

实验14 分子荧光分光光度法测定面粉中的核黄素 (维生素 B2)

复旦化学系

教学实验中心

- 一、实验目的
- 二、方法原理
- 三、FL-4500荧光分光光度计
- 四、实验步骤
- 五、数据处理
- 六、思考题

一、实验目的

1. 掌握面粉样品的消化方法，了解溶液的pH值等对核黄素荧光强度的影响。
2. 了解荧光分光光度计的主要结构及工作原理，掌握其正确使用方法。
3. 掌握荧光分析法基本原理和实验方法。

二、方法原理

1. 荧光、荧光分子/荧光物质
2. 荧光分析法：特点、定量方法
3. 荧光分光光度计：结构、原理、操作
4. 核黄素VB2：结构、性质、面粉中提取方法

分子发光的基本原理

- ❖ 第一次记录荧光现象的是16世纪西班牙的内科医生和植物学家 N.Monardes ， 1575 年他提到在含有一种称为“ Lignum Nephriticum”的木头切片的水溶液中，呈现了极为可爱的天蓝色。
- ❖ 直到1852年， Stokes在考察奎宁和叶绿素的荧光时，用分光光度计观察到其荧光的波长比入射光的波长稍微长些，才判断这种现象是这些物质在吸收光能后重新发射不同波长的光，而不是由光的漫射作用所引起的，从而导入了荧光是光发射的概念，他还由发荧光的矿石“萤石”推演而提出“荧光”这一术语。
- ❖ 1867年， Goppelsroder进行了历史上首次的荧光分析工作，应用铝—桑色素配合物的荧光进行铝的测定。
- ❖ 19世纪以前，荧光的观察是靠肉眼进行的，直到1928年，才由 Jette和West提出了第一台荧光计。

分子发光的类型

按激发的模式分类:

- 光致发光
- 化学发光/生物发光
- 热致发光
- 场致发光
- 摩擦发光

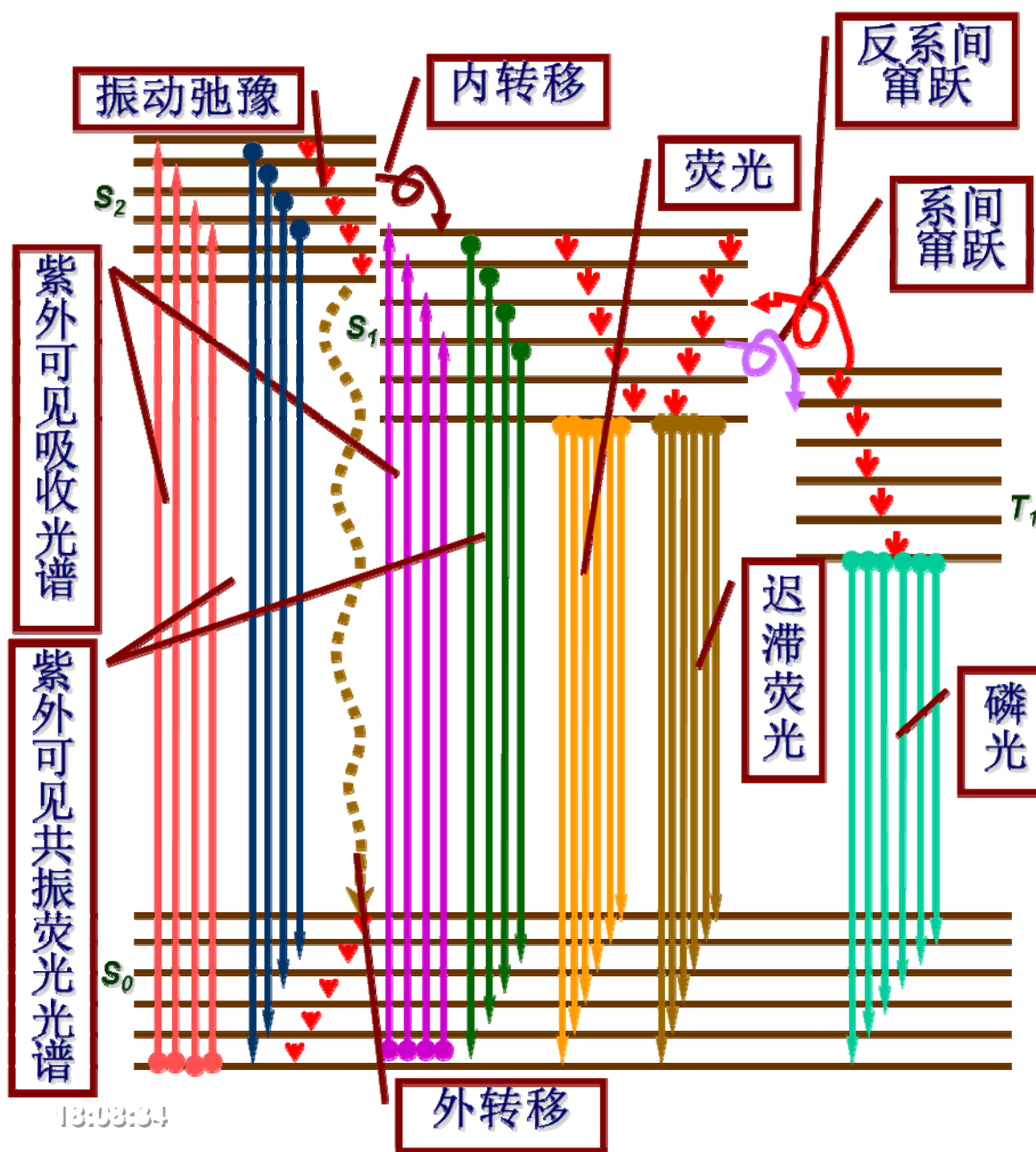
按分子激发态的类型分类:

- 荧光
 - 瞬时荧光
 - 迟滞荧光
- 磷光

按光子能量分类:

- 荧光
 - 斯托克斯荧光(Stokes): $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$
 - 反斯托克斯荧光 (Antistokes): $\lambda_{em} < \lambda_{ex}$

荧光产生的机制——分子的活化与去活化过程



1. 辐射跃迁的类型

共振荧光: 10^{-12} sec
 荧光: 10^{-8} sec
 磷光: $1 \sim 10^{-4}$ sec
 迟滞荧光: $10^2 \sim 10^{-4}$ sec

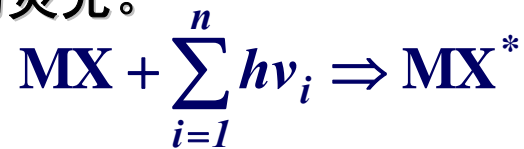
2. 无辐射跃迁的类型

振动弛豫: V_r , 10^{-12} sec
 外转移: 无辐射跃迁回到基态
 内转移: $S_2 \sim S_1$ 能级之间有重叠
 系间窜跃: $S_2 \sim T_1$ 能级之间有重叠
 反系间窜跃: 由外部获取能量后 $T_1 \sim S_2$

分子荧光(磷光)光谱

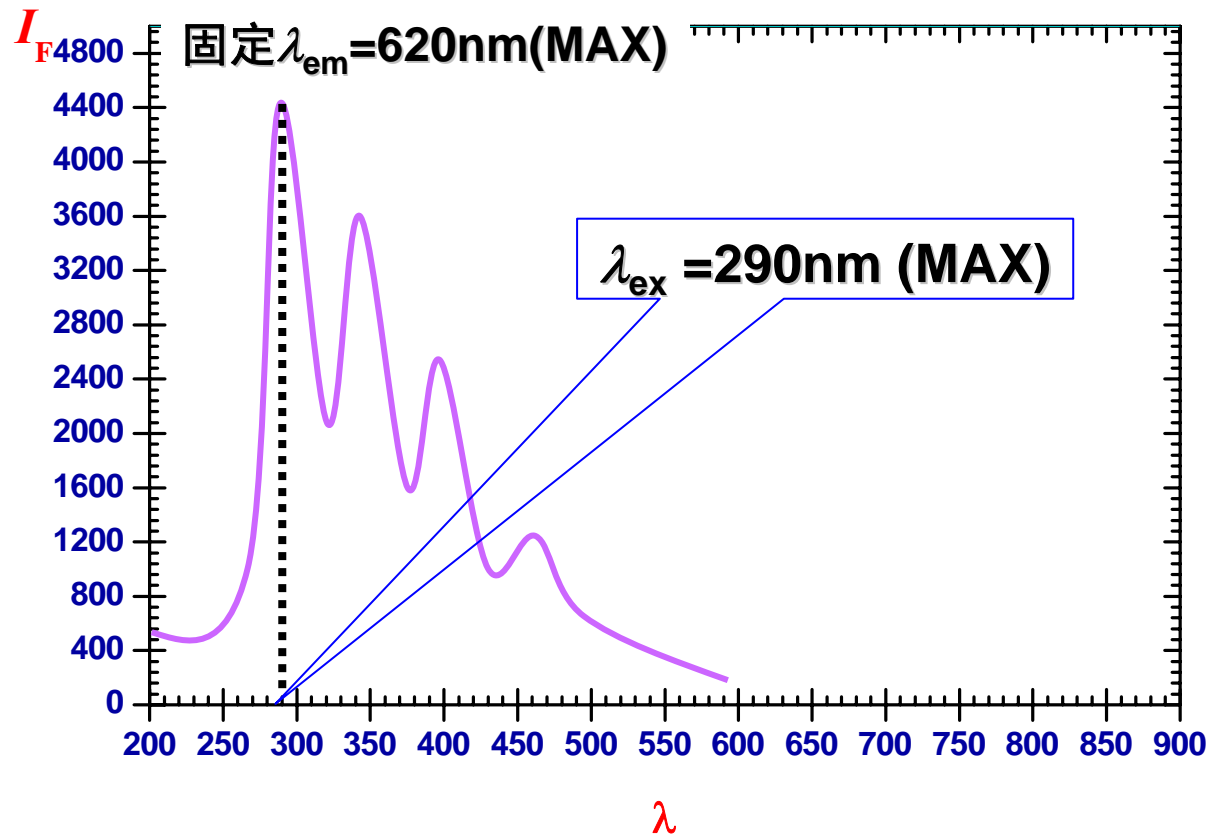
1. 荧光(磷光)激发光谱与发射光谱

荧光(磷光)均为光致发光，在光辐射的作用下，荧光物质发射出不同波长的荧光。



A. 激发光谱

固定发射波长
扫描激发波长



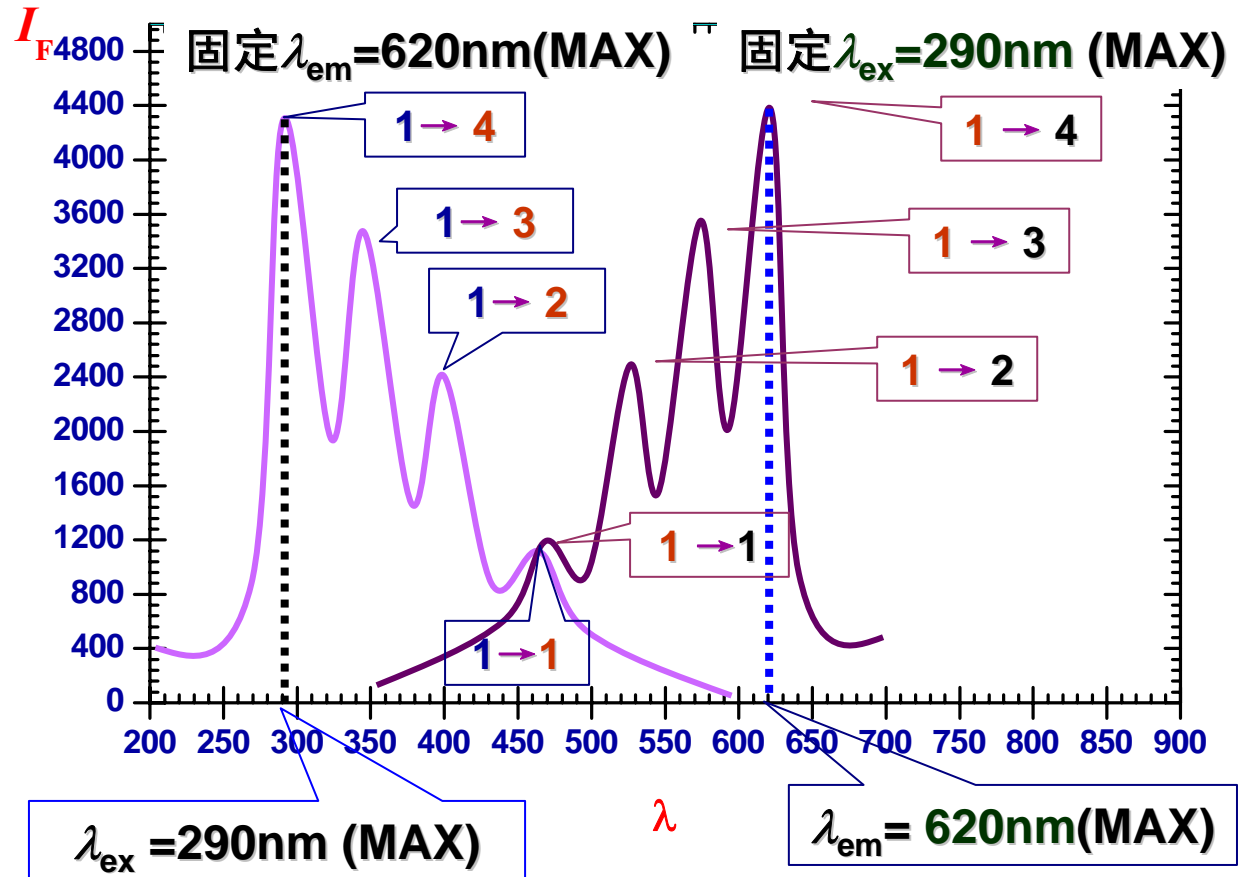
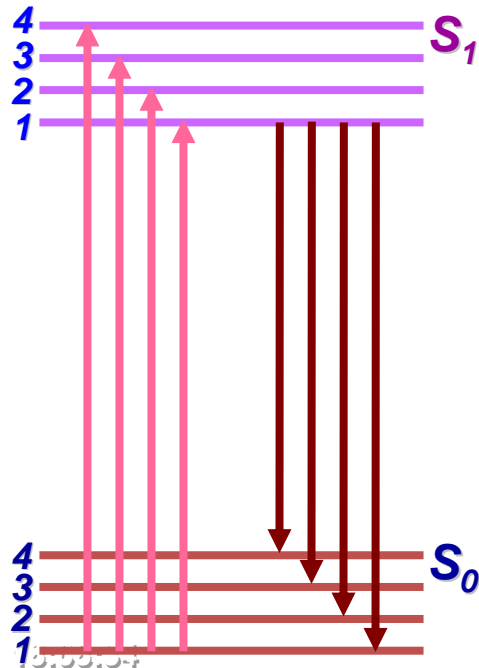
B. 发射光谱(荧光光谱)

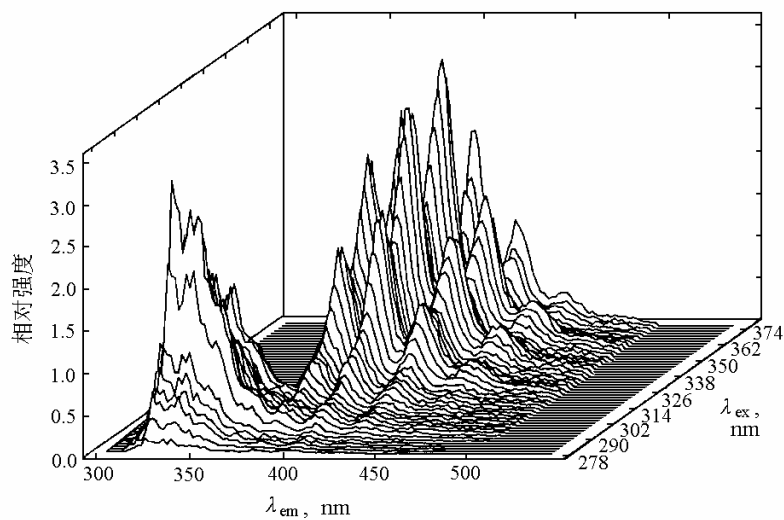
固定激发波长 扫描发射波长

发射光谱的形状与激发波长无关:

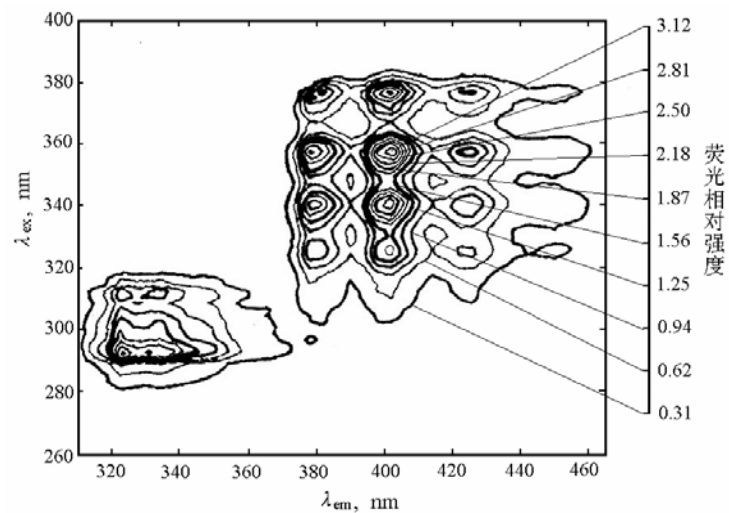
分子被激发到 S_1 或者高于 S_1 的电子态, 经过极快的内转换和振动弛豫降到 S_1 电子态的最低振动、转动能级, 然后以辐射形式释放能量回到基态。

C. 激发光谱与发射光谱的镜像关系





(a) 等角三维投影图



(b) 等高线光谱图

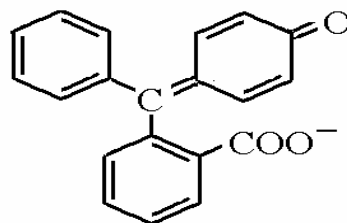
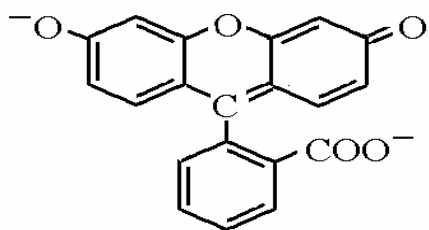
三维荧光光谱的两种表示

分子荧光光度法的一些基本概念

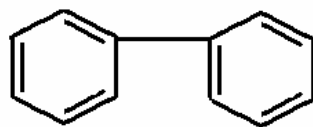
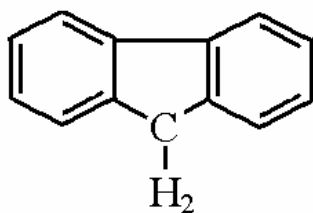
- 激发光谱、荧光光谱、三维荧光光谱 用途？

强荧光物质

结构特点： $\pi \rightarrow \pi^*$ 、共轭 π 体系、刚性平面结构、取代基



如荧光素和酚酞结构十分相似，
荧光素在溶液中有很强的荧光，
而酚酞没有。



如芴和联苯在相同的条件下，
荧光量子产率约为1和0.18

影响荧光发射溶液环境因素：

(a) 溶剂效应：取决于荧光体和溶剂的化学结构、极性、重原子效应

(b) 温度： $T \uparrow \phi_f \downarrow$ (c) pH 平衡解离关系 对 $\lambda_{f.max}$ 、 ϕ_f 均有影响

溶液荧光的猝灭

荧光物质分子与溶剂分子或溶质分子之间相互作用而致荧光强度下降的现象称为荧光的猝灭（或熄灭）

引起荧光猝灭的物质称为荧光猝灭剂。

荧光定量分析基础——荧光强度与浓度的关系

光吸收定律 (*Lambert – Beer Law*)

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \varepsilon b C, \quad T = e^{-2.303\varepsilon b C}$$

相应的吸光分数为:

$$1 - \frac{I_t}{I_0} = 1 - T = 1 - e^{-2.303\varepsilon b C}$$

$$I_0 - I_t = I_0 (1 - e^{-2.303\varepsilon b C})$$

荧光强度 (I_F) 与相应的吸光分数成正比:

$$I_F = \phi (I_0 - I_t) = \phi I_0 (1 - e^{-2.303\varepsilon b C})$$

按照级数展开式:

$$e^x = 1 + \frac{x}{1!} + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \frac{x^4}{4!} + \dots + \frac{x^n}{n!}$$

荧光定量分析基础——荧光强度与浓度的关系

$$I_F = \phi I_0 \left(2.30 \varepsilon b C - \frac{(-2.30 \varepsilon b C)^2}{2!} + \frac{(-2.30 \varepsilon b C)^3}{3!} - \frac{(-2.30 \varepsilon b C)^4}{4!} + \dots \right)$$

对于稀溶液，当 $\varepsilon b C < 0.05$ （磷光 $\varepsilon b C < 0.01$ ）时：

$$I_F = 2.30 k \phi_F I_0 \varepsilon b C$$

I_F ----荧光强度

ϕ_F ----荧光量子产率

b --吸收光程

ε --摩尔吸光系数

C --荧光物质浓度

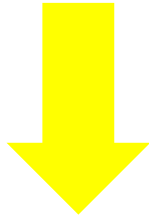
$$I_P = 2.30 k \phi_P I_0 \varepsilon b C$$

I_P ----磷光强度

ϕ_P ----磷光量子产率

k --与仪器灵敏度有关的参数

I_0 --入射光强度。



荧光定量分析基础——荧光强度与浓度的关系

稀溶液中

$$I_F = 2.3 \varphi_F I_0 \varepsilon b c$$

I_F — 荧光强度

I_0 — 入射光强度

φ_F — 荧光发射的量子产率

b — 试样的吸收光程

ε — 摩尔吸光系数

c — 试样浓度

当 I_0 及 b 一定

$$I_F = k c$$

荧光强度 I_F 与荧光物质的溶液浓度 c 成线性关系

荧光(磷光)的量子产率

荧光量子产率的定义:

$$\phi_F = \frac{\text{发射荧光的分子数}}{\text{激发分子总数}}$$

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_{i=1}^n k_i}$$

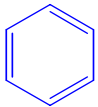
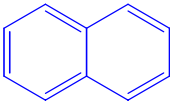
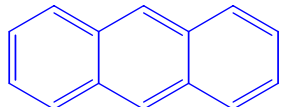
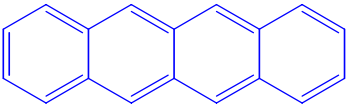
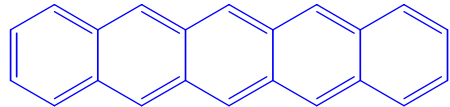
$$\phi_P = \frac{\text{发射磷光的分子数}}{\text{激发分子总数}}$$

$$\phi_P = \phi_{st} \frac{k_P}{k_P + \sum_{i=1}^n k_i}$$

k_F 、 k_P 主要取决于荧光物质的分子结构； ϕ_{st} 系间窜跃效率。
 $\sum k_i$ 主要取决于化学环境，同时也与荧光物质的分子结构有关。

大多数的荧光物质的量子产率在0.1~1之间；

例如：0.05mol/L的硫酸喹啉， $\phi_F=0.55$ ； 荧光素 $\phi_F=1$

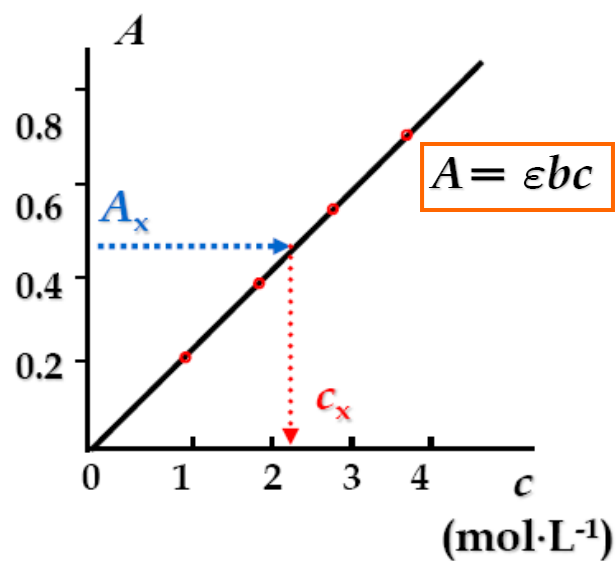
化合物					
ϕ_F	0.11	0.29	0.46	0.60	0.52

标准曲线法（工作曲线法）

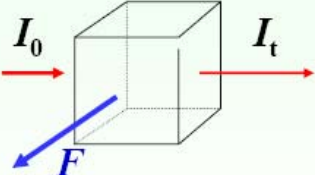
1. 最大激发波长、最大吸收波长的选择；
2. 系列标准溶液绘制工作曲线；
3. 测定未知溶液，查得其浓度。

标准曲线法求解 K ：

- (1) 图解法
- (2) 解析法



分子荧光分光光度法 v.s. 紫外-可见分光光度法

	原理	灵敏度	测定方法
UV/Vis	吸收	$10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
MFS	发射	$10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	

- **灵敏度高：**测定下限在**0.1~0.001 $\mu\text{g/mL}$** ，比分光光度法高**2~4**个数量级。

光强**I**与 **I_0** 的信号差别 \sim 荧光发射的光强

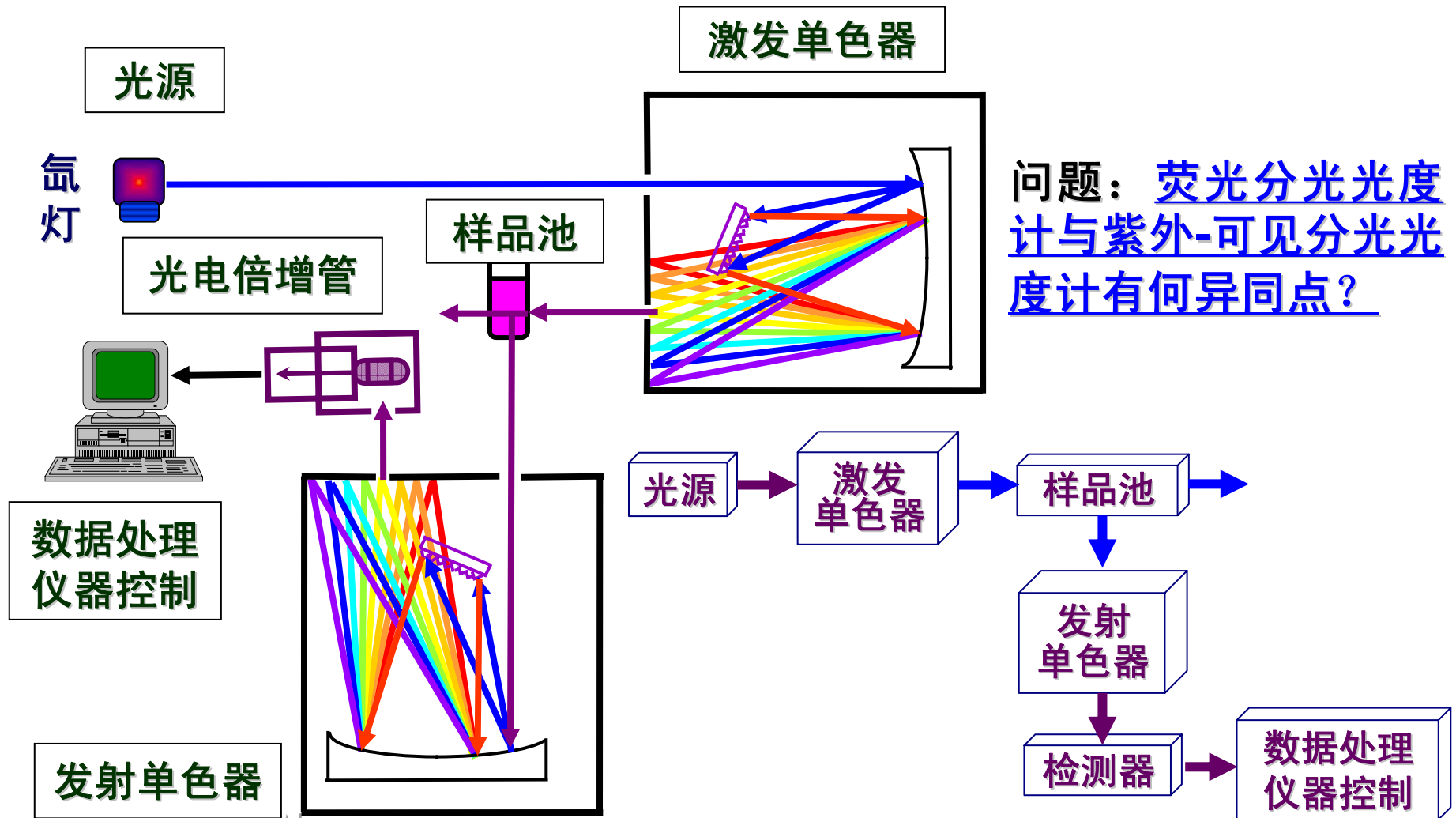
- **选择性高：**适当选择激发光波长和荧光测定波长

产生荧光的化合物有限，不及分光光度法广泛，干扰物质较少

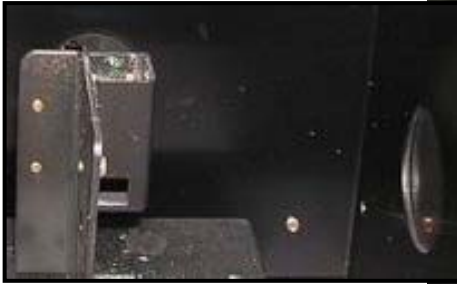
三、F-4500型荧光分光光度计

荧光分光光度计 主要组成及部件的

荧光分光光度计工作原理基及仪器结构框图



三、F-4500型荧光分光光度计



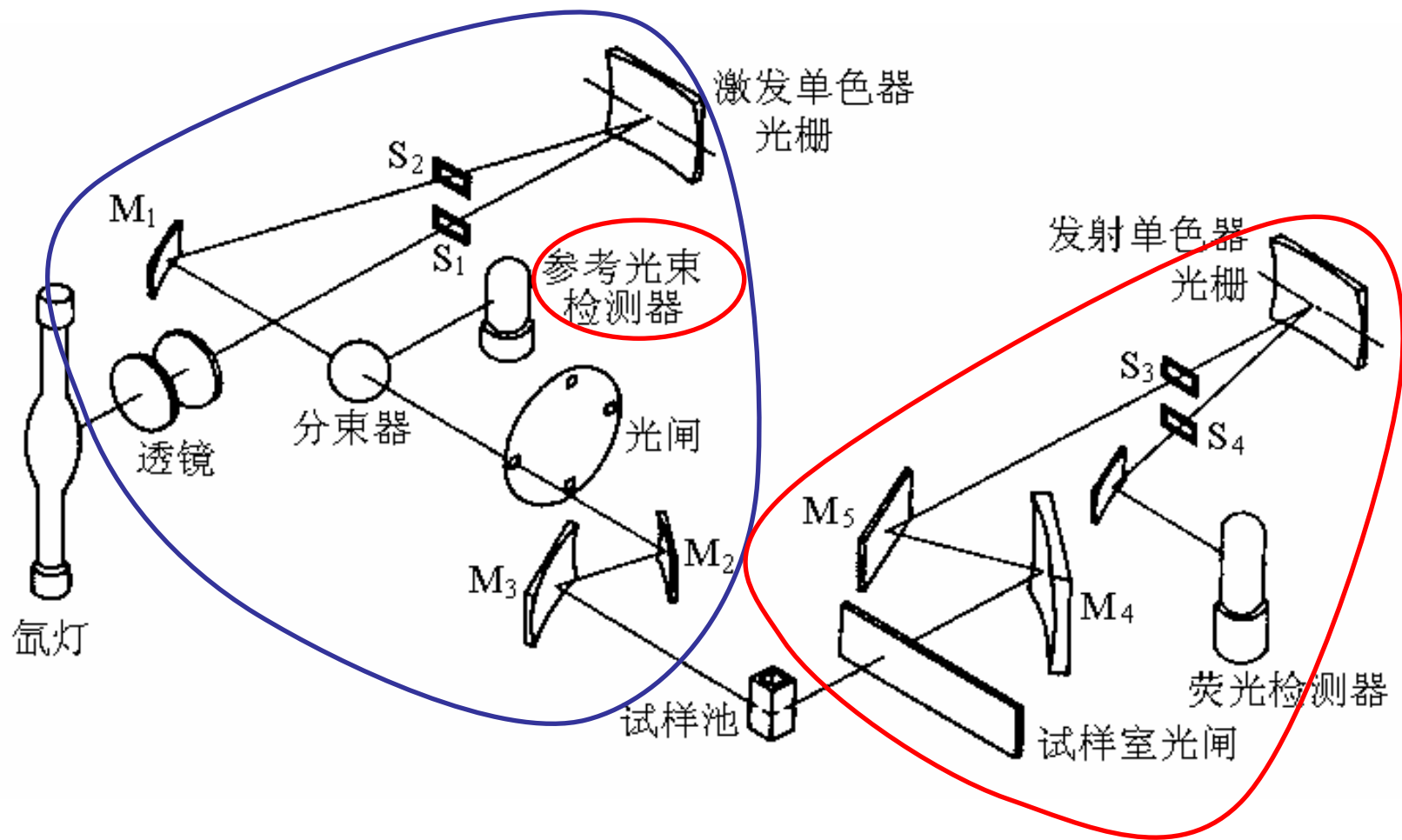
样品槽:



比色皿:
?



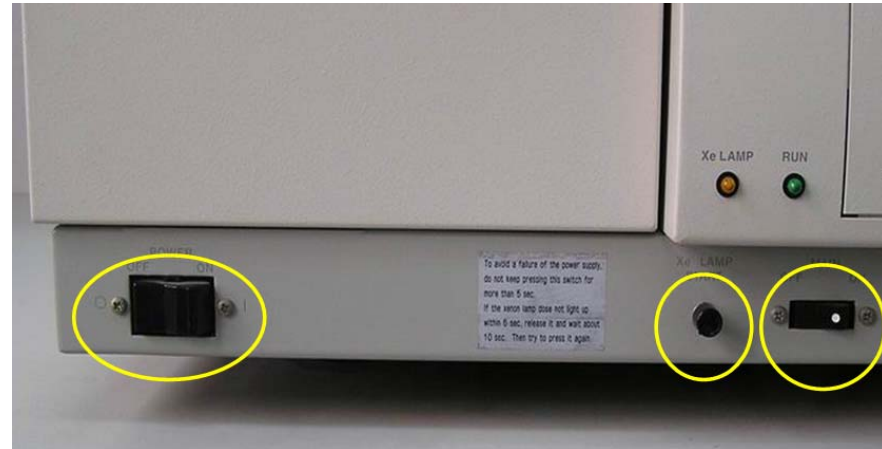
F-4500型荧光分光光度计光路图



F-4500型荧光分光光度计的使用

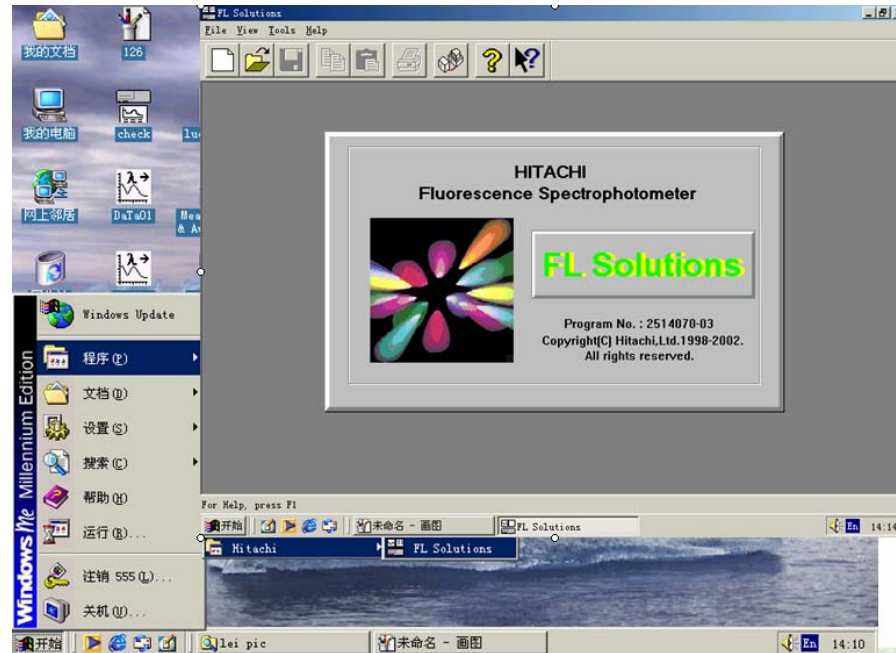
1、开机

Power-Xe lamp-Main



启动软件

FL Solutions Program



2、波长扫描 wavelength?? Scan

Start — Method — Sample — Pre-scan — Measure — 数据处理 — Report

Method:

四、实验步骤

- 1、试样溶液制备
- 2、实验条件的选择
- 3、标准曲线的绘制及样品的测定

关于核黄素VB₂、面粉中提取方法

面粉主要成分

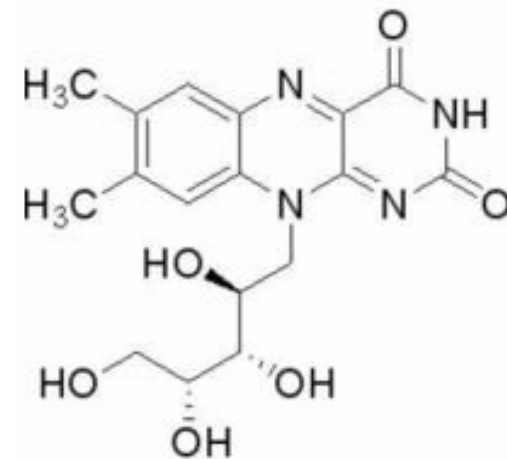
淀粉、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素等。

《营养强化面粉国家标准》面粉中核黄素含量 $1 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4} \text{g/L}$ ，回收率为98%~105%，方法检出限 $4 \times 10^{-8} \text{g/L}$

核黄素 又称维生素B₂，维他命B₂

Riboflavine C₁₇H₂₀O₆N₄

微溶于水；对空气、氧气稳定，对光敏感，在430~440nm蓝光照射下会在525nm附近发绿色荧光；在pH6~7的水溶液中荧光最强，在pH为11时荧光消失。



1、试样溶液制备

面粉10g400mL烧杯
加0.1mol/L盐酸100mL

冷却后，用NaOH调至pH6.0-6.5
，然后立即加稀盐酸至pH4.5

将混合物定量转移至250mL容量
瓶，用(5:95)醋酸溶液定容。
离心取清液，避光，待测

剧烈搅拌，倒入150mL沸水，维持
微沸30min并搅拌使均匀分散
核黄素在碱性溶液中不稳定，要边
加边摇防止局部碱性过强

加1滴丁醇
配平，离心取上清

2、实验条件的选择

(1) 激发光波长、荧光波长选择

吸取核黄素标准溶液1mL于25mL容量瓶，用(5:95)醋酸溶液定容。

暂设定荧光波长即发射光波长EX:525nm,在400-500nm波长范围对激发波长进行扫描，记录激发光谱曲线；取最大激发波长EM,在400-500nm波长范围对荧光波长进行扫描，记录荧光光谱曲线。

确定最佳激发光波长、荧光波长

(2) 酸度选择

取三个25mL容量瓶，各加入核黄素标准溶液1mL，然后分别用1:1盐酸，(5:95)醋酸，5%NaOH溶液稀释到刻度。

分别测定溶液pH值，测定荧光强度，考察酸度对荧光强度的影响，从中确定最佳酸度。

3、标准曲线的绘制及样品的测定

五、数据处理

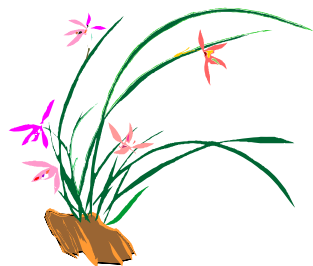
- 1、从荧光光谱图上读出最大激发 (λ_{ex}) 和发射波长 (λ_{em})
- 2、软件绘制标准工作曲线法
- 3、计算面粉提取液中维生素B₂的含量

本实验注意事项

- 1) 溶液的配制: 盐酸浓度, NaOH调节pH理论计算等
- 2) 标准溶液移取与稀释操作
- 3) 系列标液的测定顺序
- 4) 样品保存, 防止光降解
- 5) 荧光仪的开关机顺序

六、思考题

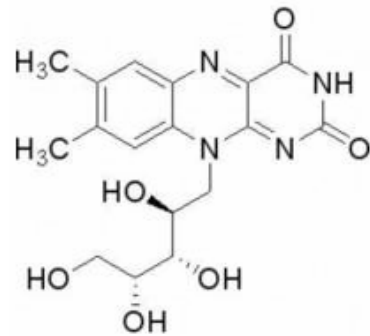
1. 在荧光测量中，为什么激发光的入射与荧光的接收不在一直线上，而呈一定角度？
2. 试述荧光分光光度计与紫外-可见分光光度计在结构上的有哪些不同点？
3. 定量测定维生素B₂可用的方法有哪些？试比较各种方法的优缺点。



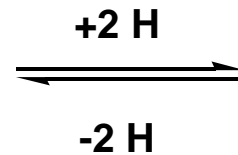
问题

核黄素结构性质???

对空气、氧气稳定，对光敏感，在430~440nm蓝光照射下会在525nm附近发绿色荧光；在pH6~7的水溶液中荧光最强，在pH为11时荧光消失。



氧化型



还原型