



## 第六章 目标成分常用定量方法(一)

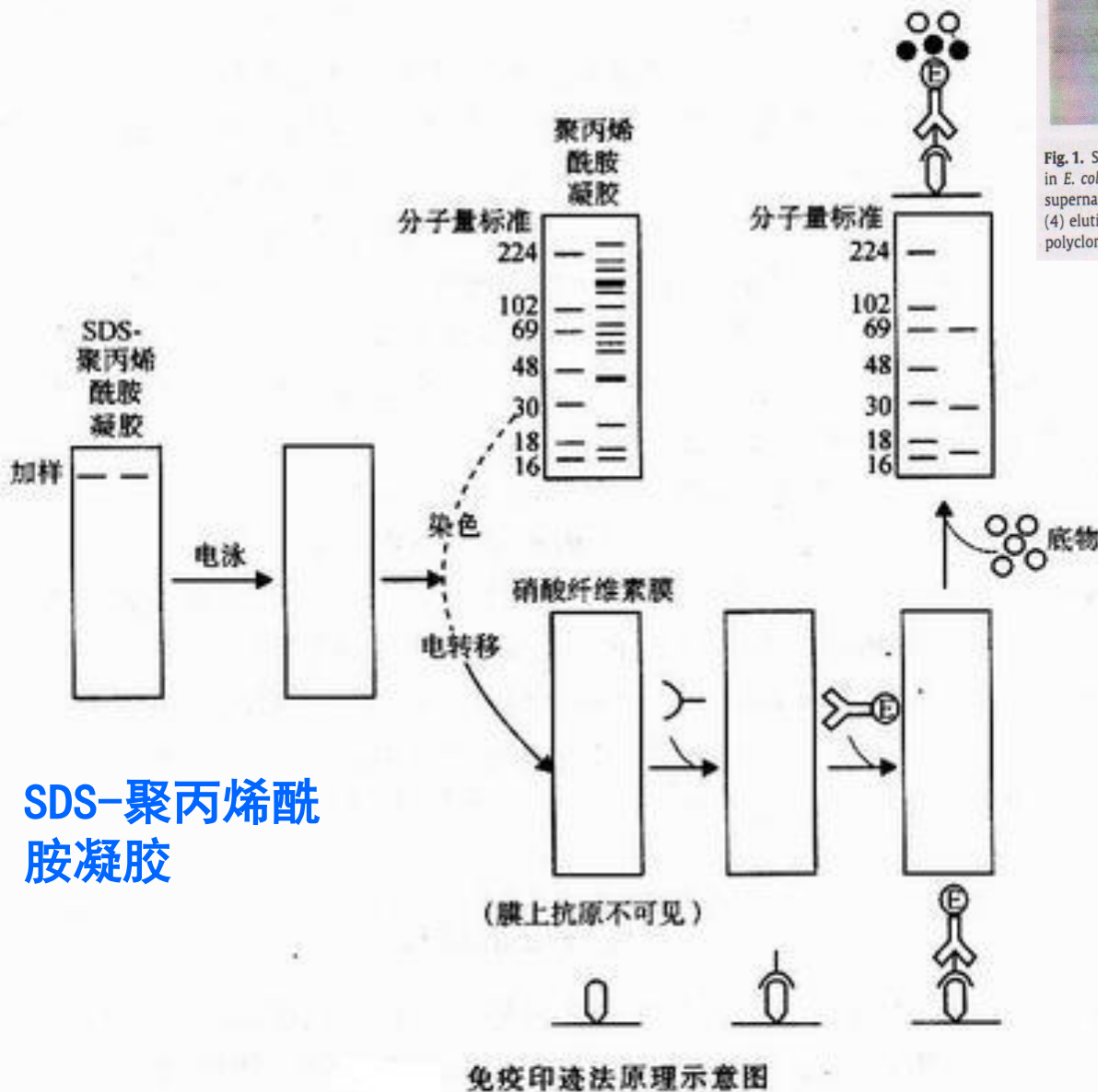
前面内容回顾: 分子杂交技术

**Western blot:** 蛋白质免疫印迹技术

**Southern blot:** DNA检测技术

**Northern blot:** RNA检测技术

# Western blot: 蛋白质检测技术



SDS-聚丙烯酰胺凝胶

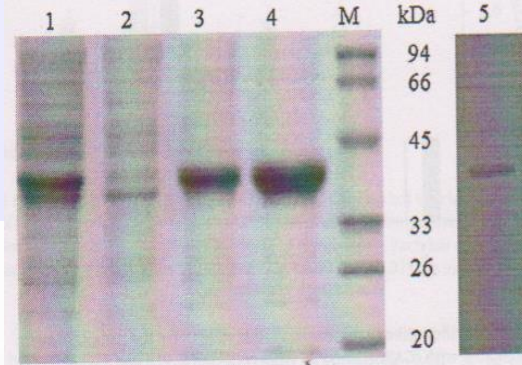
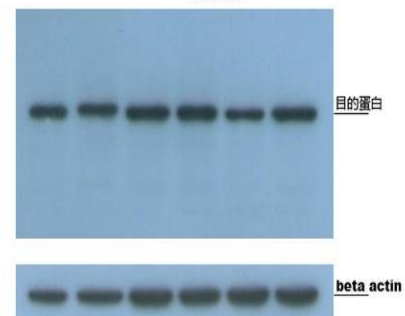


Fig. 1. SDS-PAGE and western blotting analysis of the rGAPDH expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Lanes: M, protein molecular weight marker; (1) supernatant of ultrasonicated cells lysate; (2) flow through; (3) elution; (4) elution; (5) Western blotting of purified rGAPDH with anti-GAPDH polyclonal antibody.

Western blotting服务实例

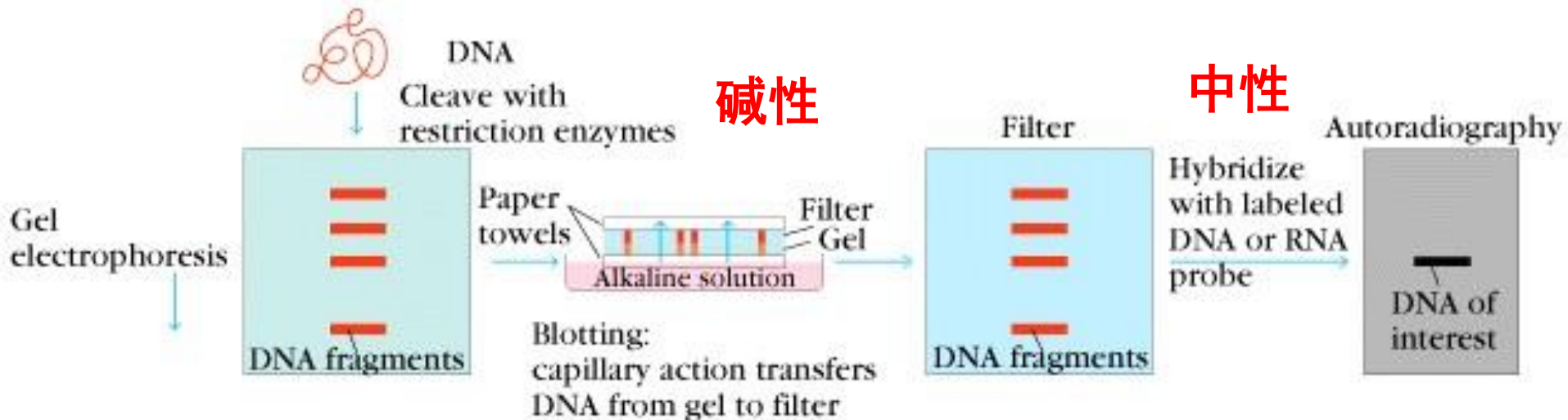
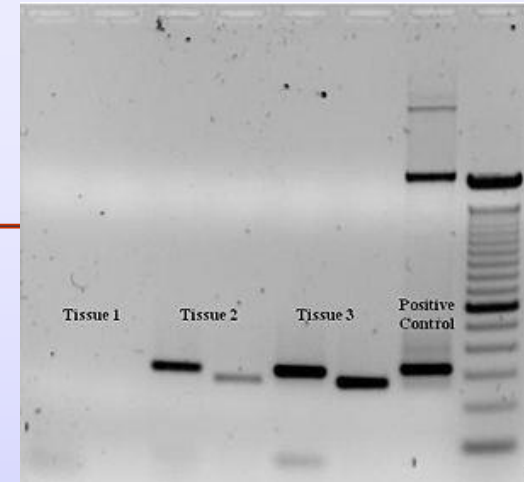


# 检测样品中特定DNA序列的存在

## Southern Blot procedure

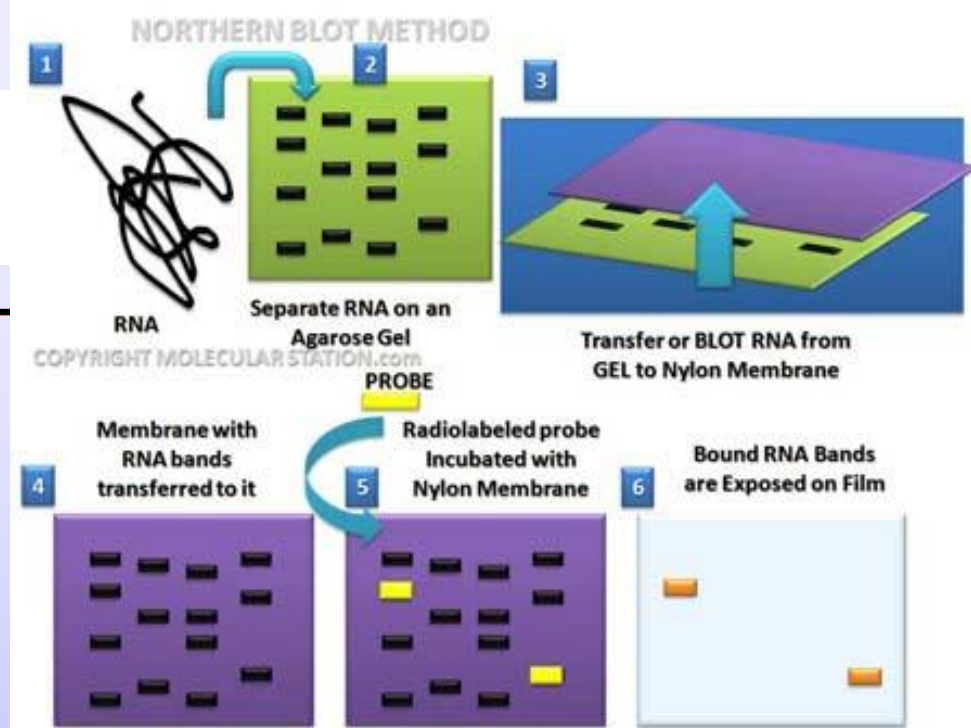
操作步骤:

DNA → 琼脂糖电泳 → 印迹转移 → 预杂交 → (杂交, 变性探针) →  
 洗膜 → 放射自显影或显色



# 检测样品中是否含有基因的转录产物 (mRNA)

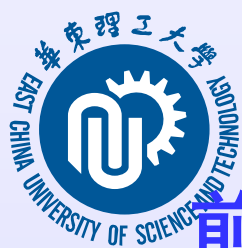
## Northern Blot procedure 操作过程



mRNA → Electrophoresis → Northern Blot → Prehybridization

→ Hybridization → Washing → Autoradiography (or Color)

mRNA提取 → 甲醛变性电泳 → 印迹转移 → 预杂交 →  
杂交 (变性探针) → 洗膜 → 放射自显影或化学发光

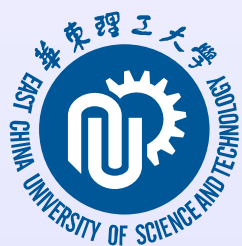


前面内容回顾:

## 常用定性鉴别方法

- ★ 常用的化学定性鉴别法
- ★ 常用的色谱定性鉴别法
- ★ 常用的光谱定性鉴别法
- ★ 常用的电泳定性鉴别法
- ★ 常用的免疫定性鉴别法
- ★ 常用分子杂交定性鉴别法

定量? 含量测定?

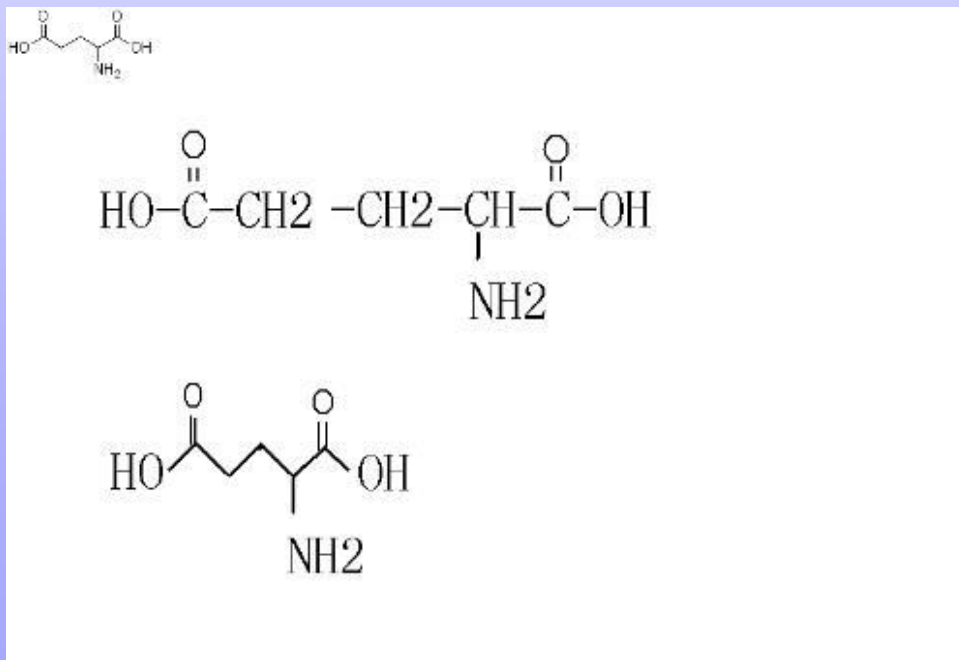


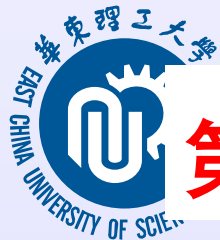
# 问题

发酵法生产谷氨酸时（谷氨酸纯化后碱中和成味精），  
如何定性定量检测发酵液中谷氨酸？（谷氨酸棒状杆菌等发酵）

$\lambda 280\text{nm}$ 左右

菌体蛋白可以做饲料，蛋白含量如何检测？





## 第六章 目标成分常用定量方法(一)

### 基本要求

1. 掌握容量法含量测定方法
2. 掌握光谱法含量测定方法（分光光度法）
3. 掌握色谱法含量测定方法
  - 1) 高效液相色谱法（HPLC法）
  - 2) 气相色谱法（GC法）
  - 3) 薄层色谱法（TLC法）
4. 电泳定量方法

# 第一节 容量分析法（滴定分析法）

**定义：**将一种已知其准确浓度的试剂溶液（称为**标准溶液**）滴加到被测物质的溶液中，直到化学反应完全时为止，然后根据所用试剂溶液的浓度和体积可以求得被测组分的含量，这种方法称为滴定分析法（或称容量分析法）。

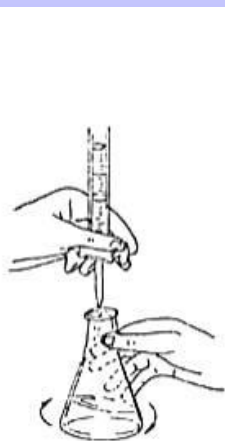


图 2-28 滴定

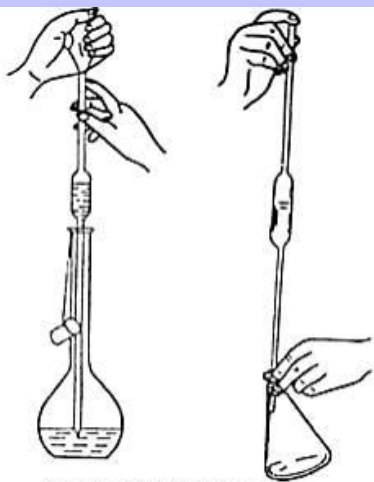


图 2-29 移液管的使用

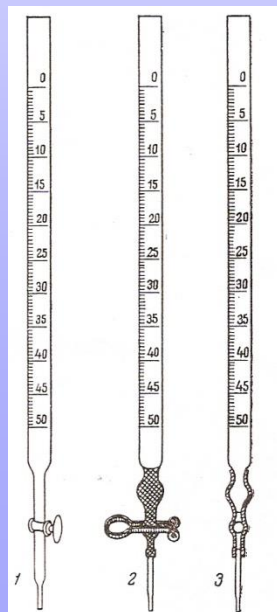
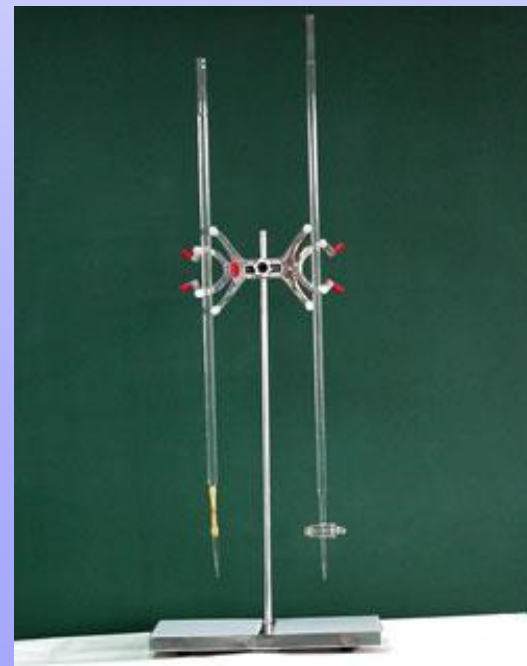


Fig. 30. Burettes





**标准溶液：**已知准确浓度的标准物质溶液

**标准溶液的配制：**准确称量一定量的标准物质，溶解于适量溶剂后定量转入容量瓶中，定容，然后根据称取标准物质的质量和容量瓶的体积即可算出该标准溶液的准确浓度。

$$C = \frac{g}{V} \text{ (g/ml)}$$

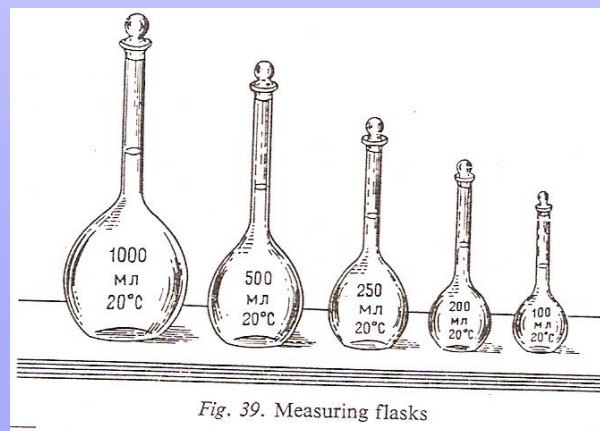
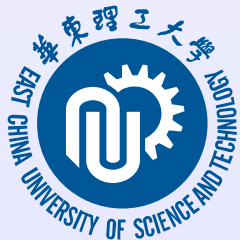


Fig. 39. Measuring flasks

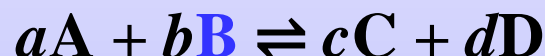
**measuring flask**



## 滴定分析法的计算

### 基本公式：

设A为待测组分，B为标准溶液，滴定反应为：



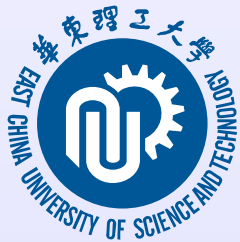
当A与B按化学计量关系完全反应时，则：

$$n_A : n_B = a : b$$

求待测溶液浓度  $C_A$ ： 若已知待测溶液的体积  $V_A$  和标准溶液的浓度  $C_B$  和体积  $V_B$ ，  
则

$$V_A \cdot C_A = a/b \cdot V_B \cdot C_B$$

$$C_A = a/b \cdot V_B \cdot C_B / V_A$$

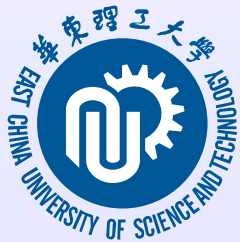


## 方法特点：

1. 加入标准溶液物质的量与被测物质的量恰好是化学计量关系；
2. 此法适于组分含量在1%以上各种物质的测定；
3. 该法快速、准确、仪器设备简单、操作简便；
4. 用途广泛。

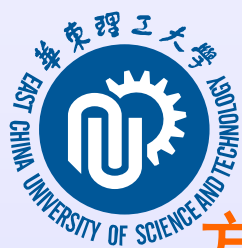
## 要求：

1. 反应要按一定的化学方程式进行，即有确定的化学计量关系；
2. 反应必须定量进行——反应接近完全 ( $>99.9\%$ ) ；
3. 反应速度要快——有时可通过加热或加入催化剂方法来加快反应速度；
4. 必须有适当的方法确定**滴定终点**——简便可靠的方法：合适的指示剂。



## 标准物质具备的条件：

- (1) 组成恒定：实际组成与化学式符合；
- (2) 纯度高：一般纯度应在99.5%以上；
- (3) 性质稳定：保存或称量过程中不分解、不吸湿、不风化、不易被氧化等；
- (4) 具有较大的摩尔质量：称取量大，称量误差小；
- (5) 使用条件下易溶于水（或稀酸、稀碱）。



## 方法误差：主要是终点误差

终点误差——滴定终点与理论终点（化学计量点）不符引起的误差

- (1) 指示剂不能准确地在化学计量点时改变颜色
- (2) 标准溶液的加入不可能恰好在指示剂变色时结束：

**接近终点时半滴半滴加入！**

- (3) 指示剂本身会消耗少量标准溶液做空白试验
- (4) 杂质消耗标准溶液

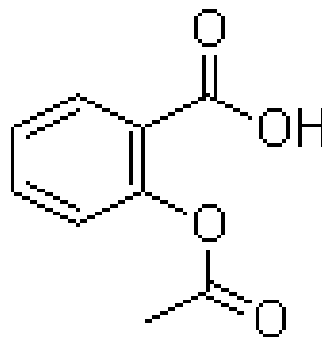


## 阿司匹林（乙酰水杨酸）

【类别】解热镇痛非甾体抗炎药，抗血小板聚集药。

### 【含量测定】

取本品约0.4g，精密称定，加中性乙醇（对酚酞指示液显中性）20ml 溶解后，加酚酞指示液3滴，用**氢氧化钠滴定液**（0.1mol/L）滴定。每1ml 氢氧化钠滴定液（0.1mol/L）相当于18.02mg的 $C_9H_8O_4$



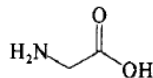
分子式： $C_9H_8O_4$

分子量：180.16

### 甘氨酸

Gan'ansuan

Glycine



$C_2H_5NO_2$  75.07

本品为氨基乙酸。按干燥品计算，含 $C_2H_5NO_2$ 不得少于99.0%。

【性状】本品为白色至类白色结晶性粉末；无臭，味甜。

本品在水中易溶，在乙醇或乙醚中几乎不溶。

【鉴别】（1）取本品与甘氨酸对照品各适量，分别加水溶

液，与0.001%的对照液比较，不得过0.001%。

重金属 取本品2.0g，加水23ml溶解，加醋酸盐缓冲液（pH3.5）2ml，依法检查（附录Ⅷ H 第一法），含重金属不得过百万分之十。

砷盐 取本品2.0g，加水23ml溶解后，加盐酸5ml，依法检查（附录Ⅷ J 第一法），应符合规定（0.0001%）。

细菌内毒素 取本品，依法检查（附录Ⅺ E），每1g甘氨酸中含内毒素的量应小于20EU（供注射用）。

【含量测定】取本品约70mg，精密称定，加无水甲酸1.5ml使溶解，加冰醋酸50ml，照电位滴定法（附录Ⅷ A），用高氯酸滴定液（0.1mol/L）滴定，并将滴定的结果用空白试验校正。每1ml高氯酸滴定液（0.1mol/L）相当于7.507mg的 $C_2H_5NO_2$ 。

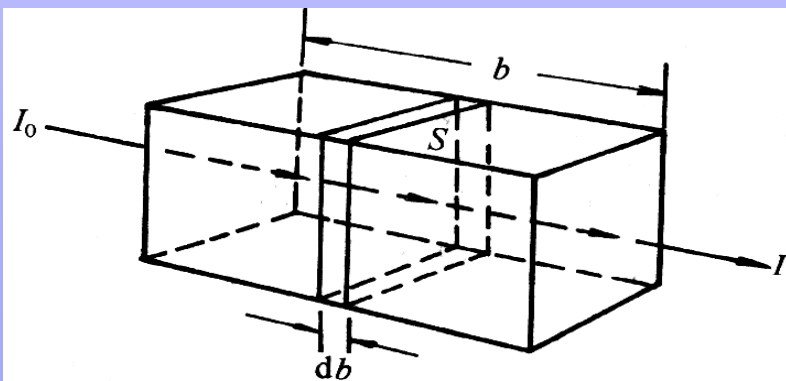
## 非水溶液酸碱滴定 (高氯酸滴定)

## 第二节 紫外-可见分光光度法定量分析

### ■ 定量依据:

#### 朗伯—比尔定律:光吸收的基本定律

当一束单色光穿过透明介质时，光的一部分将被溶液吸收，一部分透过溶液，还有一部分被器皿表面所反射。设入射光强度为  $I_0$ ，透过光强度为  $I$ ，溶液的浓度为  $c$ ，液层宽度为  $b$ ，它们之间有下列关系：**光强度的降低同入射光的强度、吸收介质的厚度、溶液的浓度成正比。**



$$A = \lg \frac{I_0}{I} = kcb$$

## 若有标准品——采用标准曲线法

- 1) **选择标准品和吸收波长的选择**: 选择待测物质的最大吸收波长, 灵敏度最高, 且可以避免其它物质的干扰。
- 2) **标准溶液的配制及标准曲线的绘制**: 以浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标, 作标准曲线。
- 3) **待测物的含量计算**: 直接将待测物质的吸光值代入标准曲线计算。如, 蛋白双缩脲法、Lowry法等。

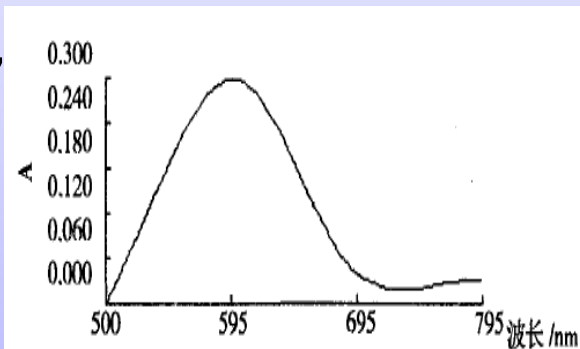
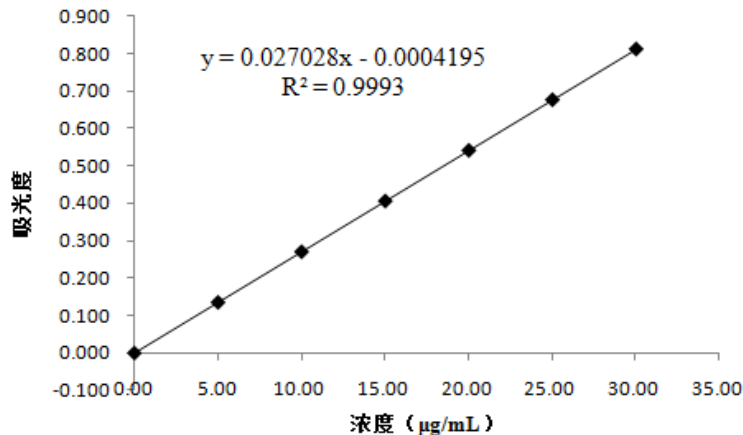
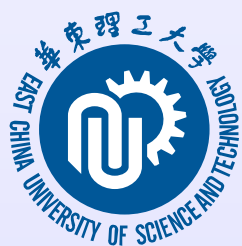


图1 血清蛋白吸收曲线

通常用 $r$ 来表示两个变量 $X$ 和 $Y$ 之间的直线相关程度,  $r$ 为 $X$ 和 $Y$ 的相关系数。 $r$ 值的绝对值越大, 两个变量之间的相关程度就越高。

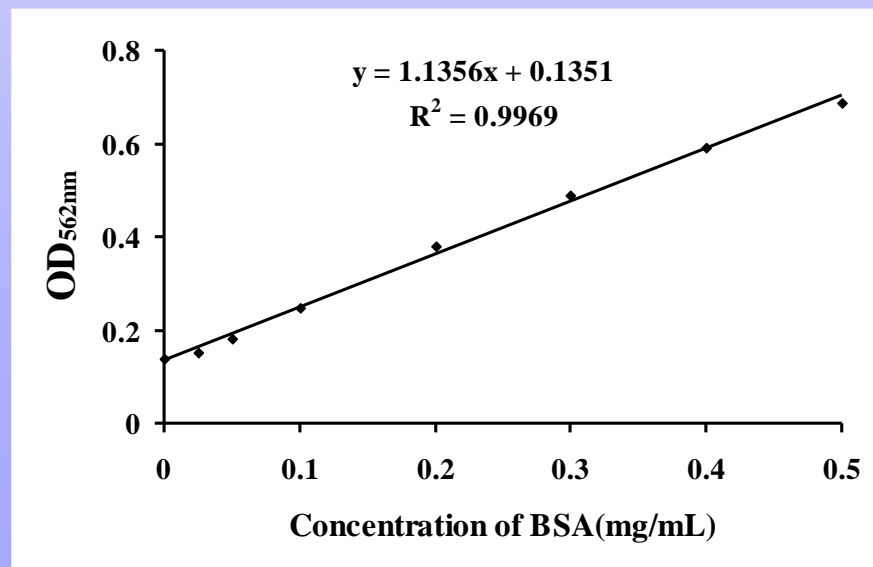
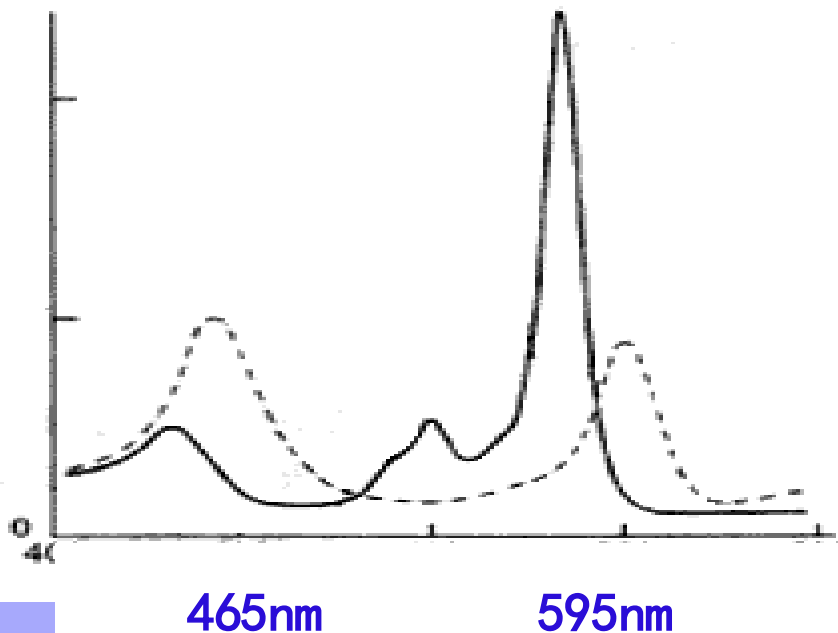


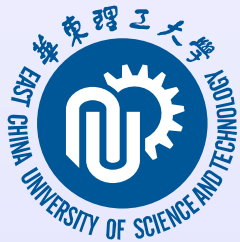




## Bradford 法测定蛋白浓度

在酸性条件下，考马斯亮蓝G-250染料与蛋白质疏水区域结合，导致该染料的最大吸收峰 $\lambda_{\max}$ 由465nm红移至595nm，且 $OD_{595nm}$ 远高于 $OD_{465nm}$ 。G-250与蛋白质形成的复合物溶液OD值与蛋白质的浓度成正比，借助分光光度计能够快速准确的测定蛋白质浓度，灵敏度可达 $1\mu g$ 。





### 若无标准品——直接利用吸光系数来计算

√**摩尔吸光系数(Molar Absorbance coefficient):** express as  $E$

The absorbance of a 1M solution in a 1 cm cell.

是指物质在1mol/L的浓度下，比色杯厚度为1cm时的吸收值。该值可以从光谱数据表中查到。

√**比吸光系数; 百分吸光系数(Percent Absorbance coefficient):**用

$E^{1\%}$

$^{1\text{cm}}$

The absorbance of a 1% w/v(1g/100ml) solution in a 1 cm cell

是指100ml溶液中含被测物质1g，液层厚度(比色杯厚度)为1cm时的吸光度值

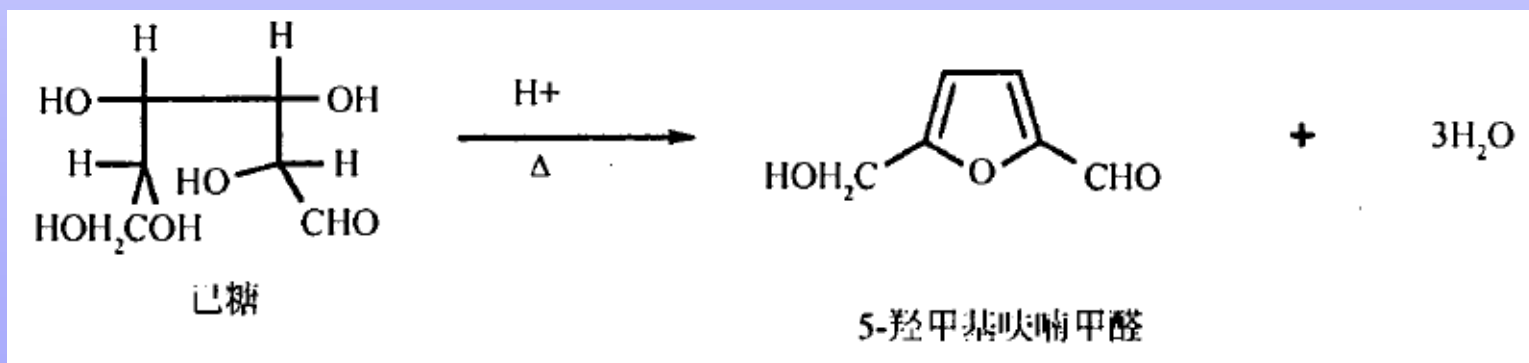
# 紫外-可见光光度法在定量检测中应用实例



## 紫外光谱法测定蜂蜜中总糖的含量

### ■ 原理

蜂蜜中的葡萄糖，果糖及多糖，在浓盐酸的作用下发生脱水反应生成羟甲基糠醛在波长**286nm**处有最大吸收，反应机理：



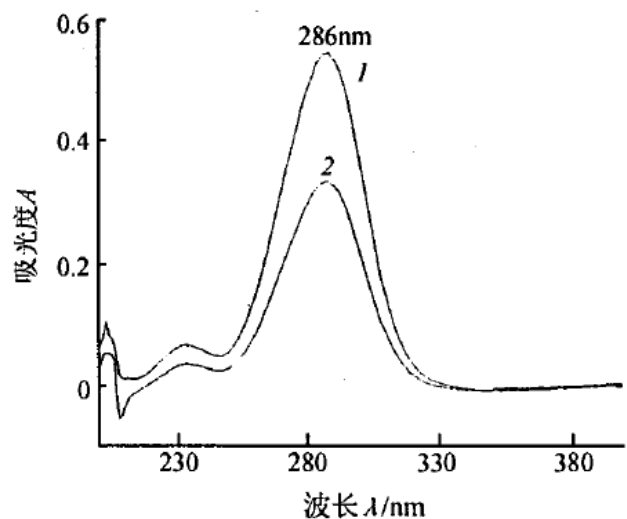


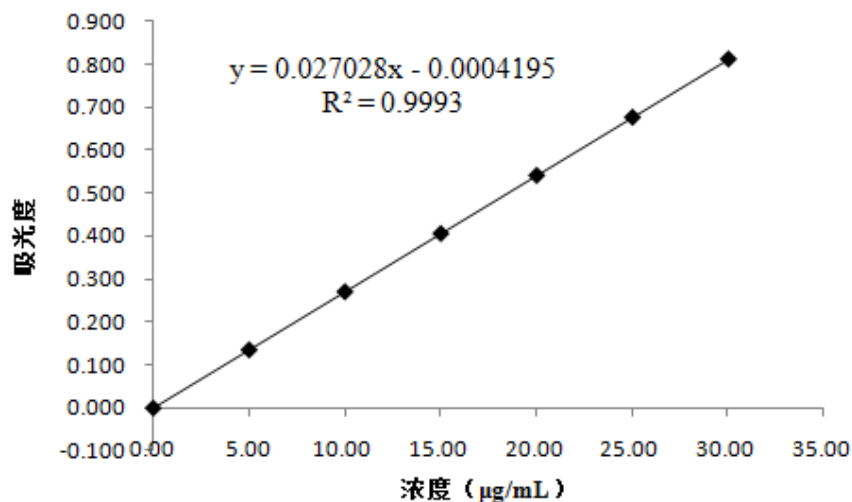
图1 最大吸收波长的确定  
1——标准品；2——样品。

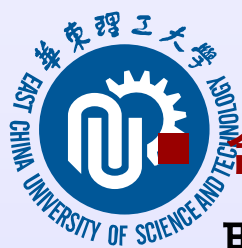
## ■ 标准品和最大吸收波长确定：

在具塞试管中加入适量的0.1 mg/mL 的**果糖**标准溶液，加入3mL 浓盐酸，用蒸馏水定容到10mL。在沸水中加热 8min，取出用流水冷却。在波长200-400nm处扫描，取适量待测液按上述方法扫描，确定其最大吸收波长为**286.0nm**。

## ■ 标准曲线的制备：

精密量取标准品溶液，配制成浓度分别为0、5、10、15、20、25、30  $\mu\text{g/mL}$  的果糖溶液，以空白为参比，于286nm处测定吸光度，以浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为  $x$ ，吸光度为  $y$ ，回归方程为：  
 $y = 0.027028x - 0.0004195$ ， $R^2 = 0.9993$ ，显示在0-30.0  $\mu\text{g/mL}$  的范围内，果糖的浓度和吸光度呈良好的线性关系。



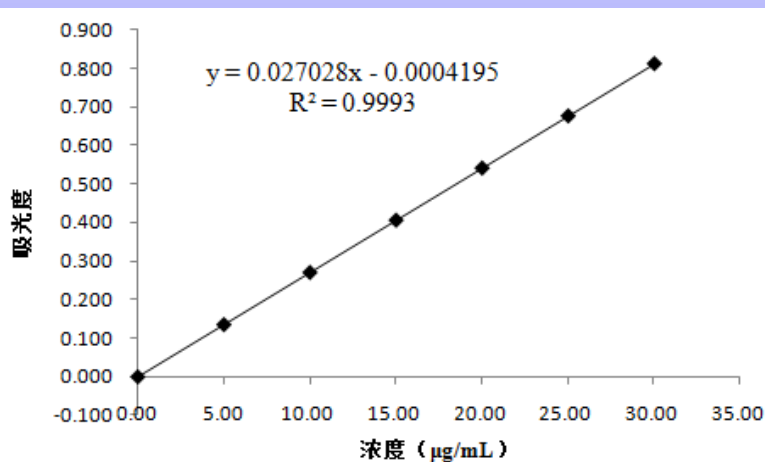


## 含量测定

取制备的5批样品，以空白为参比，在波长286nm处测定吸光度，并将其代入校准曲线回归方程分别计算出测试样品中总糖的浓度，经换算蜂蜜中总糖的平均含量为41.97%，RSD为3.16%。

表 1 样品含量测定

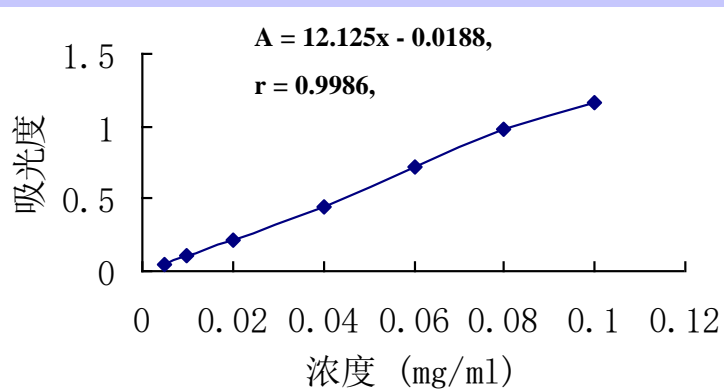
测定次数	吸光度(A)	浓度(mg/mL)	总糖含量(%)	平均值(%)	RSD(%)
1	0.470	0.0123	42.26	41.97	3.16
2	0.449	0.0117	40.30		
3	0.470	0.0123	42.26		
4	0.489	0.0128	44.02		
5	0.465	0.0121	41.79		



## 多糖含量测定常用方法：

### 苯酚—硫酸法(Duboi S方法)：

多糖在硫酸作用下水解成单糖，并迅速脱水生成糠醛衍生物，与苯酚反应生成有色化合物，再用分光光度法测定其多糖含量。常以**葡萄糖**为标准品。



1) **标准品和测定波长的选择：**选择待测物质的最大吸收波长，这时灵敏度最高，且可以避免其它物质的干扰。**485nm.**

2) **标准溶液的配制及标准曲线的绘制：**以浓度为横坐标，吸收度为纵坐标，来绘制一条标准曲线。

3) **待测物的含量计算：**直接将待测物质的吸光值代入标准曲线计算。



## ■ 标准品和测定波长的选择

取1mL标准蛋白质（**血清蛋白, BSA**）溶液，加入考马斯亮蓝G-250溶液5mL，放置10min，于500~800nm波长范围内扫描，结果蛋白质—考马斯亮蓝G-250复合在**595nm**处有吸收峰。

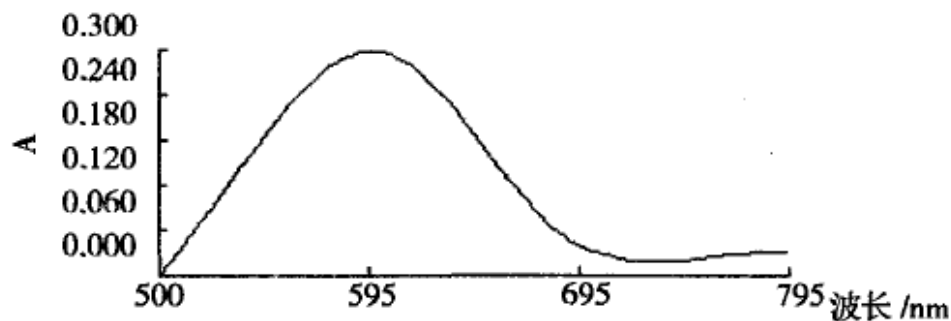


图1 血清蛋白吸收曲线



## ■ 标准曲线的制作

精密吸取不同量的标准蛋白质（**血清蛋白**）溶液于试管中，各管加水至1mL，加入考马斯亮蓝G-250溶液5mL，混匀，放置10 min，**595 nm**处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标，绘制得其线性回归方程式：

**$Y = 0.00635X + 0.15735$** ， **$r = 0.9993$** ，表明蛋白质在 **$1.67\mu\text{g/mL}$ - $16.67\mu\text{g/mL}$** 范围内线性良好。

## 样品蛋白质含量测定结果

按上述蛋白质含量测定方法，同时做三个重复，经测定吸光度值分别为0.290、0.282、0.286，计算得野木瓜多糖中蛋白质含量分别为12.57%、11.77%、12.17%，平均含量为12.17%。

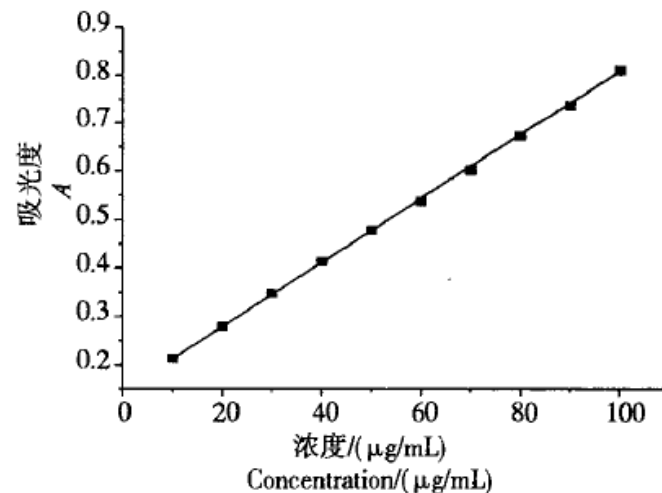
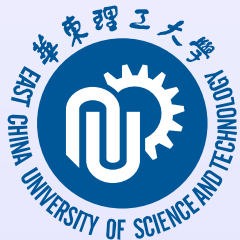


图1 蛋白质标准曲线

Fig.1 The standard curve of the proteins





## ■ 稳定性实验

取同一供试品溶液1 mL，每隔10min测定1次，观测其稳定性，结果表明在显色60 min时间内吸光度稳定性较好，结果见表1。

## ■ 精密度实验

精密吸取标准溶液(10  $\mu\text{g/mL}$ )0.5 mL进行精密度试验，连续进行6次测定其吸光度，得RSD=0.58%，小于5%，表明精密度好，结果见表2

表 1 稳定性实验结果

Table 1 The result of stability experimentation

时间 Time/min	10	20	30	40	50	60
吸光度 A	0.278	0.282	0.279	0.275	0.273	0.272

表 2 精密度实验结果

Table 2 The result of precision experimentation

样品号 Sample number	1	2	3	4	5	6	RSD/%
吸光度 A	0.542	0.547	0.546	0.550	0.551	0.543	0.58



## ■ 重复性实验

精密吸取来自同一批原料的试样，按样品测定方法，分别测定其吸光度，检验该测定方法的重现性，得 $RSD=2.37\%$ ，小于5%，表明重复性较好，结果见表3。

## ■ 回收率实验

精密吸取已配制的 $1\text{mg/mL}$ 供试品溶液 $0.5\text{mL}$ ，分别加入 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3$ 、 $0.4$ 、 $0.5\text{mL}$ 的蛋白质标准溶液，按样品测定方法，分别测定其吸光度，计算回收率，结果见表4

表 3 重现性实验结果

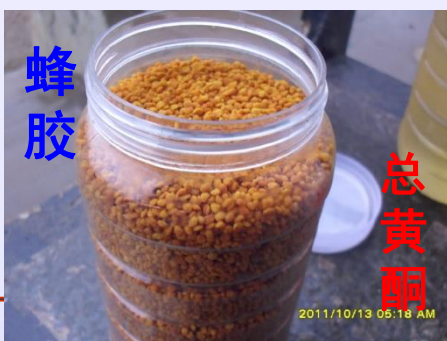
Table 3 The result of reproducibility experimentation

样品号 Sample number	1	2	3	4	5	平均	RSD/%
吸光度 A	0.219	0.221	0.226	0.229	0.216	0.222	2.37

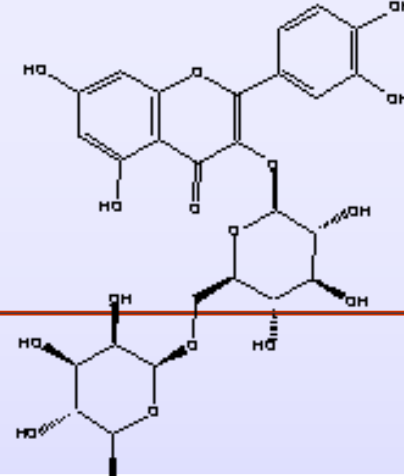
表 4 回收率实验结果

Table 4 The result of recovery rate experimentation

样品含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得总量/ $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均 /%	RSD/%
Sample content/ $\mu\text{g}$	Addition/ $\mu\text{g}$	Detected value/ $\mu\text{g}$	Recovery rate/%	Average value/%	
10.261	10	20.146	98.85	100.99	2.01
10.261	20	31.073	104.06		
10.261	30	40.615	101.18		
10.261	40	50.762	101.25		
10.261	50	60.078	99.63		

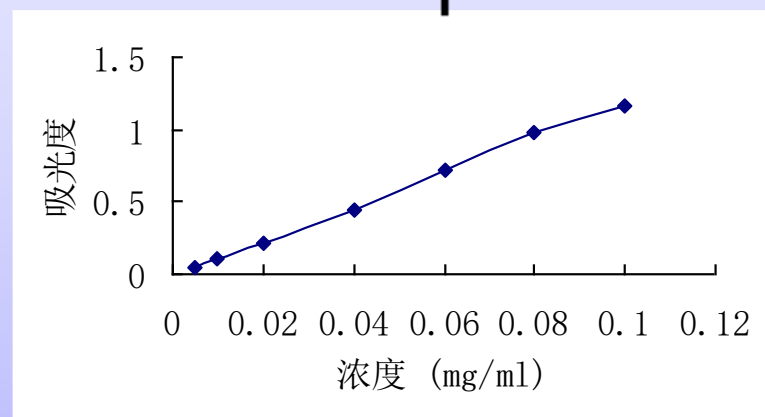


## 蜂胶中总黄酮的含量测定



### 以芦丁为标准品

分别量取标准溶液0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 于10 ml 容量瓶中，并补加75%乙醇至5 ml。加入5%  $\text{NaNO}_2$  溶液0.3 ml，摇匀，放置6 min 后，加入 5%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  溶液0.3 ml，摇匀，静置 6 min; 加4%  $\text{NaOH}$  溶液4 ml，加水稀释至刻度，摇匀，静置15 min 后，于**510 nm** 波长处测量吸光度。



**$A = 12.125x - 0.0188, r = 0.9986,$**   
**线性范围为0.005~0.1 mg/ml**

产地	样品	样品重 (g)	吸光度	黄酮含量 (%)
河南	提纯蜂胶	1.010	0.345	29.71
浙江	No. 223252	0.960	0.070	7.63
	No. 923827	1.058	0.219	18.54

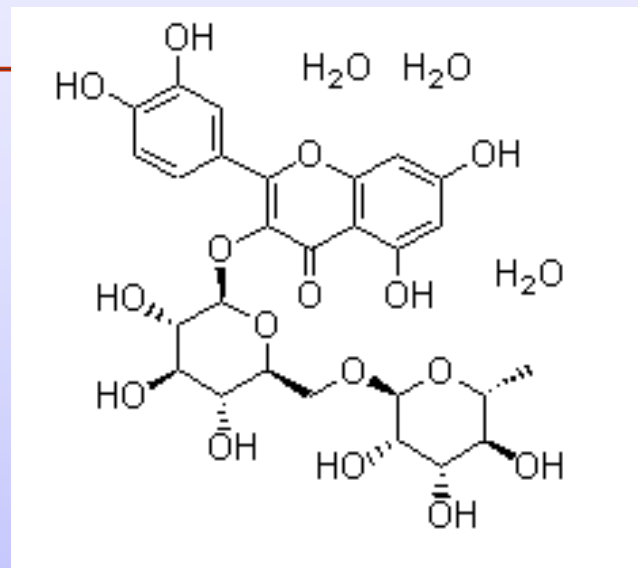
# 槐花总黄酮的测定

芦丁 ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ )

分子量: 610.51

**对照品溶液的制备** 精密称取在 $120^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的芦丁对照品50mg, 置25ml量瓶中, 加甲醇适量, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密量取10ml, 置100ml量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得 (每1ml中含无水芦丁0.2mg)。

**标准曲线的制备** 精密量取对照品溶液1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml与6ml, 分别置25ml量瓶中, 各加水至6.0ml, 加5%亚硝酸钠溶液1ml, 混匀, 放置6分钟, 加10%硝酸铝溶液1ml, 摇匀, 放置6分钟, 加氢氧化钠试液10ml, 再加水至刻度, 摇匀, 放置15分钟以相应试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法, 在500nm波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。



**测定法** 取本品粗粉约1g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加乙醚适量, 加热回流至提取液无色, 放冷, 弃去乙醚液。再加甲醇90ml, 加热回流至提取液无色, 转移至100ml量瓶中, 用甲醇少量洗涤容器, 洗液并入同一量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密量取10ml, 置100ml量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。精密量取3ml, 置25ml量瓶中, 照标准曲线制备项下的方法, 自“加水至6.0ml”起, 依法测定吸光度, 从标准曲线上读出供试品溶液中含无水芦丁的重量 ( $\mu\text{g}$ ), 计算, 即得。

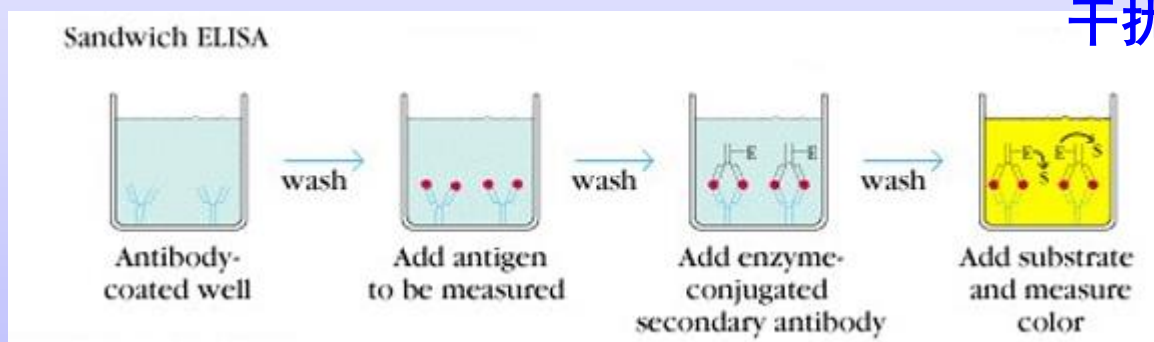


## Sandwich ELISA

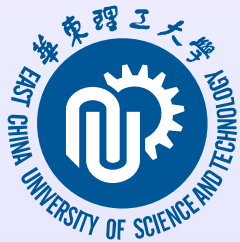
### 细胞因子（IL-1）的检测

#### ■ ELISA法检测细胞因子IL-1含量的原理

白细胞介素IL  
肿瘤坏死因子TNF  
干扰素IFN .....



采用**双抗体夹心法**测定标本中小鼠白细胞介素1 (IL-1)。用纯化的IL-1 抗体包被微孔板，制成**固相抗体**，往包被单抗的微孔中依次加入IL-1，再与HRP 标记的IL-1 抗体结合，形成**抗体-抗原-酶标抗体复合物**，洗涤后加底物TMB **显色**。TMB 在HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和IL-1 呈正相关。用酶标仪在450nm 波长下测定吸光度，通过标准曲线计算样品IL-1浓度。



## ■ 松树前花青素对小鼠巨噬细胞Raw264. 7分泌IL-1的影响

RAW264. 7细胞悬浮液,  $5 \times 10^5$ 个/mL, 接种于96孔细胞培养板, 100  $\mu$  L/孔

↓  
37°C培养4 h

↓  
添加不同浓度药物 ( $\mu$  g/mL)  
同时设置空白对照组及阳性对照 (LPS 5  $\mu$  g/ml)

↓  
培养24h

↓  
无菌管收集细胞培养上清液, 离心20 min (3000转/min)

## ■ 测定方法



IL-1 抗体包被微  
孔板  
(固相抗体)

IL-1标准品 / 待测  
样品

50  $\mu$ L/孔

37°C  
孵育30  
min

洗涤

加酶标抗  
体  
50  $\mu$ L/孔

加终止液  
50  $\mu$ L/孔

加显色剂A  
50  $\mu$ L/孔

37°C  
孵育30 min

洗涤

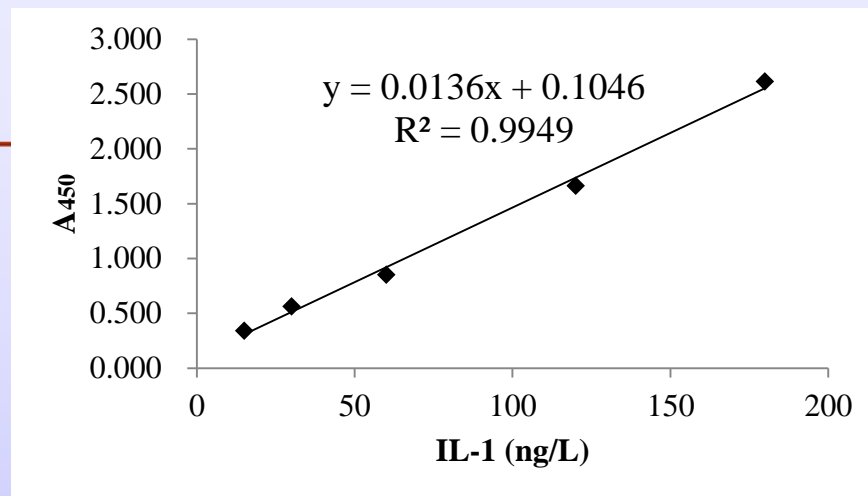
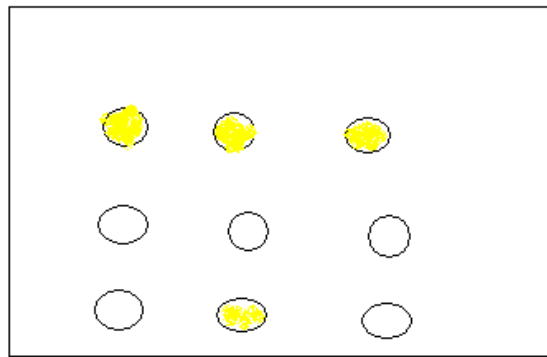
37°C  
避光显色15min

加显色剂B  
50  $\mu$ L/孔

酶标仪450nm  
测OD值





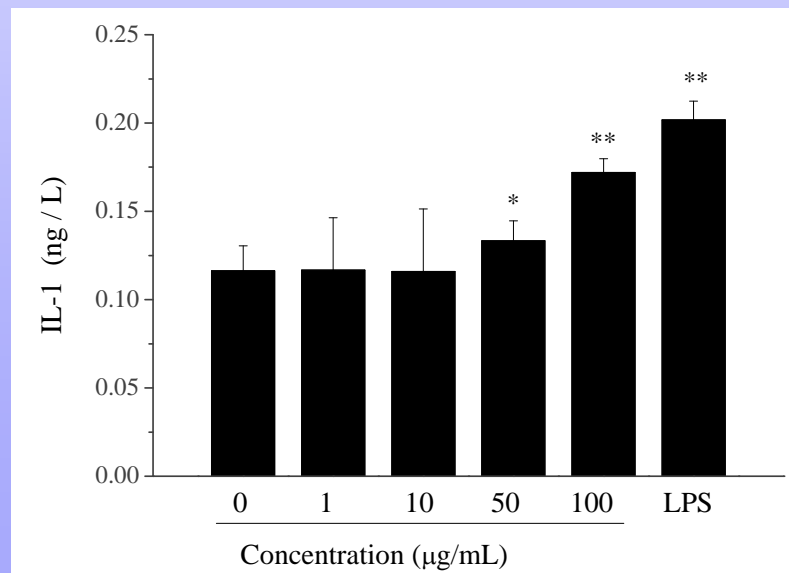


## ■ IL-1标准曲线及样品含量计算

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。

根据样品的OD 值和标准曲线的直线回归方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

## 药物对小鼠巨噬细胞Raw264.7分泌IL-1的影响





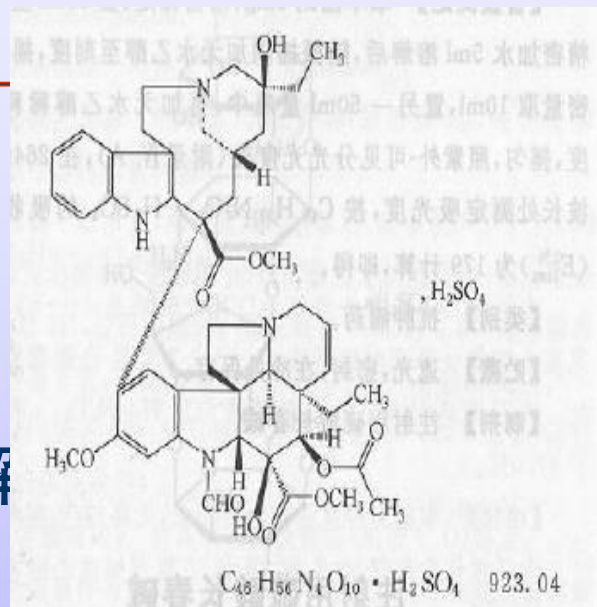
# 硫酸长春新碱

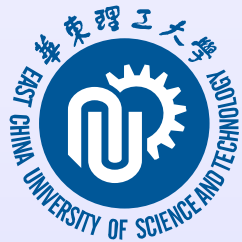
【类别】抗肿瘤药。

【性状】本品为白色或类白色的结晶性粉末；  
臭；有引湿性；遇光或热易变黄。

本品在水中易溶，在甲醇或三氯甲烷中溶解  
在乙醇中微溶。

【含量测定】取本品适量，精密称定，加甲醇溶  
解并定量稀释制成每1ml中约含20μg的溶液，  
照紫外-可见分光光度法，在297nm的波长处  
测定吸光度，按 $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$ 的吸  
收系数( $E_{1\%}^{1cm}$ )为177计算，即得。

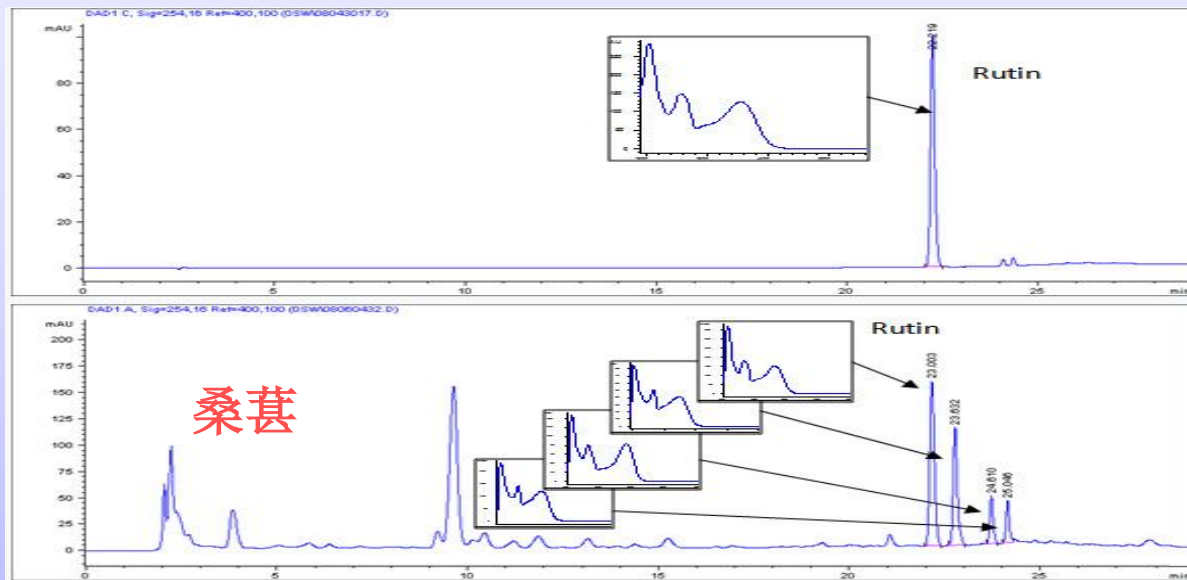




## 第三节 色谱法定量分析

- 高效液相色谱法 (HPLC)
- 气相色谱法 (GC)
- 薄层色谱法 (TLC)

# 高效液相色谱法和气相色谱法 (HPLC\GC)



色谱法不仅是一种**分离**方法，而且还是一种**定性**、**定量**检测方法。

**定性分析**：通常用与标准品比较保留值进行定性，即保留值相同**可能**是同样的组分；保留值不同，**肯定**不是同样的组分。

## HPLC\GC色谱定量分析的基本原理

定量分析是在定性分析的基础上，需要纯物质作为标准样品。

色谱的定量是相对的定量方法，即：由已知的标准样品推算出被测样品的量。

## HPLC/GC法定量的依据:

被测组分的量 (W) 与响应值 (A) (峰高或峰面积) 成正比,  $W=f \times A$ 。

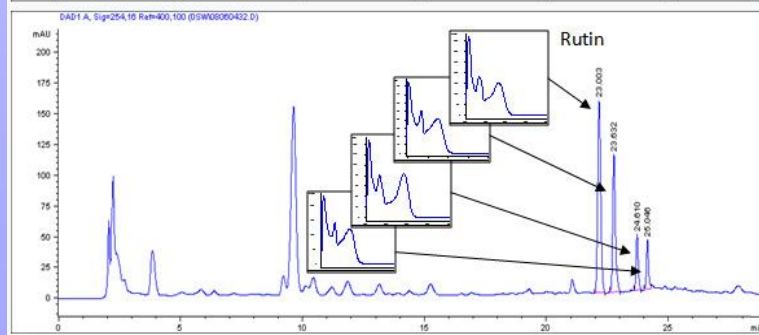
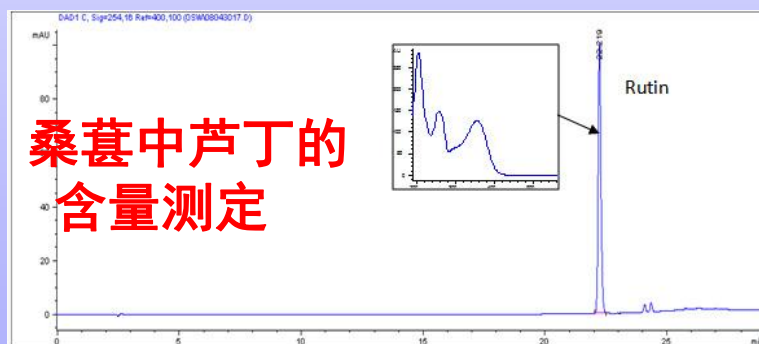
定量校正因子 (f)

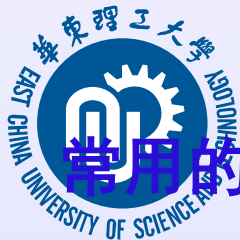
由已知标准样品的量 and 其响应值可以求得定量校正因子。

测定未知组分的响应值, 通过定量校正因子即可求得该组分的量。

$$\frac{W_s}{W_R} = \frac{A_s}{A_R}$$

$$W_s = A_s \cdot W_R / A_R$$



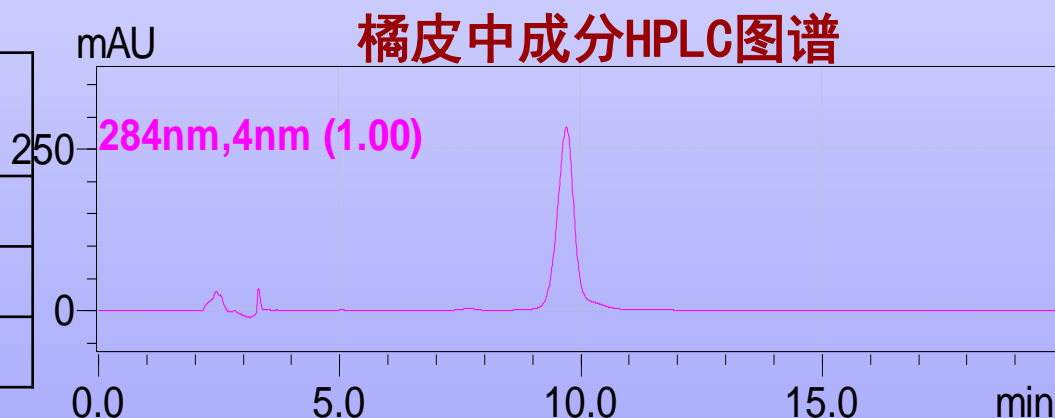


## 常用的定量方法：面积归一化法、外标法和内标法。

**面积归一化法**：即为计算各峰面积及其总和，并求出占总峰面积的百分率。

优点是简便、准确，当操作条件变化时对结果影响较小，宜于分析多组分试样中各组分的含量。**但是试样中所有组分必须全部出峰**，因此，此法在使用中受到一定限制。

Peak#	RT	Area	Area%
1	2.091	873	0.0114
2	3.345	185879	2.4355
3	9.861	7445184	97.5530

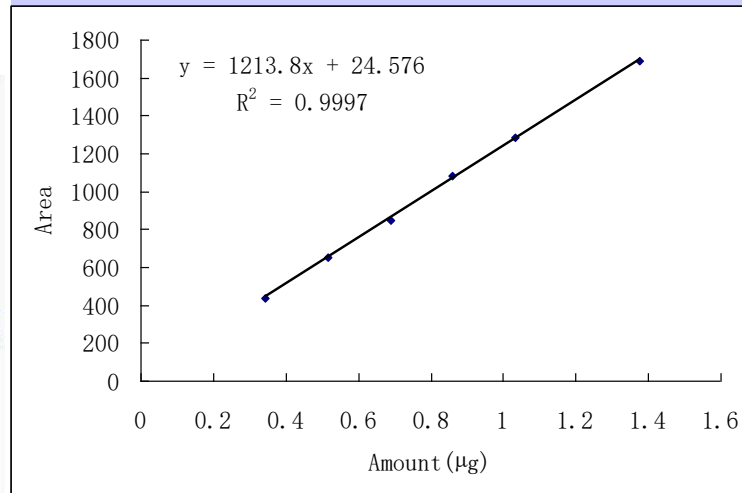
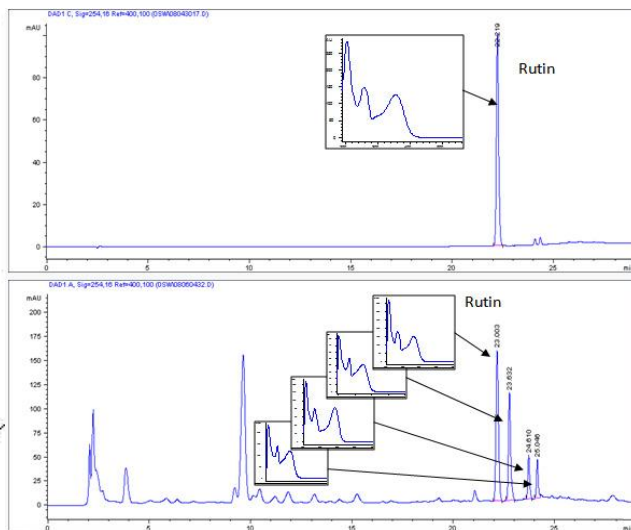
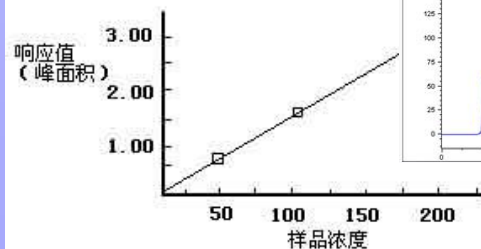


**外标法**在液相色谱中用的最多。

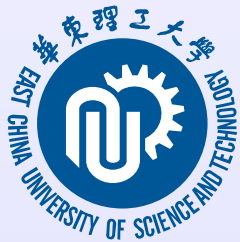
**内标法**准确但是麻烦，在标准方法中用的最多，而且在气相色谱中用的最多。

# External standard method(外标法)

- 标准溶液的配制：**用被测化合物的纯品作为标准样品，配制成一系列的已知浓度的标样（常5个浓度）。注入色谱柱的到其响应值（峰面积）。
- 标准曲线的绘制：**在一定范围内，标样的浓度与响应值之间存在较好的线性关系，即 $W=f \times A$ ，制成标准曲线。
- 待测组分含量的计算：**在完全相同的实验条件下，注入未知样品，得到欲测组分的响应值。根据已知的系数 $f$ ，即可求出欲测组分的浓度。



通常用  $r$  来表示两个变量  $X$  和  $Y$  之间的直线相关程度， $r$  为  $X$  和  $Y$  的相关系数。 $r$  值的绝对值越大，两个变量之间的相关程度就越高。



## ■ 外标法的优点：

操作、计算简单，是一种常用的定量方法。

无需各组分都被检出、洗脱。

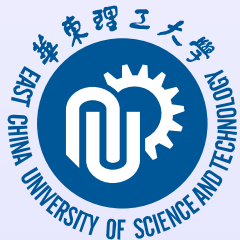
需要标样。

标样及未知样品的测定条件要一致。

进样体积要准确。

## 外标法缺点：

实验条件要求高，如检测器的灵敏度，流速、流动相组成等不能发生变化；每次进样体积要有好的重复性。

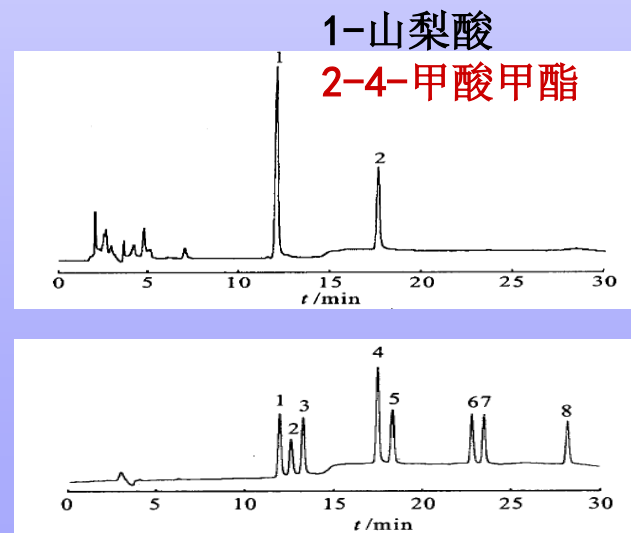
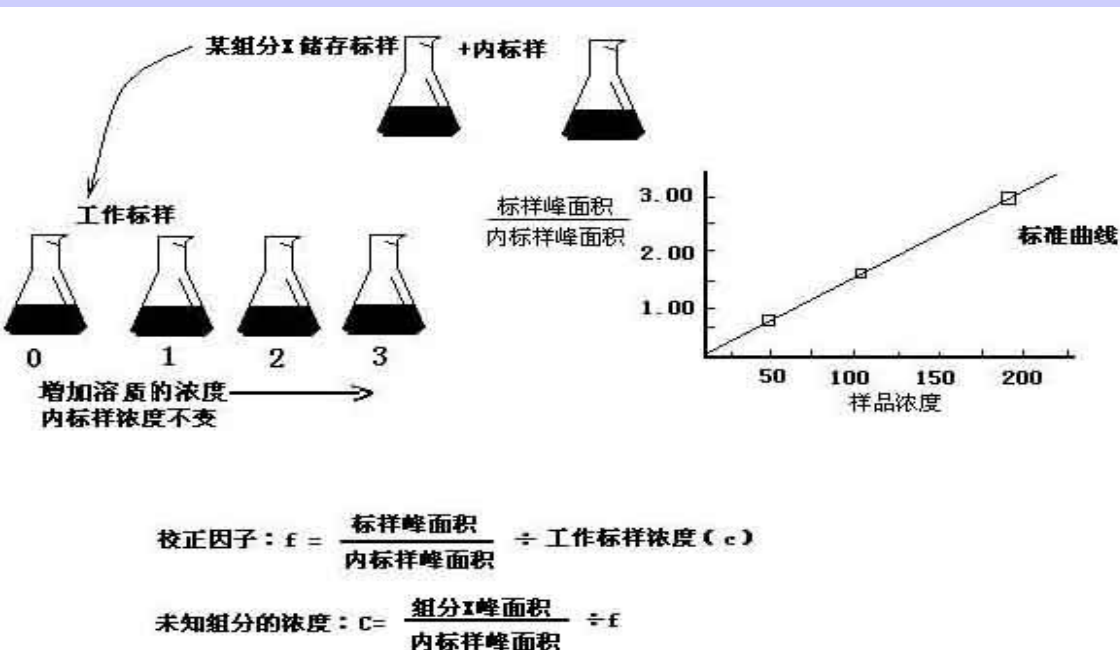


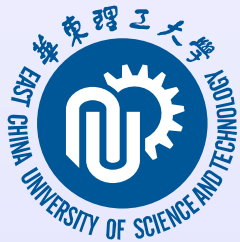
# 内标法

- 在分析测定样品中某组分含量时，加入一种**内标物质**以校准和消除出于操作条件的波动而对分析结果产生的影响，以提高分析结果的准确度。
- **内标物质**：使用内标法时，在样品中加入一定量的标准物质，它可被色谱柱所分离，又不受试样中其它组分峰的干扰，只要测定内标物和待测组分的峰面积相对响应值，即可求出待测组分在样品中的百分含量。
- **内标物质的选择**：采用内标法定量时，内标物的选择是一项十分重要的工作。理想地说：
  - 1) 内标物应当是一个能得到纯样的已知化合物，这样它能以准确、已知的量加到样品中去，
  - 2) 它应当和被分析的样品组分有基本相同或尽可能一致的物理化学性质(如化学结构、极性、挥发度及在溶剂中的溶解度等)、色谱行为和响应特征，最好是被分析物质的一个同系物。
  - 3) 在色谱分析条件下，内标物必须能与样品中各组分充分分离。



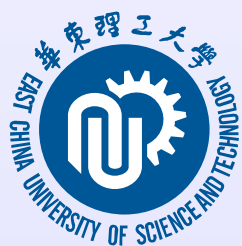
- 1、标准溶液的配制：**将已知量的内标样（浓度不变）加入标准样品（常5个浓度），制成混合标样，并配制一系列的已知浓度的工作标样。
- 2、标准曲线的绘制：**混合标样注入色谱柱，以（标样峰面积/内标样峰面积）为响应值。做重量比和面积比的关系曲线，此曲线即为标准曲线。  
即  $W = f \times A$ ,
- 3、待测组分的含量计算：**将已知量的内标样加入未知样品，注入色谱柱，得到欲测组分的响应值。  
根据已知的系数  $f$ ，即可求出欲测组分的浓度。





## ■ 内标法的特点：

- ★ 操作过程中样品和内标是混合在一起注入色谱柱的，因此只要混合溶液中被测组分与内标的量的比值恒定，上样体积的变化不会影响影响定量结果。
- ★ 内标法抵消了上样体积，乃至流动相、检测器的影响，因此比外标法精确。

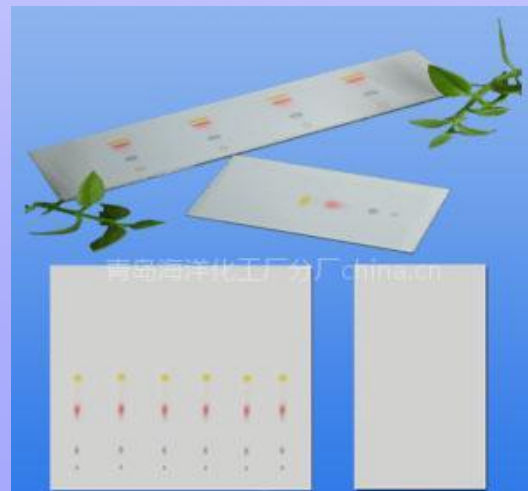


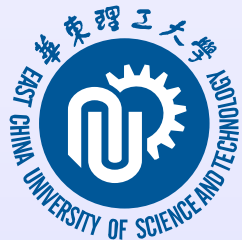
# 薄层色谱法

薄层色谱法根据展开后测定情况，又可分为薄层色谱-分光光度法和薄层扫描法。

## 1、 薄层色谱-分光光度法

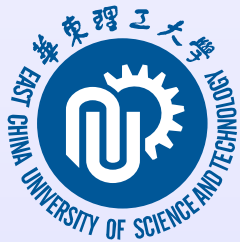
样品经薄层层析展开后，刮取与对照品斑点相应位置上的供试品条斑，用适当溶剂洗脱，收集洗脱液，采用分光光度法定量的一种方法。





### 例 防己中粉防己碱的含量测定（国家药典委员会，2000）

精密称取本品粉末（过三号筛）适量，置索氏提取器中，加浓氨试液适量，放置1 h，加氯仿适量，加热回流约6 h，提取液回收氯仿后，放冷，残渣用无水乙醇溶解制成供试品溶液。另取粉防己碱对照品适量，加氯仿制成对照品溶液。吸取供试品溶液、对照品溶液点于同一硅胶G薄层板上使成条状，以氯仿-丙酮-甲醇-浓氨试液（20：3：2：0.1）为展开剂，展开，取出，待溶剂挥尽，立即置紫外灯（365 nm）下照射数十分钟后，刮取与对照品斑点相应位置上的供试品条斑，同时刮取同一薄层板上与对照品条斑等面积的硅胶G作空白，置两个相同的色谱柱（0.7 cm×10 cm）中，用甲醇分次洗脱，洗脱液收集于蒸发皿中，蒸干，冷却，精密加0.1 mol/L盐酸溶液使残渣完全溶解，照分光光度法，在280 nm的波长处测定吸光度。按粉防己碱（C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>）的吸收系数（E）



## 2、薄层扫描法

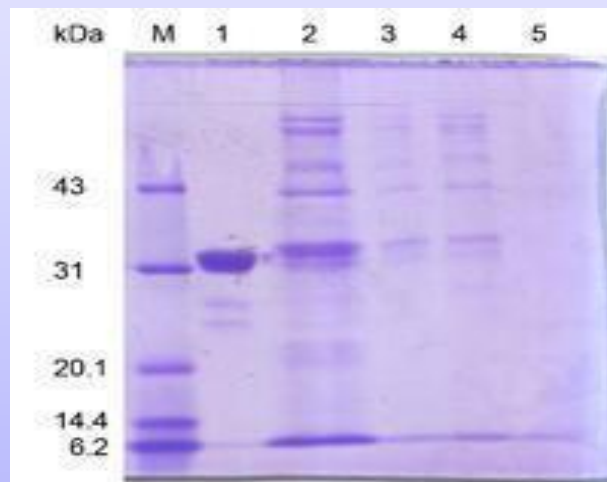
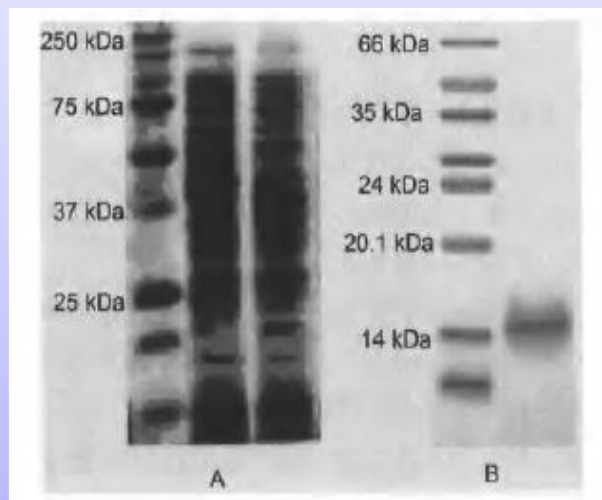
在薄层色谱板上，通过薄层扫描仪直接测定有效成分的光吸收度或荧光强度，计算出待测成分的含量的一种方法。此法较薄层层析-分光光度法简便、灵敏、稳定性好。

**例 两面针中两面针碱的含量测定**（国家药典委员会，2000）

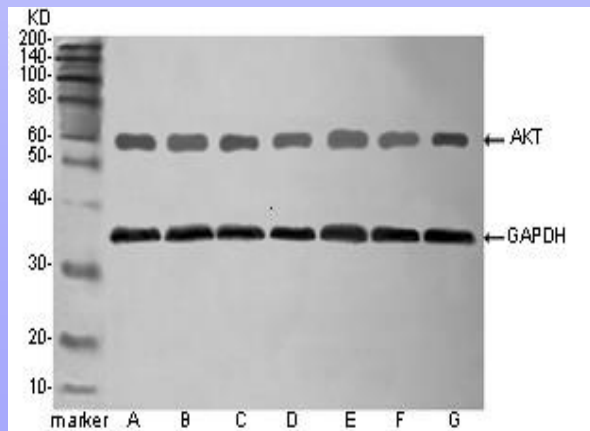
精密称取本品粗粉约适量，置索氏提取器中，加甲醇加热回流提取至回流液无色。回收甲醇，残渣用甲醇溶解作为供试品溶液。另精密称取氯化两面针碱对照品适量，加甲醇制成对照品溶液。精密吸取供试品溶液、对照品溶液，分别交叉点于同一硅胶G薄层板上，以苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-浓氨试液（20：5：3：1：0.12）为展开剂，展开，取出，晾干，置紫外灯（365 nm）下检视。于波长 $\lambda_S = 300 \text{ nm}$ ， $\lambda_R = 210 \text{ nm}$ 处进行扫描，测量供试品吸收度积分值与对照品吸收度积分值，计算，即得。

## 第四节 常用的电泳定量法

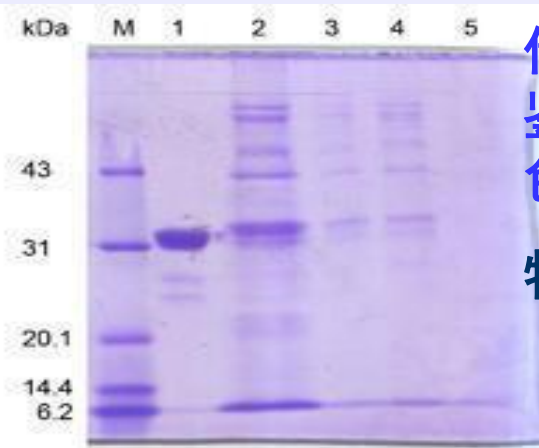
在电泳胶板上，通过凝胶成像扫描仪直接测定目标条带的光密度，计算出待测成分的含量的一种方法。



面积归一法



与内参蛋白光密度比值半定量



传统的电泳技术  
鉴别蛋白质（显色）

特异性低！



# Typical Western-blot Procedure

**Gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

（蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离）



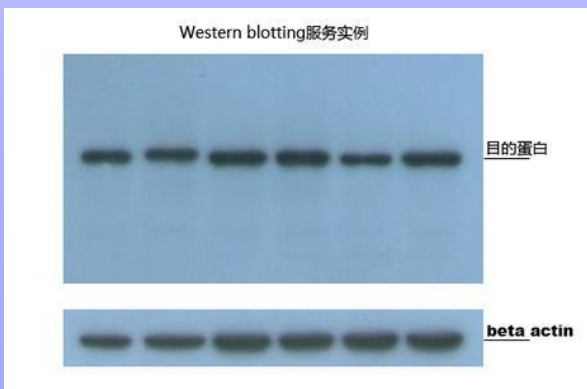
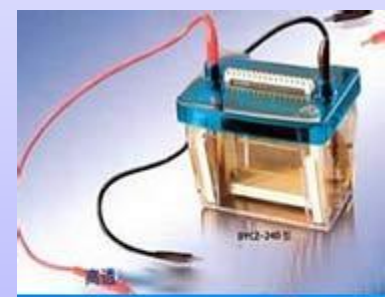
**Transfer and Blocking**

（转膜和封闭）



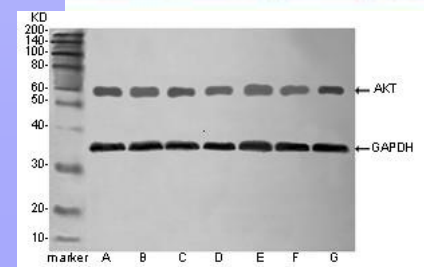
**Immunological Detection**

免疫学检测（酶免疫定位）



内参（肌动蛋白）

甘油醛-3-磷酸脱氢酶





# 问题

Western blot定量分析时，为啥设置内参？

BEL-7402  
/ 5-FU  
耐药株

4 $\mu$ M  
DMC

8 $\mu$ M  
DMC

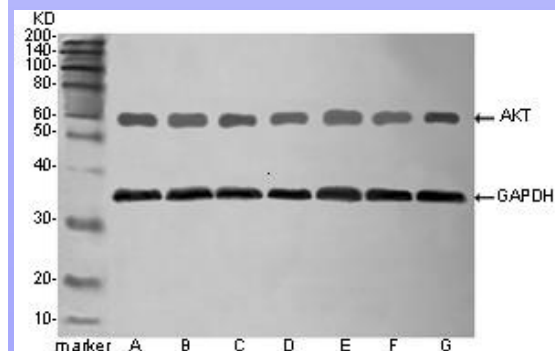
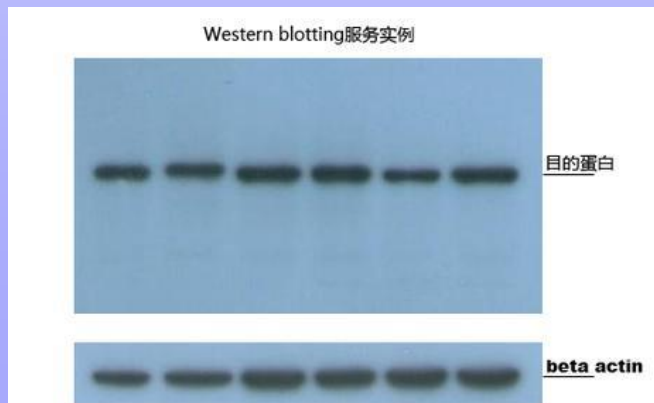
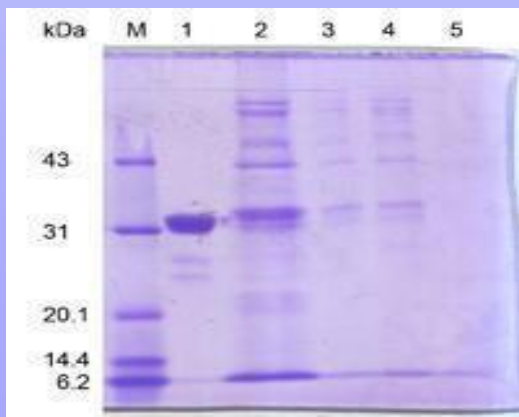
16 $\mu$ M  
DMC

BEL-7402  
敏感株

MRP1

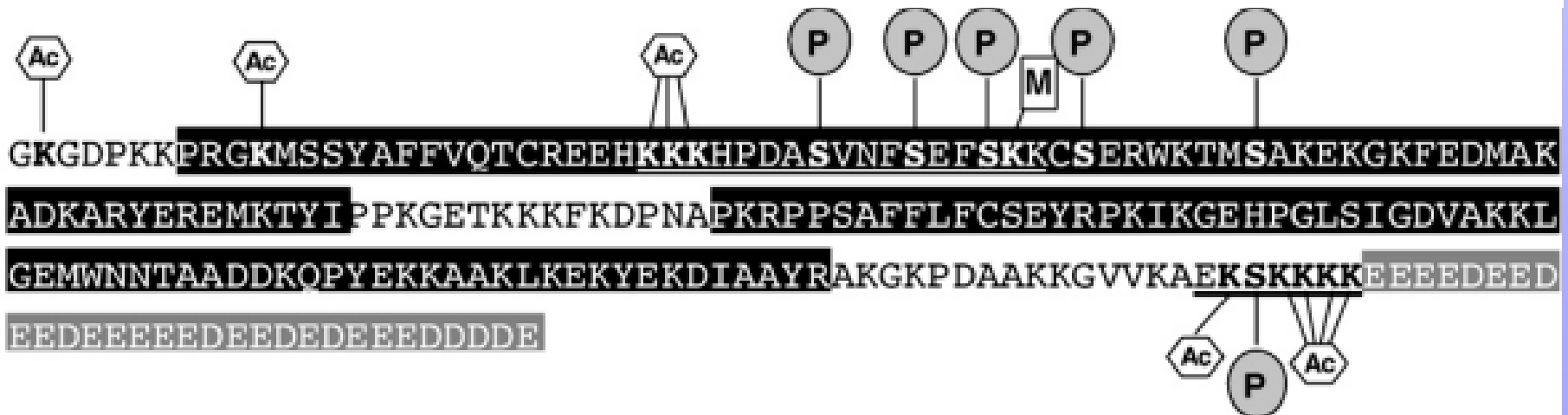
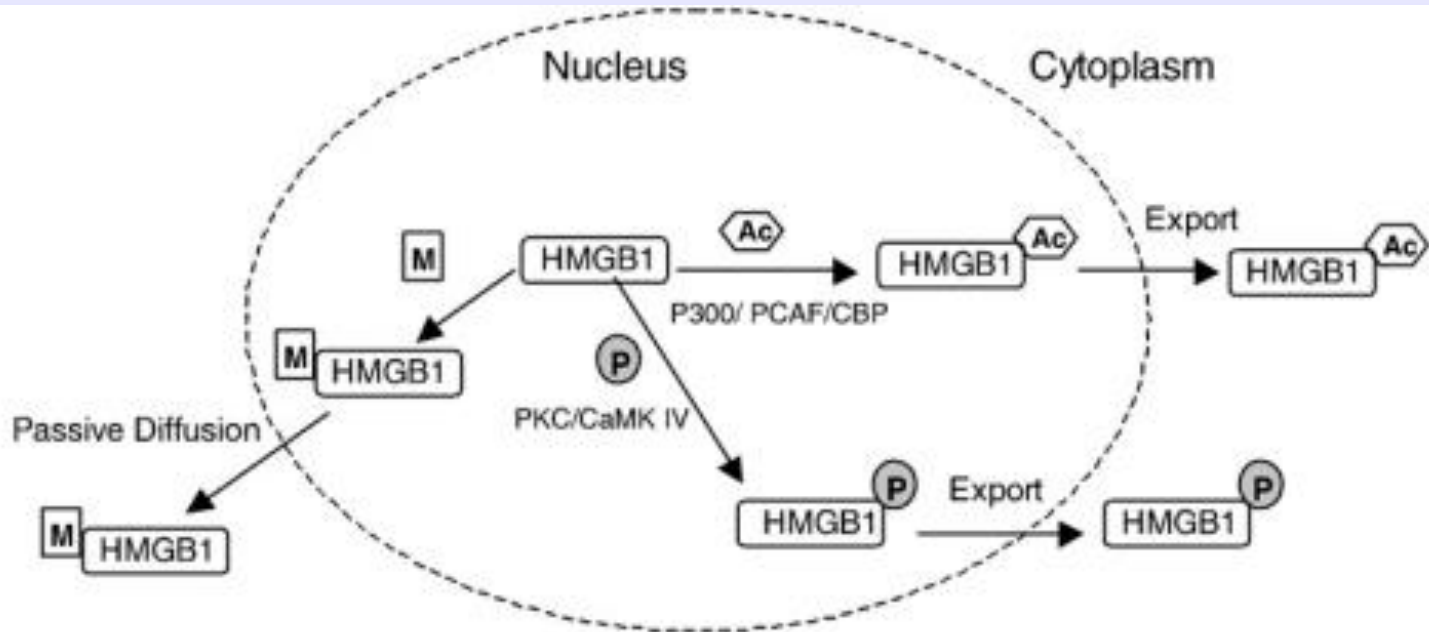


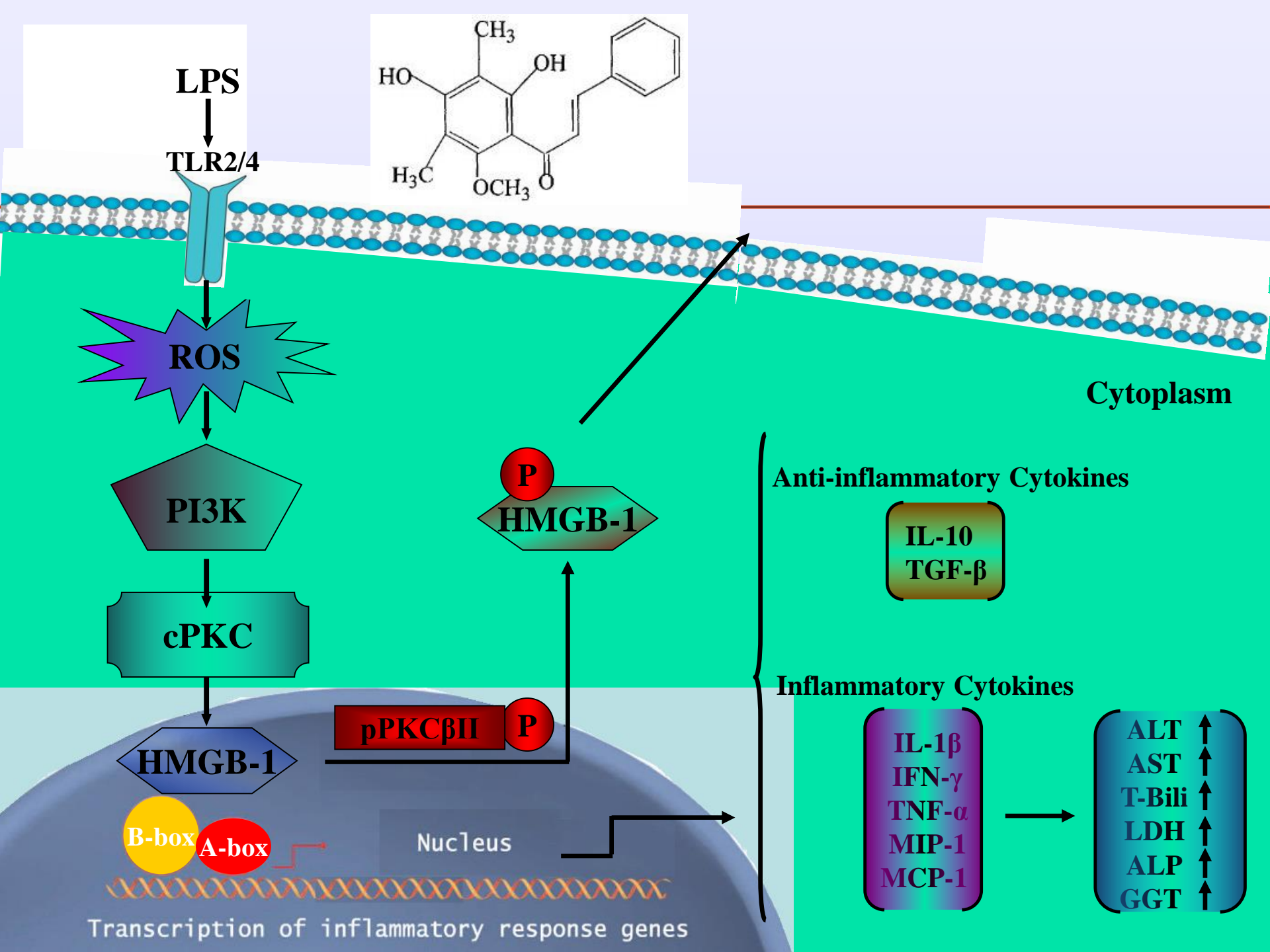
$\beta$ -actin



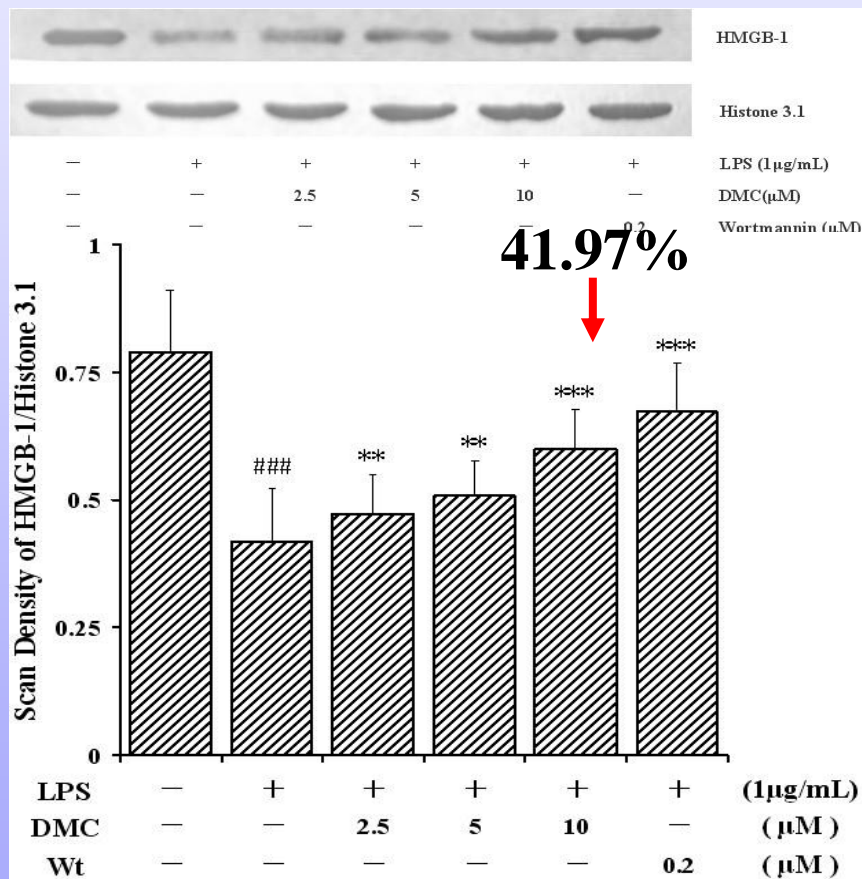


# 核蛋白HMGB-1及其信号途径



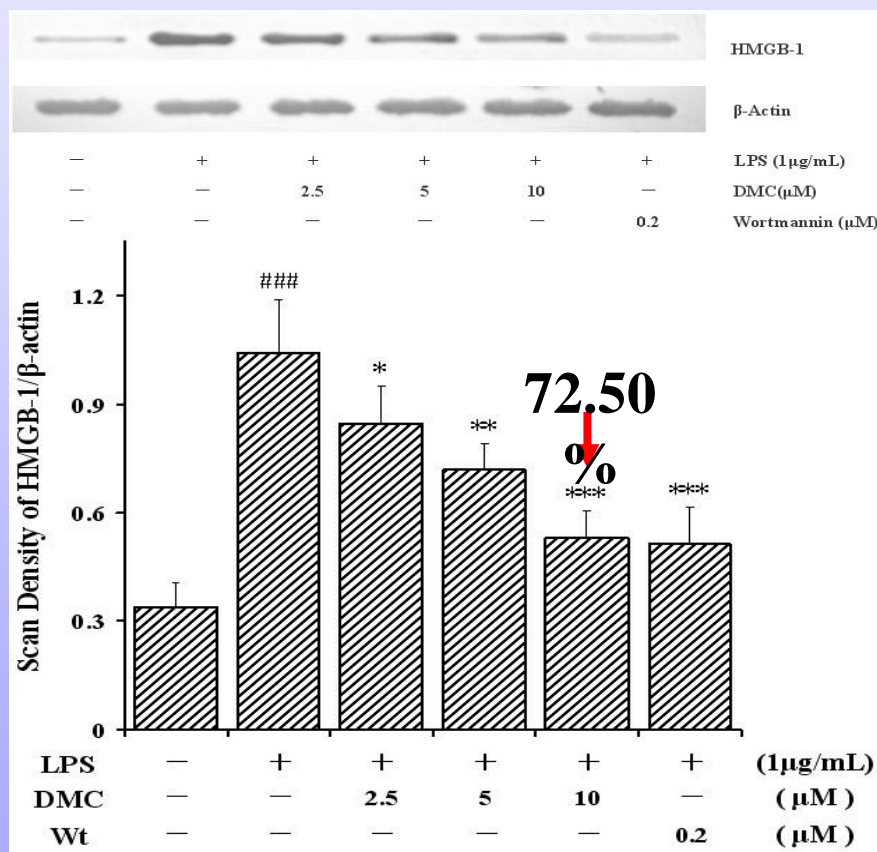


# DMC对细胞核中HMGB-1的影响



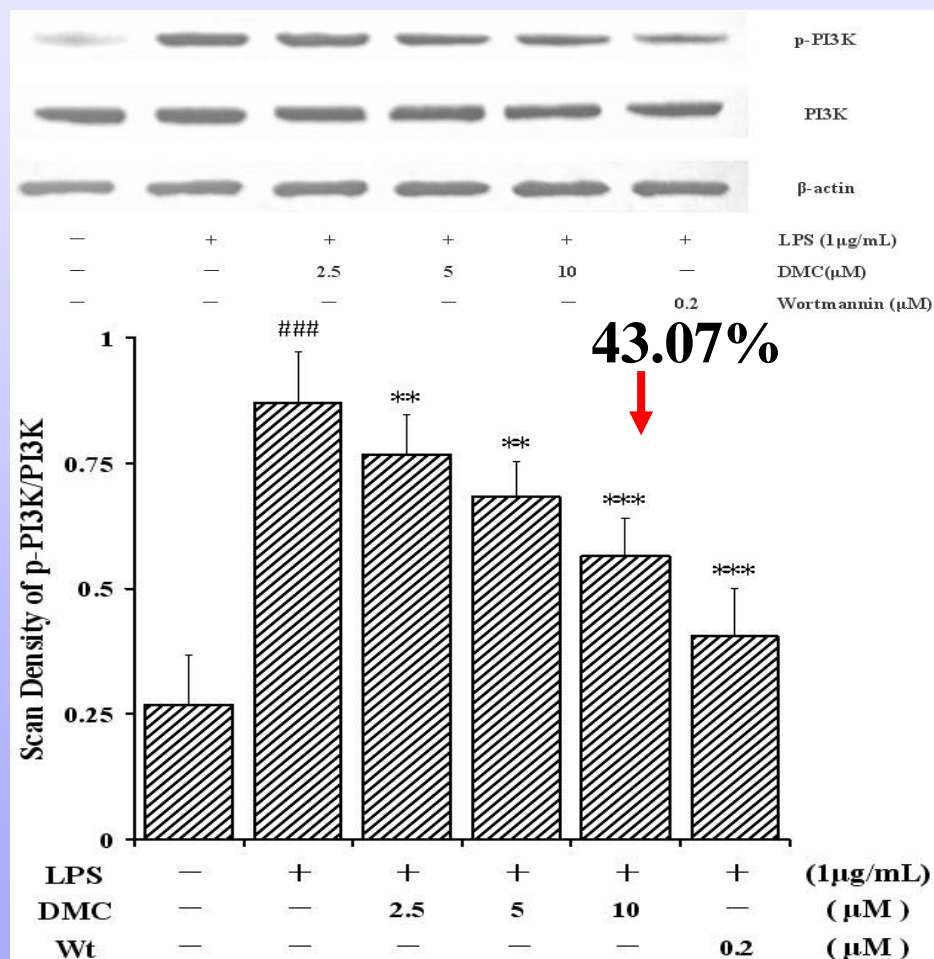
DMC具有抑制KupfferCell细胞核中HMGB-1向细胞质中转移的作用

# DMC对细胞质中HMGB-1的影响



DMC具有抑制Kupffer Cell细胞质中HMGB-1表达的作用

# DMC对细胞质中PI3K/p-PI3K的影响



DMC具有抑制Kupffer Cell细胞质中PI3K磷酸化的作用