東海大學
Exp. 16 實驗報告
Tunghai University

螢光放射法定量分析維他命 B_2

系級　姓名
組別　學號
日期 109.5.3

• 螢光 (flouregcence):

— 是一种光致冷發光的現象。当某种常溫物質經某种波長的入射光 (通常是紫外線或X射線) 照射，吸收光能後進入激發態，並立即退激發並放出放射光 (通常波長比入射光的波長長，在可見光波段)；而且一但停止入射光，螢光的現象也隨之立即消失。

— 一般以持續發光的時間來分判螢光或磷光，持續發光時間短於 10^{-8} 秒的稱為螢光，持續發光時間長於 10^{-8} 秒的稱為磷光。

— 自然界中的螢光現象:
(i) 含有稀土元素的礦物螢石和方解石
(ii) 極光也是高层大氣中的螢光現象

— 螢光的應用:
(i) 照明 (ii) 生化和醫藥 (iii) 宝石学、矿物学和取證学 (iv) 印刷防偽技術

— 定性分析:
(i) 分子之螢光光譜包括激發光譜及發射光譜，可作為定性分析之參考。
(ii) 螢光之激發光譜：試樣之激發強度隨入射光波長变化之图譜；当試樣於最大螢光強度之發射波長下偵測，以掃描不同波長入射光之激發強度時，可得到螢光之激發光譜。
(iii) 螢光之發射光譜：試樣之螢光強度隨發射波長变化之图譜；当試樣以特定激發波長的入射光照射，以掃描不同發射波長下之螢光強度時，可得到螢光之發射光譜。

東海大學 Exp. 實驗報告 Tunghai University

系級 姓名

組別 學號

日期

一 定量分析：

具螢光性質的分子通常具有特徵的激發波長和發射波長，當試樣以激發波長的入射光照射，並在特徵發射波長下偵測螢光強度，則螢光強度 (F) 與試樣濃度 (c) 之關係如下：

$$F = 2.303\, k\varphi P_0\, a\, b\, c$$

F：螢光強度。 K：與儀器測定參數有關的常數。 φ：螢光物種之量子效率。 P_0：入射光的強度。 a：吸光係數。 b：光徑長度。 c：試樣濃度。

實驗步驟： A. 藥品製備

(1) 0.05 M 醋酸鈉緩衝溶液，

0.8221

稱取 0.82 g CH_3COONa + 195 ml 蒸餾水 → (完全溶解後以 CH_3COOH 調 pH 至 5.0) → (蒸餾水) → 稀釋至 200 ml

(2) 10 ppm 貯備液製備，20 ppm riboflavin

(3) riboflavin 標準溶液

☆(a) 0.5 ml 20 ppm riboflavin 溶液 → (蒸餾水) 稀釋至 50 ml

(b) 自上述溶液中分別取 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 ml → (0.05M 醋酸鈉緩衝溶液) 稀釋至 10.0 ml，以得到 5, 10, 20, 40, 60, 80 ppb riboflavin 標準溶液。

(4) 未義品製備：

0.1469 g

(a) 取一顆 Vitamin B_2 藥重 → 以石研缽磨成粉末

(b) 40 ml 蒸餾水 + 0.102 ~ 0.103 g Vitamin B_2 → (stir 完全溶解) → 1 ml CH_3COOH → 蒸餾水

0.0240

稀釋至 50 ml → 取出 0.5 ml，再稀釋至 50 ml ⇒ 備儲溶液

pH 5.02

系級　　姓名

組別　　學號

日期

(c) 1.0 ml 儲備溶液 $\xrightarrow[\text{醋酸鈉緩衝溶液}]{0.05M}$ 稀釋至 10 ml 之分析溶液

B. 螢光儀操作程序：

(1) 熱机 15 分鐘

(2) 設定條件：

Ex	wavelength	(nm)	280
Em	wavelength	(nm)	525
Ex	slit	(nm)	~~5.0~~ 10
Em	slit	(nm)	~~2.5~~ 10

C. 螢光量測：

在激發波長 280 nm，放射波長 525 nm 條件下，分別測量上述系中不同濃度 riboflavin 標準溶液及樣品分析溶液的螢光強度。

注意事項：

1. 所有器材必須多次清洗。

2. 校正 pH meter，pH 7.00 $\xrightarrow[15\text{ mins}]{\text{Cali}}$ 7.00

pH 4.00 $\xrightarrow[5\text{ mins}]{\text{slope}}$ 4.00

儀器設定：

λ_{ex}：280 nm　　$slit_{ex}$：10 nm

λ_{em}：525 nm　　$slit_{em}$：10 nm

blank：0.05 M CH_3COONa buffer，pH 5.02

結果：

1. 整顆維他命B_2藥片重量：0.1469 g
2. 維他命B_2藥片，取樣重：0.0240 g

濃度（ppb）	5	10	20	40	60	80	未知物
螢光強度	14.8	29.3	56.1	112.8	170.8	227.3	103.5

(1)利用標準溶液的螢光強度與濃度作出檢量線。

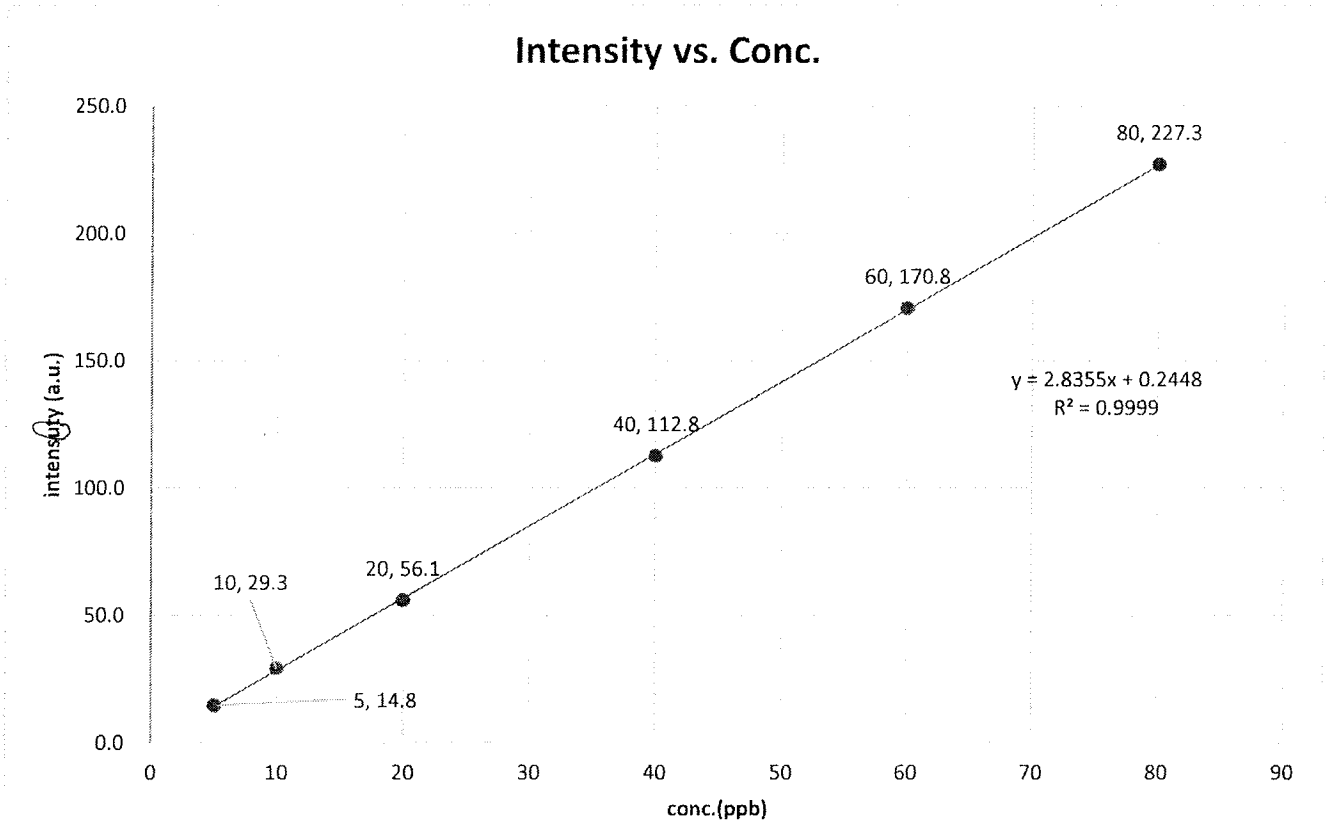
(2)由檢量曲線求出樣品分析溶液的濃度。

(3)考慮稀釋及體積因素，求出市售維他命 B_2 藥片每顆所含 riboflavin 的克數，以 mg 表示。

(1)

λ_{ex} (nm)	280.00	$slit_{ex}$ (nm)	10
λ_{em} (nm)	525.00	$slit_{em}$ (nm)	10

conc.(ppb)	5	10	20	40	60	80	未知物
intensity (a.u.)	14.8	29.3	56.1	112.8	170.8	227.3	103.5



slope	2.8355	intercept	0.2448		未知物
相關係數 r	1.0000			Intensity (a.u.)	103.5
				conc. (ppb)	36.4

1ppm = 10^{-3} ppb

系級　　姓名

組別　　學號

日期

(2) 由檢量曲線求樣品分析溶液濃度.

unknown sample 螢光強度 103.5

代入方程式 $y = 2.8355x + 0.2448$　　$R^2 = 0.9999$

$103.5 = 2.8355x + 0.2448$

$x = 36.4$ (ppb)

(3) 維他命 B_2 = 0.1469 g / 粒

取之 sample 重：0.0240 g

稀釋後濃度：3.64×10^{-8} g riboflavin / ml

$\frac{x}{1} \times \frac{0.0240}{0.1469}$ = 一顆

x = 一顆所含的 riboflavin 重

$$\frac{x}{0.1469} \times 0.0240 \times \frac{1}{50} \times 0.5 \times \frac{1}{50} \times \frac{1}{10} = 3.64 \times 10^{-8}$$

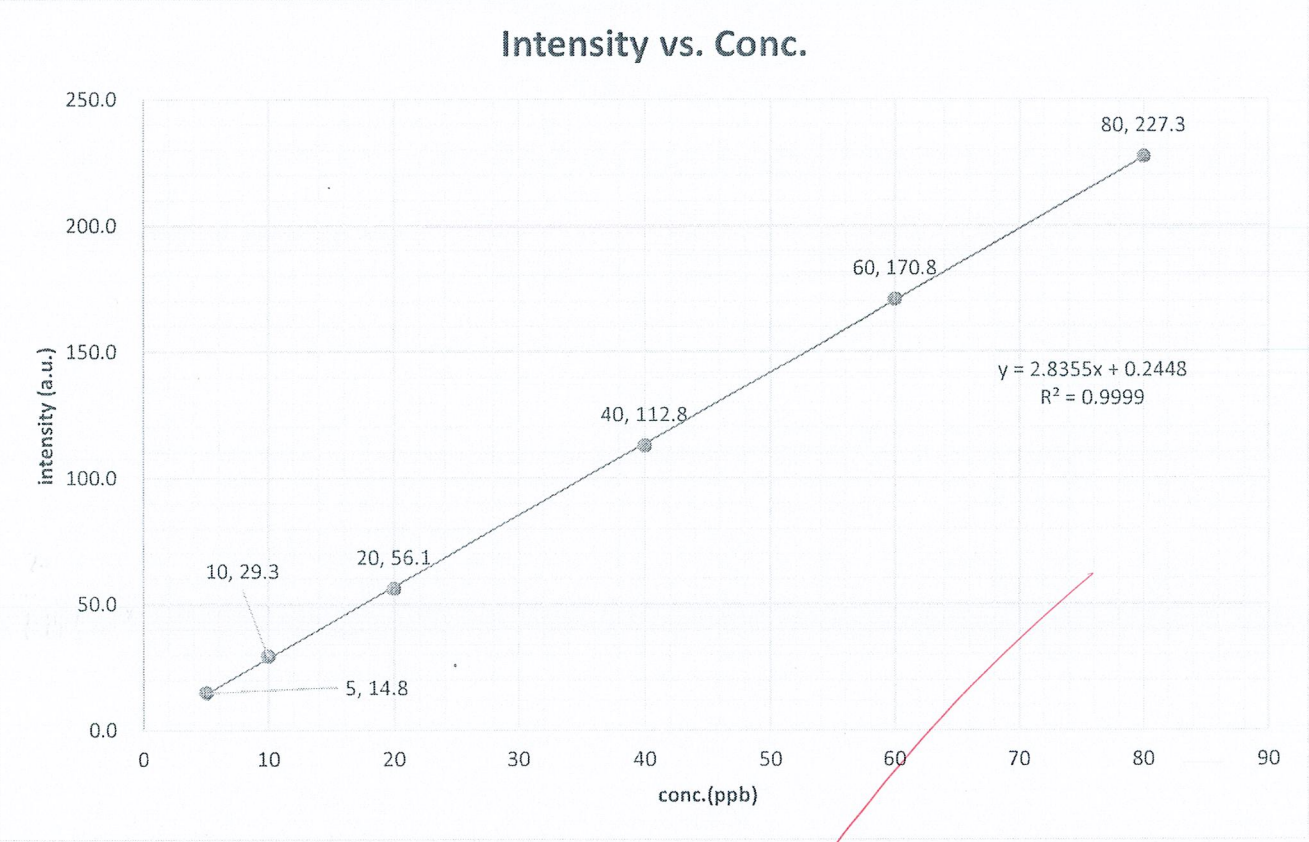
$x = 0.01113$ g = 11.14 mg

∴市售維他命 B_2 藥片每顆含 11.14 mg riboflavin

P245

λ_{ex} (nm)	280.00	$slit_{ex}$ (nm)	10
λ_{em} (nm)	525.00	$slit_{em}$ (nm)	10

conc.(ppb)	5	10	20	40	60	80	未知物
intensity (a.u.)	14.8	29.3	56.1	112.8	170.8	227.3	103.5



slope	2.8355	intercept	0.2448		未知物
相關係數 r	1.0000			Intensity (a.u.)	103.5
				conc. (ppb)	36.4

79 ppb