析时压片与粘附两种制样方法的分析结果比较

样品名称	元素成分	被测能级	峰强度比（$I_{pr.}/I_{ad.}$）	峰半宽度比（$W_{pr.}/W_{ad.}$）
BaO	Ba	$3d_{5/2}$	2.3	0.93
	O	1s	2.3	0.93
$Ni(OH)_2 \cdot H_2O$	Ni	$2p_{3/2}$	2.9	0.94
	O	1s	2.4	0.88
H_2WO_4	W	$4f_{7/2}$	1.6	0.95
	O	1s	1.7	0.94
Sample 1	Mo	$3d_{5/2}$	1.8	0.94
	Fe	$2p_{3/2}$	1.2	0.97
	C	1s	1.2	0.99
	O	1s	1.7	0.95
Sample 2	Zn	$2p_{3/2}$	1.6	0.91
	Al	2p	2.1	0.93
	N	1s	1.7	0.80
	C	1s	1.7	0.89
	O	1s	1.7	0.96

这种粉末压片制样法所需样品量较少，不需模具，快捷简便，不仅有利于保护仪器，而且有利于提高 XPS 分析的灵敏度和分辨率，是值得推广应用的粉末样品制样方法。双阳极 XPS 粉末样品压片制样步骤

相关文献：

1. XPS 分析固体粉末时的样品制备法研究， *分析测试技术与仪器*，2007，13（2）：107-109

石英比色皿对 CD 测试的影响

▶丁丽萍

（分析测试中心光谱组　Tel:010-62566250　Email: npns@iccas.ac.cn）

CD 测试采用的石英比色皿，其材质的差异，会影响测试结果，下面是对 3 个石英比色皿进行 CD 光谱测试的结果，供大家参考。

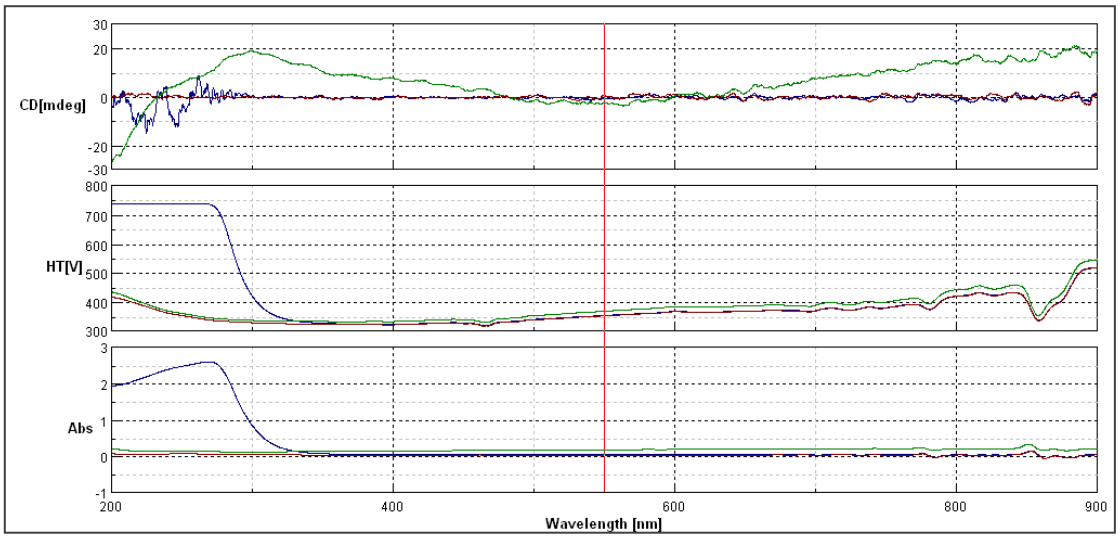


图　3 个石英比色皿 CD 光谱图（baseline 为 air, sample 为石英比色皿；图中红色为石英比色皿 1、绿色为石英比色皿 2、蓝色为石英比色皿 3）

由图可以看出，石英比色皿 1（红色）适合进行紫外区及可见区的 CD 光谱测试，石英比色皿 2（蓝色）可进行测试的波长范围为 400-900nm，石英比色皿 3（绿色）不适合进行 CD 光谱测试。建议大家进行 CD 光谱测试时，先对待选用的石英比色皿进行 CD 光谱测试，以便选择材质良好的石英池进行测试。

直接观察液体样品的原位电镜技术

▶关波

（分析测试中心电镜组　Tel:010-62588935　Email: guanbo@iccas.ac.cn）

电镜通常在高真空下工作，要求所观察的样品无水且无易挥发的其他溶剂，而很多样品(如生物样品、自组装体系)在干燥状态下和在溶剂中的存在或聚集状态不同，干燥之后在电镜中观察的结构有所变化，应用光学显微镜分辨率又不足，因此，需要在电镜中原位观察液体样品。原位液体电镜技术（in situ EM）还可观

察溶液中进行的化学反应过程，对于研究反应原理及控制反应过程具有重要意义。

自发明电镜以来，直接观察液体样品就是电镜的一个发展方向，其中一个重要的方法是应用差分抽真空系统在电镜中形成一个开放的液体样品仓，但是还存在真空比较高及液体厚度不好控制等问题，近年来，随着微加工、微流控技术及电镜本身技术的发展，使用氮化硅(SiN)、碳薄膜(carbon foil)及石墨烯(graphene sheet)作为液体样品腔(liquid cell)的原位电镜技术已取得了较大的进步。

1.用于原位观察的液体样品腔

应用液体样品腔在电镜中进行观察的原来如图 1 所示，在透射电镜中，电子束通过很薄的液体层后进行成像，在扫描电镜中，电子束入射到样品上产生背散射电子由探头吸收后成像。

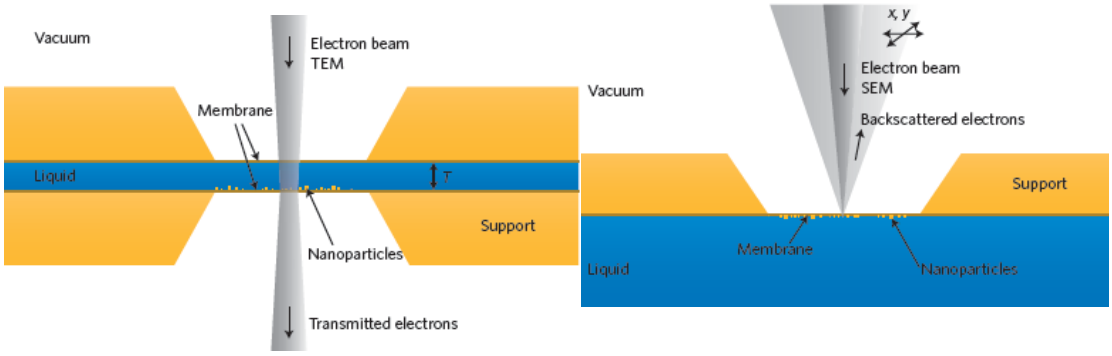


Figure 1 (a) TEM imaging of nanoparticles in a liquid fully enclosed between electron transparent windows. (b) SEM of a liquid sample under an electron transparent

液体样品腔需要满足几个条件：(1) 透射电镜(TEM)是采集透过样品的电子信号得到样品的结构信息，扫描电镜是通过电子束在样品上扫描，收集样品产生的二次电子和背散射电子等得到样品的结构信息，所以要求样品腔体观察窗口材料对电子束透明； (2)电镜在高真空工作，要求液体样品腔(liquid cell)有很好的密封性及一定的机械性能；(3)透射电镜通常要求样品厚度小于 0.5μm，所以液体样品腔的观察窗口要薄，并且要控制形成较薄的液层厚度。基于以上要求，目前使用的样品腔观察窗口有氮化硅(SiN)、碳薄膜(carbon foil)及石墨烯(graphene sheet)。其中较为成熟的是氮化硅，其膜厚度均匀、机械性能好、生产工艺成熟，液体样品腔是由以氮化硅薄膜(通常厚度为 20-100nm)为观察窗口，以硅为基底的两个芯

片组成，可外加流动系统控制液体样品循环流动，如图 2 所示。以石墨烯(graphene sheet)为观察窗口的液体腔结构如图 3 所示，石墨烯片层包裹液体样品，由于石墨烯及液层更薄所以可达到更高的分辨率，但制备样品腔的方法还不成熟。

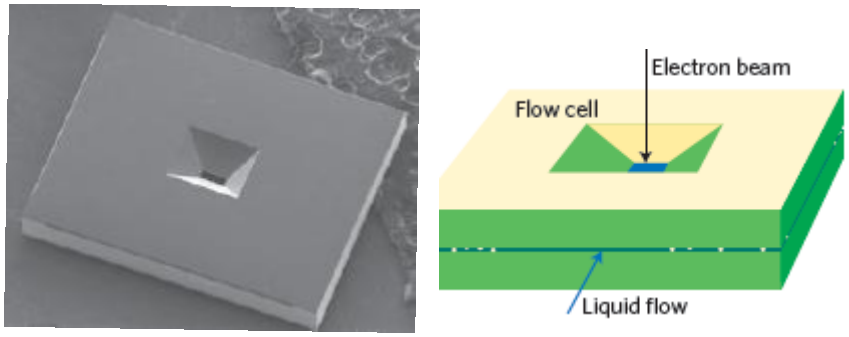


Figure 2 (a) A single Si microchip with an electron transparent SiN window. The dimensions of the microchip are 2.0 × 2.3 × 0.3 mm. (b) A microfluidic chamber formed from two of the microchips, showing the liquid flow direction.

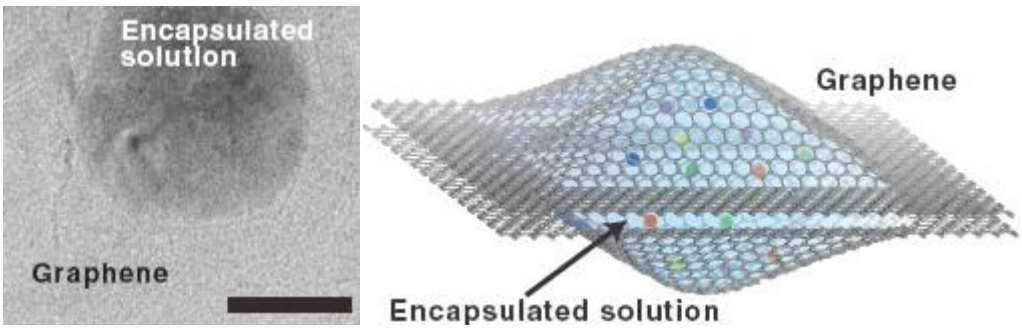


Figure 3 (a) TEM image of a graphene liquid cell; laminated graphene layers immobilize a blister of encapsulated stock solution (dark region). Scale bar, 50 nm. (b) Idealized illustration of local grapheme liquid cells encapsulating growth solution.

2.液体对电镜分辨率的影响

相对于干燥的样品，液体中的溶剂对入射电子的散射作用增大了电子束的能量色散，从而使分辨率下降，液层越厚分辨率越低。对于透射成像，假定样品位于样品腔底部即透射电子的出射端，且观察窗口对于电子束没有影响，电镜的分辨率可近似表示为：

$$d_c = \alpha C_c \frac{\Delta E}{2E}$$

其中，α 为物镜孔径半角，Cc 为色差系数，E 为电子束能量，ΔE 为电子束能量的展宽。

ΔE 与溶液的密度、组成的原子序数、液层厚度及电子质量和运动速度等相

关，对于水溶液，透射成像的分辨率近似为：

$$d_{\mathrm{TEM}} = 6\times10^{12}\frac{\alpha C_c T}{E^2}$$

式中，T 为液层厚度。如果用 200kV 的电镜，当 α= 10 mrad, Cc= 2 mm, T=1μm 时，可算得分辨率约为 4nm，加速电压为 300kV 时，分辨率约为 1nm。这些是在理想状态下即样品位于液体腔电子束的出口处能达到的分辨率，实际的样品分辨率会降低。

STEM 成像比 TEM 成像的分辨率高，液层几个微米厚时都可达到纳米级的分辨率，且样品位于液层表面即电子束入射端时分辨率最高。由于 STEM 成像对原子序数敏感，所以特别适用于在水或有机溶剂中的重元素物质的成像，例如，在 STEM 模式下，当探针电流为 0.5 nA，像素停留时间为 10μs，水溶液液层厚度为 5μm 时，可观察到 1.4nm 的 Au 颗粒。

SEM 成像使用的加速电压比 TEM/STEM 低，能量低使得展宽更大，分辨率降低，而且对于观察窗口的厚度及样品在液层的深度更为敏感。使用 20kV 的加速电压，30nm 厚的 SiN 可达到的最好分辨率约为 7nm，如果样品在液层中的深度为 100nm，分辨率就下降到约 20nm。这与 ESEM(环境扫描电镜)类似，在真空下观察固体样品 ESEM 可到到与 SEM 一样的分辨率，但是在表面有液体的样品时，随着液层厚度的增加，分辨率也下降很快。

图 4 所示为 TEM, STEM 和 SEM 成像的分辨率与液层厚度的关系，其中 TEM 和 STEM 应用的加速电压为 200kV，观察窗口是 30nm 厚的 SiN 薄膜。TEM 和 STEM 成像的分辨率随液层厚度的增加递减，而扫描电镜成像采集的是靠近窗口的液层表面的背散射电子，所以分辨率跟液层的厚度无关。

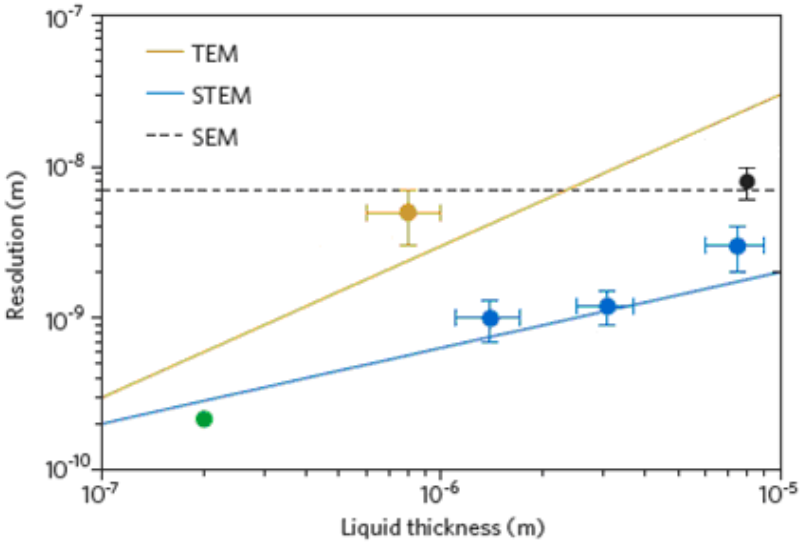


Figure 4 Resolution of different forms of electron microscopy in liquid. Theoretical maximal resolution versus water thickness for TEM, STEM and SEM. The resolution was calculated for typical TEM and STEM instrument parameters for the imaging of Au nanoparticles at the bottom of a layer of water for TEM, and at the top of the layer for STEM. Experimental data points are shown for Au nanoparticles in TEM, STEM and SEM with a 30-nm-thick SiN window, and for PbS nanoparticles in water imaged with STEM.

3.液体样品原位电镜技术在材料学中的应用

应用电镜原位技术除了可观察样品在溶液中的聚集状态外，还可实时观察溶液体中进行的化学反应，对于研究反应机理及对反应过程进行控制具有重要意义。典型的应用是对电化学过程的观察，在透射电镜的液体腔中引入电极和电解液即可实时观察电化学反应，如图 5 是用透射电镜观察的 Cu 在 Au 电极上电沉积的过程，可以清晰的看出 Cu 的成核和生长过程，通过改变电化学条件研究整个反应过程，发现 Cu 的成核密度及生长速度与扩散控制模型不符，通过实验数据进行修正可更准确的控制反应以得到特定形貌的沉积产物。

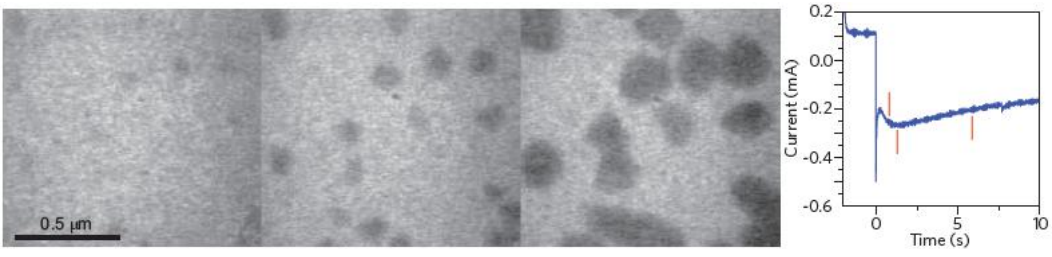


Figure5 Images and electrochemical data obtained during potentiostatic deposition of Cu on a polycrystalline Au electrode from 0.1M $CuSO_4$ /0.18M H_2SO_4. Cu has dark contrast whereas the Au (20 nm thick), SiN windows (80 nm thick) and electrolyte (1 µm thick) provide the grey background. The applied potential was −70 mV with respect to a Cu reference electrode, and the graph shows the total current versus time. The electrode area is 2 x 10^{-5} cm^2. Red lines show the times of each image.

在用透射电镜进行观察时，电子束对样品的热效应及其他效应会引发一些反应，尤其是在溶液中更溶液引发反应。例如，含 Pt+的溶液在电子束作用下会激发 Pt 颗粒的生长，图 6 示出了以 SiN 为窗口观察到的 Pt 颗粒的生长过程，显示在此过程中临近的 Pt 与 Pt 小颗粒之间通过结合生成较大的颗粒。若采用石墨烯为液体腔，透射电镜使用球差和色差校正器，可以在原子级的分辨率下观察 Pt 的生长过程，从而得到 Pt 颗粒的生长机理，如图 7 所示，首先是形成面心立方(fcc)的小 Pt 颗粒，然后小颗粒与小颗粒之间通过一个轴结合形成 fcc 的孪晶，随着孪晶轴两侧晶体的生长最后形成了六角形貌的 Pt 颗粒。

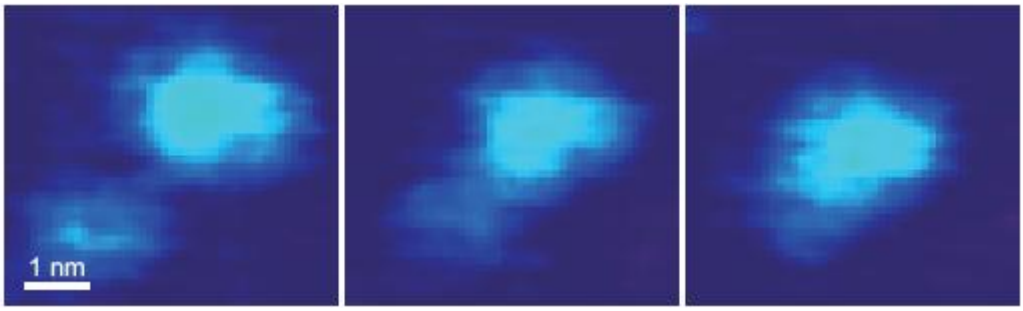


Figure 6 Images acquired during Pt nanoparticle formation from a solution containing 10 mg mL^{-1} Pt(acetylacetonate)$_2$ in a 9:1 mixture of *o*-dichlorobenzene and oleylamine. The images were recorded after 17.9, 18.7, and 22.3 s of beam exposure during which a coalescence event occurs.

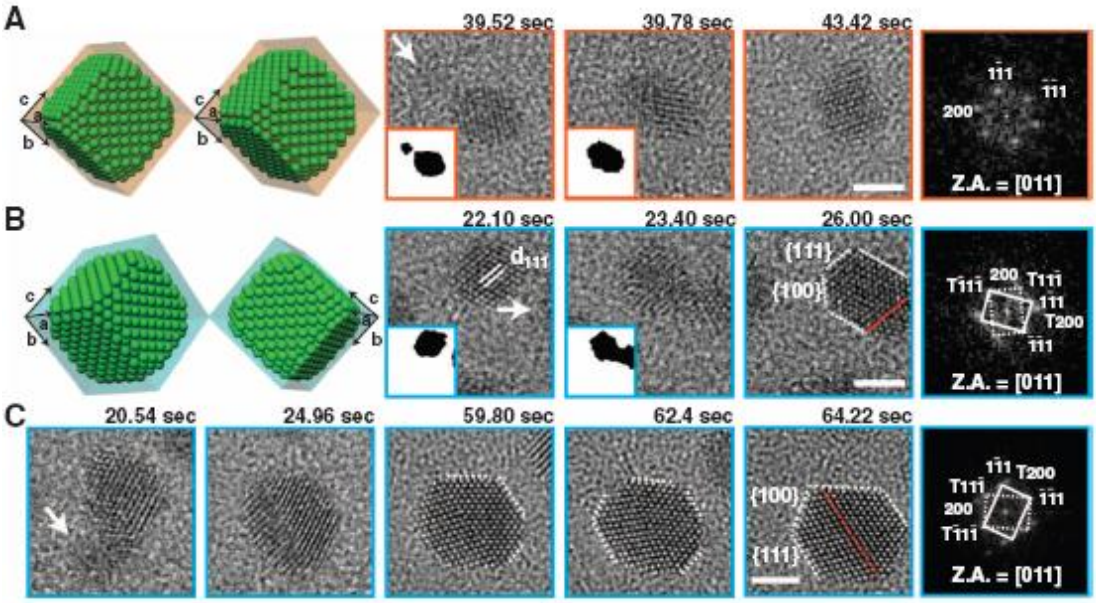


Figure 7 Imaging of Pt nanocrystal growth via coalescence and crystal-structure evolution observed with atomic resolution. Schematic illustrations and corresponding TEM images exhibiting nanocrystal coalescence along the <111> direction, evolving into (A) a single crystalline fcc structure or (B) a twinned (red dotted line) fcc structure. (C) Shape evolution of the Pt nanocrystal by straightening of the twin boundary (red dotted line) and evolution toward a hexagonal shape. White arrows denote incoming small nanocrystals (as seen in insets). Scale bars, 2 nm. Z.A., zone axis.

总之，可观察液体样品的原位电镜技术为液体中物理及化学过程的研究提供了非常有效的方法，将在更多的领域展现出良好的应用前景，如在能源领域可研究锂离子电池等储能材料及反应过程，在生物领域原位研究生命过程等。

参考文献：

1. Niels de Jonge et al., Nature Nanotechnology, 2011, 6, 695.

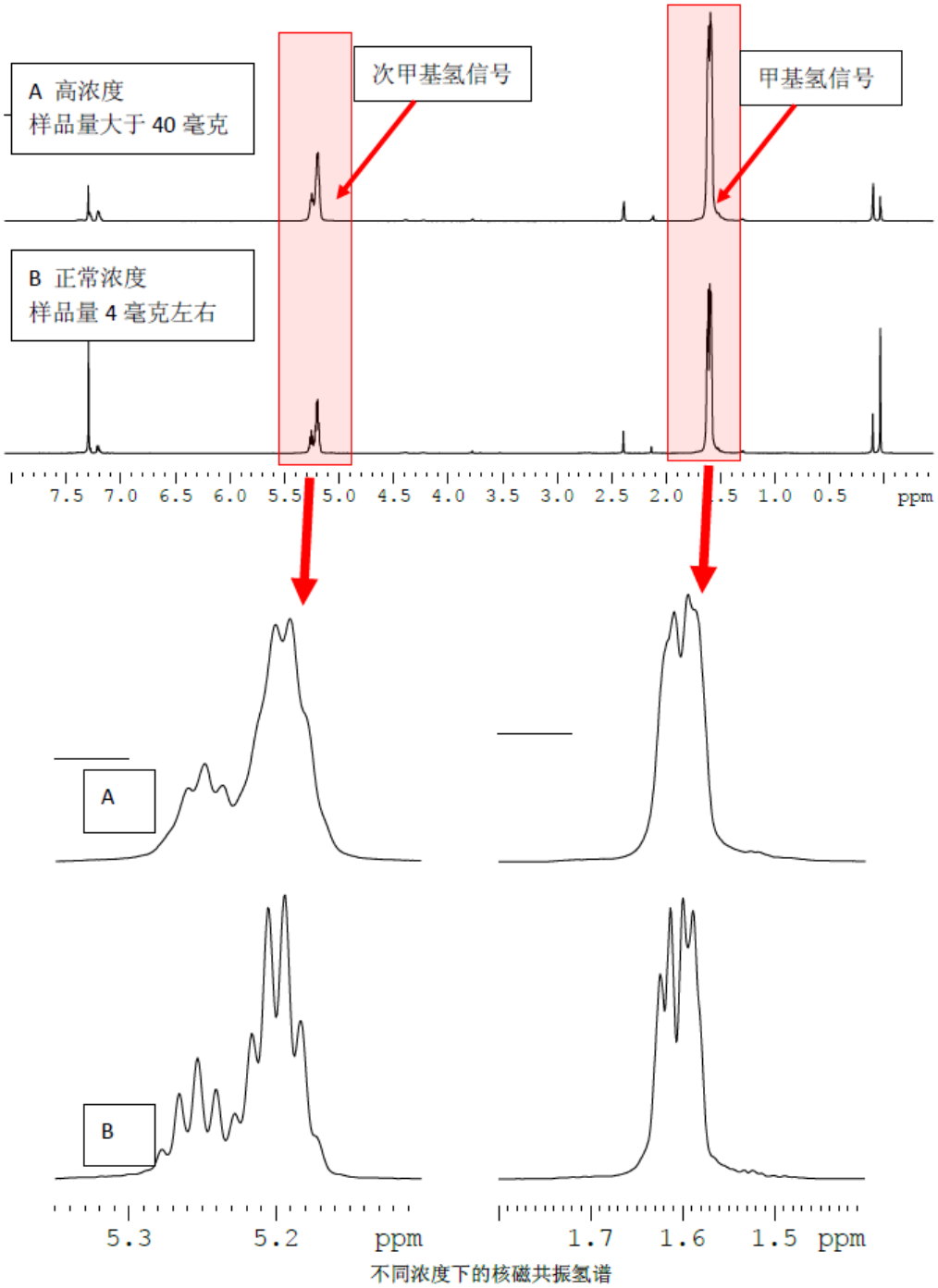
2. Jong Ming Yuk et al., Science 2012, 336, 61.

浓度对氢谱的影响

► 向俊峰

（分析测试中心核磁组 Tel:010-62627946 Email: jfxiang@iccas.ac.cn）

核磁共振氢谱是化学家常见的图谱，广泛用于化学结构鉴定，因此高质量的氢谱对于结构分析非常重要。但是在实际配置样品过程中，经常出现浓度过大造成氢谱裂分不好的情况，如下图所示。请大家切记配置氢谱样品最好 4－10 毫克足够，过高浓度反而不好。



不同浓度下的核磁共振氢谱

仪器及功能介绍

微透析与质谱

▶熊少祥

(分析测试中心质谱组 Tel:010-62554495 Email：mscbj@iccas.ac.cn)

微透析（Microdialysis，MD）是一种优良的在线取样方法，其最大的优点是：在基本不干扰生物体内正常生命过程的情况下，进行活体(in vivo)、实时(in time)、在线(on line) 取样，特别适合研究生命过程的动态变化。Bito 等 1966 年首先报道了应用半透膜可以用在对狗的血浆和大脑的细胞外液的取样分析，随后微透析广泛的应用于生物活体的神经传质的研究，由于质谱分析的快速，灵敏和进样量少等特点，其与微透析联用对生物活体的在线研究有不可替代的作用。

微体积取样能力的要求，使得微透析在酶和底物的特性分析研究中成为重要的手段，尤其是与高灵敏的检测系统联用时。质谱作为一种有力的检测手段，得到的分子和碎片离子，可以较好地提供样品的结构信息。随着电喷雾电离源（ESI）和基质辅助激光解吸电离源（MALDI）的应用和发展，质谱越来越成为生物分子的一种重要分析技术，尤其是 ESI-MS 可以通过碰撞诱导碎裂（CID）提供生物大分子的基本序列信息和结构信息，其重要作用已日渐突出。质谱在生物样品分析中的最大缺陷是存在一些物质效应，如盐及小分子物质的存在，将严重影响样品分子的离子化效率，导致检测灵敏度下降，甚至无法得到检测信号。因此，用微透析脱盐，除去生物样品基质的干扰，也成为其在质谱应用中的一个重要方面。Liu 等对 DNA 等生物样品分析时，应用在线微透析可以降低盐的浓度至 250mM，证实了微透析去盐的快速和高效[1]。

1. 微透析原理

微透析采用透析技术，关键部分是透析膜，仅仅允许水分子和其他小分子透过，膜内灌注液体介质，这种介质与膜外液流（通过向两个方向的扩散）达到平衡。微透析体系的基本部件包括：透析针，连接管，灌注介质，注射泵，样品收集器（图 1）。样品可以通过样品收集器收集，也可以通过在线注射阀引入分析系统。实验动物置于相应设计的装置中，要求动物自由活动而不影响或者破坏连接管。

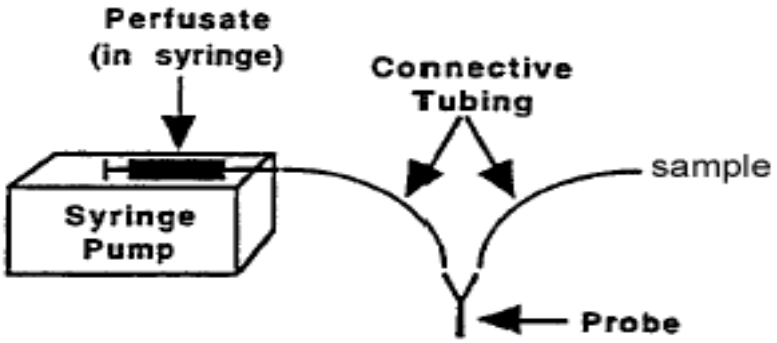


图 1 基本微透析系统示意图，组成包括驱动注射液的注射泵，微透析探针和连接管

微透析探针的设计大致有三种：线型方案，同轴方案，并列分路式方案（图 2）。透析针插入生物组织或生物母体，灌流液由注射器推入膜内套管，透析膜孔径大小允许小分子自由扩散通过而阻止蛋白质等大分子通过。被测分子足够小可以扩散通过透析膜，透析液按顺序依次通过内外套管，出口管，样品收集器进行样品收集或在线分析。

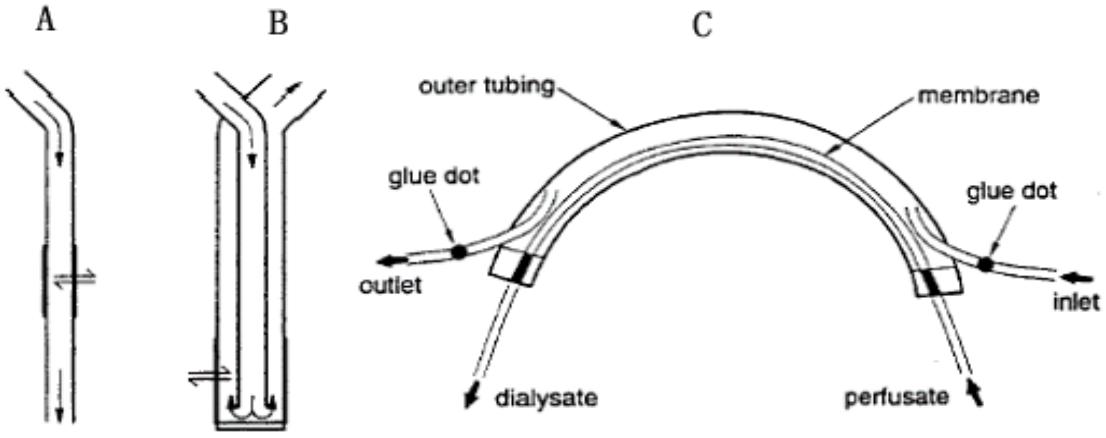


图 2 微透析探针设计三种方案示意图 （A）线型，（B）同轴型，（C）并列分路型。图中阴影部分代表透析膜，箭头指向为注射液流过探针的方向

透析针的选择主要根据插入的部位而定。线型方案使透析针插入球型组织时非常有利；而在活体脑透析中，同轴型针使用最为典型和普遍。并列式方案和环型方案实际上是同轴型的改进模式。前者由熔融硅管相互并列粘合，表面覆盖一层柱型透析膜。这种设计考虑到在动物运动时允许透析针弯曲以免结构损伤；后者透析膜的长度相对较长，约 2～4cm，适合于皮下组织、腹膜取样。并列分路

式透析针 Lunte 和 Gunaratna 分别应用于胆汁的活体微透析取样，得到较高的回收率。

二十年前就有工作者开始尝试微透析与质谱的联用。1990 年 Menacherry 和 Justice 将微透析与热喷雾串联质谱联用，测定了老鼠脑细胞外液多巴胺水平；1991 年 Caprioli 和 Lin 采用 FAB-MS 检测了老鼠体内盘尼西林的药物动力学过程；液相色谱质谱联用及电泳质谱联用也逐渐被报道。

微透析效率取决于透析针的透析效率。描述透析针的透析效率时，科学工作者通常采用 Bungay－Morrison 模式[2]，定义透析分数（EF）为：

$$EF= (Cd^{out}－C^{in}) / (Cb－C^{in})$$

$$＝1－\exp[－1/Qd(Rd + Rm + Rext)]$$

其中，Cd^{out}，C^{in}，Cb 分别表示样品在透析液，注射液和生物过程中的分析浓度。Qd 是注射速度，Rd，Rm，Rext 分别由透析液，透析膜和生物反应溶液引起的对扩散的阻力。

当注射速度一定，同等几何尺寸下，选择不同膜的关键取决于 Rm:

$$Rm=\ln(r0/r1)/Ledl\ Deff\ \phi m$$

r0 , r1 分别表示膜的内径和外径，Ledl 指膜的有效透析长度，Deff 膜中水相有效扩散系数。当膜安装到透析针后，其几何尺寸 Ledl 就固定下来，不再影响 EF 值。

事实上，膜总是对其环境作出响应。膜与生物基质的作用显然会影响以上 Rm 计算式，这种效应常常是使 EF 的起始值降低，为此 Andrade 效应因子被引入作 Rm 的实际校正：

$$Rm=\ln(r0/r1)/Ledl\ Deff\ \phi m＋A$$

当生物作用环境变化时，A 实际上包括了膜－蛋白质，膜－分析样品等其它相互作用的总和。所以，在管内或者是活体微透析取样中，必须保证微透析膜在整个研究过程中的有效寿命。

2. MD 技术的质量问题

应用微透析技术进行生物活体在线研究，如何对被测样品进行有效的定性和定量分析非常重要。微透析取样是在非平衡条件下取样，所以，所测得透析液中化合物的浓度只是探针周围样品基质中该化合物实际浓度的一部分。透析液中待测化合物的浓度与其在样品基质中浓度的关系被称为探针的提取分数(Extraction

Fraction, EF)。影响 EF 的参数有温度、灌流液流速、透析膜的化学和物理性质，探针的几何形状、膜表面积、待测化合物的理化性质及其在基质中的扩散速度。在正常微透析取样操作条件下，这些参数均保持恒定，因此，尽管未建立平衡但却快速地达到了稳态。在实际应用过程中，用回收率或释放(delivery)实验来确定探针的 EF，进而求得实际的样品浓度。具体方法如下：

2.1 流速法(Flow Rate Method)

早在 1985 年 Jacobson 等人通过测定在不同注射速度条件下微透析液中待测化合物的浓度，观察 EF 与注射速度（F），膜面积（A），平均物质传递系数（r）等相关，于是，通过实验总结出如下非线性回归规律：

$$Cdial = C0\ (1- \exp^{-rA/F})$$

C0 是探针周围样品基质中待测化合物浓度，假定样品基质中待测化合物浓度与探针膜内浓度处于平衡状态，则所测得微透析液中待测化合物的浓度即为取样部位样品基质中的浓度 Cdial。

2.2 极慢流速法(Use of Very Low Flow Rate)

Justice 等发现，在灌流速度低于 50nl/min，分子量小于 500Da 的化合物回收分数高于 95%；极慢灌流速度下回收率达到 100%所引入的误差可忽略不计[3]。利用这种方法进行研究时要解决微透析液样品收集和分析都比较困难。非在线分析一般需要至少 2μl 样品，所以要考虑延长取样时间以收集足够量的样品，并要能够处理少量样品所存在的诸如蒸发之类的问题。不过使用在线系统（如微透析取样结合毛细管电泳或毛细管 LC）有可能实现纳升样品的分析。

2.3 零净流量法(Zero-Net Flux Method)

用一系列含有已知浓度(Cp,i)的待测化合物溶液注射入探针；稳定条件下，流出透析液的浓度(Ce)是可测定的；注射基质中这些待测化合物在透析前后的浓度差(Cp,f－Cp,i)与初始注射液浓度存在线性关系（图 3 示）[4]。直线斜率的绝对值即为化合物的提取系数 EF，Y 轴截距为净流量点——既没有损失也没有得到，表征了待测化合物在组织中的浓度。该方法比反透析法更准确，在于它用实际研究的化合物自身校正，但数据量大而操作过程耗时。该方法在探针校标过程中 Cp,i 的持续稳定，在药物动力学研究中影响了实验间参数的设定，所以此方法不适用药物动力学的研究。

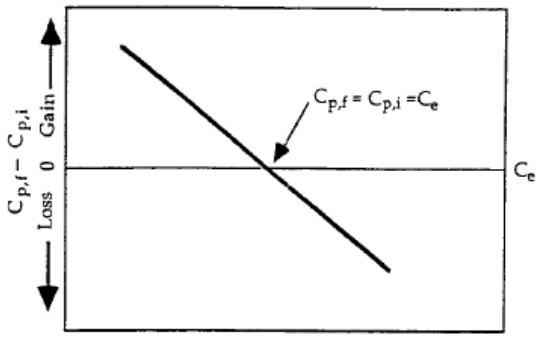


图 3 应用于活体微透析探针回收率测定的净零流量法的示意图

2.4 反透析(Retrodialysis)

反透析法实际是净流量分析的一种特例。取样时将一种内标物加到注射液中，测定该化合物向组织中的穿过速度。假定待测化合物的体内回收率与内标物向组织中的穿过量相等。该方法要求内标物与待测化合物物理特性和生物特性各方面均完全相似，否则 EF 准确性是不可靠的。反透析法改良后的释放量法(Delivery)能克服应用一种类似物作内标所引入的不确定因素[5]。就是测定分析样的释放量，并且假定同一物理条件下 EF 是不变的。释放量就是从注射液里损失的浓度相对于当样品浓度为零时注射液起始浓度的比值。因为释放量的测定只需要注射液的浓度和透析液的浓度，所以释放量法对管内和活体实验具有决定性意义。如果建立了 EF 和释放量的关系，那么就可以通过测定释放量来得到 EF 的值。Zhao 等对此项研究做了深入探讨，并且讨论了在不同流速，不同膜的几何尺寸，不同 pH 值下两者有固定的比例关系。

3. 质谱与微透析体系的联接

解决微透析技术中样品的分析方法问题是成功应用该项技术的必要前提，在开发分析方法时首先要考虑微透析取样的特点。由于使用低流速，微透析样品量一般只有 1～10 μl，另外收集样品时，透析过程也不可避免地会稀释样品。样品量少、浓度低(1 pM～1 μM)的特点为建立分析方法提出了极大挑战。要求使用的分析方法具有灵敏度高、样品量少、分析速度快的特点，最好利用在线分析对微量样品进行实时操作以减少实验误差。图 4 描述以微透析取样为基础的色质联用体系[6]。该体系可以用于流动注射分析（FIA）和色谱分析。只要开启阀门 A，FIA 模式中灌注液由注射器在线注射，在进入生物传感器或质谱前通过阳离子交换膜去盐。如果采用色谱模式，分析样直接被 IPED(integrated pulsed

electrochemical detector)检测。原位取样，样品净化，高效分离，在线去盐，直接电化学检测，质谱检测等技术联合使用在生物分析过程中是不可或缺的。

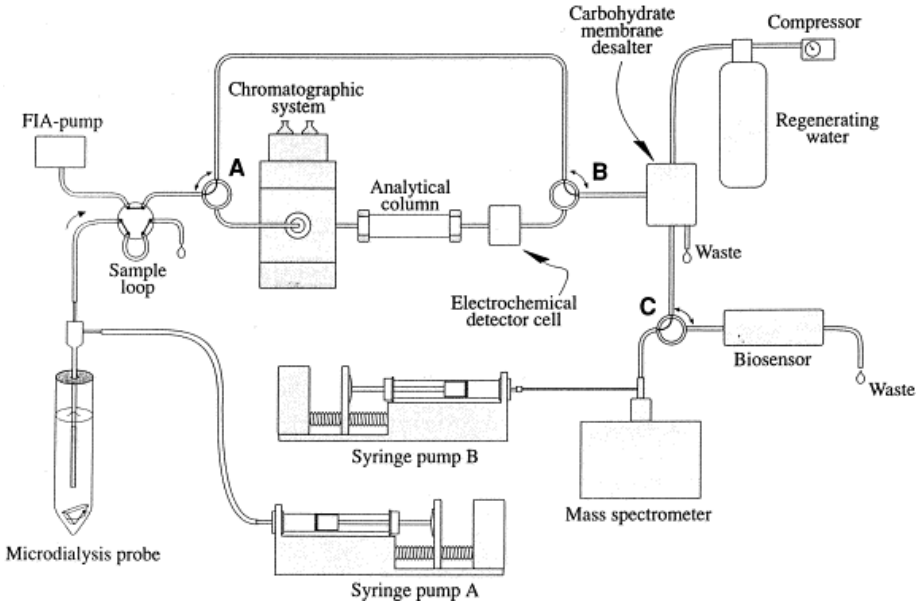


图 4 整合有脉冲电化学检测，生物传感器，质谱，在线阳离子交换膜去盐，流动注射或离子交换色谱的微透析体系

Kerns 等 1999 年报道了串联质谱（MS/MS）与微透析取样的连用体系（图 5），并对毒品代谢，酶催化反应和蛋白质配体络合反应做了在线检测和管外检测实验，证实了这套设备的优越性[7]，使用热喷雾和电喷雾接口的检出限分别达到 100 和 200ng/ml，而且有效的减少了样品存贮和预处理步骤。同时，通过串联质谱的 SRM 响应（选择反应检测），Kerns 等研究了取样时间、透析液流速、微透析取样效率等因素对实验结果的影响，并对实验条件进行了优化。对热喷雾接口优化结果为：透析针尺寸：20 ×0.4 mm I D，4 mm 膜；透析速度：10 ul/min；切换阀尺寸：200×0.12 mm I D；醋酸铵反冲洗速度：1.5 ml/min；碰撞气（氩气）：0.7 mTorr，50 eV；透析速度比通常用于微透析的要高些，然而这样减少了流体传输时间，降低了稀释作用。透析针与切换阀连接，透析液在 1.0 分钟内捕集到切换阀的 50ul 样品环中，然后用 50mM 的醋酸铵反冲洗出来。切换阀通过 200 mm ×0.26 mm I D 的管道连接到有一 100 ul 样品环的进样阀，样品被进样到 MS/MS。在电喷雾中，整套装置与图 5 相似，只不过微透析针直接连接到电喷雾接口，安装在 MS/MS 底盘上。氩气的流速为 450×10^{12} 原子/cm^2，能量为 50ev。对多肽样品而言，透析流体是为 0.1％醋酸；对其他样品选择 2mM 的醋酸铵。该体系也

适用于 FAB（快原子轰击）离子源，有科学家使用 FAB 对盘里西林 G 和 V，可卡因，丙戊酸，含磷物质在生物活体内代谢产物等进行了在线质量分析[8-11]。1999 年 Wong 和他的合作者采用类似但更为简洁的 MD－LC－MS/MS 装置在线测定了活体老鼠的褪黑色素[12]，其装置与图 5 不同之处是用一个在线注射器代替了切换阀和进样阀。

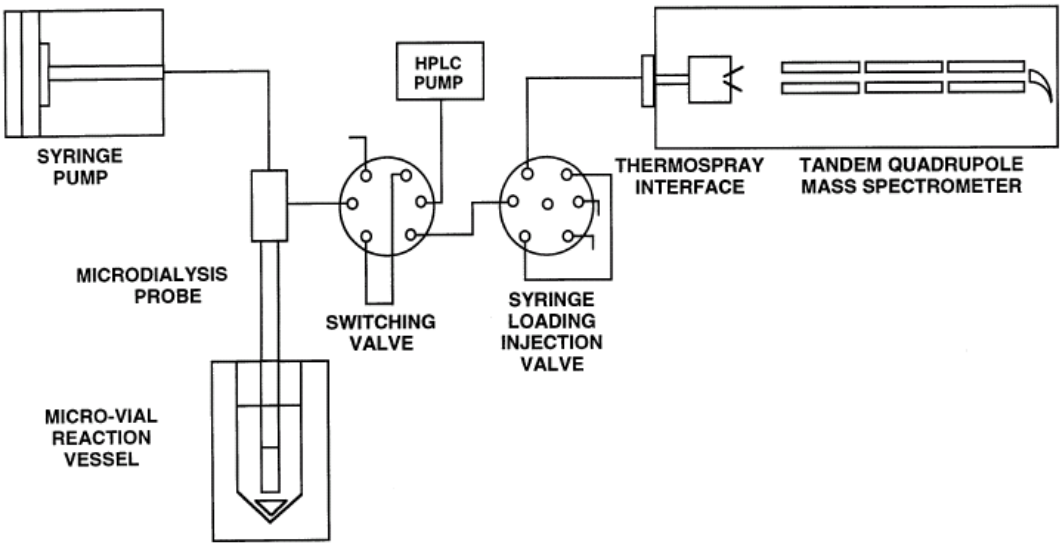


图 5　微透析取样和热喷雾多级质谱的仪器图。整合电喷雾体系与之类似，除了微透析可以不需要连接阀而直接连到电喷雾接口

4．ESI-MS 除盐接口

近年来，色质联用技术受到了广泛关注，尤其是电喷雾质谱，因为其在原理上很容易与高效分离技术如 HPLC 偶联。然而，当盐和其它小分子杂质存在时，给样品的离子化带来很大困难，所以目前实践中 ESI－MS 主要还是与反相色谱偶联。离子交换，憎水交互作用，亲和色谱等技术是非常流行的生物分离技术，它们能很好的保存蛋白质的生物活性和天然结构，可是这些色谱技术都采用含高盐缓冲试剂，为解决这一难题，Dwilson 等做了不懈努力[14 -17]。目前最常用的去盐方法是反相柱子的 2-D 色谱，其缺点是体系复杂，操作耗时；Kable 等尝试过离子捕获技术[18, 19]，然而这种技术却不适应延时操作，因为离子捕获模式下离子很快就会趋向饱和。利用在线透析可以很好使生物质谱分与液相色谱柱偶联，而且具有高通量的特征。基于此，Liu 等做了许多有益的工作 [1,20,21]。图 6 是 Canarelli 等用透析对质谱和色谱偶联体系的示意图[13]。这种偶联模式具有模块化

特点，其在线透析仪的各部分可以快速互换，而且，在线透析仪能调节流过其中的缓冲液温度，准确的温度控制对完善去盐过程是必要的。除了离子交换色谱外，其它应用含盐缓冲液的色谱也可使用这种接口来偶联 ESI-MS，可测定分子量高达 150000Da 的抗体蛋白。Lamoree 等也曾报道过用类似的装置实现了等电点聚焦－微透析－质谱（IEF-MD-MS）的偶联[22]。

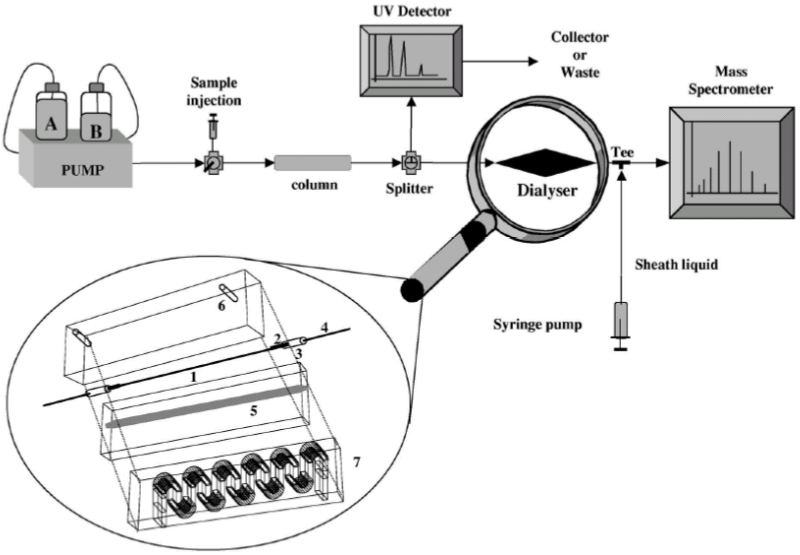


图 6　在线微透析液相色谱电喷雾质谱偶联装置示意图。
图中放大的微透析部分为：（1）空心纤维 （2）微密封套管 （3）PTFE 管 （4）熔硅毛细管（5）透析通道 （6）透析缓冲液进口 （7）包括加热体系的低端部分

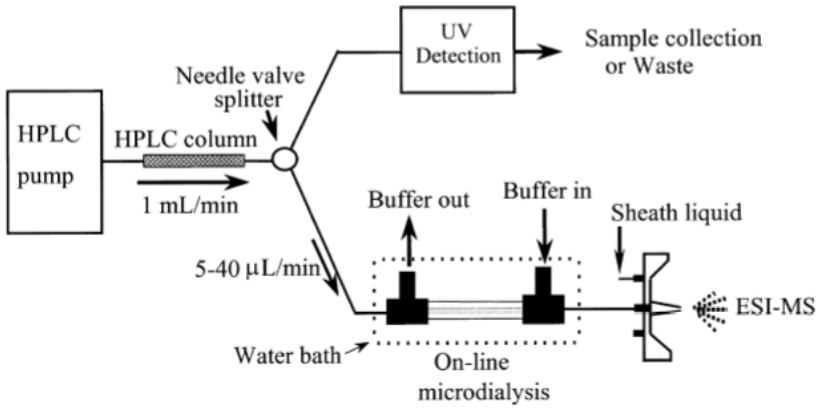


图 7　高效液相离子色谱在线微透析电喷雾质谱联用示意图

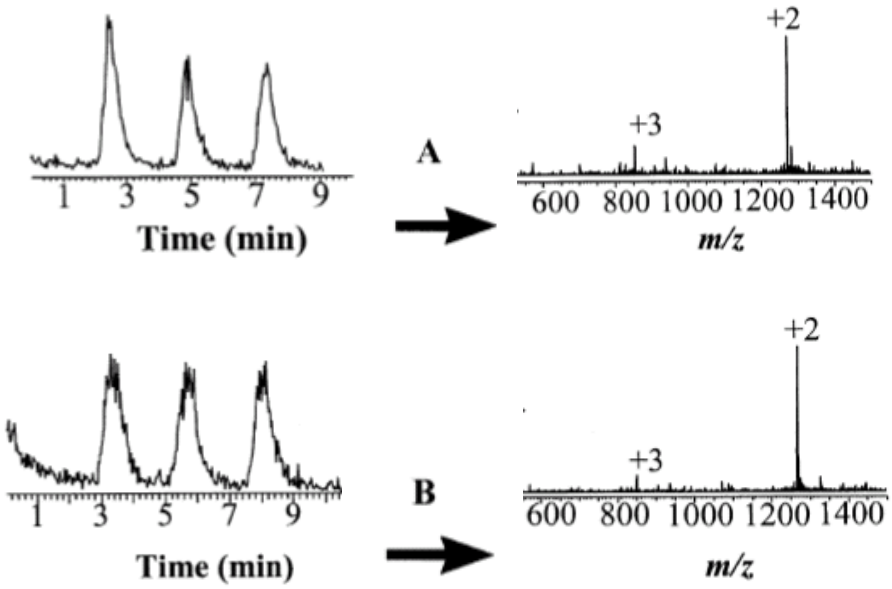


图 8　图 7 所示装置的微透析除盐效率。流动相为 5 mM 缓冲液 100 mM NaCl（A）及 50 mM 缓冲液 1 M NaCl（B）胰岛素 A 链样品的总离子色谱图和质谱图

图 7 为 Liu 等设计的利用微透析膜接口，将电喷雾质谱与离子型高效液相色谱偶联、除盐的装置示意图[1]。图 8 所示为该体系的除盐效果。可见 5 mM 缓冲液 100 mM NaCl 盐（图 8A）和 50 mM 缓冲液 1 M NaCl 盐（图 8B）样品溶液条件下，均可得到清晰的样品多电荷质谱峰。

5. 质谱-微透析联用在生物学中的应用

5.1 研究颅脑的分子生物化学机理

为了深入了解人类内心世界即意识领域的活动规律，在分子水平对其脑部或者相关器官的化学物质进行探究，无疑为科学工作者提供了有力证据。现代科技发展表明，微透析确实可以用来分析，探测甚至实时控制大脑的生命活动。主要包括（1）检测乳酸含量变化来分析代谢性功能障碍，脑损伤后脑组织缺血缺氧，那么神经元对葡萄糖的有氧氧化能力降低甚至丧失，此时主要靠葡萄糖的无氧酵解提供能量并伴随大量乳酸产生，引起酸中毒（乳酸合量的高低与伤情呈正比），导致神经细胞膜结构与功能破坏，细胞生理丧失、生化代谢停止、脑屏障破坏以及脑水肿形成；(2)检测神经递质与兴奋性氨基酸的变化为神经科学提供理论依据。神经递质释放的多少和正常与否常常决定着大脑的工作情况。Hows 等人用 LC/MS/MS 检测鼠脑透析液中乙酰胆碱（ACh）的浓度[24]，其检出限为 1 fmol，信噪比 3：1，整个过程已经程式化。同时对 ACh 酶抑制剂的柱条件进行了调试；

兴奋性氨基酸（EAA）对中枢神经有兴奋作用，在动物脑部受外界刺激后会发生明显变化，例如，谷氨酸和天门冬氨酸分别升高 8-13 倍和 6-17 倍。也有科学家在研究影响神经系统的化学物质基础及其作用机理[23-26]；(3)氧自由基在原发性和继发性脑损伤的作用。Demopoulos 指出脑组织缺氧产生的自由基导致细胞膜和细胞内膜结构脂质过氧化反应，引起细胞膜损伤，近年大量研究证实此生化作用伴随继发性脑损伤过程，而且原发性损伤后释放内原性物质神经多肽和花生四烯酸的代谢产物，引起神经元和脑血管的继发性损伤；(4)缓激肽对脑工作的作用。缓激肽是最早发现进入脑损伤部位的化学物质之一，具有强力的脑破坏性。Haskins 等人用 LC-MS/MS 对内源代谢肽进行了检测和阐述，可以达到 amol 水平[27] 。

5.2 研究药物代谢和药物动力学

MD-MS 已用于研究药物在外周组织和器官中的药物动力学(包括皮肤和皮下脂肪组织，眼，骨骼肌，血液胆汁，肝脏，肾脏)。Leveque 等人用 MD-GC-MS 测定了牛皮癣病人皮肤中的甲氧基补骨脂素（8-MOP），检测限达到 0.29ng/ml[28]。8-MOP 目前是一种治疗白癜风，先天遗传性皮炎的理想药物，通过十个病人口服此药物，然后接收检测并作药物的动力学分析表明，MD-GC-MS 在此项工作中起着重要作用。随着人们生活水平和追求层次的提高，越来越多关心自己的饮食和健康。科学家们也用 MD-MS 对肥胖，脂肪水解，饮食，运动和用药进行了深入广泛的研究[29-33]。

许多蛋白质容易形成金属加合物离子而严重影响质谱分析，Leveque 等研究了如何将非理想的金属加合物离子的形成减少到最小[34]，它可以将 ESI-MS 的灵敏度和分辨率提高至少 5 倍。很多科学工作者尝试将质谱与其它分离手段如 HPAEC 偶联，研究了一些蛋白酶抑制剂，酶水解产物等的检测[35]，为药物代谢动力学研究提供了化学依据。

参考文献：

[1] Liu C, Verma S S. Direct coupling of ionic high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry utilizing a microdialysis junction interface. J. Chromatogr. A, 1999, 835 (1-2): 93

[2] Bungay P M, Morrison P F, Dedrick R L. Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. Life Sci., 1990, 46 (2):

105
[3] Parsons L H, Justice J B. perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleas-accumbens as measured by in vivo microdialysis. Brain res., 1993, 606(2): 195
[4] Zhao Y P, Liang X Z, Lunte C E. comparison of recovery and delivery in-vitro for calibration of microdialysis probes. Anal. Chim. Acta, 1995, 316 (3): 403
[5] Ault J M, Riley C M, Meltzer N M, Lunte C E. dermal microdialysis sampling in-vivo. pharmaceut. res., 1994, 11(11): 1631
[6] Torto N, Gorton L, laurell T, Marko-Varga G. Technical issues of in vitro microdialysis sampling in bioprocess monitoring. TrAC., 1999, 18 (4): 252
[7] Edward H, Kerns L, Kevin J, et al. Monitoring in vitro experiments using microdialysis sampling on-line with mass spectrometry. J. Pharmaceut. Biomed., 1999, 20 (1-2): 115
[8] Caprioli R M, Lin S. On-Line Analysis of Penicillin Blood Levels in the Live Rat by Combined Microdialysis/Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1990, 87 (1): 240.
[9] Lin S, Caprioli R M. Proc. 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1988, 1000
[10] Lin S, Chang S,. Caprioli R M. Proc. 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1990, 1012
[11] Deterding L J, Tomer K. Proc. 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1992, 547
[12] Wong Philip S H, Yoshioka K, Xie F, et al. In vivo microdialysis / liquid chromatography / tandem mass spectrometry for the on-line monitoring of melatonin in rat. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1999, 13 (5): 407
[13] Canarelli S, Fisch I, Freitag R. On-line microdialysis of proteins with high-salt buffers for direct coupling of electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 2002, 948 (1-2): 139
[14] Dwilson I. Multiple hyphenation of liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy, Mass Spectrometry and Beyond. J. Chromatogr. A, 2000, 892 (1-2): 315
[15] Konig S, Weiler S, Fales H M. On-line Microdialysis for Mass Spectrometry. Biotech., 1998, 24 (5): 712
[16] Linnemayr K, Rizzi A, Josic D, Allmaier G. Comparison of microscale cleaning procedures for (Glyco) proteins prior to positive ion matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Anal. Chim. Acta, 1998, 372 (1-2): 187
[17] Prokai L, Aaserud D J, Simonsick W J. Microcolumn size-exclusion chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatog. A, 1999, 835 (1-2): 121
[18] Kable M A, Schols H A, Voragen A G J. Mass determination of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry following HPLC, assisted by on-line desalting and automated sample handling. Carbohyd. Polym., 2001, 44 (2): 161

[19] van de Merbel N C. Membrane-based sample preparation coupled on-line to chromatography or electrophoresis. J. Chromatogr. A, 1999, 856 (1-2): 55

[20] Liu C, Hofstadler S A, Bresson J A, et al. On-Line Dual Microdialysis with ESI-MS for Direct Analysis of Complex Biological Samples and Microorganism Lysates. Anal. Chem., 1998, 70 (9): 1797

[21] Liu C, Wu Q, Harms A C, Smith R D. On-Line Microdialysis Sample Cleanup for Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Nucleic Acid Samples. Anal. Chem., 1996, 68 (18): 3295

[22] Lamoree M H, Tjaden U R, van der Greef J. Use of microdialysis for the on-line coupling of capillary isoelectric focusing with electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1997, 777 (1): 31

[23] Kondrat R W，Kanamori K，Ross B D. In vivo microdialysis and GCMS for ^{13}Cenrichment measurement of extracellular glutamate in rat brain. J. Neurosci. Meth., 2002, 120 (2): 179

[24] Hows M E P, Organ A J, Murray S, et al. High-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry assay for the rapid high sensitivity measurement of basal acetylcholine from microdialysates . J. Neurosci. Meth., 2002, 121 (1): 33

[25] Kennedy R T，Watson C J，Haskins W E， Strecker R E， In vivo neurochemical monitoring by microdialysis and capillary separations. Curr. Opin. Chem. Biol., 2002, 6 (5): 659

[26] Schabitz W R, Giuffrida A, Berger C, et al. Release of Fatty Acid Amides in a Patient With Hemispheric Stroke: A Microdialysis Study. Stroke, 2002, 33 (8): 2112

[27] Haskins W E，Wang Z Q，Watson C J，et al. Capillary LC-MS^2 at the Attomole Level for Monitoring and Discovering Endogenous Peptides in Microdialysis Samples Collected in Vivo. Anal. Chem., 2001,73 (21): 5005

[28] Leveque N，Muret P，Mary S，et al. Validation of a microdialysis GCMS method to assess 8 methoxypsoralen in psoriatic patient dermis. J. Chromatogr. B, 2002, 780 (1): 119

[29] Gravholt C H，Dall R，Christiansen J S, et al. Preferential stimulation of abdominal subcutaneous lipolysis after prednisolone exposure in humans. Obes. Res.，2002, 10 (8): 774

[30] Marion-Latard F，Glisezinski D E. A single bout of exercise induces beta-adrenergic desensitization in human adipose tissue. Amer. J. Physiol-Regul Integr. C, 2001, 280 (1): R166

[31] Lange K H W，Lorentsen. Subcutaneous abdominal adipose tissue lipolysis during exercise determined by arteriovenous measurements in older women. J. Amer. Geriat. Soc., 2002, 50 (2): 275

[32] Karpe F, Fielding B A. Monitoring adipose tissue blood flow in man: a comparison between the (133)xenon washout method and microdialysis. Int. J. Obesity, 2002, 26 (1): 1

[33] Kolehmainen M，Vidal H，Hormone sensitive lipase expression and adipose tissue metabolism show gender difference in obese subjects after weight loss.

Int. J. Obesity，2002, 26 (1): 6
[34] Benkestock K, Edlund P O, Roeraade J. On-line microdialysis for enhanced resolution and sensitivity during electrospray mass spectrometry of non-covalent complexes and competitive binding studies. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2002, 16 (21): 2054
[35] Rumbold K, Okatch H. Monitoring on-line desalted lignocellulosic hydrolysates by microdialysis sampling micro-high performance anion exchange chromatography with integrated pulsed electrochemical detection/mass spectrometry. Biotechnol. Bioeng.，2002, 78 (7): 821

有机元素分析方法介绍

► 宗文杰

（分析测试中心元素分析组 Tel:010-62554625 Email: wjzong@iccas.ac.cn）

一 CHN 元素的定量分析

仪器名称：Flash EA 1112 元素分析仪

原理：气相色谱原理

燃烧温度：900℃

分析方法简介：有机化学样品在氦气作为载气的石英反应管中加氧的状态下，瞬间燃烧，燃烧后的气体产物经过氧化、还原随载气进入色谱柱进行分离，按照保留时间的不同，先后分离出 N 峰、CO2 峰、H2O 峰，再经热导检测器进行检测。

二 O 元素的定量分析

仪器名称：Flash EA 1112 元素分析仪

原理：气相色谱原理

燃烧温度：1060℃

分析方法简介：有机化学样品在氦气作为载气的石英反应管中，瞬间燃烧，燃烧后的气体产物经过铂碳还原，进入色谱柱分离出 CO 峰，再经热导检测器进行检测。

CHN 及 O 的测定对样品的要求：

1. 提纯干燥后的有机化合物，研细或剪碎，放入标明送样人姓名、样品编号的样品瓶中。
2. N、H 或 O 的含量需大于 0.5%；C 含量需大于 20%。

3. 液体样品需粘稠状且不挥发。
4. 样品量需 20 毫克以上。
5. 测氧的样品中不能含金属、氟、磷、硅等。

三 Cl、Br 元素的定量分析

分析方法：汞液滴定法

分析方法简介：含氯或溴的有机化合物，在氧瓶中燃烧分解，用标准汞液滴定卤离子，以二苯卡巴腙为指示剂，过量的汞与二苯卡巴腙生成紫红色的络合物，以此指示滴定的终点。

Cl、Br 元素的定量分析对样品的要求：

1. 提纯干燥后的有机化合物，研细或剪碎，放入标明送样人姓名、样品编号的样品瓶中。
2. 氯、溴的含量需大于 0.5%。
3. 液体样品需粘稠状且不挥发。
4. 样品量需 40 毫克以上。
5. 样品中不能含金属。
6. 氯、溴共存不能测定。

四 S 元素的定量分析

分析方法：氧瓶分解法

分析方法简介：含硫的有机化合物，在氧瓶中燃烧分解，用高氯酸钡标准液滴定硫酸根离子，以二甲砜偶氮 III 为指示剂，过量的钡与二甲砜偶氮 III 生成蓝色的络合物，以此指示滴定的终点。

S 元素的定量分析对样品的要求：

1. 提纯干燥后的有机化合物，研细或剪碎，放入标明送样人姓名、样品编号的样品瓶中。
2. 硫的含量需大于 0.5%。
3. 液体样品需粘稠状且不挥发。
4. 样品量需 40 毫克以上。
5. 样品中不能含金属、磷、氟等。

分析测试中心动态

分析测试中心网页改版完成

分析测试中心网站改版完成（网址为：http://cpam.iccas.ac.cn/）！为了增进仪器管理者与用户间的交流沟通，促进测试技术的应用，更有力地为科研提供支撑，改版后的网站信息更全、功能更多、互动更方便！网站设置了中心简介、通知公告、测试机组、培训信息、《分析测试中心通讯》、分析方法及应用、文档下载等栏目，欢迎您的访问，期待您的指导！

分析测试中心拟推出 2011 年新购仪器及附件介绍汇编

为了方便所内科研人员及时了解新购仪器及附件的功能，促进测试技术的应用，更有力地为科研提供支撑，分析测试中心将把化学所 2011 年新购仪器及附件的功能进行整理、汇编成册，将在 7 月份以电子版的形式上传于分析测试中心网页上，并发布到各位科研人员的邮箱中。届时欢迎您的阅读，期待与您的讨论！

主编：唐亚林

编委：（按姓氏笔画排序）

关　波　向俊锋　刘　芬　刘美蓉　宗文杰　郝　项　熊少祥

编务：丁丽萍