

比较教学法在仪器分析实验教学中的应用

谢一凡^{1,2}, 姚莉韵^{1,2,*}, 杨若林², 蔡玉兴¹, 金玉杰¹, 李宁¹

¹上海交通大学医学院, 基础医学实验教学中心, 上海 200025

²上海交通大学医学院, 药物化学与生物信息学中心, 上海 200025

摘要: 仪器分析实验是医学预防及医学检验等专业的重要实验课程之一。为提升本科生的创新实践能力, 设计了分别利用高效液相色谱仪(HPLC)和超高效合相色谱仪(UPC²)测定复方阿司匹林片中乙酰水杨酸和咖啡因含量的实验, 并将思政元素有机地融入其中。教学实践表明, 通过对不同仪器原理、功能特点的比较学习, 可以激发学生的实验兴趣和探索精神, 增强学生解决问题的能力, 进而提升学生的科学素养。

关键词: 仪器分析实验; 乙酰水杨酸; 咖啡因; 比较教学法

中图分类号: G64; O657.7+2

Application of Comparative Pedagogy in Instrumental Analysis Experiment Teaching

Yifan Xie^{1,2}, Liyun Yao^{1,2,*}, Ruolin Yang², Yuxing Cai¹, Yujie Jin¹, Ning Li¹

¹ Basic Medical Experimental Teaching Center, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China.

² Medical Chemistry and Bioinformatics Center, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Abstract: Instrumental analysis experiment constitutes an essential component for medical prevention and medical testing specialties. To improve the innovative and practical abilities of the undergraduates, a designed experiment of simultaneous determination of acetylsalicylic acid and caffeine in Aspirin tablets by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC²) was applied. Additionally, ideological and political elements were organically integrated into the teaching process. Educational practice has shown that by facilitating comparative learning of different instrument principles and functional characteristics, students' interest in experimentation and exploratory spirit can be invigorated. This approach also strengthens students' problem-solving skills, thereby elevating their scientific literacy.

Key Words: Instrumental analysis experiment; Acetylsalicylic acid; Caffeine; Comparative pedagogy

复方阿司匹林片(APC)的三个有效成分分别是乙酰水杨酸(阿司匹林, A)、乙酰对氨苯乙醚(非那西丁, P)和1,3,7-三甲基黄嘌呤(咖啡因, C), 其中乙酰水杨酸具有解热、镇痛、抗炎、抗癌及抗风湿等作用, 加入少量咖啡因可加强阿司匹林片的药效作用^[1,2]。

仪器分析结合数学、物理、光学、机械及计算机等知识和技术, 具有高效、正确、灵敏度高等优点, 被广泛应用于临床医学诊断、食品及环境安全检测等, 仪器分析实验也是医学预防及检验等专业的重要基础课。本实验设计了利用高效液相色谱仪(High Performance Liquid Chromatography,

收稿: 2023-09-19; 录用: 2023-10-16; 网络发表: 2023-10-25

*通讯作者, Email: yaoliyun517@163.com

基金资助: 上海交通大学医学院课程建设基金项目(BJ13000180095)

HPLC)和超高效合相色谱仪(Ultra Performance Convergence Chromatography, UPC²或UPCC),分别“测定复方阿司匹林片中乙酰水杨酸和咖啡因含量”的教学方案,通过比较教学法分析两种方法的实验原理、操作要点等。该实验提高了学生的观察力、思维能力、理解力、学习兴趣,从而提升学习效果及培养其创新意识^[3,4]。在教学过程中,结合教学内容充分挖掘、引入思政元素,包括学术诚信、爱国情怀等案例^[5,6],培养正确的社会主义核心价值观。

1 实验方案

1.1 仪器与试剂

仪器:超高效合相色谱仪(ACQUITY UPC², Waters公司,美国),高效液相色谱仪(Agilent1260, Agilent公司,美国),XS105电子分析天平(Mettler Toledo公司,瑞士),USC-302超声波清洗仪(上海波龙电子设备有限公司),纯水仪(Thermo公司,美国)。色谱柱1(ACQUITY UPC²™ BEH合相色谱柱 3.0 × 100 mm, 1.7 μm, Waters公司,美国);色谱柱2(ZORBAX Eclipse Plus C18液相色谱柱4.6 × 100 mm, 3.5 μm, Agilent公司,美国)。

试剂:咖啡因标准品(分析纯,上海试剂二厂),乙酰水杨酸标准品(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),复方阿司匹林片(西安利君制药有限责任公司)。甲醇(色谱纯, TEDIA, 美国),二氧化碳(食品级,上海成功气体工业有限公司)。

1.2 标准液及供试品溶液配制

1.2.1 咖啡因标准液制备

准确称取咖啡因约10.00 mg于100 mL容量瓶中,加80 mL甲醇超声溶解,用甲醇定容至刻度,制成浓度为100 μg·mL⁻¹标准溶液。

1.2.2 混合标准液制备

准确称取阿司匹林约30.00 mg和咖啡因约10.00 mg于100 mL容量瓶中,加80 mL甲醇超声溶解,用甲醇定容至刻度得乙酰水杨酸浓度和咖啡因浓度分别为300 μg·mL⁻¹和100 μg·mL⁻¹混合标准液储备液。分别移取1.00、2.00、3.00、4.00 mL储备液移入4个10 mL容量瓶中,再用甲醇定容至刻度,配成乙酰水杨酸浓度为30、60、90、120、300 μg·mL⁻¹及咖啡因10、20、30、40、100 μg·mL⁻¹的混合系列标准溶液。

1.2.3 样品储备液制备

将1片复方阿司匹林片称量后于研钵中研细,准确称取约10.00 mg粉末于50 mL的容量瓶中,加入40 mL甲醇超声溶解,用甲醇定容至刻度。用一次性过滤针吸取0.8 mL溶液,0.22 μL滤膜过滤至样品瓶中,得供试品液供测试用。

1.3 色谱条件选择

HPLC色谱条件:色谱柱(ZORBAX Eclipse Plus C18柱4.6 × 100 mm, 3.5 μm),流动相:甲醇-1%乙酸水溶液(50:50,体积比),流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:276 nm;柱温:25 °C;进样量:5 μL。

UPC²色谱条件:色谱柱:ACQUITY UPC²™ BEH柱(3.0 × 100 mm, 1.7 μm);流动相:甲醇-超临界二氧化碳(10:90,体积比),流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:276 nm;柱温:25 °C;系统背压1700 Psi;进样量:1 μL。

1.4 实验设计

本实验为3学时,实验对象为医学预防专业学生。每六人共用一台HPLC仪和一台UPC²仪,分为两组,每组三人交叉使用仪器。

本实验预习阶段,提前三周在班级微信群中发布学习任务,要求学生登录超星学习通(PC端或手机端)观看相关的学习资料(包括HPLC及UPC²的原理视频、PPT、动画),完成虚拟实验操作及思考题,由后台记录学习完成度,学生超星平台上提交实验预习报告后方能进入实验室。期间教师通过微信群或超星学习通为学生答疑解惑。

2 结果和讨论

2.1 专属性试验和系统适应性考察

分别取空白甲醇、咖啡因标准液、混合标准对照液(取2号浓度)和供试品液按1.3小节中色谱条件分别测定,记录色谱图(图1为HPLC色谱图,图2为UPC²色谱图)。

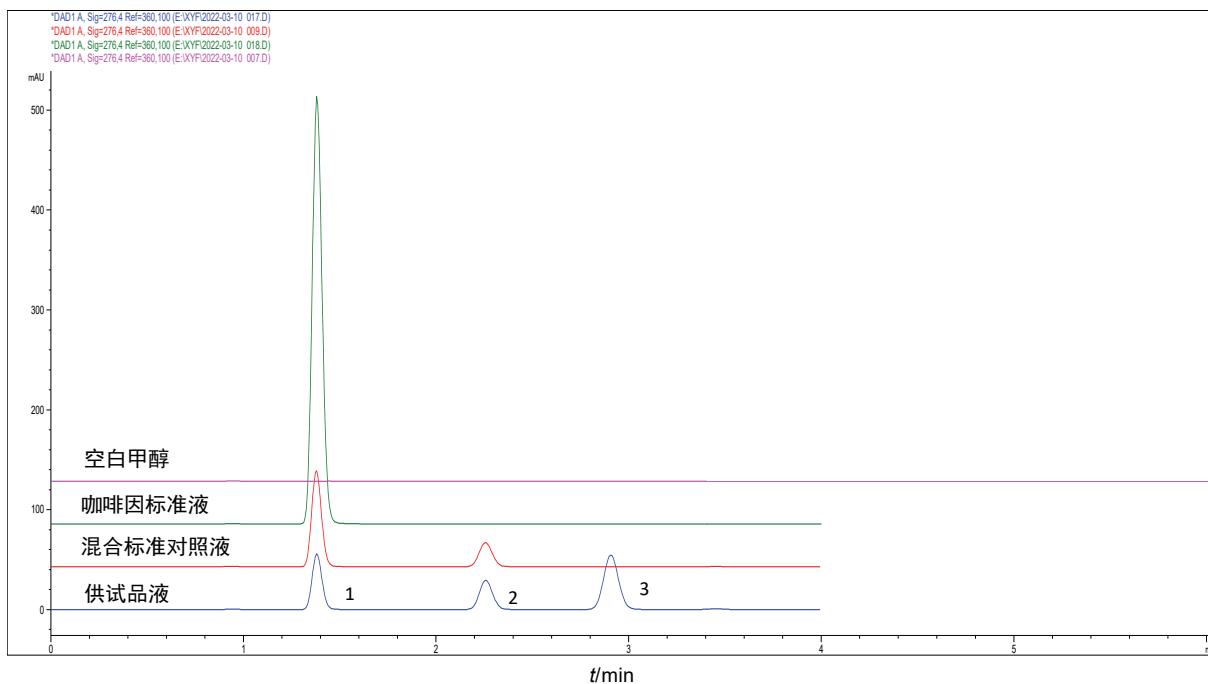


图1 HPLC色谱图

1: 咖啡因; 2: 乙酰水杨酸; 3: 非那西丁

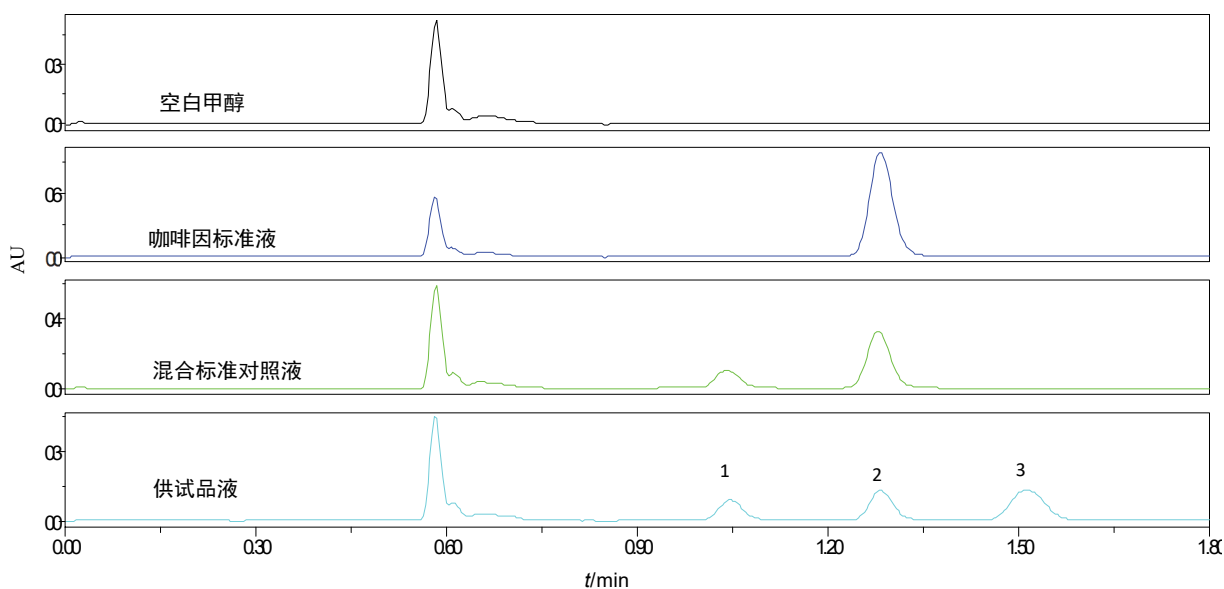


图2 UPC²色谱图

1: 乙酰水杨酸; 2: 咖啡因; 3: 非那西丁

HPLC色谱图中, 乙酰水杨酸和咖啡因出峰时间分别约2.26、1.39 min; 而UPC²色谱图中, 乙酰水杨酸和咖啡因出峰时间分别约1.05、1.28 min。乙酰水杨酸和咖啡因都能完全分开且峰形良好, 甲醇空白不会产生干扰, 样品液中也无其他杂质峰干扰, 表明方法的专属性良好, 符合定量分析要求。

2.2 仪器精密度考察

在HPLC和UPC²各自色谱条件下, 取5号混合标准液连续进样5次, 计算保留时间和峰面积的相对平均偏差值(RSD)考察仪器精密度。HPLC结果显示, 咖啡因保留时间和峰面积RSD分别为0.04%、0.8%; 乙酰水杨酸保留时间和峰面积RSD分别为0.03%、0.9%。UPC²结果显示, 咖啡因保留时间和峰面积RSD分别为0.2%、0.5%; 乙酰水杨酸保留时间和峰面积RSD分别为0.3%、0.7%。表明仪器精密度达到测试要求(图3分别为HPLC 5次进样的镜像对照图和UPC² 5次进样的叠加图)。

2.3 标准曲线及样品测定

在1.3小节色谱条件下分别进行测定, 以浓度 X 与对应的色谱峰面积 Y 进行线性拟合得回归方程。结果显示, 30–300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (乙酰水杨酸)和10–100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (咖啡因)浓度范围内(实际浓度见表1和表2), 线性关系良好。

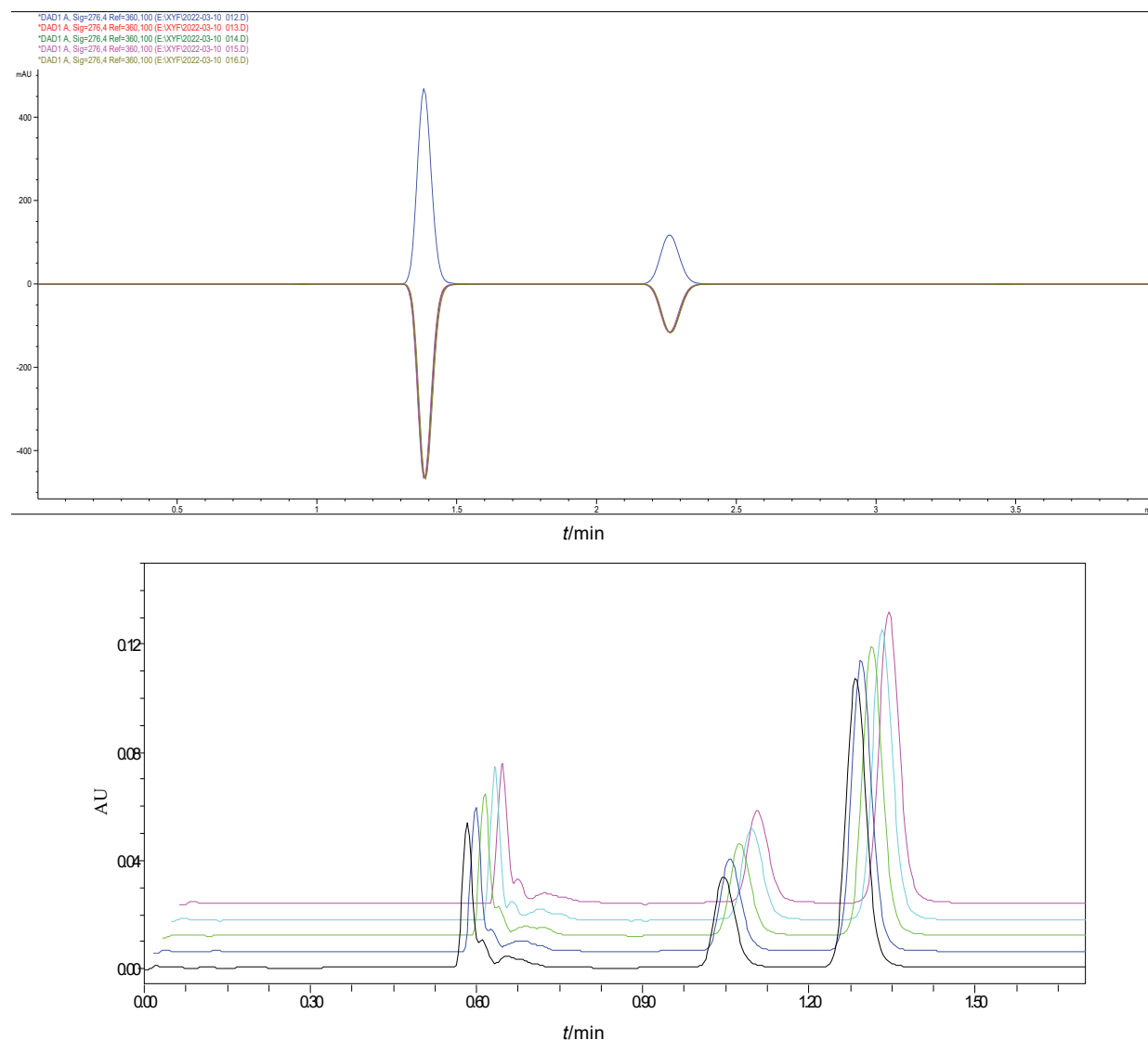


图3 HPLC镜像对照图(上)和UPC²叠加图(下)

表1 HPLC的测定结果

混合标准液浓度X (咖啡因-乙酰水杨酸) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	咖啡因峰面积(Y_1)	乙酰水杨酸峰面积(Y_2)	回归方程	回归方程计算的 样品浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	每片药中咖啡因和 乙酰水杨酸含量 (mg)
11.9-30.2	168.80	56.27			
23.8-60.4	345.55	115.88	$Y_1 = 14.069X + 9.46$	13.5	34.1 (咖啡因)
35.6-90.7	516.16	172.94			
47.5-121	681.34	228.62			
119-302	1681.01	567.31	$Y_2 = 1.8745X + 1.65$	79.8	202 (乙酰水杨酸)
样品	199.55	151.18			

表2 UPC²的测定结果

混合标准液浓度X (咖啡因-乙酰水杨酸) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	咖啡因峰面积(Y_3)	乙酰水杨酸峰面积(Y_4)	回归方程	回归方程计算的 样品浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	每片药中咖啡因和 乙酰水杨酸含量 (mg)
11.9-30.2	28565	8588			
23.8-60.4	57846	18093	$Y_3 = 2367.9X + 898.76$	14.0	35.4 (咖啡因)
35.6-90.7	85612	26992			
47.5-121	112872	35501			
119-302	282692	91237	$Y_4 = 303.65X - 616.54$	79.8	202 (乙酰水杨酸)
样品	34150	23616			

每片药中咖啡因和阿司匹林含量=回归方程计算的样品浓度 $\times 50 \times$ 每片药片质量(504.03) \div 实称药粉质量(9.98) $\div 1000$

供试液分别进样HPLC和UPC²得色谱图, 利用回归方程计算含量, 换算后得出药片中乙酰水杨酸和咖啡因含量。

2.4 软件学习

本次实验设计中, 学生对仪器的熟练操控和应用软件学习尤为重要。因此, 软件深度开发使用也是本次实验教学的重点。重叠信号(3D重叠, 镜像重叠)不仅能直观地观察信号的保留时间和峰面积的重复性, 而且在实际科研中也很实用。例如, 中药的指纹图谱研究, 不同色谱条件下的分离情况研究, 通过信号叠加可清晰地进行比较观察, 从而得到相关研究信息, 如将其用于PPT汇报中, 更生动有说服力。软件中“积分事件”可教会学生根据色谱峰的实际情况选择合理的积分方法(基线积分、切线积分、手动积分等); 而“序列表建立”能教会学生通过建立序列表, 运行序列进行全自动的分析。利用二极管阵列(DDA)检测器扫描, 从色谱图上提取紫外光谱图(图4和图5)、3D扫描图及利用软件进行色谱峰的纯度检查, 这些软件技术的掌握有助于提升学生对大型仪器的操作技能开展。而从综合性报告中直接得信噪比、理论塔板数、分离度等参数, 可帮助学生提高工作效率。

2.5 对比学习

HPLC仪和UPC²仪都能将混合物经色谱柱分离为各个单一的纯化合物, 并进行定性和定量分析, 两者的色谱理论和色谱软件相同。但UPC²采用无毒超临界CO₂和少量甲醇为流动相(绿色环保), 色谱柱采用1.7 μm 桥式乙烷杂化颗粒为固定相填料(图6), 与HPLC (3.5 μm 普通硅胶颗粒为固定相填料)相比, 具有更高机械强度、更强分离效果、更宽流速范围。从理论塔板高度(H)与流速(V)间的关系可知(图7), 小颗粒填料在流速较大的情况下, 依然保持较小的理论塔板高度, 因此在保持分离度不变的情况下可选择更高流速、更短色谱柱, 能缩短分离时间和提高分离效率。

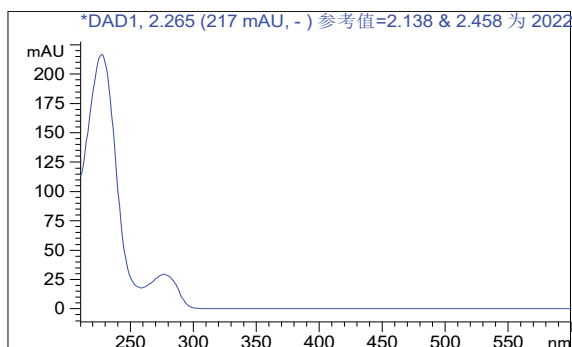


图4 乙酰水杨酸紫外光谱图

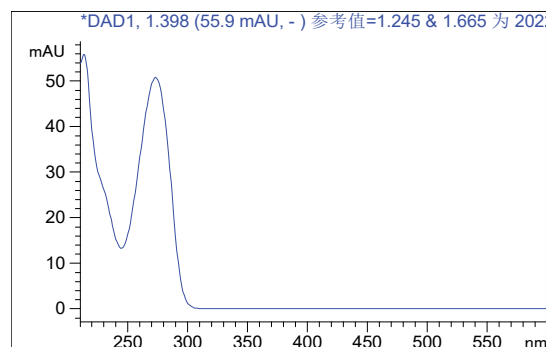


图5 咖啡因紫外光谱图

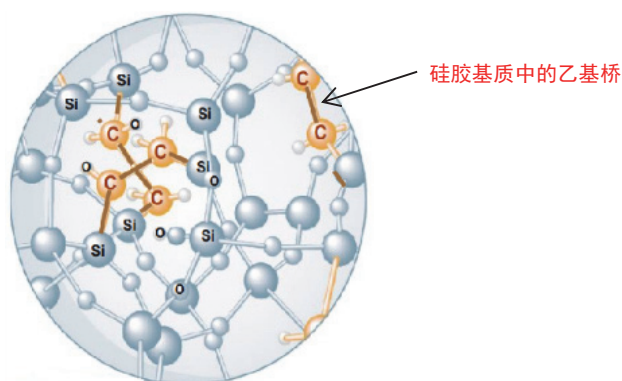


图6 硅胶杂化颗粒图

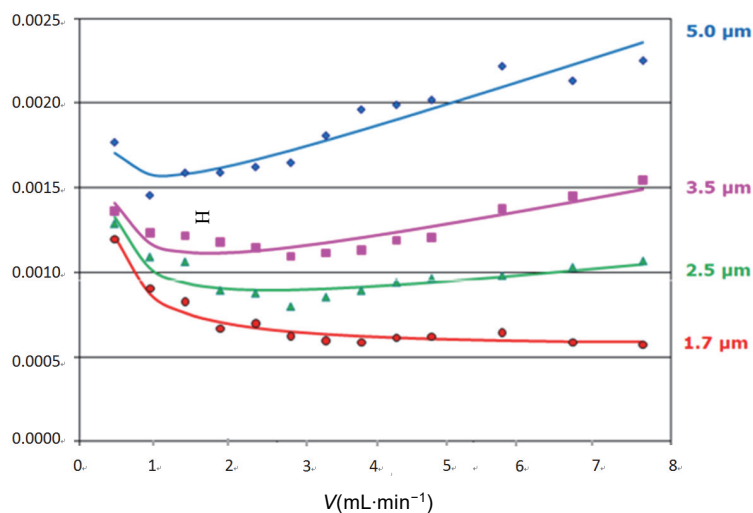


图7 理论塔板高度与流速关系图

HPLC仪与UPC²仪的应用领域既有交叉又有专属。在检验分析中，UPC²是气相和液相色谱的重要补充，在液相色谱仪较难解决的脂类成分分析、手性化合物对映体分离中表现尤为突出^[7-9]。在反相高效液相色谱分离脂类化合物，往往涉及到样品溶解的问题。而手性样品手性分离通常在正相条件下进行(反相色谱分离效果差)，这将消耗大量昂贵的有机溶剂(正己烷、异丙醇等)，且不利于环保。UPC²以超临界二氧化碳和少量有机溶剂为流动相，不仅出峰时间快，分离效果好，而且环保、运行成本低。本实验中，学生发现乙酰水杨酸和咖啡因的色谱峰出峰顺序在两种图谱中相反，HPLC色谱

图中咖啡因在前、乙酰水杨酸在后；而UPC²色谱图中乙酰水杨酸在前、咖啡因在后(图1和图2)。通过比较教学，学生能认识到不同色谱条件会影响样品的出峰时间，甚至会出现顺序相反(保留时间和分离选择性受流动相组成及色谱柱而变化)，但不影响测定结果。在实验过程中学生还能发现，药片中虽乙酰水杨酸比咖啡因的含量高很多，但色谱图上其色谱峰比咖啡因反而小，原因是276 nm波长下，咖啡因的紫外吸收强度大于乙酰水杨酸(图4和图5)。因此，通过直观的比较学习，有利于提高学生了对知识的理解。

2.6 拓展性学习

液相色谱虽能分离混合物和定量检测，但成分定性需有标准品。如本实验中非那西丁没有标准品，虽可利用DAD检测器的光谱扫描获取紫外光谱图进行定性，但紫外光谱相似的化合物很多，故有局限性。如采用液相-质谱联用仪可增强其定性检测能力，因此，实验过程中可给学生补充介绍液质联用(LC-MS-MS)的基本知识，包括四极杆质量分析器的原理和定性分析原理。拓展内容的引入，可以增加学生的学习兴趣，培养其探索精神。

3 思政教育的融入

3.1 学术诚信与职业道德

色谱分析仪在药品开发、食品安全和环境监测等科研领域广泛应用。在实验数据记录与处理过程中，引导学生要诚信对待，虚假和错误的的数据不仅得不到预料的成果，甚至会导致错误结论。可以引用媒体报道案例，如新冠疫情流行时，某些检测核酸单位为私利出具虚假报告，一定程度上误导了国家的抗疫决策。教育学生不仅要有过硬的技能和知识，更要有高度的社会责任感和职业道德素养^[10]。

3.2 唯物辩证法

教学中通过两种仪器方法学比较，使学生认识到事物都有二面性^[11]。UPC²仪虽然检测效率高、绿色环保，但仪器制造技术要求高、价格昂贵，且相比HPLC仪可联用的检测器种类也少^[12]。HPLC仪价格相对便宜，根据分析需要可选的色谱柱、流动相及检测器种类多。因此应根据实际工作的需要购买仪器，不要为了追求高大上而浪费国家的外汇。

3.3 爱国情怀

色谱分析的科研文献中大多使用进口仪器(美国Waters公司、美国Agilent公司，日本岛津公司等)，虽然国产HPLC、气相色谱(GC)仪近年也有发展，但LC-MS，气相-质谱联用仪(GC-MS)的国产化产品很少，仪器供应一旦受阻，许多科研领域将面临瘫痪，例如受美国封锁影响手机芯片断供就是一个例证。教学中可介绍中国核潜艇总设计师黄旭华院士的案例，他通过拆解儿童核潜艇模型，研究掌握了我国第一代核潜艇的重要数据。激发学生的爱国情怀、创业精神及民族自豪感，自觉承担起中华复兴的历史使命。

4 结语

本实验中学生不仅能掌握两种色谱仪的操作技术，而且也能了解前沿仪器的发展状况及在科研中的应用，提升综合实践能力。大型精密仪器应用于实验教学，不仅有助于发挥其在培养高素质人才中的作用^[13,14]，也提高了仪器的使用率，符合学校对大型仪器的管理要求^[15,16]。本实验的设计内容为多组分样品含量测定，更符合实际分析工作需求，还能使同学对色谱仪分离复杂混合物并定性、定量分析的能力有更深刻的理解。通过利用两种仪器对同一样品进行测试结果的对比和互相验证，学生充分了解仪器测试的正确性和可靠性。色谱技术是专业性很强的实用技术，近年来其相关应用的发展突飞猛进，在实验课上同时介绍一些拓展性新知识、新技术，能提高学生的学习兴趣，拓展学生的视野。本实验教学的实践显示，通过比较法学习学生可将知识点串联起来，大大提高学习效率，达到事半功倍的效果^[17]。

参 考 文 献

- [1] 陈承贵, 刘敏, 李美芳, 庞发根, 李玉兰, 王铁杰. 药物分析杂志, **2021**, *41* (3), 515.
- [2] 王腾, 王晓敏, 张亚运, 姜玉婷, 张志红, 沈齐英. 北京石油化工学院学报, **2012**, *20* (1), 41.
- [3] 薛冰纯, 吴雅琴, 刘二保. 化学教育, **2015**, *36* (10), 22.
- [4] 江玉亮, 毕文韬, 杜江燕, 杨静. 大学化学, **2020**, *35* (2), 27.
- [5] 刘宝林, 宋丹萍, 李维杰, 袁敏, 宋晓燕, 姚秀雯. 大学化学, **2021**, *36* (3), 2005020.
- [6] 胡万群, 张万群, 邵伟, 杨凯平, 李维维, 孙晴, 朱平平. 大学化学, **2021**, *36* (3), 2011003.
- [7] 彭熾雯, 王波, 刘阿静, 王莹捷, 把灵珍, 韩舜愈, 管贤贤, 周小平. 中国油脂, **2022**, *47* (1), 147.
- [8] 王波, 高黎红, 陆秀云, 冯静, 金凤, 周围. 分析实验室, **2017**, *36* (7), 831.
- [9] 谢一凡, 刘慧中, 杨若林, 蔡玉兴, 金玉杰, 李宁. 化学教育, **2018**, *39* (4), 52.
- [10] 宗蕊, 胡晓雨, 叶能胜. 首都师范大学学报(自然科学版), **2021**, *42* (4), 69.
- [11] 覃洁萍, 冯旭, 刘雯, 林瑜. 高教学刊, **2021**, *7* (27), 158.
- [12] 徐永威, 孙庆龙, 黄静, 谭晓杰. 现代仪器, **2012**, *18* (5), 45.
- [13] 向东山, 瞿琨, 杨勃, 齐宝平, 尚冰冰. 高分子通报, **2021**, No. 3, 65.
- [14] 宋红杰, 张立春, 衣晓风, 邓冬艳. 实验室科学, **2020**, *23* (6), 27.
- [15] 石变芳, 宋楠, 常静, 陆馨. 实验室研究与探索, **2019**, *38* (9), 271.
- [16] 赵玉茹, 冯建跃. 实验室研究与探索, **2019**, *38* (6), 120.
- [17] 高翔, 叶向群, 朱明乔, 何潮洪. 实验室研究与探索, **2018**, *37* (11), 215.