

荧光法测定菠菜焯水过程中维生素B₂的流失 ——荧光法测定维生素B₂的实验拓展

黄洋祺, 李誉, 李常耕, 朱颜, 孙维嘉, 范春涵, 李琰, 丁飞, 张晓光, 孔德明*

南开大学化学学院, 南开大学实验教学中心, 天津 300071

摘要: “荧光法测定维生素B₂ (VB₂)的含量”是本科生仪器分析教学中一个常用实验, 但存在实验内容偏少、学生锻炼不足等问题。菠菜是一种VB₂含量较高的绿色蔬菜, 但食用前焯水去除草酸的过程不可避免地造成VB₂的部分流失。本实验在证明荧光法可用于测定菠菜焯水过程中VB₂析出量的基础上, 提出将不同焯水时间下VB₂流失率的测定丰富到本科实验的教改思路。该思路不仅极大地丰富了原有的实验内容, 而且新颖有趣、贴近生活, 既可提升学生的学习兴趣, 又有助于帮助学生培养学以致用能力。

关键词: 实验教学改革; 荧光; 维生素B₂; 菠菜; 拓展实验

中图分类号: G64; O6

Fluorescent Detection of Vitamin B₂ Loss from Spinach during Blanching Treatment: Extended Experiment of Vitamin B₂ Detection by Fluorescence

Yangqi Huang, Yu Li, Changgeng Li, Yan Zhu, Weijia Sun, Chunhan Fan, Yan Li, Fei Ding, Xiaoguang Zhang, Deming Kong*

Experimental Teaching Center, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China.

Abstract: “Fluorescent detection of vitamin B₂ (VB₂)” is a commonly used experiment in undergraduate students’ instrumental analysis course; however, it provides limited experimental content and inadequate training for students. Spinach is a green vegetable with relatively high VB₂ content, but the blanching treatment, which is used to remove oxalic acid, inevitably results in the partial loss of VB₂. Herein, we demonstrate that fluorescent analysis can be used to determine the amount of VB₂ released from spinach during blanching treatment. Based on this, we propose a teaching reform idea of adding measurement of the time-dependent VB₂ loss rate during blanching to undergraduate experimental education. This would not only greatly enrich the original experimental content, but also make the experiment more interesting and relevant to human life, and improve students’ ability to apply what they have learned to practical problems.

Key Words: Experimental teaching reform; Fluorescence; Vitamin B₂; Spinach; Extended experiment

维生素B₂ (Vitamin B₂, 简称VB₂)是一种水溶性维生素, 是人体内很多重要酶的组成成分, 在维持人体代谢中起着重要作用。缺乏VB₂会影响人体细胞的生长和机体的生物氧化, 使代谢发生障碍, 导致口、眼和外生殖器部位的炎症, 如口角炎、唇炎、舌炎、眼结膜炎和阴囊炎等^[1-3]。由于人体自

身无法产生VB₂，只能通过食物等外界来源摄取，因此对食源性VB₂的研究具有重要意义。

VB₂的分子式为C₁₇H₂₀N₄O₆，拥有三个芳香环(图1)。分子的平面刚性结构赋予了VB₂较强的荧光性质，其最大的荧光发射波长大约在525 nm左右。“荧光法测定VB₂的含量”是很多大学仪器分析课程的常用本科教学实验^[4]。其基本的实验流程是在最佳的激发和发射波长下测定VB₂标准溶液的荧光强度，利用荧光强度与浓度的线性关系制作标准曲线。在相同条件下测定未知溶液的荧光强度，并利用制作的标准曲线计算出未知溶液中VB₂的含量。通过该实验，可以加深学生对分子荧光的理解，了解荧光光谱仪的基本结构，掌握仪器的基本使用步骤及荧光定量分析的基本操作，对于辅助仪器分析教学至关重要。但作为一个本科教学实验，其设计过于简单、实验内容偏少，学生往往很快就完成了全部实验内容。不仅使学生得不到充分的锻炼，而且无法凸显荧光分析法在人类生产和生活中的强大实际应用能力。为此，在原有实验内容的基础上开展进一步设计，拓展实验项目，开发内容更为丰富、且实验时间和操作难度适宜的本科教学实验，对于提升实验教学效果至关重要。

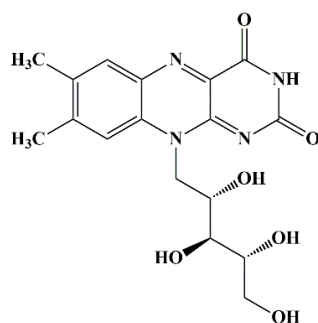


图1 VB₂的化学结构式

很多食物，包括动物肝脏、肉类、蛋类、奶及奶制品中都含有大量的VB₂。蔬菜也是人们获取VB₂的一个重要来源，部分蔬菜的VB₂含量如表1所示。菠菜是一种比较常见的蔬菜，每100 g菠菜中VB₂的含量大约为0.11 mg^[5]，属于VB₂含量较高的绿色蔬菜。但由于菠菜中含有大量的草酸(0.2–0.3 g/100 g)，食用之后会与人体内的钙、镁发生反应，生成草酸钙和草酸镁等难以消化的物质。不仅不利于人体健康，长期食用还有可能引发结石。因此，在食用前通常需要对菠菜进行焯水处理以去除草酸^[6]，这一过程不可避免地会造成VB₂的流失。本实验证明，利用荧光分析法可以考察菠菜焯水过程中VB₂的析出情况。相关实验有望作为目前本科教学实验的一个拓展，不仅可以丰富教学内容，而且使实验更加贴近于人们的实际生活。有助于提升学生的学习兴趣，加深对所学内容的理解。

表1 部分蔬菜中VB₂的含量(mg/100 g)

蔬菜	VB ₂	蔬菜	VB ₂	蔬菜	VB ₂
西兰花	0.13	苋菜	0.12	油菜	0.11
菠菜	0.11	马苋菜	0.11	韭菜	0.09
芥蓝	0.09	茼蒿	0.09	芹菜	0.08
空心菜	0.08	扁豆	0.07	缸豆	0.07
生菜	0.06	白菜	0.05	荷兰豆	0.04

1 实验部分

1.1 实验原理

荧光是一种光致发光现象。荧光物质分子在吸收了特定波长的紫外光或可见光能量之后，从基态跃迁至相应的激发态。在通过振动弛豫和内转化等非辐射途径损失掉一部分能量后，积累到第一

电子激发单重态的最低振动能级, 再从该能级向基态的各个振动能级跃迁, 产生分子荧光。在一定浓度范围内, 荧光强度(F)与荧光物质浓度(C)之间成正比关系($F = kC$), 借此可以进行定量分析。

能够发出荧光的物质通常具有刚性平面和大共轭结构。 VB_2 分子中由于存在由三个芳香环构成的共轭体系, 且结构刚性, 因此显示了良好的荧光性质。利用 VB_2 产生的荧光信号, 可以对菠菜焯水过程中释放出来的 VB_2 进行定量分析, 进而计算出该过程中 VB_2 的流失率。

1.2 试剂和材料

1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ VB_2 标准贮备液: 准确称取1.00 mg VB_2 , 将其溶解于含有1%乙酸的蒸馏水中。转移至1 L容量瓶, 并用含有1%乙酸的蒸馏水定容至刻度、摇匀。分装于棕色瓶中避光保存备用。

新鲜菠菜叶片: 购于当地菜市场。

1.3 实验仪器

Shimadzu RF-5301PC型荧光光谱仪(日本岛津)、电加热套、Sartorius电子天平(德国赛多利斯)、25 mL比色管、10 mL离心管、5 mL移液管、500 mL锥形瓶、移液器。

1.4 实验内容

1.4.1 VB_2 标准系列溶液的配制

准确移取0、0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 mL的 VB_2 标准贮备液于25 mL比色管中, 用蒸馏水稀释至刻度, 摇匀。

1.4.2 菠菜焯水实验

(1) 选取新鲜的菠菜叶片, 洗净, 用吸水纸去除表面水分, 晾干或用吹风机吹干备用。

(2) 向500 mL锥形瓶中加入400 mL蒸馏水, 在电热套上加热至沸腾。此过程中将锥形瓶盖上锡纸以减少热量和水分损失。

(3) 准确称取40 g左右菠菜叶片, 并快速加入至锥形瓶中, 开始计时。每1 min用移液器从中取出2.5 mL水溶液至离心管中, 冷却至室温备用。5 min后停止加热, 此时取出两份水溶液, 一份编号入上述的取出液系列, 一份用于绘制取出液的荧光光谱。

1.4.3 荧光光谱的绘制

从1.4.1配制的标准溶液中选取一个浓度较大的用于荧光光谱的绘制。具体步骤如下: 以525 nm作为发射波长绘制激发光谱, 确定最佳激发波长。再用该激发波长绘制发射光谱, 确定最佳发射波长。使用相同的步骤, 绘制焯水5 min取出液的激发和发射光谱, 并确定其最佳激发波长和最佳发射波长。此过程中, 激发和发射狭缝分别设置为5 nm和3 nm。

1.4.4 菠菜中 VB_2 流失率检测

分别选取463 nm和526 nm为激发和发射波长, 依次测定1.4.1中 VB_2 标准系列溶液的荧光强度。以荧光强度为纵坐标, VB_2 浓度为横坐标绘制标准曲线。在相同激发和发射波长下, 测定1.4.2中每个焯水时间点下取出液的荧光强度。利用绘制的标准曲线计算出各取出液中 VB_2 的浓度, 进而计算出各个时间点下析出的 VB_2 质量及流失百分率。

$$VB_2\text{流失百分率} = \frac{\text{析出的}VB_2\text{质量}}{\text{菠菜中}VB_2\text{总质量}} \times 100\%$$

其中, 菠菜中 VB_2 总质量按每100 g菠菜中含0.11 mg VB_2 计算。

2 结果与讨论

2.1 荧光分析法用于菠菜焯水研究的可行性

VB_2 为水溶性维生素, 室温下的溶解度为12 mg/100 mL。加热时, VB_2 在中性或酸性条件下具有较高的稳定性。也就是说, 在焯水过程中, 菠菜中的 VB_2 可以释放到热水中, 并在热水中稳定存在。因此可以推测, 利用荧光分析法, 可以对焯水过程中释放到水里的 VB_2 含量变化进行监测, 进而计算出 VB_2 析出量随焯水时间的变化。为证明这一点, 准确称取一定量(40.45 g)的菠菜进行焯水处理

(图2)。为减少焯水过程中因水分蒸发所造成的体积损失,选用锥形瓶作为容器,并在实验过程中用锡纸密封锥形瓶口,只在取样时短暂打开。选取焯水5 min的取出液进行荧光光谱的绘制,并与VB₂标准溶液进行对比。结果如图3所示,该取出液具有荧光性质,其最大激发波长(λ_{ex})和最大发射波长(λ_{em})分别为463 nm和525 nm,与VB₂标准溶液($\lambda_{\text{ex}} = 466 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$)非常接近。虽然菠菜中同时存在草酸、维生素C、维生素E、胡萝卜素和视黄醇等物质,但它们或者没有荧光,或者激发波长和发射波长与VB₂差别较大。因此可以推断,图3b中所示的荧光信号是由菠菜焯水过程中析出的VB₂所引起的。利用荧光光谱,可以对析出的VB₂进行定量检测。



图2 (a) 菠菜样品; (b) 焯水装置; (c) 焯水不同时间的取出液

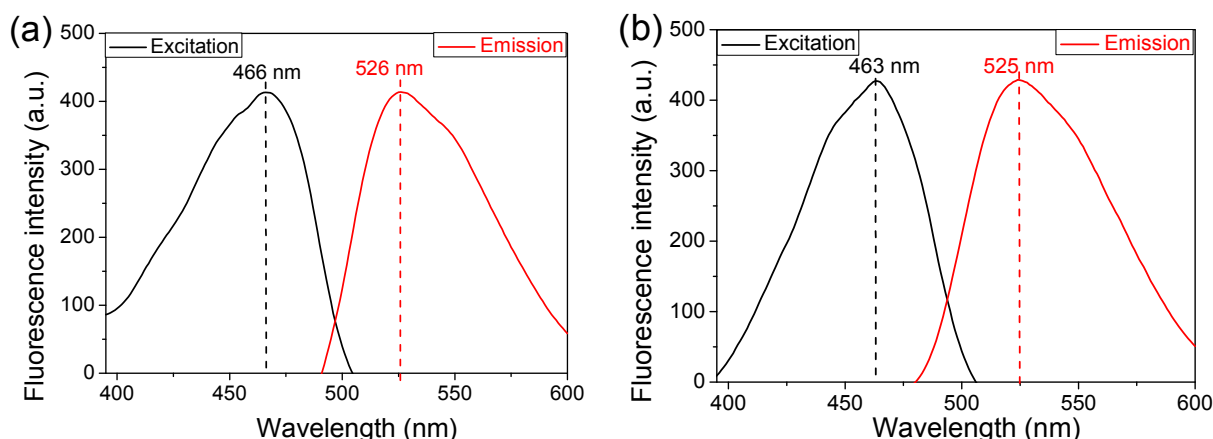
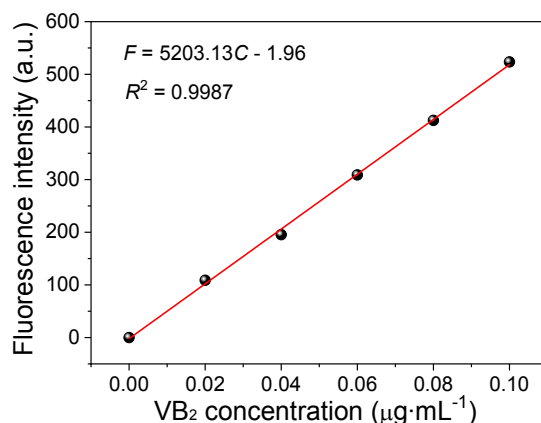


图3 VB₂标准溶液(0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (a)和菠菜焯水5 min取出液(b)的激发和发射光谱

2.2 标准曲线绘制

测定VB₂标准系列溶液的荧光强度,并绘制标准曲线。由于VB₂标准溶液与菠菜焯水取出液的最大激发波长和发射波长略有不同,为使绘制的标准曲线适用于菠菜焯水取出液中VB₂的定量分析,对激发和发射波长进行了折中选取。从图3可以看出,无论是标准溶液还是焯水取出液,在激发光谱中,荧光强度在最大激发波长前变化较缓,在最大激发波长后迅速下降,因此选择较小的463 nm作为激发波长。由于荧光光谱的对称性,发射光谱给出了相反的趋势,即荧光强度在最大发射波长前变化较大,在最大发射波长后变化减缓,因此选择较大的526 nm作为发射波长。在选取的激发和发射波长下,绘制的标准曲线如图4所示。在0.02–0.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,荧光强度与VB₂浓度呈现良好的线性关系。线性回归方程为 $F = 5203.13C (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) - 1.96$,线性相关系数(R^2)为0.9987。

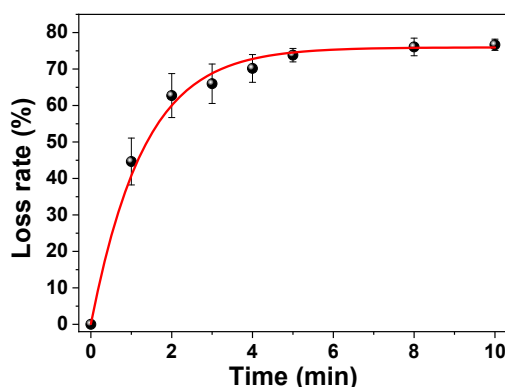
图4 VB₂荧光分析的标准曲线

2.3 菠菜焯水过程中VB₂的析出研究

将不同焯水时间点的取出液冷却至室温,在与绘制标准曲线相同的实验条件下测定荧光强度,并利用前面得到的标准曲线计算出每个时间点下取出液中VB₂的浓度,进而计算出该时间点下VB₂的总析出量。注意,在进行VB₂总析出量计算时,需要把前面各时间点取出液中含有的VB₂计算在内。举例而言,计算焯水3 min时VB₂的总析出量,需要加上第1 min和第2 min取出液(各2.5 mL)里的VB₂(各自时间点下取出液中VB₂浓度 × 2.5 mL)。以每100 g菠菜中含有0.11 mg VB₂计算,40.45 g菠菜中含有的VB₂总量为0.04450 mg (44.50 μg)。利用此数据,可以计算出各个时间点下VB₂的流失率。从表2和图5可以看出,在焯水过程中,VB₂快速从菠菜中析出。在焯水1 min和2 min时,VB₂的析出百分

表2 不同焯水时间下VB₂的流失率

菠菜质量 (g)	水总体积 (mL)	焯水时间 (min)	荧光强度 (a.u.)	水中VB ₂ 浓度 (μg·mL ⁻¹)	水体积 (mL)	前面取出液中VB ₂ 总质量(μg)	VB ₂ 析出总 质量(μg)	VB ₂ 流失 率(%)
40.45	400.0	1	256.509	0.04968	400.0	0.00	19.87	44.65
		2	361.830	0.06992	397.5	0.12	27.92	62.74
		3	380.834	0.07357	395.0	0.30	29.36	65.98
		4	405.586	0.07833	392.5	0.48	31.23	70.18
		5	427.252	0.08249	390.0	0.68	32.85	73.82
		8	440.8576	0.08511	387.5	0.87	33.85	76.07
		10	444.4703	0.08580	385.0	1.08	34.11	76.66

图5 不同焯水时间下的VB₂流失率

率分别为44.65%和62.74%。在0到1 min的时间段, VB₂的析出速率最快。在1到2 min的时间段, 仍保留了较快的析出。其中一个原因是当菠菜刚加入沸水中时, 会使体系的温度下降。也就是说, 在开始的1 min内, 有一段时间锥形瓶中的水并没有处于沸腾状态, 导致VB₂未能充分析出。2 min后, VB₂的析出速率变缓。当焯水时间为5 min时, VB₂的析出百分率为73.82%。将焯水时间继续延长至10 min时, VB₂的析出百分率达到76.66%。从以上结果可以看出, 由于VB₂在沸水中具有较高的溶解度, 在焯水过程中, VB₂极易从菠菜中析出。当焯水时间为3 min时, 大约2/3的VB₂将会进入到水中而流失。当焯水时间为5 min时, 大约3/4的VB₂将会析出。在此基础上继续延长焯水时间, 对VB₂的析出影响不大。考虑到人们在实际生活中并不会对菠菜进行过长时间的焯水, 大约有1/2~1/3的VB₂会保留在菠菜当中。从以上实验结果可以看出, 虽然菠菜是VB₂含量相对较高的一种绿色蔬菜, 但由于食用前往往需要焯水处理以去除草酸, 会造成一半以上的VB₂流失, 导致人们实际摄入的VB₂并不多。平行进行三组实验以验证分析结果的重现性。实验结果表明(图5), 该方法重现性良好, 除在VB₂快速析出阶段(0~3 min)相对偏差较大外(~7%), 其他阶段, 尤其是析出平衡阶段, 偏差均在5%以内。

2.4 将实验内容应用于本科教学的可行性

该实验可以有效克服原有实验内容偏少、学生得不到充分锻炼的问题。在原有实验基础上加入本部分内容后, 全部实验可以在4个学时之内完成。另外, 该部分实验内容对仪器设备要求简单, 只需要引入化学实验室常备的电子天平、电热套和锥形瓶即可。以上特点使其尤其适用于本科实验教学。在两个学期的试运行中, 学生普遍反映良好, 被誉为印象最为深刻的仪器分析实验。学生给出了如下评价: 实验既贴近生活, 易于操作, 又新颖有趣, 通过实验, 我们对理论知识有了更深的理解; 实验揭示了有关菠菜焯水过程中维生素的流失情况, 对指导我们的生活颇有意义; 实验在原有课程实验的基础上, 以分析技术证明生活中蔬菜焯水对某些营养素的影响, 更加贴近生活; 实验对原有课程进行了丰富补充, 实验内容安全有趣, 能够与日常生活紧密联系, 起到对学生在学以致用方面的提示作用; 实验生动有趣, 与人们的生活密切相关, 通过该实验, 对将分析技术应用于人类生活有了更为深入的理解。

3 结语

在证明荧光分析法可以用于分析菠菜焯水过程中VB₂流失情况的基础上, 提出将该实验内容丰富到本科教学实验“荧光法测定维生素B₂”的实验教学改革思路。这一改革思路具有如下优点: (1) 丰富了实验内容, 克服了原有实验内容偏少、学生锻炼不足的问题; (2) 实验内容新颖有趣, 既有利于提升学生的学习兴趣, 又有利于加深学生对课堂知识的理解; (3) 研究内容贴近生活, 有利于帮助学生培养学以致用能力; (4) 实验时长适宜, 对仪器要求低, 使用化学实验室的常备仪器即可完成, 尤其适用于推广为本科教学实验。

参 考 文 献

- [1] 郑桂霞. 药物与人, 2008, 21 (2), 47.
- [2] 王霞. 化学教育, 2002, 23 (5), 1.
- [3] 孙吉峻, 陈前, 俞继榕, 赵全芹. 大学化学, 2023, 38 (7), 183.
- [4] 李文友, 丁飞. 仪器分析实验. 第2版. 北京: 科学出版社, 2021: 63~64.
- [5] 唐川惠. 现代食品, 2018, 24 (21), 53.
- [6] 于康. 决策探索(上), 2019, No. 3, 89.