

荧光分光光度法测定 面粉中核黄素 (VB₂)

复旦化学系

教学实验中心

王丛笑

- 一、实验目的
- 二、实验原理
- 三、FL-4500型气相色谱仪
- 四、实验步骤
- 五、数据处理
- 六、思考题

下一页

一、实验目的

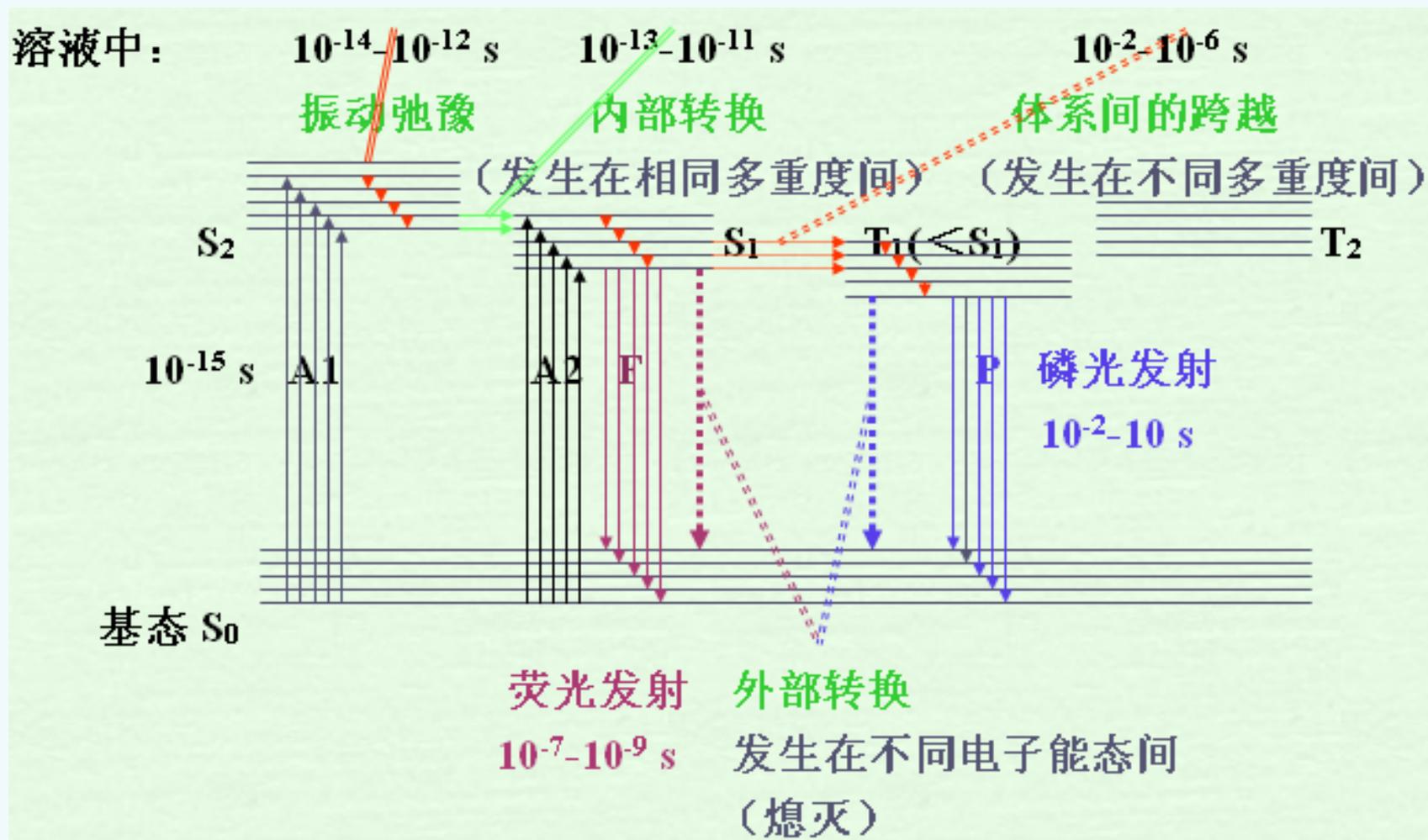
- 1、掌握面粉样品的消化方法，了解溶液的pH值等对核黄素荧光强度的影响。
- 2、了解荧光分光光度计的主要结构及工作原理，掌握其正确使用方法。
- 3、荧光分析法基本原理和学习测绘核黄素的激发光谱和荧光光谱，标准曲线法定量分析。

二、实验原理

- 1、荧光、荧光分子/荧光物质
- 2、荧光分析法：特点、定量方法
- 3、核黄素 VB_2 ：结构、性质、面粉中提取方法
- 4、荧光分光光度计：结构、原理、操作

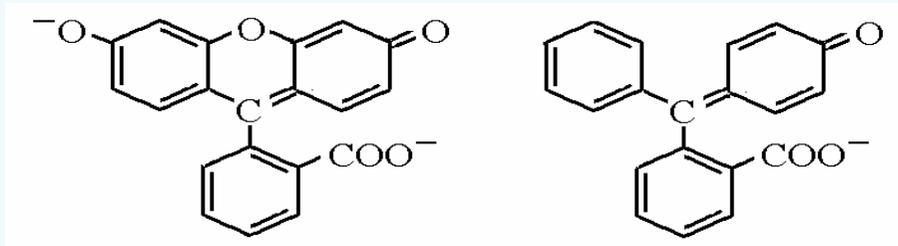
问题1. 荧光、荧光分子

荧光产生的机制——去活化过程

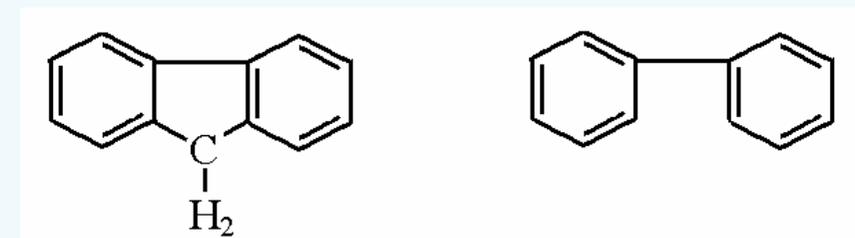


强荧光物质

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 p.362 :

(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 p.364

荧光物质分子与溶剂分子或溶质分子之间相互作用而导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。

问题2. 分子荧光分析法

方法的分类	被测物理性质	相应的分析方法
光学分析法	辐射的发射	发射光谱法 (X 射线、紫外、可见光等), 火焰光度法, 荧光光谱法 (X 射线、紫外、可见光), 磷光光谱法, 放射化学法
	辐射的吸收	分光光度法 (X 射线、紫外、可见光、红外), 原子吸收法, 核磁共振波谱法, 电子自旋共振波谱法
	辐射的散射	浊度法, 拉曼光谱法
	辐射的折射	折射法, 干涉法
	辐射的衍射	X 射线衍射法, 电子衍射法
	辐射的旋转	偏振法, 旋光色散法, 圆二色性法

光谱名称的问题:

1. 原子光谱与分子光谱

原子光谱: 电子能级跃迁;

分子光谱: 电子能级、振动能级、转动能级跃迁

2. 吸收光谱与发射光谱

吸收光谱: 从低能级向高能级跃迁, 使光的强度减弱;

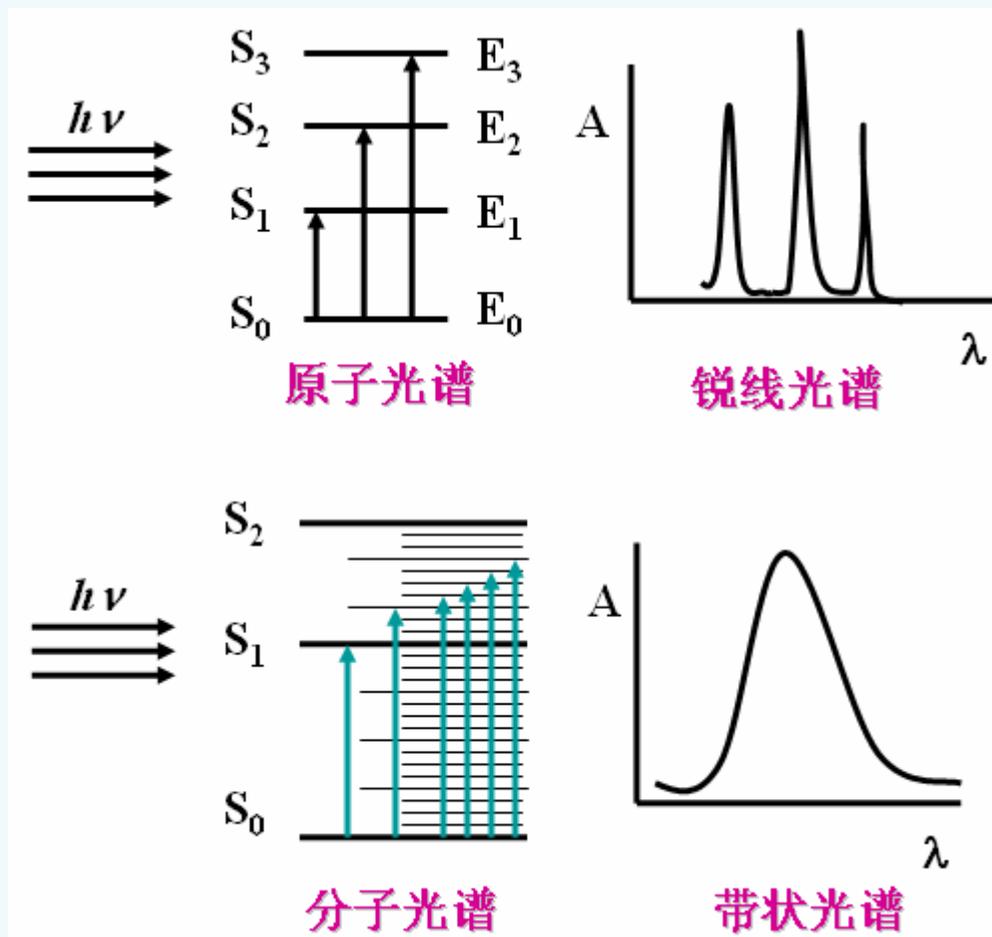
发射光谱: 从高能级跃迁回低能级, 相应的能量以光的形式辐射出来

3. 关系

原子光谱: 原子吸收光谱、原子发射光谱;

分子光谱: 分子吸收光谱 (可见、紫外、红外吸收光谱)

原子光谱 V.S. 分子光谱



原子光谱/线光

谱:

电子跃迁能级
(单重态、三重态)

分子光谱/带光

谱:

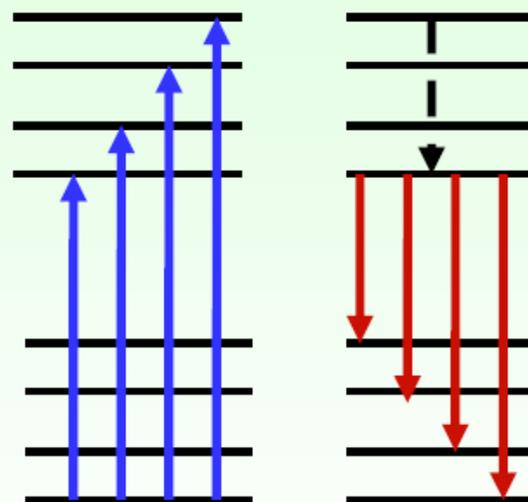
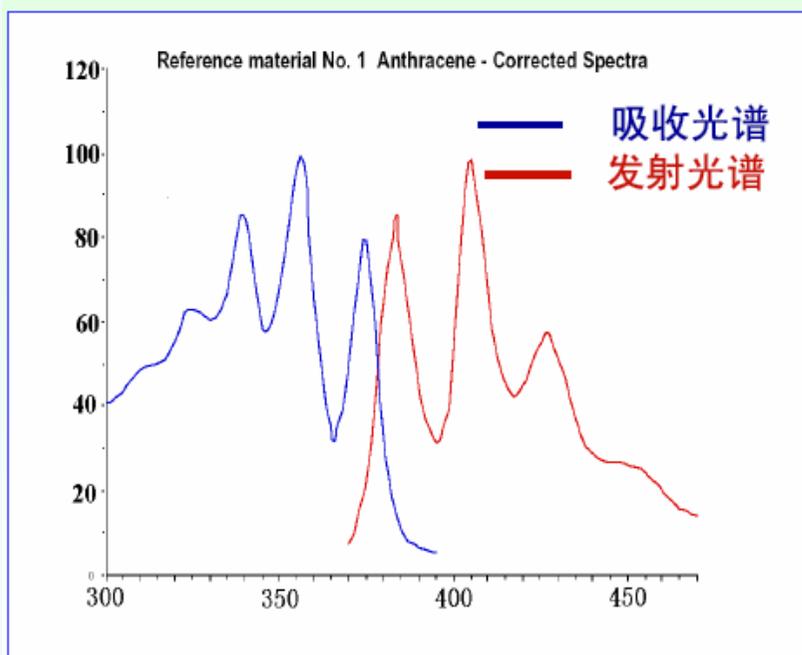
电子跃迁能级
分子振动能级
分子转动能级

吸收光谱 V.S. 发射光谱

激发光谱

荧光光谱

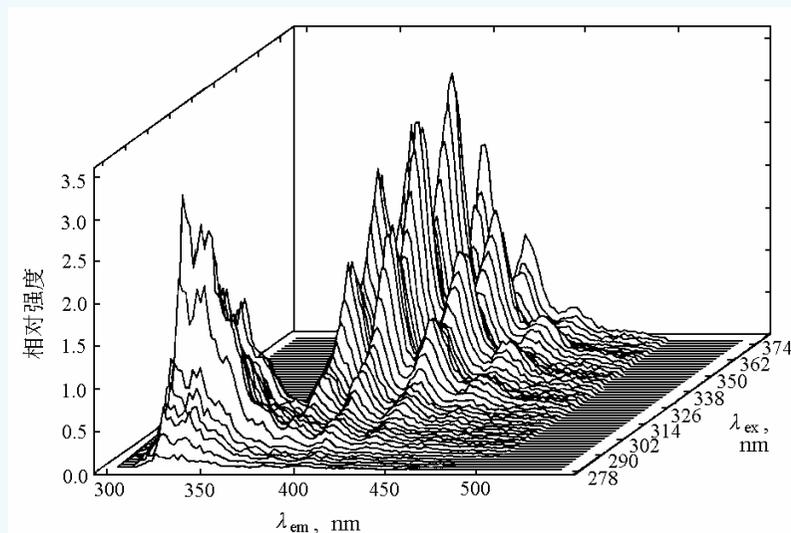
葱的激发光谱（吸收光谱）和发射光谱（荧光光谱）



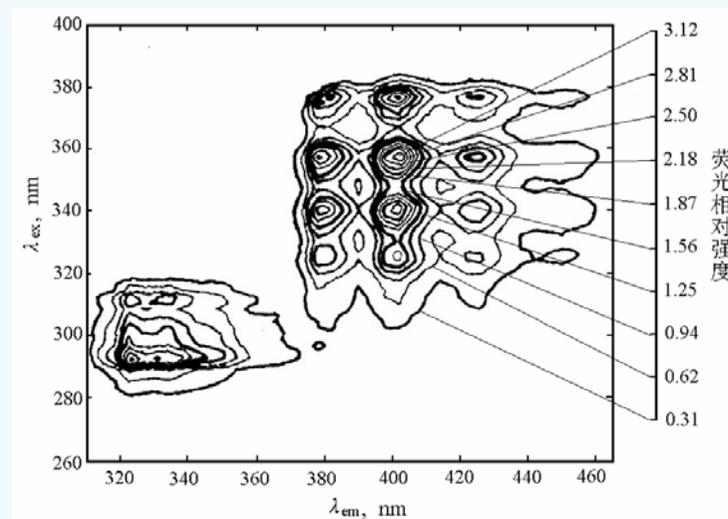
激发光谱: Excitation Spectrum, 激发波长: λ_{ex}

发射光谱 Emission Spectrum, 发射波长: λ_{em}

$$\lambda_{em,max} \text{ 处} \\ I_F \sim \lambda_{ex}$$



(a) 等角三维投影图



(b) 等高线光谱图

图15-3 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？

荧光定量分析的基础

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 $I_F = k c$

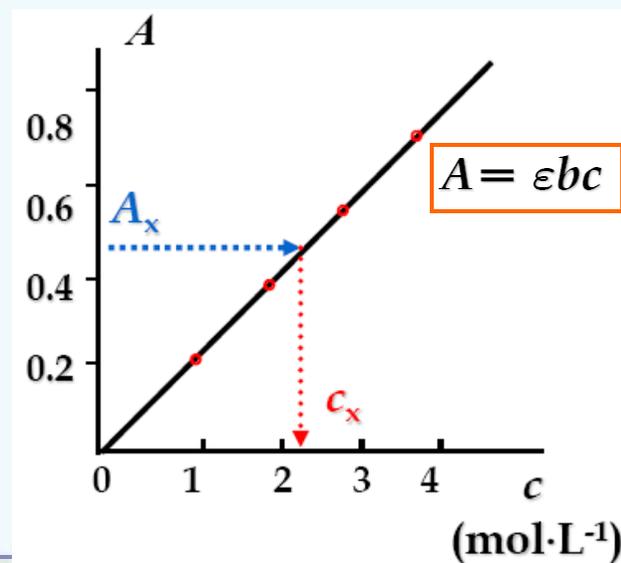
荧光强度 I_F 与荧光物质的溶液浓度 c 成线性关系

标准曲线法（工作曲线法）

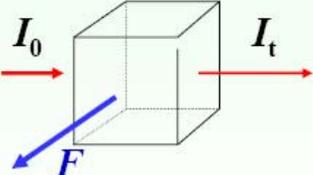
1. 最大激发波长、最大吸收波长的选择；
2. 系列标准溶液绘制工作曲线；
3. 测定未知溶液，查得其浓度。

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 $0.1 \sim 0.001 \mu\text{g/mL}$, 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



样品槽:

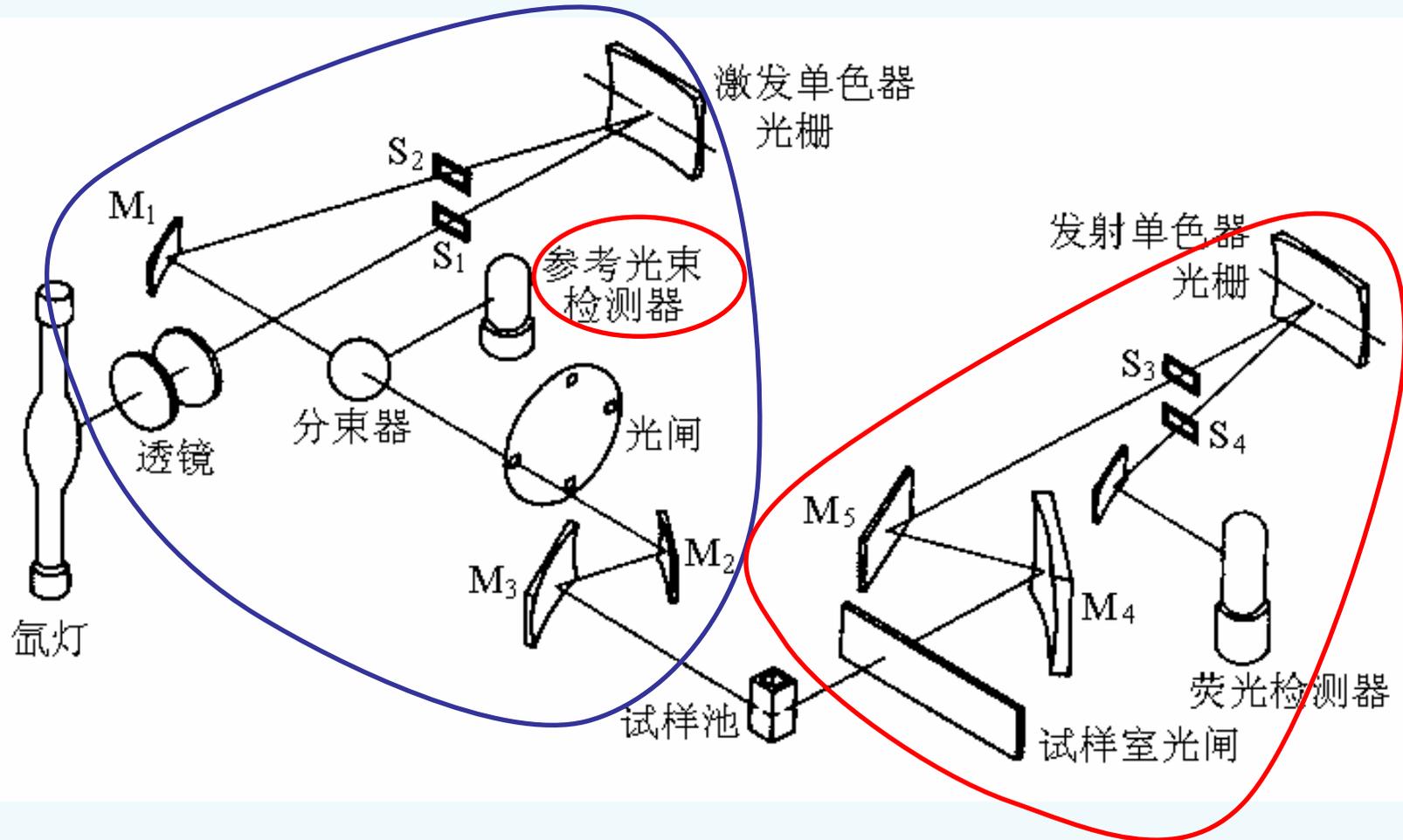


比色皿:
?



15:41:01

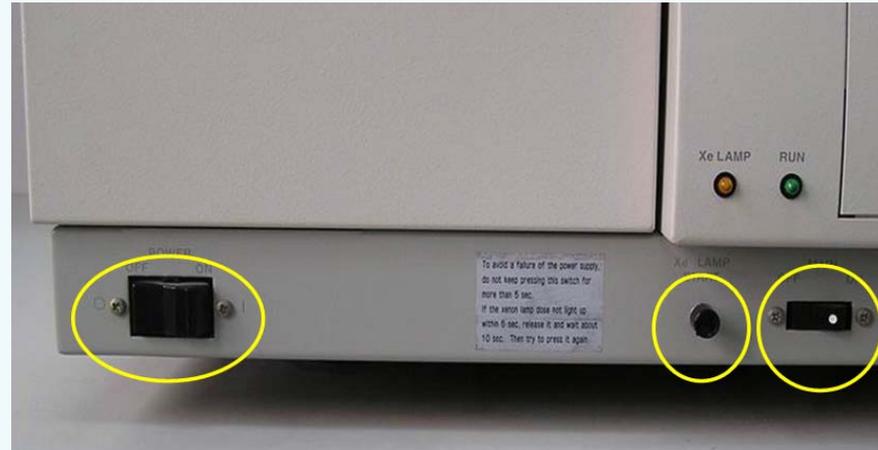
F-4500型荧光分光光度计光路图



F-4500型荧光分光光度计的使用

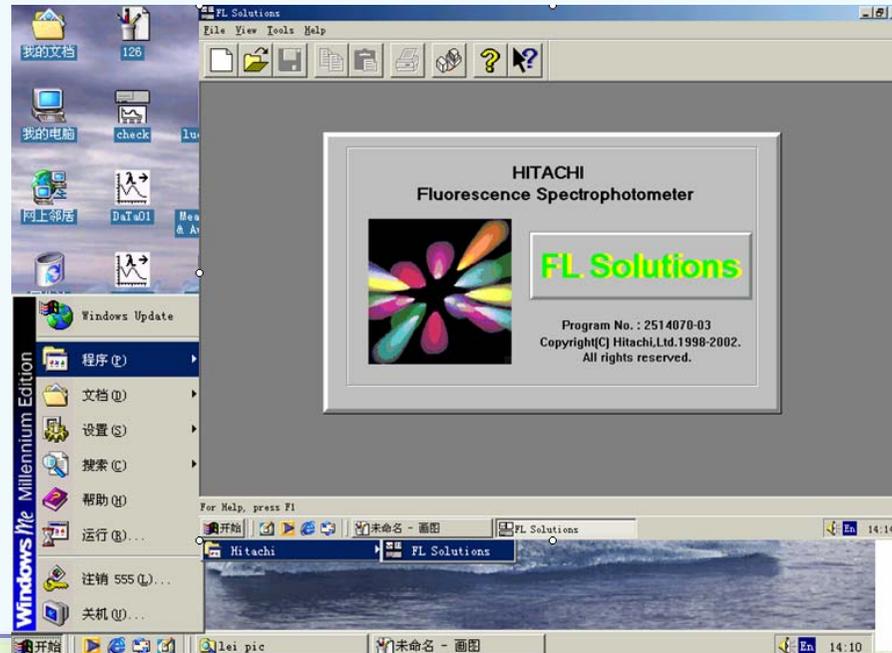
1、开机

Power-Xe lamp-Main



启动软件

FL Solutions Program



15:41:01



F-4500型荧光分光光度计的使用

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

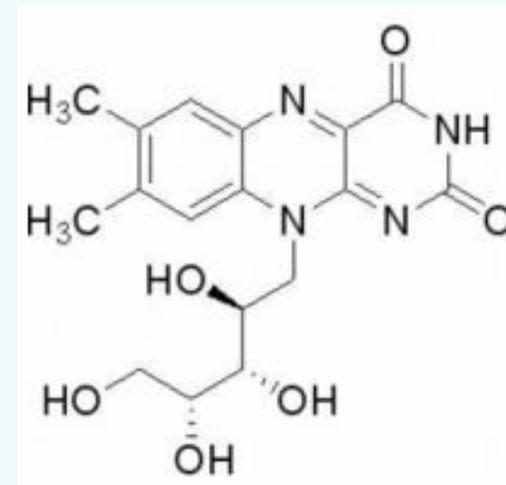
面粉主要成分

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10g 400mL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（作用？）
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 1:1盐酸，② (5:95)醋酸，③ 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。



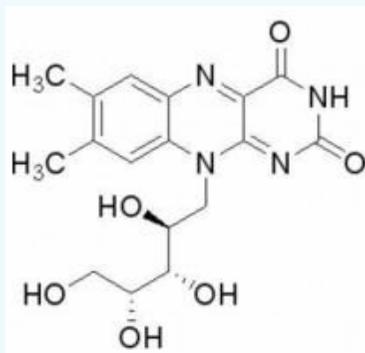
问题3

面粉的主要成分???

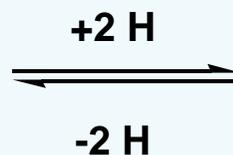
淀粉、蛋白质、脂肪、矿物质、维生素等。《营养强化面粉国家标准》面粉中核黄素含量 $1 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-4} \text{g/L}$ ，回收率为98%~105%。方法检出限 $4 \times 10^{-8} \text{g/L}$ 。

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