

分子荧光分光光度法测定面粉中的核黄素

复旦大学 化学教学实验中心

张晋芳

一、实验目的

- 1、学习荧光分析法的基本原理及荧光的测定方法；
- 2、掌握面粉的制样方法；
- 3、了解荧光分光光度计的主要结构、工作原理及使用方法。

二、内容提要

某些物质经紫外光或可见光照射后，会发射出荧光（较入射波长更长），荧光光谱能反映这些物质的特性。根据荧光强度和波长的分析方法称为荧光分析法。

对同一物质，在稀溶液（即 $A=abc < 0.05$ ）中有：

$$F=2.3 \Phi_f abcI_0$$

式中 F 荧光强度 Φ_f 荧光过程的量子效率；

a 荧光分子的吸光系数； b 试样的吸收光程；

c 物质的浓度； I_0 入射光强度。

当 I_0 、 b 不变时： $F=Kc$

荧光分析法灵敏度高（较分光光度法大2~3个数量级）、样少、快速等特点,在食品、医药、农业、环保、化工等领域广泛应用。

但由于许多物质不会发生荧光，故在使用范围上受到一定的限制。

维生素B₂又称核黄素。冬春季寒冷干燥，有的人嘴唇会出现干裂，其主要原因是缺少维生素B₂。缺乏维生素B₂会影响生物氧化，还会得舌炎、眼结膜炎、角膜炎等。动物内脏维生素B₂含量高其次是奶、蛋、豆类等。小麦虽然是维生素B₂的良好来源，但由于这些营养成分大部分集中在麦粒的外壳中，所以在面粉加工的过程中大部分损失掉了，精加工的面粉维生素与矿物质的损失更加严重。

维生素B₂每人每天摄入量不低于0.5mg

- 维生素B₂在430~440nm蓝光照射下发出荧光，峰值波长为525nm左右，在pH 6~7的溶液中荧光最强，pH= 11时荧光消失。
- 在稀溶液中，荧光的强度与维生素B₂的浓度成正比，利用维生素B₂的这一性质，选择合适的激发波长、荧光波长和实验条件，可对维生素B₂进行定量测定。
- 本实验采用标准曲线法来测定维生素B₂的含量。

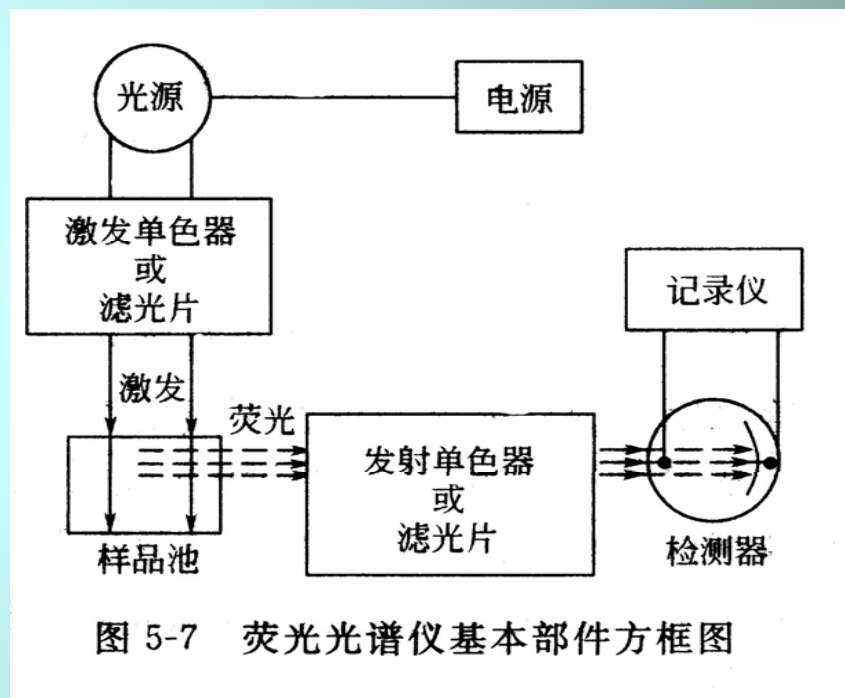
F-4500荧光分光光度计： 主机、计算机工作站、GP-IB通信接口卡

F-4500荧光分光光度计的工作原理

——主机

- 光源（氙灯）
- 单色器：激发单色器
发射单色器
- 样品池（低荧光材料）
- 检测器（光电倍增管、模/数转换器、微处理器）
- 微处理器 由GP-IB通信接口卡与计算机连接

仪器功能： 激发/发射波长扫描、
荧光强度测定、时间扫描、三维
荧光光谱扫描



- 工作原理:

氙灯产生的连续光由激发单色器色散出具有一定光谱通带的单色光，照射在样品上激发后产生的荧光，由发射单色器色散成荧光光谱，并由光电倍增管检测荧光强度，通过模/数转换器转换为数字信号，经主机微处理器由GP-IB通信卡传送到计算机工作站。计算机工作站将接受到的数字信号进行处理，由显示器显示数据及谱图。

三、实验步骤

1、样品溶液的制备（两人制备一份）

准确称取均匀的面粉样品7~8g；加入70~80ml 0.1mol·L⁻¹盐酸溶液（先加入几ml，搅拌成稀糊状，如有块状此时要用玻棒按压使颗粒分散后，再将剩余部分加入），加入150 ml沸水，煮沸30min以上。冷却后在搅拌下用NaOH溶液调节pH值至6.0~6.5，再用HCl溶液调至4.5。

将混合物定量转移至250 ml容量瓶中，用1%醋酸溶液定容（因气泡，定容时可加1滴丁醇），先离心（注意使用离心机时保持平衡）再过滤（在砂芯漏斗中放一层滤纸），取20 ml左右清晰滤液避光保存，待测。

2、实验条件的选择

(1) 激发光波长（入射光波长）EX

荧光波长（发射光波长）EM 的选择

- ①将荧光分光光度计的荧光波长（发射光波长）EM暂设定为525nm处，在400~500nm波长范围内对EX进行扫描，确定最佳的EX（最高峰值处）。
- ②然后将激发光波长（入射光波长）EX设定在最高峰值处，在500~600nm波长范围内对EM进行扫描，确定最佳的EM（最高峰值处）。

(2) 酸度的选择

分别用1: 1盐酸、1%醋酸、5%氢氧化钠定容1.00ml核黄素标液于25ml容量瓶中，测定pH值并测定荧光强度，考察酸度对荧光强度的影响，确定最佳的调节pH的溶液。

3、标准曲线的绘制（每人一份）

准确移取 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 核黄素标准溶液 1.00ml，用（2）所确定的溶液定容于 100ml 容量瓶中。然后再依次移取此标准溶液 0.00，1.00，2.00，3.00，4.00，5.00ml 于 6 个 25ml 容量瓶中，定容（用最佳溶液）。

在所选定的实验条件下，从稀到浓测定各个标准溶液的荧光强度。（测定前，用空白液（0号样品）点击基线校正。）

4、样品的测定

四、注意事项

- 1、面粉样品在加入大量液体前一定要分散开颗粒；
- 2、为保证试液澄清，先离心再过滤，注意所用的器皿尽量空干水，必要时用溶液润洗；
- 3、开机顺序：
打印机电源—主机总电源 (POWER)—氙灯电源（按下不超过一秒，黄灯应亮，打开后用支架保护）—主电源 (MAIN)（绿灯频闪2-3下后熄灭）—显示器 (CRT)—计算机
关机顺序：
终止程序——关计算机——关主电源 (MAIN) ——关主机总电源 (POWER) ——关计算机电源——关打印机电源
- 4、设置参数时要注意输出方式 (Output)，只在做标准曲线时才选择打印 (Print Report)，其它实验条件的选择等都选择数据表显示 (Excel)；
- 5、测定面粉样品前，液槽需先用蒸馏水冲洗后再使用；
- 6、维生素B₂的水溶液遇光易变质，标准溶液应新鲜配制，制好的样品应避光保存。

五、 数据处理

- 1、 记录最佳激发光波长（入射光波长）EX和最佳荧光波长（发射光波长）EM；
- 2、 记录酸度对荧光强度的影响，确定测量的最佳pH值；
- 3、 打印标准曲线；
- 4、 记录面粉样品中核黄素浓度，并计算面粉样品中核黄素的含量。