

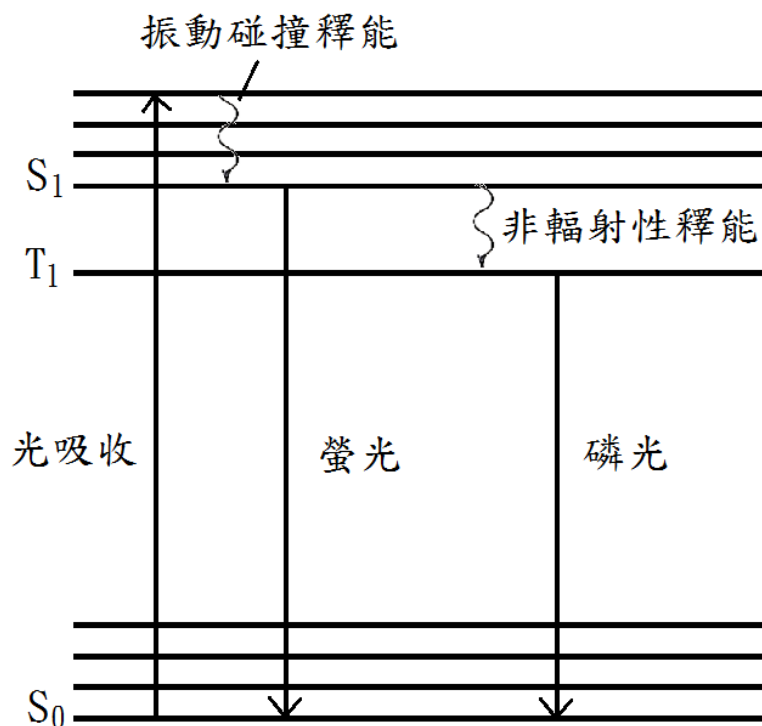
實驗十六、螢光放射法定量分析維他命 B₂

一、目的：

學習利用螢光光譜儀定量分析藥品中的維他命 B₂(Riboflavin)含量。

二、原理

螢光 (Fluorescence) 是一種由光子激發所產生的光放射 (luminescence) 現象。以一有機分子為例，其螢光放射原理可利用下面的能階圖說明。



圖一 螢光的原理

能階 (S_0) 的分子受到適當波長的光照射，分子吸收光能量而使其內能提昇當位於穩定狀態至激發狀態能階 (S_1) 中的某一高能量振動能階。在溶液裡，此不穩定的分子會立刻經由振動碰撞而將部份能量以熱的形式釋放於溶液中，其內能則下降至激發狀態 S_1 的最低振動能階。若分子本身的結構特性與周圍環境條件適合，此分子可由 S_1 直接返回 S_0 穩定狀態，並將多餘能量以光的形式釋出，這就是螢光。從圖中亦可看出，由於分子吸收的光能有

部份是經由振動碰撞而逸失，螢光放射的能量小於激發光能量，也就是說螢光放射的波長通常大於激發光波長，此稱為 Stokes law。

一個化合物的螢光量子產率(quantum yield; Q)是指放射螢光的分子數目與所有被激發的分子數目比率。量子產率與化合物分子的化學結構及分子所處的溶液環境有密切的關係，一個高螢光性分子其量子產率在某些條件下趨近於 1，而沒有明顯螢光性的化合物其量子產率趨近於零。表一列出幾種有機化合物的螢光量子產率。

表一．螢光性化合物與量子產率

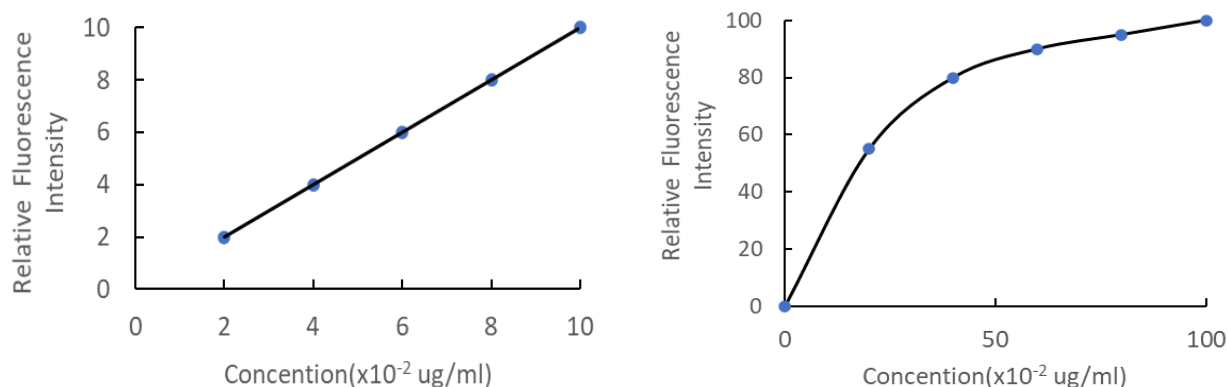
Compound	Solution	Quantum yield
Fluorescein	0.1N NaOH	0.92
Eosin	0.1N NaOH	0.19
Rhodamine B	Ethanol	0.97
riboflavin	Aqueous solution, pH 7	0.26
Anthracene	Ethanol	0.3
Naphthalene	Ethanol	0.12
Indole	water	0.45
Chlorophyll a	Ether	0.32
Chlorophyll b	Ether	0.12

一般而言，其低能量 $\pi \rightarrow \pi^*$ 躍遷能階且結構剛硬性強的多環芳香族化合物其螢光性最強，但苯環上的取代基常會影響分子對激發光的最大吸收波長，改變螢光波長範圍，甚至降低螢光效率。除分子本身結構外，溫度、溶劑組成、pH 值、溶氧等溶液環境亦會影響螢光效率，因此在進行螢光分析時，實驗條件必須控制適宜以獲得穩定且再現性佳的結果。

當溶液中的螢光性化合物濃度低時，螢光放射強度 (F) 與濃度 (C) 間應有一線性關係，可表示為

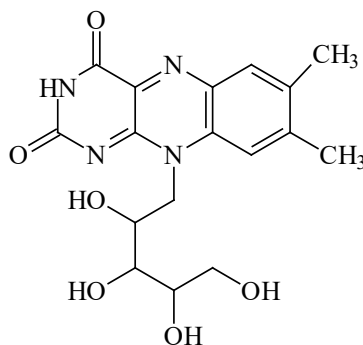
$$F = KC$$

其中 K 是常數。以量測螢光強度進行定量分析即是根據此關係式。高濃度時此線性關係不存在，這是因為兩個因素導致線性的負偏差: 自消光與自吸收。自消光是由於激發態的螢光分子在高濃度下相互碰撞機率增加，非放光形式的能量轉移更易發生，降低螢光效率。自吸收則是當螢光波長範圍與分子吸收峰部份重疊，螢光光束穿過溶液時會被穩定狀態的分子吸收，測得的螢光強度因而較低。圖二顯示 diaminostilbene 的水溶液在不同濃度範圍下的螢光強度對濃度的檢量線。



圖二 diaminostilbene 水溶液的螢光強度檢量曲線

許多具螢光放射性質的有機與生化分子均可利用螢光分析。維他命 B2 (Riboflavin; 結構如下) 是一種輔助酵素前置物 (coenzyme precursor)，它也是一個水溶性的螢光分子。



本實驗將利用螢光分析法測定市售維他命 B₂ 藥片中的 riboflavin 含量。先以標準 riboflavin 溶液製作濃度檢量線，螢光激發波長設定在 280nm，放射波長設定在 525nm，藉濃度檢量線定量分析藥片中的 riboflavin 含量。

三、儀器

Agilent technologies Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer

四、實驗步驟：

A. 藥品製備

- (1) 0.05M 醋酸鈉緩衝溶液 — 稱取 0.82 克 CH₃COONa，溶於 195 毫升蒸餾水中，再以 CH₃COOH 調整 pH 值至 5.0，最後稀釋至 200 毫升。
- (2) 20 ppm riboflavin — 以 250 毫升蒸餾水溶解 20 毫克 riboflavin，加入 10 毫升 CH₃COOH，再以蒸餾水稀釋至 1.0 升。(助教已製備)

(3)riboflavin 標準溶液的製備 —

- (a)取 0.5 毫升 20 ppm riboflavin 溶液，以蒸餾水稀釋至 50 毫升，配製成 200 ppb riboflavin 溶液。
- (b)自上述溶液中分別取 0.25，0.50，1.00，2.00，3.00，4.00 毫升，以 0.05M 醋酸鈉緩衝溶液稀釋至 10.0 毫升，分別得到 5，10，20，40，60，80 ppb riboflavin 標準溶液。

(4)樣品製備 —

- (a)取一顆市售維他命 B₂ 藥片，先稱重，記錄重量，再以研鉢磨成粉末備用。
- (b)以 40 毫升蒸餾水溶解 0.02 ~ 0.03 克維他命 B₂ 粉末，加入 1 毫升 CH₃COOH，以蒸餾水稀釋至 50 毫升，再取出 0.5 毫升進一步稀釋至 50 毫升，此為樣品儲備溶液。
- (C)取 1.0 毫升樣品儲備溶液，以 0.05M 醋酸鈉緩衝溶液稀釋至 10 毫升，此為樣品分析溶液。

B、螢光儀操作程序:

(1)熱機 15 分鐘

(2)設定儀器條件:

Ex wavelength (nm)	280
Em wavelength (nm)	525
Ex slit (nm)	10.0
Em slit (nm)	10.0

C、螢光量測:

在激發波長 280nm，放射波長 525nm 條件下，分別測量上述六種不同濃度 riboflavin 標準溶液及樣品分析溶液的螢光強度。

五、數據處理:

由實驗結果計算市售維他命 B₂ 藥片每顆所含 riboflavin 的克數，以 mg 表示。

儀器設定：

λ_{ex} : slit_{ex}:

λ_{em} : slit_{em}:

blank:

結果:

1. 整顆維他命B₂藥片重量:

2. 維他命B₂藥片，取樣重:

濃度 (ppb)							未知物
螢光強度							

(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 B₂ 藥片每顆所含 riboflavin 的克數，
以 mg 表示。