

## 研究型仪器分析综合实验课程的案例与实践

吴倩\*, 吕远霞, 郭紫旋, 赵治皓, 张志敏, 卢红梅

中南大学化学化工学院, 长沙 410083

**摘要:** 本文设计了一个以科学研究为背景, 结合多种仪器分析方法的综合仪器分析实验。此实验以代谢组学为背景, 由气相色谱-质谱与液相色谱-质谱联合表征血浆中小分子。一个实验掌握三种分析仪器的原理和操作, 解决课程缺乏知识关联性的问题。通过仪器结构的深度讲解和开放实验参数设置的方式提高实验探索性, 调动学生主观能动性。

**关键词:** 仪器分析实验课; 研究型课程; 色谱-质谱联用; 代谢组学; 血浆

**中图分类号:** G64; O6

## A Case Study and Practice of Research-Oriented Comprehensive Instrumental Analysis Laboratory Courses

Qian Wu\*, Yuanxia Lv, Zixuan Guo, Zhihao Zhao, Zhimin Zhang, Hongmei Lu

College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China.

**Abstract:** This study presents a research-oriented comprehensive instrumental analysis laboratory course designed within a scientific research context. We developed an integrated experiment combining gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for metabolomic profiling of plasma small molecules. This approach enables students to master the principles and operational techniques of three analytical instruments (GC, LC, and MS) through a single experiment, effectively addressing the issue of knowledge fragmentation in traditional courses. By incorporating detailed instrument structure explanations and open experimental parameter settings, we significantly enhanced the course's exploratory nature and actively engaged students' initiative in learning.

**Key Words:** Instrumental analysis laboratory class; Research-oriented courses; Chromatography coupled with mass spectrometry; Metabolomics; Blood plasma

仪器分析是使用特殊的仪器通过测量物质的物理化学性质得到样品中物质的定性定量信息以及时间、空间分布信息的一门学科, 是应用化学、化学工程以及生物医药等专业的重要基础课程。通常在理论课程的同时会开设仪器分析实验课程, 辅助学生理解仪器分析理论知识、掌握仪器分析实践操作技能、拓展仪器分析相关能力<sup>[1-3]</sup>。但是, 多年来仪器分析实验课程的开设一直都面临着几大难题。首先是由于分析仪器大多实现软件化、智能化操作, 使得大部分实验内容设计难以真正涉及分析仪器的结构和原理, 实验过程中傻瓜式的按钮操作即可得到结果, 学生在实验过程中缺乏主观能动性<sup>[3,4]</sup>。其次是仪器分析课程涉及的分析仪器种类多、原理复杂, 而大部分仪器分析实验课在有限的时间内只能完成一种仪器分析方法的实验, 缺乏不同方法之间、不同仪器之间知识原理的关联

收稿: 2024-11-19; 录用: 2025-01-20; 网络发表: 2025-04-18

\*通讯作者, Email: qianwu@csu.edu.cn

基金资助: 湖南省教学改革研究项目(HNJG-20230117); 国家自然科学基金面上项目(22474156, 22074159); 国家自然科学基金青年项目(21804142); 湖南省自然科学基金优秀项目(2022JJ20054)

性, 导致学生难以融会贯通所学知识<sup>[5]</sup>。再次, 大部分仪器分析实验课程都固定了仪器参数和条件, 使得仪器分析实验过程的技术难度降低, 从而使学生在实验过程中缺乏目的性和探索欲<sup>[6]</sup>。

因此, 本文以色谱与质谱分析为例, 以生物医药领域的疾病代谢组学研究为背景和导向, 设计了一个研究型的仪器分析综合实验<sup>[7,8]</sup>。参考实验室前期研究成果<sup>[9,10]</sup>, 开设液相色谱-质谱和气相色谱-质谱联合分析表征血浆中小分子的实验。实验涉及复杂样品的前处理、色谱-质谱联用仪的内部结构的了解与检测方法的建立、样品的检测及多维复杂数据的处理, 最终得到复杂血浆样品中非靶代谢物的定性定量信息。实验过程涉及一个目标明确的完整研究过程, 且融会贯通了三种分析仪器, 并在流程中设立开放性实验条件供学生探索, 极大提高了仪器分析实验的知识连贯性、学生的主观能动性和探索欲。

## 1 实验背景介绍

血浆是人体中一种重要的体液, 含有大量反映人体生理状态和疾病状态的内源性物质或反映摄入营养及药物代谢过程的外源性物质。所以, 全面的检测血浆中各个小分子的含量和结构将系统地反映生命体的生命过程及疾病、治疗发生发展机理, 为临床疾病诊断、病理学研究、药物开发提供最重要的信息<sup>[7]</sup>。色谱分析由于其强大高效的分离能力被认为是复杂样品多组分同时分析的金标准方法。但是光依靠色谱得不到物质的具体分子结构信息, 而质谱可以快速得到物质分子以及分子碎片的精确质量, 提供物质结构的本质信息。因此近年来色谱-质谱联用技术的广泛发展很好地解决了这个问题<sup>[7,8]</sup>。

血浆内含有的内源性物质, 如氨基酸、糖类、核苷酸类、脂质类等, 都具有很高的极性和沸点, 更适合于液相色谱分析。但气相色谱-质谱作为一项发展更为成熟的技术, 其色谱分离效率和峰容量以及质谱谱库成熟程度均高于液相色谱。所以, 本实验采用液相色谱-质谱与气相色谱-质谱对血浆中小分子进行联合表征, 尽最大可能对血浆中的生物小分子进行全解析。

## 2 实验目的

- (1) 了解血浆等复杂生物样本前处理的重要性, 熟悉生物样品前处理的基本方法;
- (2) 掌握生物小分子表征的色谱-质谱联用仪的结构、原理和方法;
- (3) 了解色谱-质谱多维数据定性定量处理的方法。

## 3 实验原理讲解

### 3.1 血浆的样品前处理

样品的前处理过程通常有三个目的: 对目标物质的提取、干扰基质的除去, 以及目标物质的浓缩和增敏。血浆中含有的大量蛋白大分子会对小分子的色谱质谱检测产生干扰, 所以不管是液相色谱还是气相色谱分析, 血浆处理的第一步是溶剂提取及蛋白沉淀。对于气相色谱, 本实验采用纯甲醇进行溶剂提取(图1), 大部分有机小分子都将提取到甲醇中, 但蛋白大分子由于纯水与有机溶剂介电常数的巨大差别而无法溶解在甲醇中从而发生沉淀。对于液相色谱, 由于其可在常温下实现分离, 目标分析物无需具有可挥发性, 所以其可分离的物质极性范围更大, 对溶剂提取的极性覆盖范围要求也更高。所以, 本实验采用氯仿-甲醇-水的三相提取体系<sup>[9]</sup>(图1), 在提取过程中, 样品将分为两相, 上相为水-甲醇混合相, 下相为甲醇-氯仿混合相。上相为极性高的溶剂, 主要提取亲水性很强的代谢物, 如氨基酸、糖等, 下相为极性很低的溶剂, 主要提取疏水性很强的代谢物, 如磷脂、甘油酯、脂肪酸等。而蛋白将沉淀在两相之间。溶剂提取后, 通过离心将蛋白沉淀与溶剂完全分离, 取上清液便得到代谢物萃取液。对于气相色谱-质谱分析, 血浆中大部分代谢物的极性和沸点都较高, 无法直接在气相色谱操作温度下进行气化, 所以需要在溶剂提取后进行极性基团的衍生, 使分析物沸点降低。本实验采用的是两步衍生<sup>[11]</sup>。如式(1)和式(2)所示(X为O、S、NH等杂原子), 包括将羰基

衍生形成甲基脒以及将羟基进行硅烷化。为了引入反应试剂，在甲醇提取后要先用氮吹仪将甲醇除去之后再加入衍生试剂进行反应。反应后溶液便可以直接进行气相色谱-质谱检测。而对于液相色谱-质谱分析，由于氯仿和甲醇等溶剂均对后期液相色谱分析的流动相产生干扰，所以将上相和下相提取液分别取出后同样采用氮吹仪吹干，然后用乙腈复溶，等待检测。

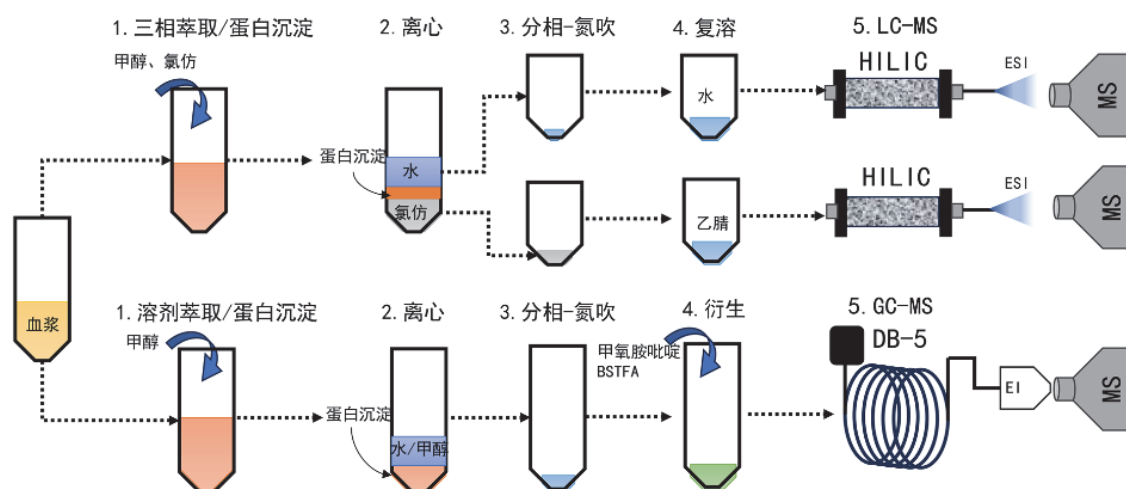
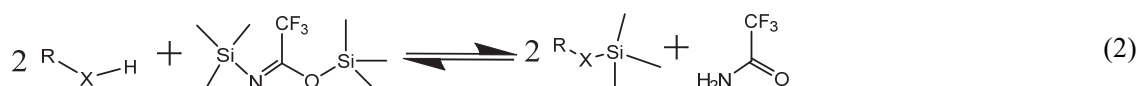
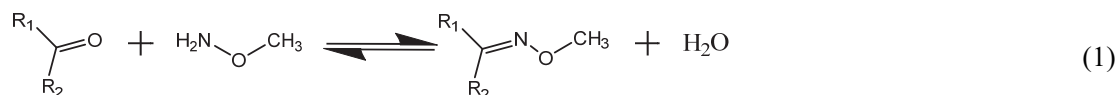


图1 实验流程与原理图

### 3.2 气相色谱-质谱及液相色谱-质谱分离分析原理

气相色谱分离采用的色谱柱为通用型的弱极性色谱柱DB-5 (图1)，固定液为聚甲基硅氧烷中掺杂有5%的苯基取代基，所以其极性很小。分析物主要以沸点高低顺序分离流出，沸点高的后流出，沸点低的先流出。为了得到更高的分离容量和更均匀的保留时间分布，本实验采用程序升温分离。程序升温的速度决定了分析物流出的速度及分离度，一般需要通过实际样品中的峰流出情况进行调整和优化。进样温度一般略高于所有物质的沸点。进样过程中，由于液体气化有很大的膨胀系数，如果直接进入色谱将产生很宽的进样谱带，所以一般液体的进样要采用分流进样，不同的分流比将影响分离度以及分析物的灵敏度。由于本实验要对血浆内所有的小分子进行非靶标全分析，所以质谱采用全扫描模式。对于气相色谱-质谱分析，质谱采用电子轰击电离源，此电离源为硬电离，进入的有机物将大部分被打碎成碎片后被后端四极杆分析器检测。因此，色谱-质谱检测将得到每一个色谱峰流出点的分析物碎片质谱图。对于液相色谱-质谱分析，由于代谢物极性分布很广，我们采用柱效与分离能力均较强的HILIC亲水作用色谱进行分离(图1)，使得高极性的氨基酸等极性小分子有较强的保留与分离能力，而疏水性极强的脂质分子保留时间不至于太长。质谱采用电喷雾电离源，是软电离源，分析物被电离后仍以分子离子形式存在，并进入后端飞行时间分析器得到精确质荷比。为了进一步得到物质的具体结构，质谱的采集程序事件(event)设置为在全扫描事件后进行自动二级质谱事件，仪器对流出组分先进行全扫描后根据全扫描信号的最高峰在下一个时间点进行此峰二级质谱检测。二级质谱通过离子阱串联飞行时间分析器来得到，母离子首先在离子阱中聚焦，再通过提高离子阱中的气压来使得母离子碎裂，然后通过弹射将碎裂得到的子离子进入后一级飞行时间质谱

进行检测。因此,液相色谱-质谱在得到分子离子峰的同时还能得到此分子离子相对应的碎片离子二级质谱图。

### 3.3 色谱-质谱多维数据处理原理及方法

色谱-质谱数据处理的目的主要有三个:一是提取色谱-质谱二维数据中的特征峰并进行峰面积积分实现相对或绝对定量;二是通过每个特征的碎片质谱图解析物质的分子结构;三是对不同样品中的所有小分子数据进行多元分析,分析得到不同样品之间的差异化学信息。其中对于第一个定量目的,在气相色谱-质谱中,我们直接通过对总离子流各个谱峰进行积分就能得到各个物质的信号峰面积,然后利用加入的已知浓度的内标物的峰面积对各物质进行相对的定量;而在液相色谱中,我们通过提取每个离子通道各个保留时间的峰面积来得到每个物质的信号,然后利用与这些特征定性结果同类的外标样的质谱峰面积来对这些特征进行单点外标法定量。对于定性,气相色谱-质谱直接依靠每个色谱峰对应物质的碎片质谱峰信息通过谱库检索进行定性;液相色谱-质谱依靠特征的一级精确质量和二级质谱进行搜库来匹配库中一级二级质谱信息一样的物质。而至于多元分析,则需要批量样品处理,不在本实验范围内。

## 4 实验内容与步骤

### 4.1 实验试剂与仪器

HPLC级甲醇、醋酸氨和氯仿来自Sigma-Aldrich公司(美国),HPLC级乙腈来自TEDIA公司(美国),纯净水来自娃哈哈公司(中国杭州)。标准样品十七烷酸( $\geq 98\%$ )和衍生试剂,甲氧胺吡啶(98%)、*N,O*-双(三甲基硅基)三氟乙酰胺(BSTFA,  $\geq 99.0\%$ )、三甲基氯化亚砷(TMCS,  $\geq 98\%$ ),均购买自Sigma-Aldrich公司(美国)。大鼠血浆样本购于鸿泉生物科技有限公司(广州)。

气相色谱柱为DB-5MS毛细管柱(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ , 美国Agilent公司),液相色谱柱为HILIC超高效液相色谱柱(2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国Waters公司)。实验使用的仪器包括台式高速冷冻离心机(VL-165R, 湖南迈克实验仪器有限公司)、氮吹仪(HSC-24A, 天津恒奥科技有限公司)、气相色谱-质谱联用仪(GC/MS-QP2010 Ultra, 日本岛津公司)、超高压液相色谱-质谱联用仪(LC-30AD UPLC-ESI-IT-TOF, 日本岛津公司)。

### 4.2 血浆样品处理

冰冻的大鼠血浆样本处理前在4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中解冻30 min,用100  $\mu\text{L}$ 的移液枪各移取100  $\mu\text{L}$ 血浆,分别置于两个1.5 mL离心管中。

#### 4.2.1 气相色谱-质谱样品前处理

(1) 溶剂提取:向血浆中加入50  $\mu\text{L}$ 内标(十七烷酸, 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),再加入300  $\mu\text{L}$ 甲醇除蛋白,涡旋15 s后在4  $^{\circ}\text{C}$ 下离心(16000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 15 min)。

(2) 浓缩:取上清液于5 mL玻璃管中氮吹干备用;剩余的蛋白沉淀作为化学废弃物,将放入生化垃圾桶中集中处理。

(3) 第一次衍生:向玻璃管中加入50  $\mu\text{L}$ 甲氧胺吡啶(1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),密封,70  $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h。

(4) 第二次衍生:向玻璃管中继续加入100  $\mu\text{L}$  BSTFA (含1% TMCS),密封,70  $^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h。

#### 4.2.2 液相色谱-质谱样品前处理

(1) 三相提取:血浆采用三相法进行萃取和蛋白质沉淀<sup>[9,12]</sup>。详细步骤为加200  $\mu\text{L}$ 氯仿和100  $\mu\text{L}$ 甲醇,涡旋5 min后在4  $^{\circ}\text{C}$ 下离心(16000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 15 min),液体将分层为上、中、下三层。

(2) 浓缩换溶剂:将上层和下层分别取入1.5 mL离心管中,用氮吹仪吹干备用。剩余的蛋白沉淀将作为废弃垃圾放入生化垃圾桶中集中处理。

(3) 复溶:上层加入50  $\mu\text{L}$ 去离子水,下层加入50  $\mu\text{L}$ 甲醇,涡旋2 min,再次离心10 min (16000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ )。分别取上清液置于进样瓶中等待进样。

### 4.3 色谱-质谱分析检测

#### 4.3.1 气相色谱-质谱检测

色谱分离采用DB-5MS毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 载气为高纯氮气, 流速为1 mL·min<sup>-1</sup>。采用分流进样模式, 分流比为10:1, 20:1或30:1(开放给学生调节优化), 进样体积为1 μL。进样口温度为280 °C, 色谱柱的初始温度为70–90 °C(开放给学生调节优化), 保持4 min, 以5–8 °C·min<sup>-1</sup>升温至270 °C(开放给学生调节优化), 保持1 min, 溶剂切除时间为6 min, 数据采集时间为6.5–30 min。离子源温度为200 °C, 接口温度为250 °C, 检测电压为0.8 kV, 在全扫描模式(30–600 *m/z*)下采集数据。色谱柱与质谱条件的设置及开放调节条件的范围均参考文献<sup>[10,11]</sup>。

#### 4.3.2 液相色谱-质谱检测

色谱分离采用超高效液相色谱柱HILIC (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 柱温40 °C, 进样量2 μL, 进样温度: 4 °C。水相B为90%纯水-10% 50 mmol·L<sup>-1</sup>醋酸铵缓冲盐(V/V)溶液, pH=4。有机相A为90%乙腈-10% 50 mmol·L<sup>-1</sup>醋酸铵缓冲盐(V/V)溶液, pH=4。流速为0.4 mL·min<sup>-1</sup>。有机相A与水相B的线性梯度洗脱设置为: 0–1 min, 100% A; 13–15min, 50%–70% A(开放给学生调节优化)。

质谱条件为: 电喷雾电离源的喷嘴电压为正离子模式3500–5000 V、负离子模式2000–3500V(开放给学生调节优化), CDL温度150–250 °C(开放给学生调节优化), 加热块温度200 °C, 雾化气体(N<sub>2</sub>)流量0.5–1.5 L·min<sup>-1</sup>(开放给学生调节优化), 干燥气体(N<sub>2</sub>)压力100 KPa, 离子阱压力为1.8 × 10<sup>-2</sup> Pa, TOF真空度1.3 × 10<sup>-4</sup> Pa。质谱在全扫描模式下进行, *m/z*范围为100–1000。离子累积时间为30–60 ms(开放给学生调节优化)。采集程序的事件(event)设置方法为在全扫描事件后增加自动二级碎片扫描事件, 得到每个时间点一级质谱中较高信号峰的二级碎片峰用于后续定性。色谱柱与质谱条件的设置及开放调节条件的范围均参考文献<sup>[9]</sup>。

### 4.4 数据处理

#### 4.4.1 特征峰提取

对于气相色谱, 使用岛津GCMSsolution分析软件对采集的原始数据进行处理。总离子流(TIC)谱图中的谱峰即为特征峰。通过提取每个特征峰的峰面积, 将得到包含样本名、保留时间、峰面积的二维矩阵。

对于液相色谱, 使用工作站软件将所有液质数据转化为mzdata格式, 再导入到MZmine软件包中进行数据预处理, 对数据进行过滤, 峰平滑, 峰对齐, 归一化。数据预处理后产生了一个包含样本名, 保留时间, *m/z*, 峰面积的特征峰矩阵。

#### 4.4.2 特征峰定性与定量

对于气相色谱, 可采用工作站内置数据库进行手动定性或自动定性, 通过与数据库质谱图进行相似度对比来匹配可能分子结构。出现质谱图后, 点击上方的“相似度检索结果”快捷键, 即可出现检索结果, 选取相似度大于90%且匹配度排名第一的物质作为定性结果。对于定量, 通过以下公式(3)进行计算未知物的含量(*C<sub>x</sub>*):

$$C_x = \frac{S_x}{S_i} \times C_i \quad (3)$$

其中, *C<sub>i</sub>*为内标物的已知浓度, *S<sub>x</sub>*和*S<sub>i</sub>*分别为未知物和内标物的积分峰面积。

对于液相色谱, 首先通过标准样品与实际样品的质荷比和保留时间对比进行部分有标准品代谢物的定性分析; 其次, 对于其他质荷比和保留时间与标准样品不同的峰可通过其一级质谱的*m/z*以及二级质谱的碎片质谱进行代谢物或有机物质谱数据库(METLIN、HMDB、LIPID MAPS和PubChem)搜库定性分析。依据TOFMS的质量精度, 搜库的质荷比允许误差可设为50 ppm。对于定量, 通过以下公式(4)进行计算未知物的含量(*C<sub>x</sub>*):

$$C_x = \frac{S_x}{S_s} \times C_s \quad (4)$$

其中, *C<sub>s</sub>*为对应种类标样的已知浓度, *S<sub>x</sub>*和*S<sub>s</sub>*分别为未知物和对应该种类标样的积分峰面积。

## 5 实验结果与分析

### 5.1 气相色谱-质谱的定性定量分析结果与讨论

图2展示了在最优的实验条件下(分流比30 : 1, 色谱柱的初始温度为70 °C, 保持4 min, 以8 °C·min<sup>-1</sup>升温至270 °C)的血浆气相色谱-质谱检测的总离子流图。从图2来看, 血浆组分在色谱分离过程中峰分布较为均匀, 说明程序升温条件很好地调节了不同沸点极性代谢物的出峰时间, 得到了最高的分辨率和最大的峰容量。通过工作站自带EI-MS的碎片质谱库搜索可得到谱峰的可能代谢物结构。从定性结果(见补充材料表S1)可以看出, 气相色谱-质谱分离检测主要可获得血浆中的三类物质的定性定量结果, 包括氨基酸、糖和脂肪酸或有机酸。这些代谢物都是质量小于500 Da的代谢物, 且均含有羧基或羟基。这说明化学衍生极大地提高了高沸点、高极性的生物小分子的挥发性。但对于较高分子量的代谢物, 如脂质, 则无法检出。

### 5.2 液相色谱-质谱的定性定量分析结果与讨论

从最优实验条件(线性梯度洗脱设置为: 0–1 min, 100% A; 13–15 min, 50% A, 质谱离子源电压正离子4500 V、负离子模式3500 V, 脱溶剂毛细管(CDL)温度200 °C, 雾化流量1.5 L·min<sup>-1</sup>, 离子累积时间60 ms)下的液相色谱-质谱的提取离子流可以发现, 通过三相液相萃取, 分离分析的代谢物覆盖范围得到了显著的提高。由图3和补充材料表S2可知, 上相水相中主要检出的是小分子量亲水性强的氨基酸, 而下相氯仿相中主要检出的是高分子量的疏水性更强的脂质。由于使用亲水作用色谱, 脂质在色谱柱上的保留时间较传统的反相色谱柱显著地缩短, 各类脂质的保留时间分布更加均匀, 分离更加快速。但由于电喷雾电离过程中对分析物极性有较高要求, 中性的代谢物(如糖类)则难以直接利用液相色谱质谱检出。

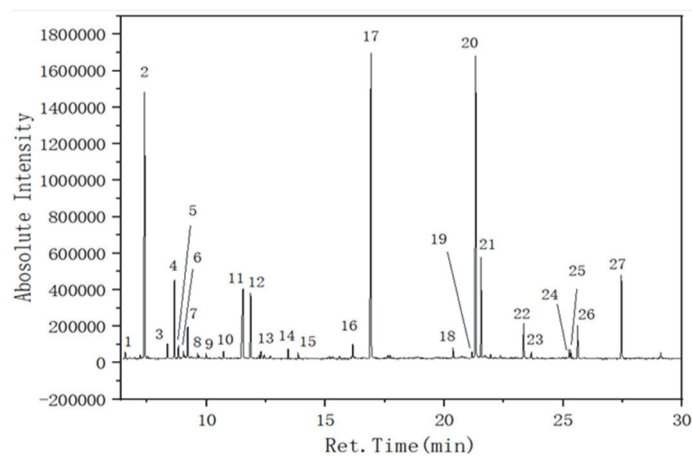


图2 气相色谱-质谱TIC色谱图

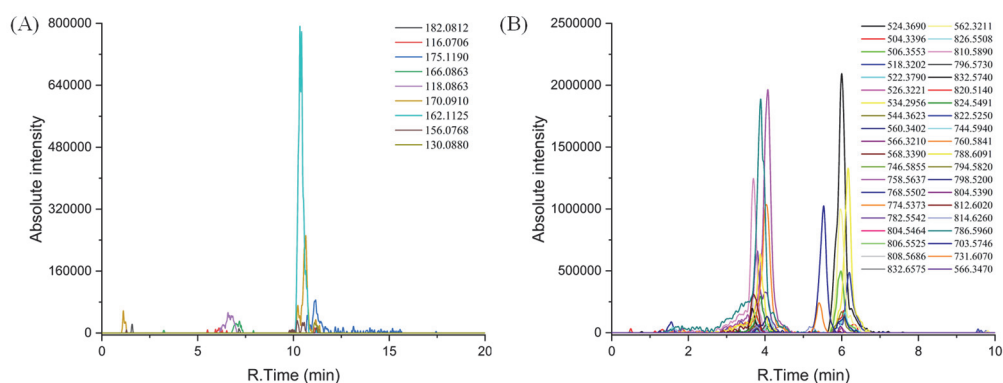


图3 血浆上层提取液(A)和下层提取液(B)的液相色谱-质谱的提取离子流色谱(EIC)图

### 5.3 气相色谱-质谱与液相色谱-质谱分析结果的对比

从两种方法对比的韦恩图(图4)中可以看出,其检测结果有很强的正交性。气相色谱-质谱主要检出的是分子量较小、极性较低的代谢物,而液相色谱-质谱主要检出的是分子量较大、极性较高的代谢物。即使两种方法均能检测出一定数量的氨基酸,但其共有氨基酸也只有2个,气相色谱检出的氨基酸分子量更小,而液相色谱检出的氨基酸分子量更大。这种正交性使两种方法的联合表征可以显著提高检测的覆盖范围。但总体来说,液相色谱-质谱在生物样品中代谢物的检测中更占优势。

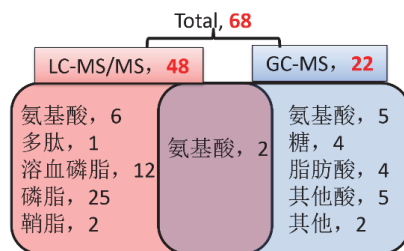


图4 两方法对比的韦恩图

## 6 研究型教学过程的探讨与建议

### 6.1 实验分组与分工设置

由于色谱-质谱属于大型仪器,一般无法实现多台仪器同时供学生使用,所以学生需要分组依次进行上样检测。考虑到实验的时长和学生的参与性,我们通常将25名左右的学生分为6组,每组4-5人,其中2人进行液相色谱-质谱检测,另2-3人进行气相色谱-质谱实验,两个实验操作同时进行。但为了让学生全面了解两种仪器,所有学生都要参与两种实验仪器的讲解以及最终数据处理过程,这样既控制了实验时间又使学生获得对实验原理和数据的全面了解。

### 6.2 实验现象的记录与思考

本实验有多个环节需要提醒学生进行现象记录和思考。(1) 前处理部分:在进行三相萃取或有机溶剂提取沉淀时,需要观察蛋白沉淀的现象以及三相体系分相的现象;(2) 色谱分离及分离前的准备过程:需要持续记录液相色谱与气相色谱的泵压变化,关注色谱过程中管路的堵塞或漏液/气的情况,同时思考随着液相色谱流动相梯度洗脱的过程,泵压为什么会发生变化。

### 6.3 实验条件的开放设置

作为研究型实验课程,实验中应尽量鼓励学生积极思考实验条件的设置与对实验结果的影响。虽然受限于本科生实验的时长(8个学时),无法对每个实验条件进行优化与考察,但可以开放一些关键性的实验条件,要求学生依据所学的色谱-质谱基本原理在合理范围内调整实验条件,预测实验结果会随条件变化而产生什么变化,再通过不同组学生设置不同条件下实验结果的差异对比来验证自己的猜想。所开放的条件包括(图5):(1) 液相色谱分离条件的调节。通过提高或降低初始流动相中A相的比例或提高或降低B相比比例随时间升高的速度来改善亲水作用色谱和疏水作用色谱的分离度。(2) 液相质谱参数的调节。通过调节电喷雾电压、电喷雾离子源温度、鞘气流大小以及离子阱累积时间来提高分析物的质谱信号大小。(3) 气相色谱分离条件的调节。通过提高或降低分流比、提高或降低色谱分离初始温度、提高或降低色谱程序升温的速度来提高色谱分离度。

### 6.4 仪器结构的讲解

在仪器结构的讲解过程中,通过实物展示让学生了解真实的色谱-质谱结构,切实感受其仪器组件的尺寸和材质,更直观地理解高温高压下色谱分离与电离等过程。可以展示实物外观与内部构造的重点配件包括(图5):(1) 液相色谱结构。以流动相流动方向介绍每一个部件的结构和功能,包括储液瓶、在线真空脱气机、高压往复泵(单向阀、柱塞、排气阀)、在线混合器、自动进样器(六通阀、

机械臂、注射泵)、柱温箱。(2) 液相质谱结构。高压喷雾针、鞘流气出口、辅助高温气化的管。(3) 气相色谱结构。以载气流动方向为路线介绍每一个部件的结构和功能,包括气瓶、稳压阀、稳流阀、气化室、分流管、毛细管柱、柱温箱、质谱入口。所有部件主要展示它们在液相色谱和气相色谱流路结构中的位置与相互连接方式,结合其外观与内部结构示意图讲解其工作原理。例如,从液相色谱模块中指出六通进样阀的位置(在线混合器与色谱柱之间),引导学生观察其结构由上部的定子、内部的转子以及下部的转轴和电机组成。在实物观测后再展示其工作原理。观察完仪器部件的结构后,在每组学生上机检测样品时至少应有一名学生在老师的示范下亲自进行一些动手操作,包括液相色谱柱或气相毛细管柱的安装、液相色谱泵的手动排气操作、电喷雾离子源的清洗。

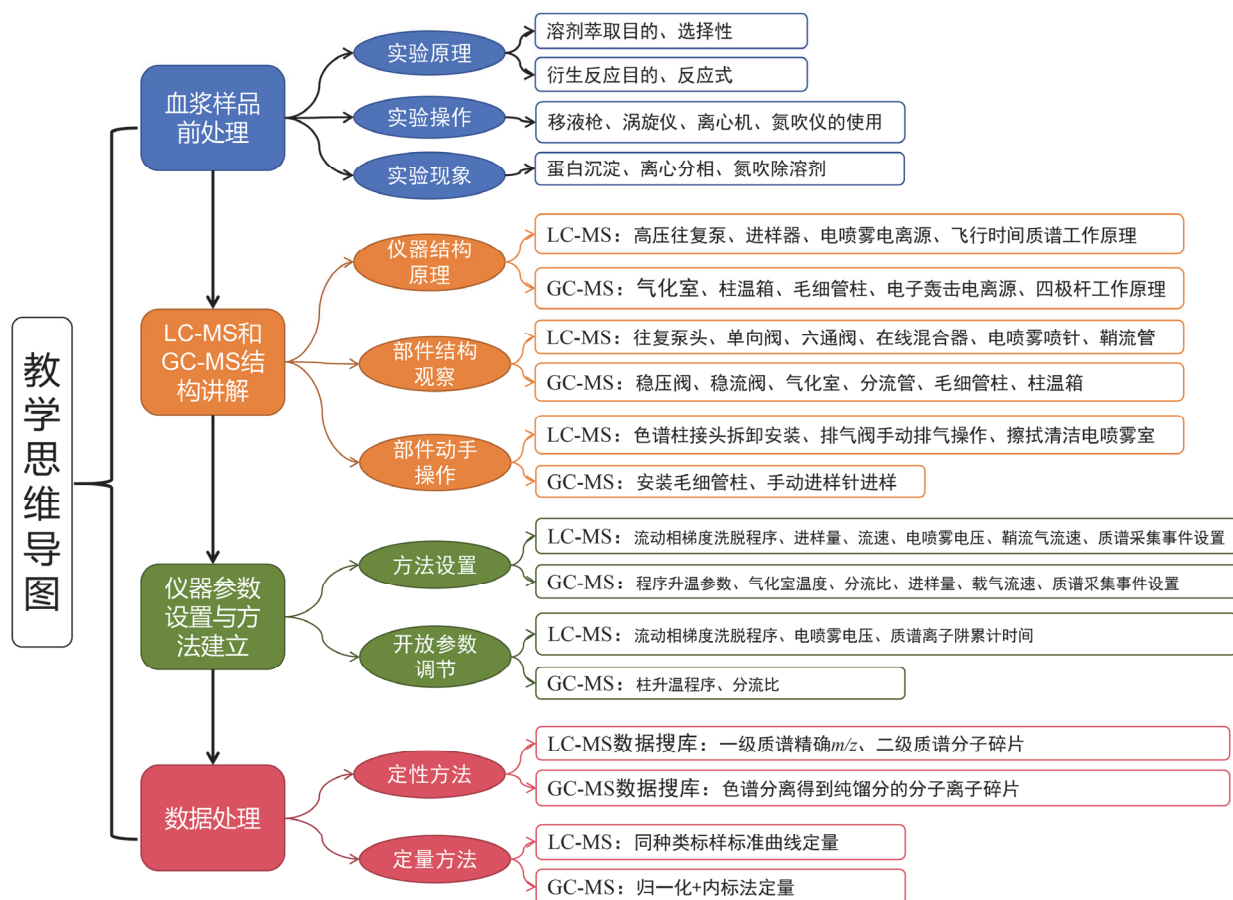


图5 教学知识点思维导图

## 6.5 实验报告的评定标准

实验报告不但应注重实验结果,还应注重实验过程的监控。因此,实验考核分为实验记录(占比30%)、实验结果报告(占比30%)和实验数据分析(占比40%)三个部分进行考核。实验记录需每人独立记录,注重记录实验过程中的现象和仪器反馈数据,主要记录的内容包括:溶剂萃取过程、离心沉淀过程、衍生过程的实验现象、液相色谱泵压反馈、气相色谱柱温和气压反馈仪器反馈数据,共五项,每项占比总分的6%(6分)。通过实时反馈现象和数据监控实验过程。实验结果除了对分析指标进行评价外,更重要的是对学生分析结果的过程进行评价。实验结果包括代谢物定性表、检测代谢物数目和种类分类概括、定量结果表,三项各占比10%(10分)。最后一部分实验数据分析与讨论需考核实验数据分析方法和分析讨论的准确性,包括不同物质液相色谱保留时间顺序规律的理论分析

(10%, 10分)、气相色谱保留时间顺序的理论分析(10%, 10分)、物质定性搜库方法与结果的分析讨论(10%, 10分), 以及定量方法和结果的分析讨论(10%, 10分)。

## 7 结语

本论文设计了一个以科研应用为背景的综合性研究型仪器分析实验课程, 具体来说是以疾病代谢组学研究为背景的气相色谱-质谱与液相色谱-质谱联合表征血浆中代谢物的仪器分析实验。实验的设计结合了气相色谱、液相色谱和质谱等多个仪器分析技术的原理、特点以及实验操作技能等各方面的知识点, 通过血浆中代谢物定性定量全分析这个共同分析目的将气相色谱、液相色谱和质谱多种仪器分析方法联合起来, 并进行对比互补, 有效解决了仪器分析实验中气相色谱、液相色谱和质谱等不同仪器之间知识关联性差的问题。以此为例展示了如何通过研究型综合实验提高教学中各分析仪器原理和技术的关联性。并通过实验内容设计引入了色谱-质谱联用系统结构的深入讲解以及色谱-质谱参数的开放性调节等重点实践环节, 有效解决了仪器分析实验目前实验探索性弱以及无法调动学生主观能动性的各种问题。

## 参 考 文 献

- [1] 白青鸿. 天津化工 **2024**, *38* (03), 154.
- [2] 李向军, 陈丽霞, 姚鑫, 赵红, 曹金超. 化学教与学, **2024**, *2024* (8), 21.
- [3] 张平, 高祥, 裴文霞, 汪建飞, 周毅, 赵建荣. 广东化工, **2024**, *51* (7), 187.
- [4] 张宏森, 王乐乐, 牛中毅. 中国现代教育装备, **2024**, *437* (13), 86.
- [5] 胡仲禹, 范丛斌, 丁海新, 林华盛. 当代化工研究, **2024**, No. 11, 143.
- [6] 李雪敏, 王晨晖, 冯旭利, 贺无恙. 实验室科学, **2024**, *27* (4), 78.
- [7] Demicheva, E.; Dordiuk, V.; Espino, F. P.; Ushenin, K.; Aboushanab, S.; Shevyrin, V.; Buhler, A.; Mukhlynina, E.; Solovyova, O.; Danilova, I.; *et al.* *Metabolites* **2024**, *14* (1).
- [8] Roberts, J. L.; Whiley, L.; Gray, N.; Gay, M.; Lawler, N. G. *Separations* **2022**, *9* (7).
- [9] Wu, Q.; Xu, Y.; Ji, H.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Lu, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411* (23), 6189.
- [10] Ye, S.; Lu, H. *Anal. Lett.* **2022**, *55* (5), 675.
- [11] da Cunha, K. F.; Lanaro, R.; Martins, A. F.; Oliveira, K. D.; Costa, J. L. *Forensic Toxicol.* **2021**, *39* (1), 222.
- [12] Bi, H.; Krausz, K. W.; Manna, S. K.; Li, F.; Johnson, C. H.; Gonzalez, F. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (15), 5279.