目标导向型研究生仪器分析实验教学设计 ——以 GC&GC-MS 法测定冰片的成分及含量为例

邵伟, 张万群, 胡万群, 李维维, 杨凯平, 朱平平*

化学国家级实验教学示范中心(中国科学技术大学), 合肥 230026

摘要: 研究生课程教学是研究生培养的第一个阶段, 本文介绍了针对研究生综合仪器分析实验课程开设的一个实验项目“GC&GC-MS测定冰片的成分及含量”。针对选修该课程研究生实验学生的基础情况和教学目标, 采用以学生为中心的目标导向式教学法, 要求学生围绕一个测试目标, 通过五条实验路线的分工合作最终得到实验结果, 在实验中掌握科学的逻辑思维方式和解决复杂问题的能力, 为以后的科研工作打好基础。

关键词: 气相色谱; 气质联用; 冰片; 右旋龙脑; 手性分离; 目标导向型教学模式; 混合式教学

中图分类号: G64; O6

Teaching Design of the Goal-Oriented Graduate Student Instrumental Analysis Experiment “GC&GC-MS Determination of the Composition and Content of Borneol”

Wei Shao, Wanqun Zhang, Wanqun Hu, Weiwei Li, Kaiping Yang, Pingping Zhu *

National Demonstration Center for Experimental Chemistry Education (University of Science and Technology of China), Hefei 230026, China.

Abstract: Postgraduate course teaching is the first stage of postgraduate training. This article introduces an experiment “GC&GC-MS Determination of Borneol Composition and Content” for postgraduates in the “Comprehensive Instrumental Analysis Laboratory” course. According to the background of students and teaching goals of postgraduate experiments, a student-centered, goal-oriented teaching mode is adopted. Students are required to adopt five experimental routes to achieve the goal through collaboration in the experimental process. In the experiment, students can exercise the scientific and logical way of thinking and the ability to solve complex problems, which lays a solid foundation for future scientific research.

Key Words: Gas chromatography; GC-MS; Borneol; (+)-Borneol; Chiral separation; Goal-oriented teaching mode; Mixed teaching

现代仪器分析是以利用现代科学仪器对物质进行定性分析、定量分析和结构分析为基础的一门科学, 其应用范围涉及化学、材料、物理、医药、生物等领域, 可促进科学研究、助力科技创新^[1]。研究生仪器分析实验课程的设计应体现其高阶性、创新性、挑战度, 培养学生掌握现代仪器操作和分析的手段与方法, 辅助学生有效开展科学研究, 提高学生综合分析解决问题的能力。

收稿: 2021-10-15; 录用: 2021-11-15; 网络发表: 2021-12-10

*通讯作者, Email: zhupp@ustc.edu.cn

基金资助: 安徽省教育厅研究生教学研究项目(2019jyxm0021); 中国科学技术大学教学研究项目(2019xjyxm044); 中国科学技术大学研究生教育创新计划项目(2021ycjg02)

研究生综合仪器分析实验课程是中国科学技术大学化学实验教学中心于2020年正式开设的一门研究生选修课, 课程内容包括X射线衍射、核磁共振、扫描电镜、质谱等十余种大型仪器(表1), 选课对象为来自长春应化所、稀土研究所、苏州纳米所、材料系、科技史与科技考古系、近代力学系等十余个单位和方向的研究生, 大部分为一年级的新生。学生在仪器分析方面的基础普遍薄弱, 而且水平参差不齐, 因此, 针对选课学生的基础以及培养目标, 本实验使用了“目标导向式”教学方法。要求学生围绕某一个目标或任务自主学习, 不仅培养了学生仪器操作的技能, 还帮助他们掌握科学的逻辑思维方式和研究方法, 为以后的科研工作打好基础。

表1 中国科学技术大学研究生综合仪器分析实验课程设置

序号	课程内容	课时	授课方式
1	X射线衍射分析	5	讲授+实践
2	核磁共振分析	5	讲授+实践
3	红外光谱分析	5	讲授+实践
4	电感耦合等离子体质谱分析	5	讲授+实践
5	气相色谱及气质联用分析	5	讲授+实践
6	液相色谱-三重四级杆质谱	5	讲授+实践
7	扫描电镜	5	讲授+实践
8	差热与热重分析	5	讲授+实践
9	研讨课	5	讨论

1 实验设计

1.1 实验内容设计

冰片又称龙脑, 最早记载于《名医别录》^[2], 2020年版《中国药典》记载^[3], 冰片分为天然冰片、艾片、合成冰片。天然冰片取材于樟科植物龙脑香树或称龙脑樟树的新鲜枝叶, 经人工提取、加工制成结晶, 其主要成分是右旋龙脑[(+)-borneol]。艾片取材于菊科植物艾纳香的新鲜叶, 经人工提取、加工制成结晶, 其主要成分为左旋龙脑[(-)-borneol]。合成冰片又称机制冰片, 用樟脑及松节油经人工化学方法加工而成, 主要成分为右旋龙脑、左旋龙脑和异龙脑(图1), 其人工合成的副产物异龙脑具有较大的毒性^[4]。冰片常作为“药引”, 现代药理学研究表明, 冰片可以显著有效地使血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)开放, 使药物能够进入到脑脊液当中从而发挥出良好的治疗作用^[4-11]。例如冰片可以促进神经递质多巴胺药物的吸收, 对于帕金森病的治疗很有帮助^[12]。在相关研究工作中, 对药物中活性成分的定性和定量, 是科研中的一项基本操作。

由于天然冰片较为难得, 有很多企业使用合成冰片来代替天然冰片, 合成冰片成分较为复杂, 除了左旋龙脑和右旋龙脑, 还含有异龙脑、樟脑等杂质, 其中有些成分不但对人体无益, 甚至可能是有害的, 因此我们需要辨析和确定冰片中的活性成分右旋龙脑的含量。

图1 龙脑的四种结构

a-左旋龙脑; b-右旋龙脑; c-左旋异龙脑; d-右旋异龙脑

本实验运用气相色谱、手性气相色谱、气质联用三种分析方法来达到这一目的。涉及的知识点包括色谱分离、手性、手性分离，质谱分析、谱图解析，标准曲线法等等。

本实验采用“目标导向”式教学模式。在学生进实验室之前，布置本次实验要完成的任务，要求学生提前自学，实验操作前，对于要做什么有基本了解；在做实验的过程中发现自己的不足，边做边学，及时反思总结，以适应将来的科研工作。本实验的主要目标是利用气相色谱/气质联用仪，建立定性定量方法，分析复杂混合物中的右旋龙脑成分，又可以分解为以下五个小任务(表2)，要求学生分工合作来完成此目标。

表2 自选实验路线

序号	实验路线
任务1	选择合适的分离条件，对龙脑，异龙脑进行分离并确定其各自的保留时间
任务2	使用手性色谱柱，选择合适的分离条件，对左旋/右旋龙脑进行分离
任务3	本实验中有一瓶溶液的标签是错的，试着将它找出来
任务4	有一个样品成分不清楚，请你综合利用所学知识，鉴定其中都有哪些组分
任务5	请你综合利用所学知识，建立方法测定某滴眼液中右旋龙脑的含量

任务1-3为必选，4、5为可选

1.2 实验过程设计

本实验要求学生根据教师布置的课程任务，提前了解相关知识，如仪器原理、工作站操作等等。在实验过程中，需要四位同学分工合作，完成所有测试任务；实验完成后，学生要对所有实验数据进行综合分析，进而以科技论文的形式将实验过程和结果呈现出来；之后在小组讨论、师生研讨会等场合，以PPT答辩等方式进一步交流，强化所学知识。

1.3 考核方式

本实验中使用个性化与层次化教学，对学生的仪器技能掌握程度不做统一要求。

实验一方面考查学生的实验习惯，比如实验操作是否规范、数据记录是否及时且完整、科技论文撰写是否符合要求；另一方面考查学生的学习、思维及分析能力，比如课前是否及时预习并查阅资料、实验过程中的分析是否合理、是否能提出自己的创新思路或想法等等。

2 仪器与试剂

2.1 仪器

本实验中涉及了气相色谱、手性气相色谱及气质联用仪的使用，所用仪器如表3所示。

表3 实验所用仪器及色谱柱

仪器名称	型号	色谱柱
气相色谱仪1	Agilent 7890B GC	TR-WAX 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm 色谱柱
气相色谱仪2	Agilent 7890B GC	CycloSil-B 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm 手性柱
气质联用仪	Thermo Fisher ISQ GC-MS	TR-1 MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm 色谱柱

2.2 待测样准备

(1) 冰片样品：称取1 g左右冰片，用甲醇定容于100 mL容量瓶中作为储备液。取100 μL储备液，加入900 μL甲醇置于2 mL进样瓶中贴上标签备用。

(2) 艾片样品：称取1 g左右艾片，用甲醇定容于100 mL容量瓶中作为储备液。取100 μL储备液，加入900 μL甲醇置于2 mL进样瓶中贴上标签备用。

(3) 合成冰片样品：称取1 g左右合成冰片，用甲醇定容于100 mL容量瓶中作为储备液。取100 μL

储备液，加入900 μL 甲醇置于2 mL进样瓶中贴上标签备用。

(4) 异龙脑样品：称取1 g左右异龙脑，用甲醇定容于100 mL容量瓶中作为储备液。取100 μL 储备液，加入900 μL 甲醇置于2 mL进样瓶中贴上标签备用。

(5) 未知样品：称取1 g左右未知龙脑样品，用甲醇定容于100 mL容量瓶中作为储备液。取100 μL 储备液，加入900 μL 甲醇置于2 mL进样瓶中贴上标签备用。

(6) 某品牌滴眼液样品：取某品牌滴眼液15 mL，加入5 mL乙酸乙酯萃取，离心，取上层乙酸乙酯溶液作为供试品。

3 实验步骤

任务1：设定气相色谱仪器1参数，对1–4号样品进行检测，分析实验结果，确定各龙脑组分的保留时间。

任务2：设定气相色谱仪器2参数，对1–3号样品进行检测，分析实验结果，确定左旋/右旋龙脑的保留时间。

任务3：设定气质联用仪参数，对1–6号样品进行检测，对质谱图进行分析，结合保留时间对每个样品中各组分进行定性，找出标签错误的样品。

任务4：结合气相色谱与气质联用的实验数据，分析5号样品中具体有哪些组分。

任务5：设定气相色谱仪器2参数，取1号样储备液进行逐级稀释，分别进样，分析实验结果，估算某滴眼液中右旋龙脑的含量。

4 结果与讨论

4.1 任务1

对实验参数进行优化后，确定使用以下参数对样品进行分离，1–4号样的色谱图如图2所示，对色谱图进行分析可知，本色谱柱对左旋龙脑和右旋龙脑没有分离效果，都在同一个位置(保留时间6.221 min)出峰，合成龙脑除了龙脑的峰之外，还在5.969 min处有一个峰，异龙脑的保留时间为4.870 min。

图2 1–4号样品色谱图(WAX柱)

a-1号样；b-2号样；c-3号样；d-4号样；

色谱条件：进样口气化温度：250 $^{\circ}\text{C}$ ，分流比：10:1；色谱柱流速：2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，载气 N_2 ；柱温箱 80 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 1 min，以 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升到 160 $^{\circ}\text{C}$ ，保持 0.5 min；检测器基座温度：250 $^{\circ}\text{C}$ ， H_2 ：45 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，Air：450 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ， N_2 ：40 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

4.2 任务2

对实验参数进行优化后,使用手性柱对1-3号样进行分析,得出的色谱图如图3所示,在手性柱上左旋龙脑(保留时间9.961 min)和右旋龙脑(10.065 min)基本能够达到基线分离。

图3 1-3号样品色谱图(手性柱)

a-1号样; b-2号样; c-3号样

色谱条件: 进样口气化温度: 250 °C, 分流比: 10 : 1; 色谱柱流速: 1.5 mL·min⁻¹, 载气 N₂; 柱温箱 80 °C, 保持 1 min, 以 10 °C·min⁻¹ 升到 160 °C, 保持 0.5 min; 检测器基座温度: 250 °C, H₂: 45 mL·min⁻¹, Air: 450 mL·min⁻¹, N₂: 40 mL·min⁻¹

4.3 任务3

对实验参数进行优化后,使用气质联用仪对1-6号样品进行分析,1-2号样品在保留时间5.26 min处有色谱峰,经过谱图分析确定为龙脑的峰。3号样在5.14 min与5.26 min处有峰,经过谱图解析确定为异龙脑和龙脑的峰(图4)。4号样在4.91处有峰,经过谱图解析,确定其结构并非异龙脑,而是樟脑(图5),后与樟脑色谱图进行比对后证实了这一结论;实验证明,4号样品的标签错误。

图4 3号样品的色谱图(非极性柱)

色谱条件: 进样口气化温度: 250 °C, 分流比: 10 : 1; 色谱柱流速: 1.5 mL·min⁻¹, 载气He; 柱温箱: 80 °C, 保持1 min, 以 10 °C·min⁻¹ 升到 200 °C, 保持5 min; 质谱条件: 传输线温度: 280 °C, 离子源温度300 °C, 电子能量: 70 eV, 扫描范围: 33-500, 溶剂延迟: 3 min

图5 几种龙脑组分的质谱图

a-樟脑; b-异龙脑; c-龙脑

4.4 任务4

对5号样分别进行气相色谱及气质联用测试, 气相色谱图如图6所示, 对气相色谱图进行分析可知, 样品中主要成分为樟脑(保留时间8.8 min左右), 含量大约为90%。其次还含有少量异龙脑与龙脑, 此外在保留时间8.212 min左右也有峰出现, 结合气质联用分析其可能为樟脑的同分异构体(图7)。

图6 5号样品色谱图(手性柱)

图7 5号样中的杂质成分

保留时间8.212 min

4.5 任务5

使用气相色谱仪2对6号样品进行测定, 得出该样品进行检测在保留时间10.061 min位置有峰, 说明该样品中的龙脑含有右旋龙脑。取1号样储备液50、100、200、300、400 μL , 分别加入950、900、800、700、600 μL 甲醇于2 mL进样瓶中, 配制成标准溶液, 分别进样, 获得右旋龙脑峰的峰面积如表4所示, 由浓度与峰面积数据做出标准曲线(图8), 根据标准曲线计算出6号样中右旋龙脑的浓度为 $1.6034 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 由于该样品是5 mL乙酸乙酯于15 mL滴眼液样品中萃取而来, 因此估算原滴眼液样品中添加天然冰片的浓度为 $0.5344 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表4 标准曲线数据

序号	浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	峰面积
标样1	0.4999	357.3
标样2	0.9997	897.5
标样3	1.9994	2174
标样4	2.9991	4203
标样5	3.9988	5792
6号样	x	1897.5

图8 右旋龙脑溶液标准曲线

4.6 课后思考题

- (1) 气相色谱、手性气相色谱、气质联用各有什么优缺点? 针对检测目的, 应该采用哪种仪器来分析更加合适?
- (2) 谈谈在本实验中, 可以如何优化参数使实验结果更理想。
- (3) 谈谈实验中的误差可能会来自哪里, 以及如何减小误差。
- (4) 谈谈在分析工作中, 应该怎样逐步建立定性/定量分析方法; 以及有哪些要注意的事项。
- (5) 谈谈你对本实验的感受, 你认为本实验还可怎样优化/拓展。

5 实验教学特点

对于研究生来说, 他们在将来的科研生涯中可能会碰到一些实际问题, 看起来非常复杂、无从着手; 但是仔细分析就会发现, 可以把一个比较大的问题分解成几个较为简单的小问题, 这样就能比较轻松地解决。本实验的教学目的除了普及色谱知识以外, 主要在于培养学生解决问题的思路, 提高学生的科研综合水平, 包括自学能力、查阅文献的能力、综合分析问题的能力、团队合作能

力, 以及探索能力。

在科研生活中, 往往会碰到仪器条件不足的情况, 这时候就要想办法, 尽可能利用手头的仪器条件, 达到自己的测试目的。本实验选用了三种仪器, 三种色谱柱, 这三种仪器各有利弊: 气相色谱能很好地对樟脑、异龙脑、龙脑进行分离, 但无法对左旋龙脑与右旋龙脑进行分离; 手性气相色谱能将左旋龙脑与右旋龙脑分离开, 但无法对未知组分进行定性; 气质联用仪可以对未知组分进行定性, 但非极性色谱柱分离效果不如气相色谱, 灵敏度也不如氢火焰离子化检测器(FID)。因此我们希望学生能够掌握每台仪器的应用范围和优缺点, 在测试时, 根据自己的测试需求选择合适的仪器, 而不是求全责备, 追求最贵最好的仪器。

6 教学组织方式和教学方法

6.1 实验学时安排和运行方式

本实验的学时根据实际情况可安排4–8学时。本校研究生综合仪器分析实验每个实验项目为4学时, 使用小组循环的方式, 每小组4人, 同时使用三台仪器进行测试。气质联用仪使用自动进样操作, 同时学生使用两台气相色谱仪手动进样完成色谱部分分析, 实验需要小组成员分工合作完成。

6.2 目标导向的混合式教学法

由于实验课时较短而内容较多, 本实验使用目标导向的混合式教学法。教师将仪器原理、工作站操作录制成微课视频, 放到学校Blackboard网络教学平台, 供学生实验课前进行线上预习。学生提前了解实验中应注意的问题, 熟悉使用到的仪器设备原理、构造和操作技巧。在实验过程中分工合作, 高效完成所有测试工作, 所有数据汇总在一起完成一个实验目标(表5)。对于教师来说, 实验课开始之前的各种预习资源的准备、实验课上的引导、课后的交流互动都是非常必要的。

表5 实验环节及时间分配

时段	工作	用时
课前	了解实验内容	5 min
课前	了解仪器结构与工作原理	15–20 min
课前	学习工作站操作	15–20 min
课中	实验操作	180 min
课后	实验数据处理	20 min
课后	撰写实验报告	30 min
课后	PPT答辩及内容分享	时间另定

7 实验安全须知

- (1) 本实验使用了氢气, 要注意用气安全, 测试完毕后立即关闭氢气。
- (2) 本实验所用气相色谱仪进样口、柱温箱都有很高的温度, 要防止烫伤。
- (3) 本实验使用了微量进样针, 使用时要注意防止刺伤。
- (4) 样品有一定挥发性, 要戴手套操作, 尽量在通风橱中操作。
- (5) 测试完毕后将所有物品收拾好, 仪器调至待机状态。

8 结语

研究生仪器分析实验可以作为本科生实验和研究生将来科研工作的一个桥梁, 除了掌握各种仪器技能之外, 还要让学生快速进入科研状态, 从原有的“手把手教”转变为“敢于上手、敢于独立思考、敢于探索”的状态。本实验完成了一个目标导向式教学设计, 培养了学生的科研技能和思维能力, 为他们将来的科研工作打下了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 吕燕. 大学化学, **2022**, 37 (4), 2107077.
- [2] 高雅, 李友明, 罗燕, 曲章义. 现代药物与临床, **2021**, 36 (7), 1537.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [4] 谭东宇, 王静宇, 康伟聪, 杨阳, 杨桢. 中国实验方剂学杂志, **2019**, 25 (21), 212.
- [5] 赵洋洋, 郭玉洪, 黄汕梅, 银帮巧, 唐耀平. 南京中医药大学学报, **2021**, 37 (1), 150.
- [6] 张英睿, 王建, 董泰玮, 陈念, 胡琼丹, 樊亚梅. 中成药, **2020**, 42 (12), 3236.
- [7] 杨彩霞, 张秋菊, 徐名刷, 张卫平, 杨雪, 荔淑楠, 王引权. 甘肃中医药大学学报, **2018**, 35 (4), 96.
- [8] 苏坤莲, 凡永杰, 刘原, 岳桂华, 郑景辉, 王庆高, 刘锐, 唐耀平. 辽宁中医杂志, **2018**, 45 (9), 2001.
- [9] 汪宏锦, 吴俊杰, 薛强, 张继芬, 徐晓玉. 中国中药杂志, **2017**, 42 (11), 2200.
- [10] 刘养凤, 张军平, 张伯礼, 范祥, 于春泉, 李玉红, 王晓晖, 姜智浩. 中国中医药信息杂志, **2004**, No. 2, 122.
- [11] 尚坤, 李敬文, 常美月, 孙云龙, 毕莹, 张欣. 吉林中医药, **2018**, 38 (4), 439.
- [12] Tang, S.; Wang, A.; Yan, X.; Chu, L.; Yang, X.; Song, Y.; Sun, K.; Yu, X.; Liu, R.; Wu, Z.; *et al.* *Drug Deliv.* **2019**, 26, 700.