

# 维生素 B<sub>2</sub> 含量测定的综合型实验设计

张 岩, 陈 岩, 周立敏\*

(中国海洋大学化学化工学院, 青岛 266100)

**摘要:**目的 以实践创新能力培养为核心, 通过设计维生素 B<sub>2</sub> 含量测定的综合型实验, 激发学生对仪器分析实验的兴趣, 提升学生运用理论知识创造性开展实验研究的综合能力素质。方法 设计维生素 B<sub>2</sub> 含量测定综合实验, 让本科生探索荧光法测维生素 B<sub>2</sub> 含量的原理、流程及操作, 探讨不同 pH 和光照条件下其吸收光谱与荧光光谱变化。结果 确定荧光法测定维生素 B<sub>2</sub> 的最佳实验条件, 使学生熟练地掌握相关仪器的工作原理与构造。结论 该综合实验达到预定目标, 有效地提升了学生的实践能力与创新思维。  
**关键词:** 维生素 B<sub>2</sub>; 综合型实验; 仪器分析实验

## 0 引言

高校作为国家教育强国和人才强国的主要阵地, 不仅要承担科学探索、学术研究和知识创新的任务, 为发展提供前沿科技成果, 推动科学进步和社会发展, 更重要的是, 还要为社会培养一批又一批具有专业技能、创新和逻辑思维能力的高素质创新人才。这就需要对包括高校实验教学在内的大学课程进行不断的改革和创新, 从而培育出适应社会高速发展的高素质人才。

高等学校仪器分析实验是大学化学教学的重要内容, 既让学生充分了解和常见分析仪器的工作原理、仪器构造和分析方法等理论知识, 还能为将来仪器分析工作领域培养一批知识储备扎实、专业素质高、实践能力强的毕业生<sup>[1-4]</sup>。过去一段时间, 高等学校仪器分析实验教学一直沿用的是传统的教师讲授、学生接收的教学模式。这种模式虽然可以培养学生的基本实验操作能力, 但普遍存在学生学习兴趣和积极性差、创新性设计不够强等问题<sup>[5-7]</sup>。为此, 我们在仪器分析实验教学中更加注重融入创新实验设计, 更加注重综合型知识掌握运用, 更加注重激发学生对深层次仪器结构和实验原理的兴趣, 开展了以维生素 B<sub>2</sub>(VB<sub>2</sub>)含量测定的综合型实验为代表的仪器分析实验教学。

VB<sub>2</sub> 易溶于水而不溶于乙醚等有机溶剂, 在中性或酸性溶液中稳定, 遇光照易分解, 对热稳定。VB<sub>2</sub> 在特定波长的激发下会发出荧光, 且荧光强度与 VB<sub>2</sub> 的浓度成正

比。这一原理为荧光法定量分析 VB<sub>2</sub> 提供了理论基础。近年来, 国内外学者在荧光法测定 VB<sub>2</sub> 方面取得了很多进展<sup>[8-10]</sup>, 建立了荧光法测定 VB<sub>2</sub> 的详细步骤。但具体实践中仍存在问题, 比如, 受样品处理不当、仪器参数设置不合理、样品受到光热以及酸碱度的影响等, 都有可能对 VB<sub>2</sub> 的结果出现偏差。本研究旨在通过综合型实验设计, 为荧光法测定 VB<sub>2</sub> 提供更加准确、更为可靠的方法, 特别是在实验设计过程中, 能够有效激发学生对实验原理和仪器运用的思考、求证, 实现对综合实验知识的整合、拓展, 进而培育学生的创新思维能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

盐酸、氢氧化钠、冰醋酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 商品化 VB<sub>2</sub> 片剂, F-4700 型荧光分光光度计(日立), T9 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 酸度计(上海雷磁)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 VB<sub>2</sub> 储备液的配制

准确称取 10.0 mg VB<sub>2</sub>, 用适量 1% 的醋酸溶液溶解, 然后转移至 1000 mL 棕色的容量瓶中, 用 1% 的醋酸溶液定容, 配制成 10 mg/mL 的储备液避光保存。

#### 1.2.2 VB<sub>2</sub> 标准溶液的配制

在六支 25 mL 比色管中, 避光下分别加入 0.00、

基金项目: 中国海洋大学本科教育教学一般项目(编号: 2024JY027)。

第一作者: 张岩, 硕士, 实验师, 研究方向为分析化学实验教学与实验室管理。

\* 通信作者: 周立敏, 博士, 高级实验师, 研究方向为分析化学实验教学与实验室管理。E-mail: zlm@ouc.edu.cn

0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 的 VB<sub>2</sub> 储备溶液, 各加入 2.00 mL 冰醋酸(体积比 1:1), 加水稀释至刻度, 摇匀, 避光保存。

### 1.2.3 样品的处理

避光条件下, 称取十片 VB<sub>2</sub>(0.0607 g/片), 进行研磨处理, 从研细的粉末中称取一片的质量 0.0607 g, 将其溶解在 50 mL 的 1% 的醋酸中, 超声 10 min 使其溶解。取 5 mL 溶解的 VB<sub>2</sub> 溶液, 转移至 1000 mL 棕色的容量瓶中, 用 1% 的醋酸溶液定容, 避光保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 VB<sub>2</sub> 最佳激发波长和发射波长的选择

VB<sub>2</sub> 由异咯嗪衍生而成, 其结构中含有苯环及多个共轭双键, 在紫外和可见区会出现紫外吸收光谱和荧光发射光谱。依据荧光光谱产生的作用机理, 当分子吸收特定能量的光子后发生电子跃迁, 处于激发态的电子再返回基态时会发射荧光, 且发射峰位置具有特征性, 不会随着激发波长的改变而变化。确定发射波长后, 反向扫描激发光谱得最佳激发波长值, 实验结果见图 1。由图可知, VB<sub>2</sub> 的最大激发波长和最大荧光波长为:  $\lambda_{\text{ex}}=443 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=523 \text{ nm}$ 。

### 2.2 酸度对 VB<sub>2</sub> 紫外吸收和荧光光谱的影响

Drössler 等<sup>[9]</sup> 对 VB<sub>2</sub> 进行研究时发现溶液的酸碱度

对其紫外吸收和荧光特性有明显的影响。在不同酸碱环境中, VB<sub>2</sub> 的紫外吸收光谱均呈现出四个显著的吸收峰。这些峰中包括在紫外区由苯环所产生的 B 带和 E 带, 另外两个吸收峰则位于近可见区和可见区, 结果见图 2。从图 2 中可以看出 B 带和 E 带的波长和吸光度受酸度的影响较小。在盐酸和醋酸中, VB<sub>2</sub> 的吸收光谱几乎没有变化, 而在碱性溶液中, VB<sub>2</sub> 最大吸收波长从 374 nm 向短波长移动。这主要是由于 VB<sub>2</sub> 在 pH 介于 0.2 至 9.5 的范围内主要以中性形态存在, 而在强酸和强碱中分别以阳离子态和阴离子态存在<sup>[10]</sup>。这种不同的存在形式导致了 VB<sub>2</sub> 紫外吸收光谱的相应变化。

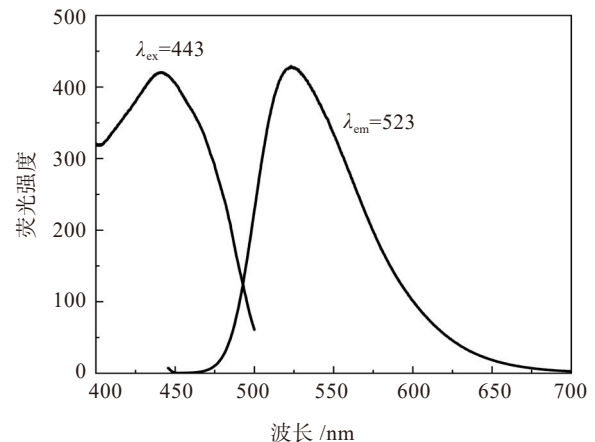
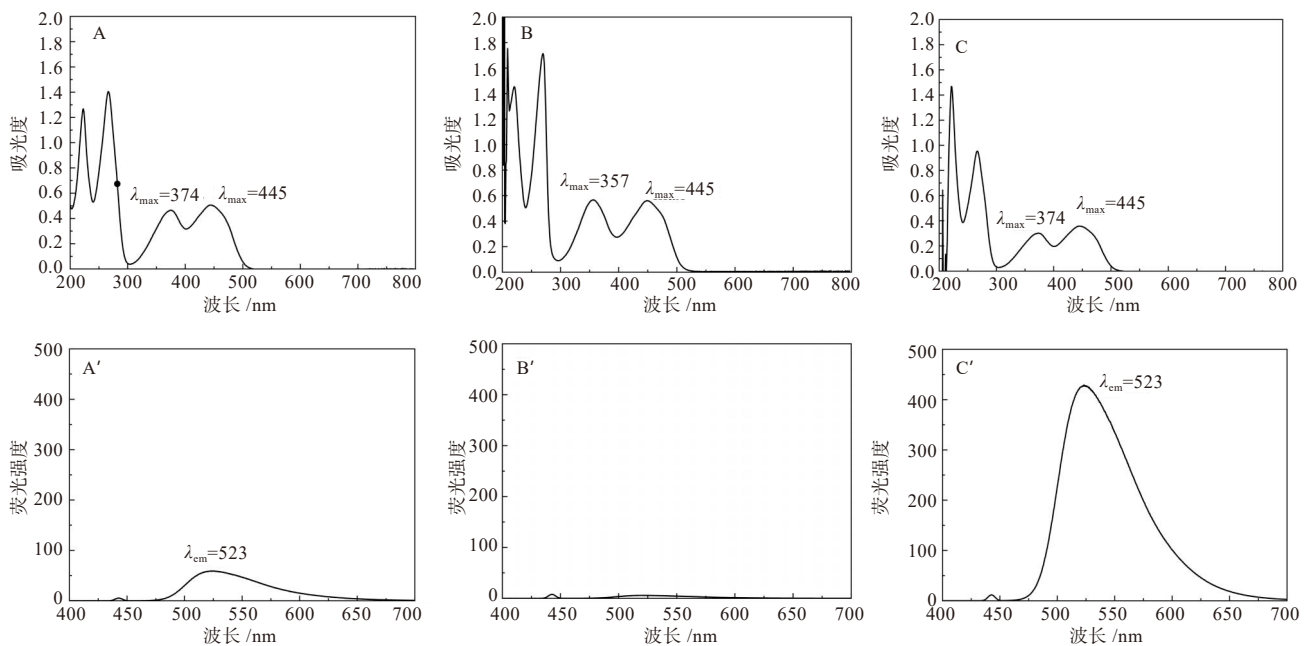


图 1 VB<sub>2</sub> 激发波长和发射波长的选择



注: A 和 A' 为 0.1 mol/L HCl; B 和 B' 为 0.1 mol/L NaOH; C 和 C' 为 0.1 mol/L HAc, 荧光的激发波长为 443 nm。

图 2 不同酸度下 VB<sub>2</sub> 的紫外吸收光谱(A~C)和荧光的谱图(A'~C')

从图 2 中可以看出, 荧光光谱受酸碱度的影响更加明显。在激发波长为 443 nm 时, 醋酸中的荧光强度最强,

而在氢氧化钠溶液中几乎无荧光。这可能是由于碱性条件下 VB<sub>2</sub> 发生光分解, 转化为光黄素或其他无荧光物质, 导

致荧光强度降低<sup>[11]</sup>。

为了深入探究 pH 对 VB<sub>2</sub> 的影响, 我们采用浓度为 10 mg/L VB<sub>2</sub> 的溶液, 选择  $\lambda_{\text{ex}}=443 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=523 \text{ nm}$ , 对不同 pH 条件下的 VB<sub>2</sub> 荧光强度进行了测定, 具体结果如图 3 所示。当 pH 值从 4.0 逐步提升至 6.0 时, VB<sub>2</sub> 荧光强度缓慢增大, 直至 pH 达到 6.5, 荧光强度达到峰值。然而, 当 pH 超过 6.5 时, 荧光强度逐渐减弱, 当 pH 达到 11 强碱性环境时, VB<sub>2</sub> 荧光强度几乎完全消失。实验结果表明, VB<sub>2</sub> 在碱性溶液中表现出明显的不稳定性, 而在酸性环境中则相对更为稳定<sup>[12]</sup>。因此, 我们选择了 pH=6.5 的醋酸环境作为最佳的测定条件。

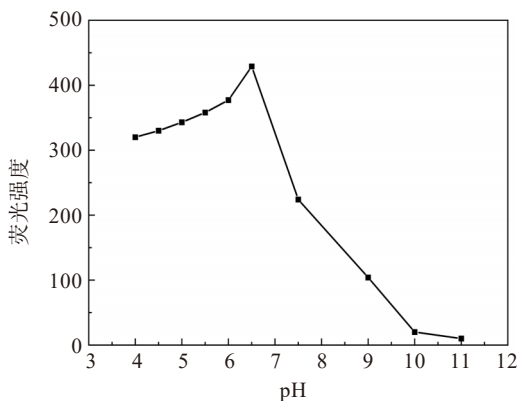


图 3 不同 pH 下 VB<sub>2</sub> 的荧光强度的变化曲线

### 2.3 光照对 VB<sub>2</sub> 紫外吸收和荧光光谱的影响

VB<sub>2</sub> 在光照条件下容易发生光解。为了探讨光照对 VB<sub>2</sub> 光谱特性的具体影响, 我们取 pH=6.5, 浓度为 10 mg/L 的 VB<sub>2</sub> 溶液, 分别在冷藏避光、室温避光和室温日光三种条件下, 选择  $\lambda_{\text{ex}}=443 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=523 \text{ nm}$ , 每小时测量一次荧光强度, 结果如图 4 所示。从图可以看出, 在冷藏避光和室温避光的条件下, VB<sub>2</sub> 的荧光强度 5 h 内相对稳定, 变化不大。但是, 在室温日光的环境中, VB<sub>2</sub> 的荧光强度却显著下降。经过 5 h 的照射后, 其荧光强度降低了 61%。

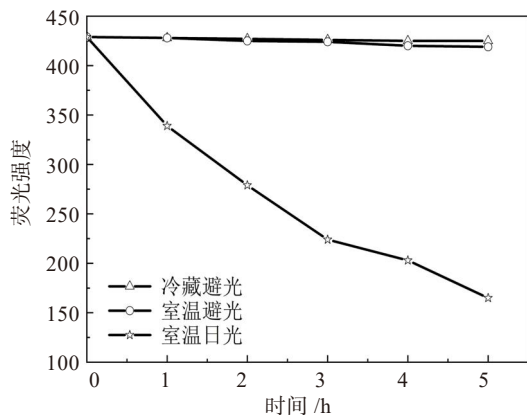
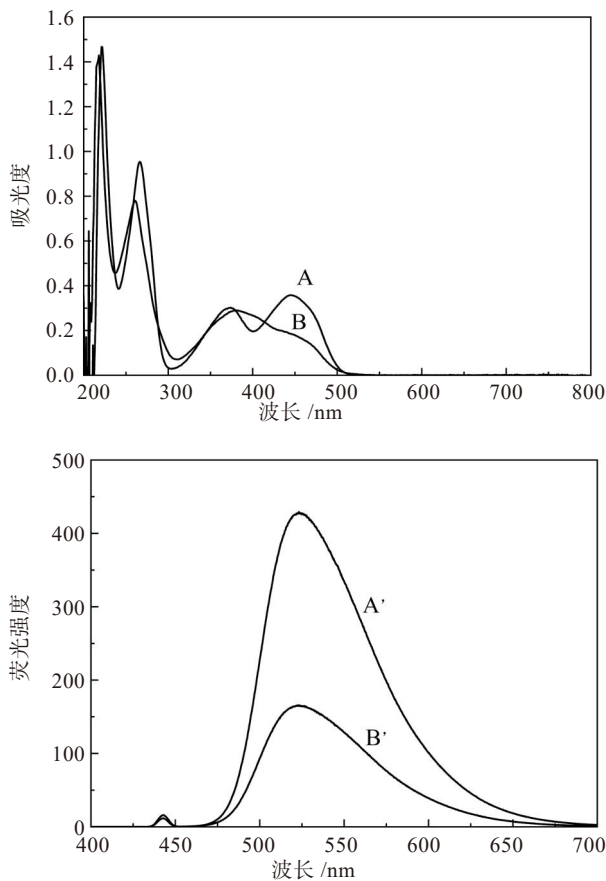


图 4 不同光照条件下 VB<sub>2</sub> 的荧光强度的变化曲线

为了更深入地了解 VB<sub>2</sub> 在光照条件下的变化过程, 我们分别在光照前后对其进行了紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱的测定, 结果见图 5。在有机化合物的光谱特征里, E 带与 B 带主要源于分子中苯环的  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁, 其光谱特性能够直观反映苯环的结构状态。对比光照前后的吸收图谱, E 带与 B 带并未发生显著的位移、强度改变或者峰形变化。这说明光照条件并未对 VB<sub>2</sub> 分子中苯环的共轭电子体系以及整体结构造成明显的分解。光照 5 h 后 445 nm 处的吸收峰消失, 而在 383 nm 处出现了新的吸收峰。这一结果说明光照导致了 VB<sub>2</sub> 的分解, 使得除苯环以外的共轭结构受到破坏。同时 VB<sub>2</sub> 光照后荧光强度大大减弱, 且并未观察到新的荧光物质的生成。这一实验结果进一步印证了 VB<sub>2</sub> 对光的敏感性。因此, 在进行相关实验时, 我们必须确保样品的新鲜配制, 并在整个实验过程中严格保持避光条件。



注: A 和 A' 为光解前; B 和 B' 为光解 5 h 后。

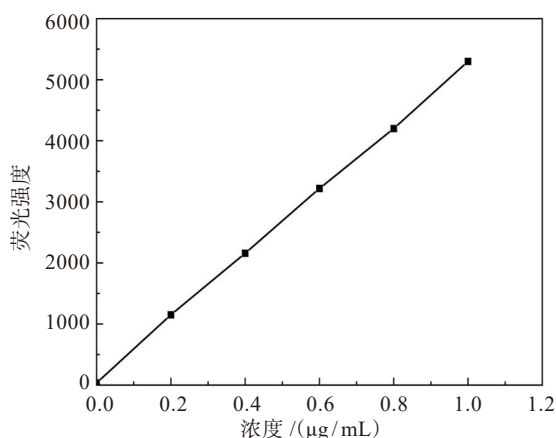
图 5 VB<sub>2</sub> 的紫外吸收光谱(A, B)和荧光光谱(A', B')

### 2.4 药品 VB<sub>2</sub> 含量的测定

选择  $\lambda_{\text{ex}}=443$ ,  $\lambda_{\text{em}}=523$  调零后, 测试 pH=6.5 醋酸配制的 VB<sub>2</sub> 的标准溶液的荧光强度见表 1, 做工作曲线见图 6。测得样品的浓度为 0.478 mg/mL, 折合成每个药品的含量为 4.78 mg, 与药品的含量 5 mg 接近。

表 1 VB<sub>2</sub> 标准溶液的荧光强度

| VB <sub>2</sub> 浓度 / (mg/mL) | 0  | 0.2  | 0.4  | 0.6  | 0.8  | 1.0  | 样品   |
|------------------------------|----|------|------|------|------|------|------|
| $I_f$                        | 35 | 1150 | 2558 | 3219 | 4200 | 5300 | 2562 |

图 6 VB<sub>2</sub> 的标准曲线

### 3 讨论与结论

VB<sub>2</sub> 含量测定是我校化学化工学院面向化学专业开设的常规实验教学项目之一, 综合型实验设计不仅包含 VB<sub>2</sub> 稳定性影响因素的考察, 还涉及 pH 计、紫外-可见分光光度计和荧光分光光度计的应用, 提高了学生实际操作的能力, 加强了对知识的掌握。

本实验主要探究了不同 pH 及光照条件对 VB<sub>2</sub> 的影响, 并评估了综合型实验对学生的作用。在酸度影响方面, 不同 pH 下 VB<sub>2</sub> 以不同形态存在, 对其吸收光谱及荧光发射光谱产生一定的影响。实验数据表明, 在 pH=6.5 的醋酸环境中, VB<sub>2</sub> 荧光强度达到最强。结果说明特定酸度环境是 VB<sub>2</sub> 呈现高荧光的关键条件。光照条件对 VB<sub>2</sub> 浓度的影响显著, 在冷藏避光和室温避光条件下, VB<sub>2</sub> 荧光强度保持稳定, 当暴露于室内自然光下, VB<sub>2</sub> 的荧光强度迅速下降, 经过 5 小时的照射后, 其荧光强度降低了 61%。说明光照作用能够破坏其荧光结构, 导致荧光强度减弱。结果说明在储存和使用 VB<sub>2</sub> 过程中, 避免光照的重要性, 也为相关实验操作和实际应用提供了关键的注意事项。

综合型实验的开展, 对学生专业素养提升效果显著。它不仅让学生全面且深入地理解了荧光法测定 VB<sub>2</sub> 含量的原理, 还通过仪器操作训练提高了学生的实验操作技能, 如仪器参数的精准设置、样品的规范处理等。同时, 在对实验数据的分析与讨论过程中, 极大地锻炼了学生分析问题、解决问题的能力, 进一步巩固了理论知识与实践操作

之间的联系。

通过综合型实验, 学生能够更深入地掌握专业知识, 并在实践中灵活运用所学, 为未来在科研或实际工作中解决复杂问题奠定了坚实基础, 以便更好地适应化学领域不断发展的需求。

### 参考文献

- [1] 黄军, 周颖琳, 吕占霞, 等. 适应创新性人才培养的仪器分析实验教学改革初探[J]. 大学化学, 2022, 37(4): 1-5.
- [2] 李宣东, 张红霞, 李欣, 等. 仪器分析实验助力拔尖人才培养的教学实践[J]. 大学化学, 2023, 38(5): 82-91.
- [3] 蔡向忠, 王秀红, 李银生. 改革仪器分析实验教学培养学生创新能力[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(11): 168-171.
- [4] 谷春秀, 周考文, 李亚秋. 仪器分析实验教学改革与实践[J]. 实验技术与管理, 2011, 28(3): 244-249.
- [5] 李振华, 苏琼, 孙初锋, 等. 面向创新实践能力培养的仪器分析四轮融合教学创新[J]. 大学化学, 2023, 38(9): 25-31.
- [6] 吴硕, 郭慧敏, 董校, 等. 面向拔尖创新人才培养的仪器分析课程建设与改革实践[J]. 大学化学, 2023, 38(2): 65-70.
- [7] 吉邢虎, 吴卫兵, 何治柯. 浅谈仪器分析实验教学的实践和体会[J]. 化学通报, 2015, 78(12): 1176-1178.
- [8] ZOU GAGH M, RIOS A. Supercritical fluid extraction as an online clean-up technique for determination of riboflavin vitamins in food sample by capillary electrophoresis with fluorimetric detection [J]. Electrophoresis, 2008, 29(15): 3213-3219.
- [9] DRÖSSLER P, HOLZER W, PENZKOFER A, *et al.* pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution [J]. Chemical Physics, 2002, 282: 429-439.
- [10] DRÖSSLER P, HOLZER W, PENZKOFER A, *et al.* Fluorescence quenching of riboflavin in aqueous solution by methionin and cystein [J]. Chemical Physics, 2003, 286: 409-420.
- [11] 程春英, 尹学博. 荧光法测定药品中维生素 B<sub>2</sub> 含量的综合型实验设计[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(12): 159-162.
- [12] 周丽丽, 胡北, 崔胜云. 荧光光谱法测定啤酒中核黄素的含量[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2012, 38(1): 78-82.