

紫外-荧光检测器串联高效液相色谱法测定维生素B₂片含量的实验设计

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: 设计一种紫外检测器(UVD)与荧光检测器(FLD)串联的高效液相色谱法(HPLC)测定维生素B₂片含量的方法, 并应用于实验教学。该实验方案能克服常规HPLC法(单一检测器)存在的缺陷, 同时实验过程中学生不仅掌握了HPLC的操作, 而且能了解UVD和FLD的原理及应用, 利于培养学生的综合检测能力和拓展思维能力。

关键词: 高效液相色谱法; 紫外-荧光双检测器; 维生素B₂片; 含量测定; 实验教学

中图分类号: G64; O657.7+2

Experimental Design for HPLC Determination of Vitamin B₂ in Tablets via UVD-FLD Connected in Series

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: The high performance liquid chromatography (HPLC) method of UV detector-fluorescence detector (UVD-FLD) connected in series for the determination of vitamin B₂ in tablets was designed as a teaching experiment. This method can overcome the limitations of common HPLC by a single detector. Through the application of this method for experimental teaching, students could not only master the basic theory and operation of HPLC, but also understand the principles and functions of UVD and FLD. Furthermore, it also improved the undergraduate students' experimental skill and comprehension.

Key Words: HPLC; UV detector-fluorescence detector; Vitamin B₂; Content determination; Laboratory teaching

维生素B₂也称核黄素(化学结构见图1), 缺乏可引起口角炎、舌炎、贫血等^[1]。维生素B₂广泛参与机体各种物质和能量代谢, 是许多酶系统的重要辅基组分, 也是婴幼儿配方乳粉中的一个重要营养指标^[2]。

由于维生素B₂结构中含共轭双键, 既有紫外吸收又有荧光特性, 故常采用紫外分光光度法^[3]、荧光分光光度法^[4]和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[5]进行含量测定。紫外分光光度法和荧光分光光度法由于不分离样品, 所含微量杂质会影响测试结果; 而HPLC法利用色谱柱分离后再进行测定, 能排除杂质干扰, 但常规HPLC法一般只采用单一检测器(紫外), 对

收稿: 2022-11-23; 录用: 2023-01-03; 网络发表: 2023-01-31

*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)

检测灵敏度会有影响。因此采用串联双检测器的HPLC法,对维生素B₂片的含量测定具有更高的灵敏度^[6]。

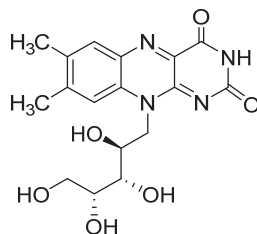


图1 维生素B₂的结构式

仪器分析实验是我校医学检验专业学生的一门重要课程,教学目的是了解仪器的构造、掌握仪器的性能 and 操作方法,并为后续检验专业实践打下基础。基于此目标,我们将与专业关联度不大的“HPLC法测定槐角提取液中槐甙的含量”实验^[7],改为“HPLC法检测维生素B₂片的含量”。实验方案设计中,从提高学生兴趣、培养其科学思维和创新能力的目标出发,将高广谱性可变波长紫外检测器(variable wavelength UV detector, UVD)和高特异性荧光检测器(fluorescence detector, FLD)串联应用于HPLC法中,实验中学生不仅能掌握两种检测器的原理和操作,而且通过对紫外和荧光色谱图测试结果差异性的比较学习,能拓展学生对现有知识的应用,提高学生发现问题、解决问题的能力,进而提高其创新能力^[8,9]。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

仪器:高效液相色谱仪(Agilent1100,美国Agilent,配UVD/FLD)。XS105电子分析天平(Mettler Toledo,瑞士),USC-302超声波清洗仪(上海波龙电子设备有限公司),刻度移液管,棕色容量瓶(500 mL, 50 mL, 10 mL),石英玻璃比色皿(Q),普通玻璃比色皿(G)。色谱柱(ZORBAX Eclipse Plus C18柱 4.6×100 mm, $3.5 \mu\text{m}$),纯水仪(Thermo)。

试剂:维生素B₂标准品(上海展云化工有限公司,含量97.5%–102.0%),维生素B₂药片(南京白敬宇制药有限责任公司,产品批号:200603)。乙腈(HPLC级,美国TEDIA),乙酸(HPLC级,美国TEDIA)。

1.2 溶液配制

(1) 储备液配制:准确称取10.00 mg维生素B₂标准品,溶于适量1%乙酸溶液(超声避光),转入500 mL棕色容量瓶中,用1%乙酸溶液定容至刻度,得 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。再移取此溶液2.50 mL于50 mL棕色容量瓶中,用1%乙酸溶液定容至刻度,得 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液,置于阴暗处。

(2) 系列标准液配制:取4个10 mL棕色容量瓶,避光下分别移入2.00、4.00、6.00、8.00 mL储备液,用1%乙酸溶液定容至刻度,配成0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准液。

(3) 样品液配制:避光条件下,称取4片维生素B₂药片总重为266.10 mg(平均每片重66.53 mg)。将维生素B₂药片置于研钵中研细,称取约10.00 mg粉末于50 mL棕色容量瓶中,加入40 mL 1%乙酸溶液,超声溶解,用1%乙酸溶液定容至刻度。移取此溶液2.00 mL于50 mL棕色容量瓶中,用1%乙酸溶液稀释定容至刻度。用一次性过滤针吸取0.8 mL溶液,0.22 μm 微孔过滤膜过滤至棕色样品瓶中,得样品液供测试用。

1.3 色谱条件

色谱柱为ZORBAX Eclipse Plus C18柱(4.6×100 mm, $3.5 \mu\text{m}$),流动相为1%乙酸溶液-乙腈(82:18, V/V),流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;紫外检测波长268 nm;荧光检测激发波长274 nm、发射波长523 nm,柱温 20°C ;进样量 $10 \mu\text{L}$;PMT-GAIN为16。

2 实验结果和讨论

2.1 激发波长和发射波长的优化

按“1.3”中色谱条件,取浓度为 $0.60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 维生素B₂标准液,做荧光发射光谱图和激发光谱图的试验,进行发射光谱曲线及激发光谱曲线测试,从图上求得维生素B₂的最大发射波长和最大激发波长: $\lambda_{\text{Em}} = 523\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Ex}} = 274\text{ nm}$ 。

2.2 专属性考察

分别取空白液、标准液($c = 0.60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和样品液,按“1.3”色谱条件,分别测定后记录色谱图。图2、图3分别为UVD、FLD的色谱图。

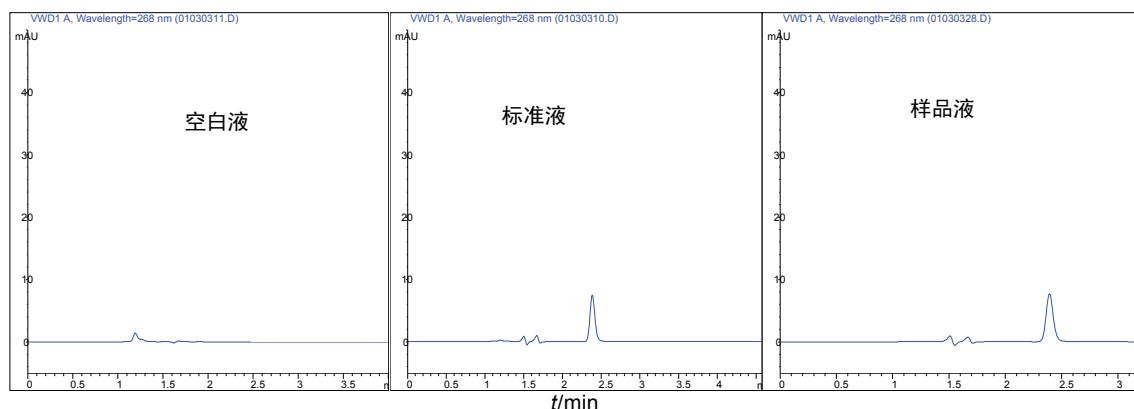


图2 紫外检测器的色谱图

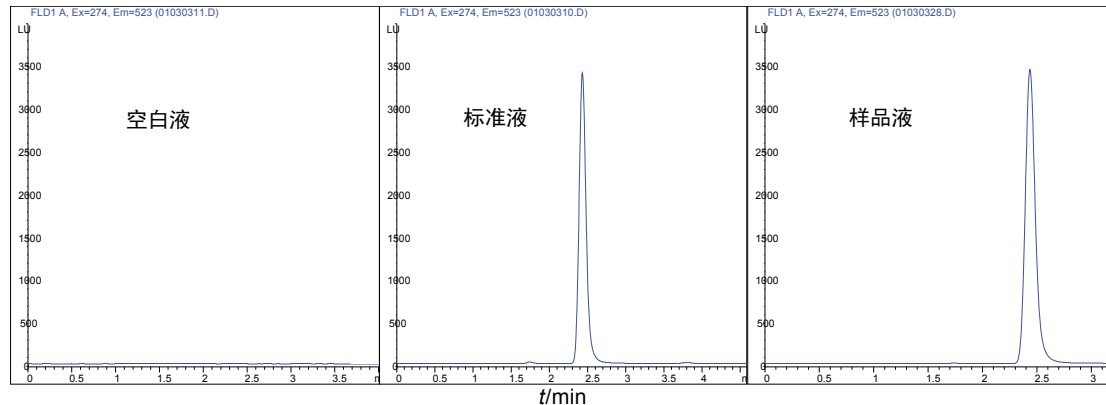


图3 荧光检测器的色谱图

由图2和3可知,维生素B₂在UVD和FLD中出峰时间分别是2.38 min和2.43 min (FLD串联在UVD后面,故出峰时间不同)。维生素B₂能被完全分离,且峰形良好,空白不干扰待测组分测定,样品液无其他杂质峰干扰。表明专属性满足方法学验证要求。从色谱图上可发现,相同浓度样品在FLD中峰高达3500 (Y轴标尺范围: 0–4000);而在UVD中峰高只有8 (Y轴标尺范围: 0–50),说明荧光检测器灵敏度远高于紫外检测器。

2.3 仪器精密度考察

取浓度为 $0.60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 维生素B₂标准液,按“1.3”色谱条件连续进样5次。HPLC结果显示,UVD中维生素B₂保留时间相对标准偏差(RSD)为0.24%,峰面积RSD为0.075%。FLD中维生素B₂保留时间RSD为0.26%,峰面积RSD为0.35%。表明仪器精密度达到HPLC质量分析方法学认证要求。图4中蓝色为UVD色谱峰、红色为FLD色谱峰。

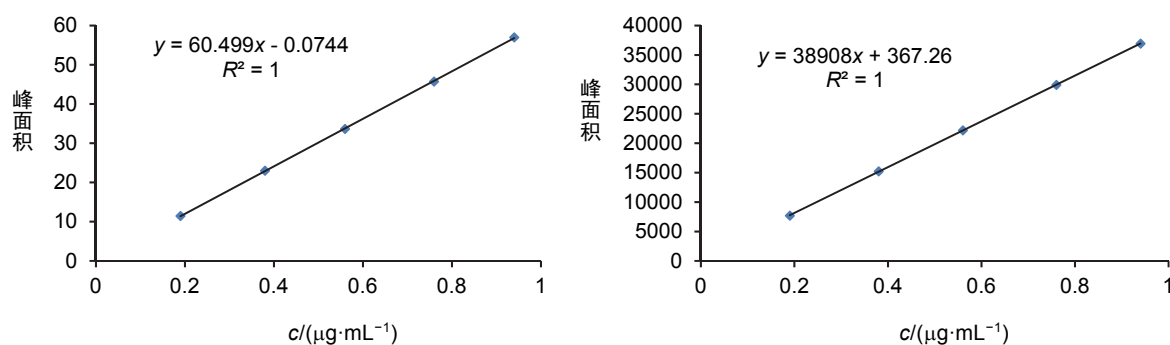


图4 五次重复进样的色谱图

电子版为彩图, 后同

2.4 标准曲线及样品测定

按“1.3”色谱条件, 分别测定系列标准液, 以浓度(x)与对应色谱峰峰面积(y)进行线性拟合。由图5可见, 在浓度 $0.20\text{--}1.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好, 回归方程分别为 $y = 60.499x - 0.0744$, $R^2 = 1$ (UVD); $y = 38908x + 367.26$, $R^2 = 1$ (FLD)。

图5 维生素B₂的标准曲线

按“1.3”色谱条件测定样品液, 利用回归方程计算样品液中维生素B₂的浓度, 换算后得每片药片中维生素B₂含量为 4.64 mg (表1), 与药片标示含量(5.0 mg)接近。

表1 某组学生维生素B₂含量测定的结果

维生素B ₂ 标准液 $c/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	UVD峰面积 A_{UVD}	FLD峰面积 A_{FLD}	回归方程	回归方程计算的样品 浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	每片药片中维生 素B ₂ 含量*/mg
0.19	11.46	7692.32	$Y_{\text{UVD}} = 60.499X - 0.0744$	0.57	4.64
0.38	23.02	15228.5			
0.56	33.66	22191.5			
0.76	45.72	29906.4			
0.94	56.98	36927.6	$Y_{\text{FLD}} = 38908X + 367.26$	0.57	4.64
样品	34.61	22459.0			

*每片药片中维生素B₂含量计算: 回归方程计算的样品浓度(0.57) $\times 50 \times 50 \times$ 每片药片质量(66.53) $\div$ 实称药粉质量(10.22) $\div 2 \div 1000$

2.5 维生素B₂稳定性考察

取浓度为 $1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准液2份,分别加入玻璃比色皿和石英比色皿中,置于窗台上10、20、30 min后取样测试(晴天, $15\ ^\circ\text{C}$),比较色谱峰面积的变化。发现样品置于两种比色皿中的变化无差异,维生素B₂的主峰均随时间增加而变小,而3.03 min出现的杂质峰随放置时间增加而变大。实验证实,维生素B₂溶液置于玻璃或石英比色皿中,都会发生光降解反应,即紫外光和可见光下维生素B₂都不稳定,因此,维生素B₂应避光放置。

3 实验安排

课堂实验中面对的学生来自不同地区,存在化学基础知识及学习能力上的差异,给教学过程带来一定的困扰。我们采用了启发式、问题式和讨论式等以学生为中心的教学模式,使不同知识层次的学生能自主选择时间、地点及次数进行学习,从而提高总体教学效果^[10]。在本实验设计中,课前先将关于仪器构造原理及操作方法的介绍等微视频和针对性的思考题上传至校内网络教学平台(PC端)及“学习通”超星平台(手机端)上供学生预习,教师通过在线答疑、逐步引导学生找出解决问题的思路和方法,让学生体会到自主学习的快乐^[11]。课内操作实验完成后,安排学生写实验报告时,进行样品光照稳定性的互动交流,进一步培养学生的科研思维和创新意识。

4 教学效果评价

通过三年的教学实践(医学检验本科专业),结果表明,所设计的分析方法稳定、实验效果突出,完全适合于仪器分析实验教学。学生普遍认为该实验贴近生活,有趣味并能学到理论课上接触不到的知识,如“通过此实验证实了维生素B₂在日光中的不稳定性”,拓展了许多知识面。

实验前完成思考题的过程中,学生通过查阅相关文献资料、与教师在线互动,既达到预习效果又能提升分析问题、解决问题能力。课堂教学中,由于前期学习准备充分,学生能很熟练地操作仪器,获得良好的实验成果。我们针对3届学生共150人发放问卷调查,结果显示,对实验效果的总体满意率达91%(图6)。其中非常满意为27%,满意为64%,一般为9%。

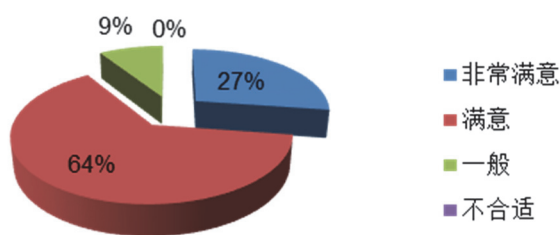


图6 问卷调查结果

5 结语

荧光分析法因具有更高的灵敏度,因而被广泛应用于生命科学、医学及药物分析等领域中^[12-14]。此实验设计将荧光检测器与紫外检测器串联应用于医学检验专业的实验教学中,既提高了HPLC法检测的灵敏度,又能通过比较法学习强化学生对知识理解力,拓展学生的思维,同时也为学生在未来工作中,能熟练操作各种分析仪器打下良好的基础。

本文也为其他院校的教师推广一个提高仪器分析实验教学的方法。利用科研上闲置或使用率低的仪器,通过校资产管理处的调拨信息,将相关仪器与原有的教学仪器进行整合,扩大教学资源,提高教学质量和教学效率。本文利用教研室长期闲置的荧光检测器与原HPLC上的紫外检测器串联,通过选择具有荧光的维生素B₂为检测样品。通过这一过程,学生在不需要增加学时数和工作量的情

况下,学习了二种检测器的使用,了解了各自的性能特点。进行比较学习更能提高学生的学习兴趣和理解能力。

两种检测器联用在实际工作也有其优越性,当样品(尤其是生物样品)需要监控测定的组分是多个,其中有些有紫外吸收、有些有荧光发射,通过检测器串联的方法,使每个组分都能得到最佳的检测,尤其是具有荧光的低含量组分,在荧光检测器中既可消除复杂的背景干扰,又能很好地被检测出来,并且一步就完成,节省时间,提高效率。通过本实验,学生可初步了解被检测样品特点和检测器的选择的关系,为其未来科研工作提供很好的帮助。

检验专业的医科生,更需要具备一个理科生的素质。动手能力,以及操作各种大型仪器检测数据的能力对他们尤其重要。针对检验专业的学生,不仅实践了串联检测器在HPLC中的应用,在教学过程中也拓展了质谱技术及液质联用技术的知识,并在课程网站上发布了大量相关知识及虚拟实验。扎实的理论知识和技术上的活用是我们培养高素质人才的目标。

不同厂家生产的维生素B₂片含量存在差异,国家药典对其含量有一定要求,因此,设计一种准确、快速的含量检测方法具有实际意义,此实验设计方案也可用于药厂对其产品的质量控制。

参 考 文 献

- [1] 房冉,王晗,陈玉双,张佳茹,郑玉林. 中国现代应用药学, **2020**, 37 (22), 2764.
- [2] 张隆龙,王海燕,胡越,曹进. 食品安全质量检测学报, **2019**, 10 (1), 129.
- [3] 李兰水,周凤盈. 中国药师, **2013**, 16 (11), 1745.
- [4] 程春英,尹学博. 实验室研究与探索, **2014**, 33 (12), 159.
- [5] 陈华龙,刘旺培. 海峡药学, **2016**, 28 (2), 63.
- [6] 闫小华,张毕奎,李焕德,马鸿宪. 色谱, **2000**, 18 (5), 432.
- [7] 谢一凡,刘慧中,杨若林,蔡玉兴,金玉杰,李宁. 化学教育, **2017**, 38 (2), 52.
- [8] 薛冰纯,吴雅琴,刘二保. 化学教育, **2015**, 36 (10), 22.
- [9] 江玉亮,毕文韬,杜江燕,杨静. 大学化学, **2020**, 35 (2), 27.
- [10] 王丽梅,张秀玲,邱玉娥,刘明成. 化学教育, **2014**, 35 (8), 40.
- [11] 李俊波,白慧云,张鑫鑫,杨燕强,杨金香. 化学教育, **2019**, 40 (12), 44.
- [12] 陶建峰,陈明惠,郑刚,王成,宋云霄. 光学技术, **2019**, 45 (1), 124.
- [13] 徐小兰,黄志华,余跃华,杨蓉,王枫. 中国优生与遗传杂志, **2017**, 25 (4), 118.
- [14] 梁璋仪,赵新生. 大学化学, **2005**, 20 (2), 1.