

Spektrofluorimetrijsko određivanje koncentracije riboflavina u energetskim pićima

Žugec, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:081184>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski studij Biotehnologija**

**Tea Žugec
58220448**

**Spektrofluorimetrijsko određivanje koncentracije
riboflavina u energetske pićima**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna kemija

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Spektrofluorimetrijsko određivanje koncentracije riboflavina u energetskim pićima Tea Žugec, 58220448

Sažetak:

Riboflavin (vitamin B₂) je esencijalan vitamin važan za normalno funkcioniranje metaboličkih procesa u organizmima. Zahvaljujući strukturi molekule, riboflavin ima sposobnost fluorescencije. Prirodni izvori riboflavina su hrana biljnog podrijetla, mlijeko i jaja, a može se pronaći i u komercijalnim prehrambenim proizvodima poput energetskih napitaka. Cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju riboflavina u energetskim pićima pomoću spektrofluorimetrijske metode. Spektrofluorimetrija je korištena zbog svoje jednostavnosti i osjetljivosti te zbog fluorescencije riboflavina. Dobiveni rezultati, odnosno izmjerene koncentracije, pokazuju da je spektrofluorimetrijska metoda učinkovita metoda za određivanje koncentracije riboflavina u energetskim pićima. Osim samih izmjerenih koncentracija, koje se u pravilu poklapaju s deklariranim, točnost metode korištene u svrhu određivanja koncentracije riboflavina u energetskim pićima potvrđuju i rezultati provedene metode dodatka standarda.

Ključne riječi: riboflavin, spektrofluorimetrija, metoda dodatka standarda

Rad sadrži: 21 stranica, 6 slika, 2 tablice, 15 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Filip Šupljika

Datum obrane: 1. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology or Biotechnology or Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Spectrofluorimetric determination of concentration of riboflavin in energy drinks

Tea Žugec, 58220448

Abstract:

Riboflavin (vitamin B₂) is an essential vitamin important for normal functioning of metabolic processes in organisms. Due to the structure of molecule, riboflavin has ability to fluoresce. Natural sources of riboflavin are food of plant origin, milk and eggs, however it can be found in commercial food products such as energy drinks. The aim of this study was to determine concentration of riboflavin in energy drinks using the spectrofluorimetric method. Spectrofluorimetry is used because of its simplicity and sensitivity and because of fluorescence of riboflavin. The results obtained, i.e. the concentrations measured in this study show that the spectrofluorimetric method is an effective method for determination of concentrations of riboflavin in energy drinks. Besides the measured concentrations that generally coincide with declared ones, accuracy of the method used to determine the concentration of riboflavin in energy drinks is confirmed by results of the standard addition method.

Keywords: riboflavin, spectrofluorimetry, standard addition method

Thesis contains: 21 pages, 6 figures, 2 tables, 15 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Filip Šupljika, PhD, Assistant Professor

Technical support and assistance: Filip Šupljika, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: September, 1, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. RIBOFLAVIN	2
2.2. SPEKTROSKOPSKO ODREĐIVANJE RIBOFLAVINA	3
2.3. SPEKTROFLUORIMETRIJA.....	5
2.4. ENERGETSKA PIĆA.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI.....	8
3.2. METODE.....	8
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	13
5. ZAKLJUČCI	19
6. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

Riboflavin, derivat izoaloksazina, je vitamin skupine B čiju osnovnu strukturu čini triciklički heteronuklearni prsten, a osim same osnove sadrži i ribitolni pobočni ogranak. Radi se o vitaminu topljivom u vodi koji je za ljudski organizam esencijalan, odnosno potreban je svakodnevni unos. Molekule riboflavina imaju vrlo važnu ulogu u raznim metaboličkim procesima organizama. Strukturna građa izoalksazinskog prstena riboflavina odgovorna je za sposobnost istog da fluoreskira prilikom izlaganja UV svjetlu. Fluorescencija molekula javlja se prilikom vraćanja pobuđenih atoma nazad u njihovo osnovno stanje.

Riboflavin je u manjim koncentracijama prisutan u energetske pićima. Energetska pića su bezalkoholna pića koja sadrže velike količine šećera i kofeina. Na ljudski organizam djeluju tako da stimuliraju središnji živčani sustav uzrokujući pritom kratkoročno podizanje razine energije i koncentracije.

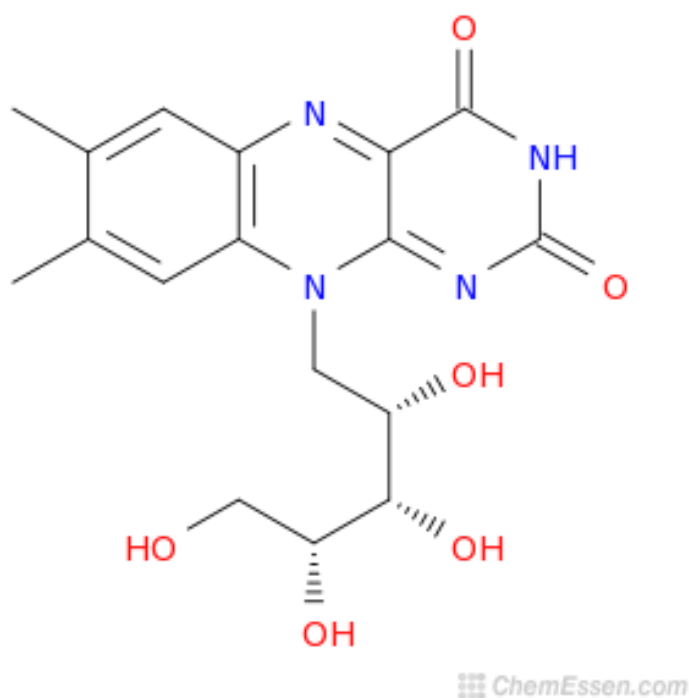
Spektrofluorimetrija jest analitička metoda koja se temelji na mjerenju intenziteta fluorescencije, a mjerni uređaj za spomenutu metodu je spektrofluorimetar. Sama metoda je osjetljiva, selektivna, nedestruktivna u odnosu na analit, brza i jednostavna za provođenje. Bitna prednost je i mogućnost rada pri niskim koncentracijama analita.

Cilj ovog rada bio je spektrofluorimetrijskom metodom odrediti koncentracije riboflavina u uzorcima različitih energetske napitaka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RIBOFLAVIN

Riboflavin pripada skupini B vitamina te je poznat kao vitamin B₂. Vitamini su organski spojevi u malim količinama potrebni za rad i funkcioniranje organizma. Riboflavin je derivat izoaloksazina, tricikličkog heteronuklearnog prstena koji čini osnovu strukture flavina. Također, u strukturi riboflavina (Slika 1.) prisutan je i D-ribitol kao pobočni ogranak povezan preko dušikovog atoma strukturne osnove (Ghann, 2008). Ribitol je alkohol nastao redukcijom pentoznog šećera riboze, odnosno njezine karbonilne skupine (ChEBI, 2020). Molekulska formula glasi C₁₇H₂₀N₄O₆, a prema IUPAC-ovom nazivlju riboflavin se naziva 7,8-dimetil-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroksipentil]benzo[g]pteridin-2,4-dion. Molekulska masa spoja iznosi 376,4 g/mol (Ghann, 2008; NIH, 2005).



Slika 1. Struktura riboflavina (Anonymous 1, 2022)

Riboflavin u čvrstom stanju tvori žuto-narančaste kristale. Kao i ostali pripadnici skupine B vitamina, topljiv je u vodi. Pokazuje stabilnost u neutralnim i blago kiselim otopinama. Vitamin B₂ osjetljiv je na svjetlost te pokazuje nestabilnost, pri čemu dolazi do razgradnje molekula tijekom dužeg izlaganja. Otopine riboflavina žute su boje. Iz samog imena vitamina B₂ moguće

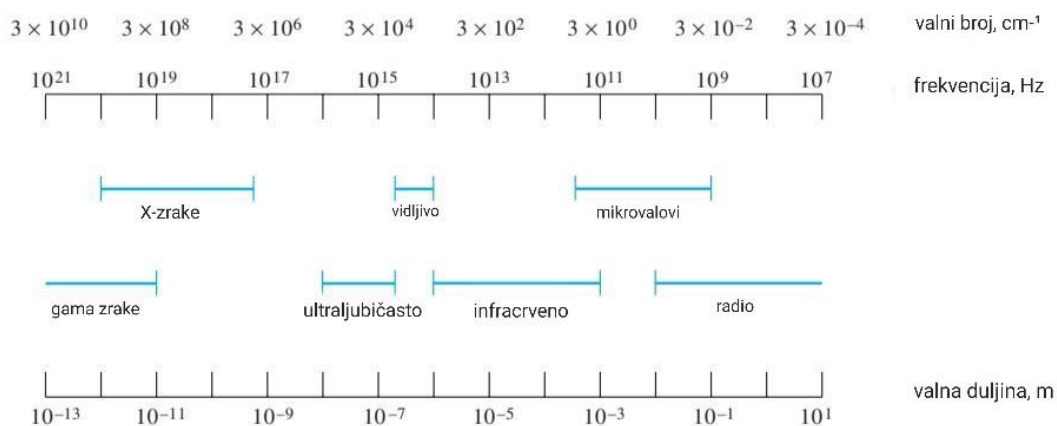
je naslutiti njegovo obojenje s obzirom da *flavus* na latinskom znači žuti. Riboflavin je odgovoran za obojenje mnogih prehrambenih proizvoda, između ostalog i energetske pića (Internetska nutricionistička enciklopedija, 2015; Ghann, 2008). Prirodno je prisutan u hrani biljnog podrijetla, jajima i mlijeku te posjeduje antioksidativna svojstva. S obzirom da je riboflavin topljiv u vodi, ne zadržava se u tijelu, već ga je potrebno svakodnevno unositi. Preporučeni dnevni unos ovog vitamina iznosi 1,8 g za odraslu osobu (Hrvatska enciklopedija, 2021).

S obzirom da je sastavni dio flavoproteina, riboflavin ima važnu ulogu u metaboličkim procesima organizma. Naime, flavoproteini su enzimi čiji je koenzim derivat riboflavina. Takvi su koenzimi flavin adenin dinukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN) koji sudjeluju u proizvodnji stanične energije, ciklusu limunske kiseline, ciklusu razgradnje masnih kiselina i oksidativnoj fosforilaciji (Ghann, 2008).

Riboflavin pokazuje fluorescenciju prilikom izlaganja UV svjetlu valnih duljina od 440 do 500 nm. Za sposobnost spoja da fluorescira odgovorni su π -konjugirani elektroni i rezonancija iz izoaloksazinskog prstena. Također, heterociklički i aromatski dijelovi strukture, kao što je izoaloksazin, pojačavaju samu fluorescenciju (Ghann, 2008).

2.2. SPEKTROSKOPSKO ODREĐIVANJE RIBOFLAVINA

Spektroskopske metode temelje se na međudjelovanju zračenja i čestica iz uzorka nad kojim se vrši analiza. Pritom se najčešće radi o elektromagnetskom zračenju. Elektromagnetsko zračenje istovremeno pokazuje i svojstva vala i svojstva čestice. Elektromagnetsko zračenje, promatrano kao val, sastoji se od električnog i magnetskog polja koji osciliraju po sinusoidi okomito jedan na drugog te okomito na smjer širenja vala. Sve vrste elektromagnetskih valova prikazane su spektrom elektromagnetskog zračenja (Slika 2.). Ukoliko se elektromagnetsko zračenje promatra kao čestica, takvo se zračenje sastoji od paketa energije nazvanih fotoni ili kvanti.



Slika 2. Spektar elektromagnetskog zračenja (Skoog, Holler, Crouch, 2016)

Snaga zračenja koje emitiraju molekule analita prilikom pobuđivanja direktno je proporcionalna koncentraciji tog analita u otopini uzorka. Pojmovi koji su povezani s elektromagnetskim zračenjem, a istovremeno su od velike važnosti za spektroskopske metode su svakako transmitacija i apsorbancija. Transmitacija (T) jest omjer zračenja koje je prošlo kroz uzorak (P) i upadnog zračenja (P_0) dok se apsorbancija (A) definira kao logaritamska vrijednost omjera upadnog zračenja (P_0) i zračenja koje je prošlo kroz uzorak (P). Odnos zračenja i koncentracije analita definiran je Beer-Lambertovim zakonom koji predstavlja matematički opis apsorbancije (A):

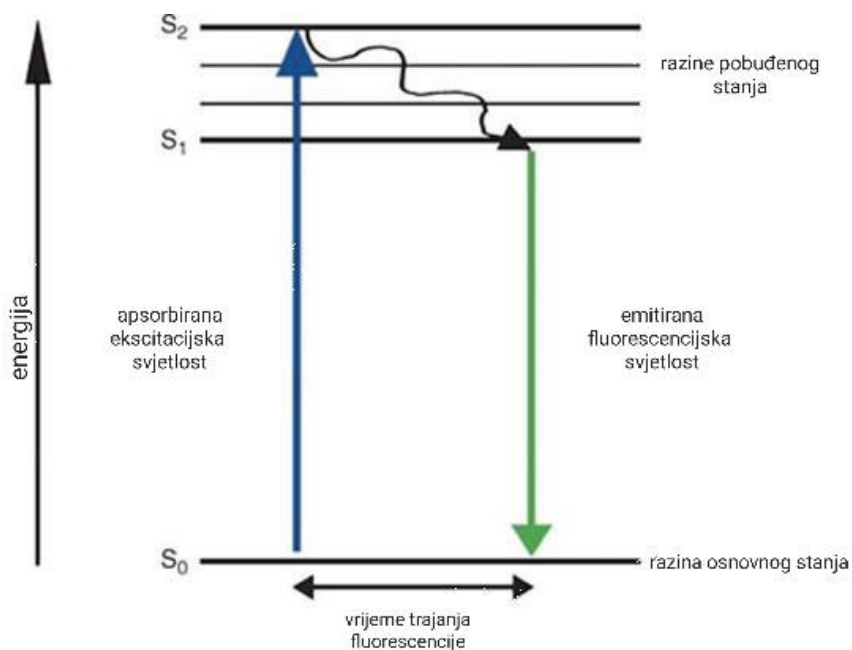
$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

U jednadžbi 1 A označava apsorbanciju pri određenoj valnoj duljini, a ϵ predstavlja molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) karakterističan za određenu molekulsku vrstu. b je duljina puta svjetlosti kroz uzorak i najčešće se može poistovjetiti sa širinom kivete. Konačno, c je množinska koncentracija molekula analita u uzorku.

Beer-Lambertov zakon dobro opisuje apsorbanciju u otopinama koje sadrže niže koncentracije analita (najčešće do $0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Pri analizi koncentriranijih otopina do izražaja dolaze međusobne interakcije molekula analita te interakcije molekula analita i molekula otapala. Posljedično dolazi do odstupanja od Beer-Lambertovog zakona (Skoog, Holler, Crouch, 2016).

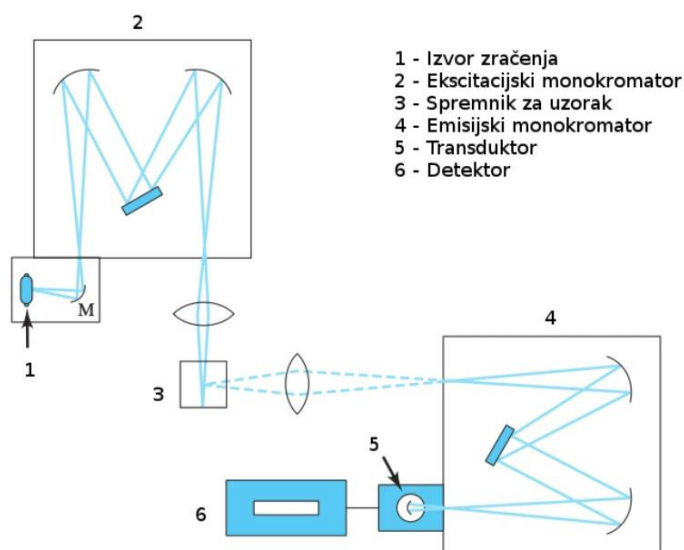
2.3. SPEKTROFLUORIMETRIJA

Spektrofluorimetrija jest analitička metoda zasnovana na mjerenju intenziteta fluorescencije. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji fluorescirajućeg spoja u uzorku (Nežić, 2018). Fluorescencija se definira kao pojava emisije svjetlosti koja nastaje prilikom vraćanja pobuđenog atoma ili molekule u njegovo osnovno stanje, a emisija se odvija vrlo kratko nakon nestanka izvora pobude (Britannica, 2023). Vrijeme trajanja fluorescencije reda je veličine nanosekunde. Sukladno tome, da bi došlo do fluorescencije, potrebno je atome odnosno molekule dovesti u stanje više energije, zvano pobuđeno stanje. Atomi i molekule se u pobuđeno stanje dovode na način da apsorbiraju fotone. Do emisije svjetlosti dolazi zbog spontanog otpuštanja energije i prijenosa na susjedne molekule ili atome. Pritom vrijedi Stokesov zakon koji nalaže da je emitirana svjetlost veće valne duljine od one apsorbirane. Energija se spontano emitira sve dok se prvobitni atom ili molekula ne vrate u stanje najniže energije koje se naziva osnovno stanje. Fluoresciranje molekule ili atoma može se pojednostavljeno objasniti pomoću dijagrama Jablonskog (Slika 3.) koji prikazuje osnovno i pobuđeno stanje molekule ili atoma te apsorbiranu i emitiranu svjetlost. Apsorbirana svjetlost dovodi atom ili molekulu iz osnovnog u pobuđeno stanje, zatim u takvom stanju atom ili molekula predaju dio energije susjednim česticama dok ostatak energije otpuštaju u obliku emitirane svjetlosti, odnosno fluorescencije (Hofmann, 2010).



Slika 3. Dijagram Jablonskog (Anonymous 2, 2007)

Spektrofluorimetrija, odnosno mjerenje fluorescencije vrši se pomoću mjernog instrumenta koji se naziva spektrofluorimetar. Dijelovi spektrofluorimetra (Slika 4.) su izvor zračenja, ekscitacijski monokromator, spremnik za uzorak, emisijski monokromator, transduktor i detektor.



Slika 4. Dijelovi spektrofluorimetra (Skoog i sur., 2016)

Izvor zračenja zadužen je za emitiranje zračenja i kod spektrofiorimetara se u tu svrhu najčešće koristi ksenonska lampa. Ekscitacijski monokromator od snopa svjetlosnih zraka koje potječu iz izvora selektira samo svjetlost određene valne duljine koja omogućuje pobuđivanje molekula uzorka. S druge strane, emisijski monokromator pak selektira zrake svjetlosti koje emitira pobuđeni uzorak i time omogućava da do detektora dolazi samo svjetlost određene valne duljine, a ne čitavi snop. Selektivni filter za emitiranu svjetlost postavlja se pod kutem od 90° između uzorka i detektora. Prilikom mjerenja, uzorak se stavlja u kivete od kvarcnog stakla koje imaju sve četiri stranice glatke i prozirne (Nežić, 2018; Ghann, 2008).

Spektrofiorimetrijska metoda selektivna je i neinvazivna metoda te nije destruktivna s obzirom na promatrani uzorak. Vrlo je osjetljiva te može detektirati koncentracije analita i do 1×10^{-8} mol/dm⁻³. Također, radi se o brznoj metodi pri kojoj su rezultati dostupni u roku nekoliko minuta. S obzirom na temperaturnu osjetljivost fluorofora, prilikom analize uzorka navedenom metodom važan parametar je svakako i temperatura pa je prilikom mjerenja uzorke potrebno termostatirati (Ghann, 2008).

2.4. ENERGETSKA PIĆA

Energetska pića su bezalkoholna pića koja sadrže velike količine šećera i kofeina te sastojke poput taurina, ginsenga, guarane i vitamina B skupine. Iako su na tržištu prisutni razni energetske napici mnogobrojnih proizvođača, po sastavu se minimalno razlikuju. Jedna limenka od 250 ml napitka prosječno sadrži 80-300 mg kofeina te čak 27 g šećera (HZJZ, 2023). Kofein je alkaloid i purinski derivat ksantina i njegova molekulska formula glasi C₈H₁₀N₄O₂. Djeluje na ljudsko tijelo tako da stimulira središnji živčani sustav. Konzumiranje kofeina u umjerenim dozama (50-200 mg) uzrokuje podizanje energije i bolju koncentraciju te smanjuje umor, ali prekomjerni unos može dovesti do ubrzanih otkucaja srca te povećanog krvnog tlaka (HARVARD T.H. CHAN, 2020). Energetska pića tako uzrokuju kratkoročan osjećaj podizanja razine energije te poboljšanja koncentracije i same mentalne i kognitivne sposobnosti. Nakon kratkotrajnog naleta energije, tijelo se ponovno vraća u stanje padajuće razine energije (HARVARD T.H. CHAN, 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- riboflavin (Sigma Life Science)
- glacijalna octena kiselina (Alkaloid Skopje, pro analysi)
- destilirana voda

3.1.2. Aparatura i pribor

- analitička vaga METTLER TOLEDO
- automatske pipete
- Erlenmayerova tikvica 100 ml
- staklene boce 200 ml
- bočice 5 i 10 ml
- spektrofluorimetar PerkinElmer LS 55
- kvarcne kivete
- ultrazvučna kupelj BANDELIN SONOREX DIGIPLUS
- termostatirana kupelj HAAEKE K
- pH-metar METTLER TOLEDO
- staničevina

3.2. Metode

3.2.1. Priprema otopina riboflavina za izradu baždarnog dijagrama

Za potrebe izrade baždarnog dijagrama najprije je pripravljeno 100 ml stock otopine riboflavina koncentracije $8 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^{-3}$. Na osnovu proizvoljnog volumena od 100 ml te navedene koncentracije izračunata je potrebna masa riboflavina u prahu. Otopina je pripravljena u Erlenmayerovoj tikvici otapanjem 3,0109 mg riboflavina u krutom stanju u 100 ml približno 1%-tne octene kiseline. Korištena octena kiselina pripravljena je razrjeđivanjem glacijalne 99,5%-tne octene kiseline na način da se 0,95 ml koncentrirane octene kiseline razrijedilo s 99,05 ml destilirane vode.

Za izradu baždarnog dijagrama korištene su otopine riboflavina različitih koncentracija. Otopine su pripravljene u staklenim bočicama od 5 ili 10 ml s plastičnim čepom. Sve

upotrebljavane otopine dobivene su razrjeđivanjem stock otopine riboflavina s razrjeđenom, približno 1%-tnom octenom kiselinom.

Pripremljene otopine čuvane su u hladnjaku na 4 °C u ambalaži omotanoj aluminijskom folijom kako bi se spriječio utjecaj svjetlosti na analit. Takav način čuvanja otopina nužan je zbog očuvanja molekula riboflavina i njegovih svojstava.

3.2.2. Izrada baždarnog dijagrama za spektrofluorimetrijsko određivanje riboflavina

Otopine različitih koncentracija analizirane su pomoću spektrofluorimetra PerkinElmer LS 55. Spektrofluorimetar je povezan s računalom putem računalnog programa FL WinLab u kojem je moguće prilagoditi parametre snimanja svakog uzorka. Također, uređaj je povezan s termostatom kupelji HAAEKE K koja održava temperaturu analiziranog uzorka konstantnom. Radna temperatura termostata kupelji tijekom svih je mjerenja bila namještena na 25,0 °C s mogućim odstupanjem od $\pm 0,2$ °C.

Parametri spektrofluorimetra korišteni prilikom izrade baždarnog dijagrama su sljedeći:

- spektar valnih duljina snimanja: 480-700 nm
- valna duljina pobude (sukladno podacima iz literature (Ghann, 2008)): 444 nm
- slitovi: ex. slit - 5 nm; em. slit - 3 nm
- brzina snimanja: 100 nm /min

Navedeni parametri primijenjeni su na sva mjerenja.

Kiveta od kvarcnog stakla, napunjena s 2 ml otopine za analizu, stavlja se na predviđeno mjesto u spektrofluorimetru. Analiza uzoraka pomoću spektrofluorimetra zahtijeva korištenje kiveta izrađenih od kvarcnog stakla koje imaju sve 4 stranice bistre. Za svaki uzorak mjerenje je provedeno u 3 paralele. Otopine su mjerene redom od otopine najmanje koncentracije riboflavina do one najveće koncentracije. Između mjerenja otopina različitih koncentracija svaka je kiveta oprana. Kivete su prane vodom, a potom i etanolom te potpuno osušene s ciljem uklanjanja zaostalih kapljica koje bi mogle utjecati na koncentraciju otopine u kivetu te posljedično tome na rezultate mjerenja intenziteta fluorescencije. Uz to, prije samog postavljanja kivete s uzorkom u spektrofluorimetar, vanjštinu kivete potrebno je pobrisati

staničevinom.

Svakom uzorku mjeren je pH pomoću pH-metra METTLER TOLEDO.

Osim samih uzoraka, sniman je i emisijski spektar razrijeđene octene kiseline, odnosno uzorka slijepe probe čija se vrijednost relativnog intenziteta fluorescencije prilikom obrade podataka oduzima od izmjerene vrijednosti za otopinu određene koncentracije riboflavina. Navedni se korak provodi kako bi se minimizirao utjecaj otapala na analiziranu vrijednost, odnosno da bi se konačna vrijednost intenziteta fluorescencije odnosila isključivo na analit.

Za izradu dijagrama ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji korišten je maksimum fluorescencije koji je zabilježen pri valnoj duljini od 525 nm. S obzirom da su za svaki uzorak dobivene 3 vrijednosti maksimuma fluorescencije za istu koncentraciju riboflavina, baždarni dijagram izrađen je uvrštavanjem aritmetičke sredine spomenutih vrijednosti. Na apscisi dijagrama nalazi se koncentracija riboflavina, a na ordinati vrijednost relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini od 525 nm. Kao posljednji korak izrade baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije riboflavina spektrofluorimetrijskom metodom izvedena je jednadžba pravca baždarnog dijagrama.

Obrada podataka koja uključuje oduzimanje slijepe probe, izračunavanje aritmetičkih sredina vrijednosti triju mjerenja te izrada grafičkih prikaza međusobne ovisnosti veličina izvršena je u računalnom programu OriginPro 7.5.

3.2.3. Degaziranje energetskih napitaka

Prije same analize energetskog napitka proveden je korak degaziranja istog. Energetski napitak je najprije iz originalne ambalaže premješten u čistu staklenu bocu s odgovarajućim poklopcem. Postupak degaziranja proveden je u ultrazvučnoj kupelji BANDELIN SONOREX DIGIPLUS.

Parametri prilikom degaziranja u ultrazvučnog kupelji:

- temperatura: 25 °C
- %: 40
- vrijeme trajanja: 10 min

Svrha provedbe koraka degaziranja energetskih pića prije spektrofluorimetrijske analize jest

uklanjanje mjehurića koji predstavljaju potencijalne smetnje prilikom snimanja uzorka.

3.2.4. Spektrofluorimetrijsko određivanje koncentracije riboflavina u uzorcima energetskih pića

Tijekom ovog eksperimentalnog procesa analizirano je 9 različitih energetskih pića. Svako piće je prije spektrofluorimetrijske analize razrijeđeno kako bi koncentracija uzorka koji ide na analizu bila unutar opsega koncentracija koje pokriva prethodno konstruirani baždarni dijagram. Ovisno o deklariranoj koncentraciji riboflavina u određenom napitku, analizirani energetski napitci su različito razrjeđivani s razrijeđenom, približno 1%-tnom, octenom kiselinom. Razrijeđeni uzorci pripremljeni su u bočicama od 5 ili 10 ml. Svakom je uzorku izmjeren pH. 2 ml uzorka je zatim automatskom pipetom otpipetirano u kvarcnu fluorimetrijsku kivetu. Svaku kivetu potrebno je staničevinom obrisati izvana kako bi se s vanjske strane kivete uklonila zaostala prašina i druge nečistoće koje bi mogle utjecati na kasnije mjerenje. Kiveta s uzorkom postavljena je u spektrofluorimetar na odgovarajuće mjesto. Svi uvjeti mjerenja i parametri spektrofluorimetra postavljeni su kao i prilikom spektrofluorimetrijskog analiziranja otopina različitih koncentracija riboflavina korištenih za izradu baždarnog dijagrama. Nužno je da mjerenja za izradu baždarnog dijagrama i mjerenja uzoraka budu provedena u identičnim uvjetima kako bi baždarni dijagram davao točne informacije o uzorcima. Svaki uzorak analiziran je u 3 paralele s ciljem smanjivanja mogućnosti pogreške prilikom mjerenja.

Za eksperimentalno određivanje koncentracije riboflavina u određenom energetskom napitku korištena je aritmetička sredina triju vrijednosti maksimuma relativnog intenziteta fluorescencije, odnosno relativnog intenziteta fluorescencije na 525 nm. Dobivena srednja vrijednost intenziteta fluorescencije uvrštena je u jednadžbu pravca baždarnog dijagrama da bi se kao rezultat dobila koncentracija riboflavina.

3.2.5. Metoda dodatka standarda

Metoda dodatka standarda provedena je u svrhu potvrđivanja pretpostavke da određena koncentracija riboflavina u otopini povećava vrijednost intenziteta fluorescencije za točno određenu vrijednost. Sukladno tome, cilj metode dodatka standarda bio je ispitivanje točnosti

same spektrofluorimetrijske metode. Spomenuta metoda ispitana je na jednom energetsom piću.

Pripremljena su 4 uzorka za analizu. Prvi je uzorak pripremljen razrjeđivanjem originalnog energetskeg napitka s približno 1%-tnom octenom kiselinom. Preostala su 3 uzorka dobivena razrjeđivanjem energetskeg napitka razrijeđenom, približno 1%-tnom, octenom kiselinom te dodatkom stock otopine riboflavina.

Otopine su pripremljene i čuvane u staklenim bočicama od 5 ili 10 ml.

Za svaki od 4 uzorka provedena su 3 spektrofluorimetrijska mjerenja. Osim samih mjerenja uzoraka, izmjeren je i intenzitet fluorescencije uzorka slijepe probe koja se pri obradi podataka oduzima od svih mjerenja uzoraka. Također, svakom od uzoraka korištenih za provedbu metode dodatka standarda izmjerena je pH vrijednost.

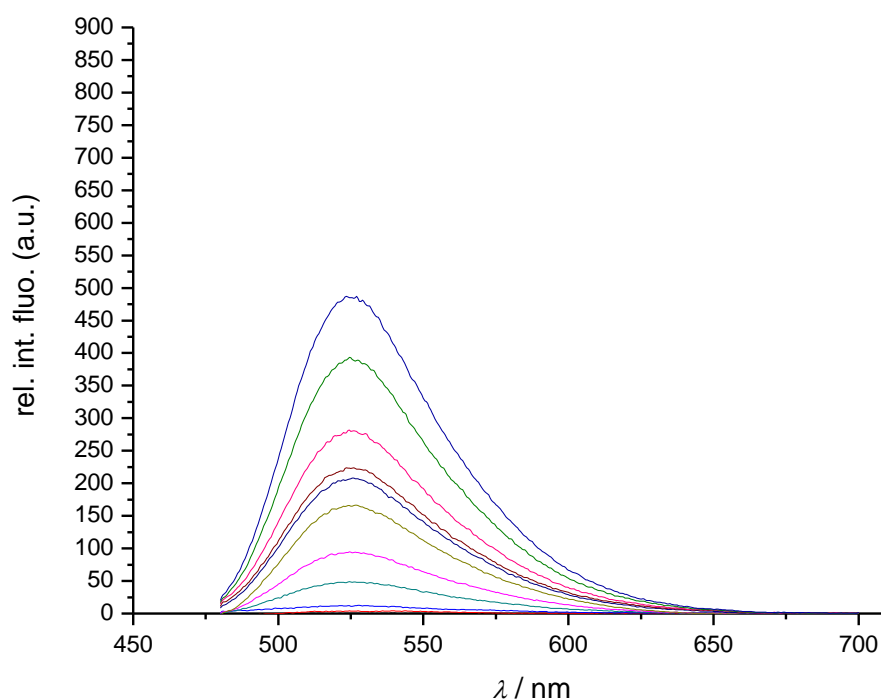
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Cilj ovog rada je određivanje koncentracije riboflavina u energetske pićima pomoću spektrofotometrijske metode. Eksperiment je započet izradom baždarnog dijagrama. Ostatak eksperimentalnog procesa sastoji se od analize 9 različitih energetske pića i određivanja koncentracije riboflavina u istim na osnovu prethodno izrađenog baždarnog dijagrama. Također, provedena je i metoda kojom se provjerava točnost spektrofotometrijske metode korištene za mjerenje koncentracije riboflavina.

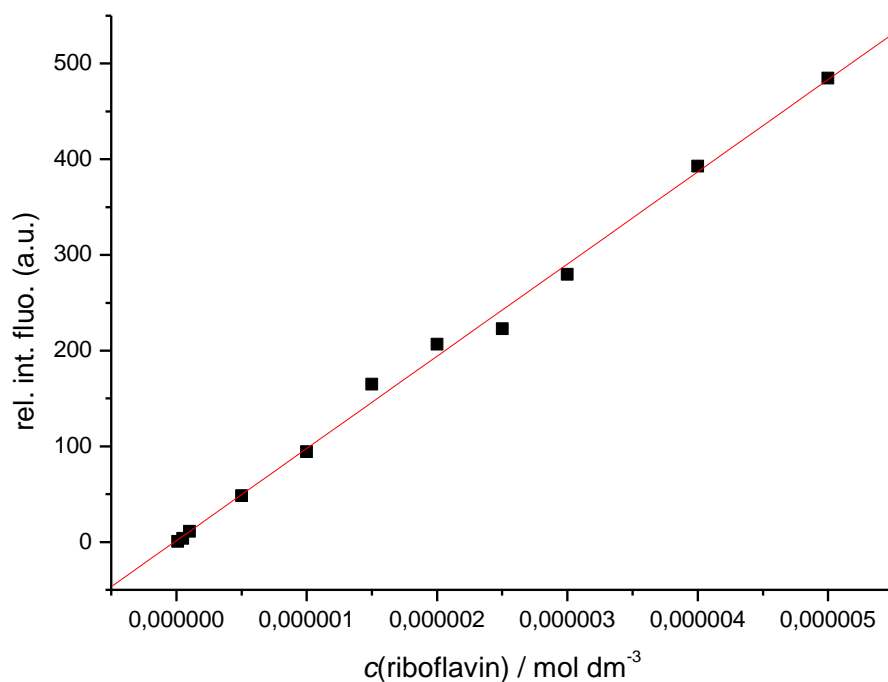
4.2. Izrada baždarnog dijagrama

Za potrebe izrade baždarnog dijagrama spektrofotometrijskom metodom izmjeren je intenzitet fluorescencije 11 otopina riboflavina poznatih koncentracija (Slika 5.). Raspon koncentracija kreće se od $1 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ do $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 5. Spektrofotometrijski emisijski spektar riboflavina

Baždarni dijagram konstruiran je u obliku pravca koji prikazuje ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini od 525 nm na kojoj je zabilježen apsorpcijski maksimum o koncentraciji riboflavina u analiziranoj otopini (Slika 6.).



Slika 6. Baždarni dijagram riboflavina

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 9,636 \times 10^7 x + 1,413 \quad (2)$$

Sve otopine korištene za izradu baždarnog dijagrama pokazivale su pH vrijednost u rasponu od $3,1 \pm 0,1$.

4.3. Spektrofluorimetrijsko određivanje koncentracije riboflavina u uzorcima energetskih pića

Devet različitih energetskih napitaka analizirano je spektrofluorimetrom te je za svaki uzorak mjerenje ponovljeno 3 puta. Srednja vrijednost triju vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini maksimuma relativnog intenziteta fluorescencije od 525 nm za svaki uzorak uvrštena je u jednadžbu pravca baždarnog dijagrama (Jednadžba 2.). U svrhu pojednostavljivanja prikaza jednadžba pravca preuređena je kako bi se izvela eksplicitna jednadžba. Eksplicitna jednadžba za određivanje koncentracije riboflavina u energetskim pićima glasi:

$$c(\text{ED})/\text{mol dm}^{-3} = \frac{\text{rel.int.fluo}(\text{ED})-1,413}{9,636 \times 10^7} \quad (3)$$

Izravnim korištenjem eksplicitnog oblika jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (Jednadžba 3.) izračunate su koncentracije riboflavina u analiziranim uzorcima energetskih napitaka (Tablica 1.). S obzirom da je na deklaraciji proizvoda koncentracija riboflavina izražena u obliku masene koncentracije, sve izračunate molarne koncentracije preračunate su i u masene koncentracije riboflavina.

Tablica 1. Koncentracije riboflavina u analiziranim energetskim pićima

Energetsko piće	$c(\text{ED})/\text{mol dm}^{-3}$	$\gamma / \text{g dm}^{-3}$	$\gamma / \text{g dm}^{-3}$ (deklarirano)
ED 1	$(2,16 \pm 0,16) \times 10^{-5}$	$8,13 \times 10^{-3}$	6×10^{-3}
ED 2	$(2,14 \pm 0,09) \times 10^{-5}$	$8,05 \times 10^{-3}$	7×10^{-3}
ED 3	$(7,11 \pm 0,40) \times 10^{-6}$	$2,68 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
ED 4	$(1,42 \pm 0,01) \times 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-3}$	/
ED 5	$(5,25 \pm 0,14) \times 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-2}$	7×10^{-3}
ED 5	$(5,05 \pm 0,36) \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^{-2}$	7×10^{-3}
ED 6	$(2,08 \pm 0,11) \times 10^{-5}$	$7,84 \times 10^{-3}$	6×10^{-3}
ED 7	$(1,68 \pm 0,17) \times 10^{-6}$	$6,33 \times 10^{-4}$	/
ED 8	$(1,82 \pm 0,06) \times 10^{-5}$	$6,85 \times 10^{-3}$	/
ED 9	$(1,93 \pm 0,04) \times 10^{-6}$	$7,26 \times 10^{-4}$	/

/ - koncentracija riboflavina nije deklarirana na proizvodu

U 4 od 5 analiziranih energetskih napitaka koji su na ambalaži imali deklariranu koncentraciju riboflavina dobivena koncentracija odgovara deklariranoj. Pritom se odstupanja od $\pm 0,002 \text{ g dm}^{-3}$ mogu pripisati osobinama same metode. Osjetljivost spektrofotometrijske metode, točnost volumena automatskih pipeta te ljudska pogreška neki su od mogućih faktora koji su doveli do odstupanja.

Analizom jednog energetskog pića s deklariranom koncentracijom (ED 5) dobivena se koncentracija ne slaže s onom deklariranom. Za navedeni su uzorak sva mjerenja ponovljena dva puta te su obje analize u konačnici dovele do istih rezultata.

Svim analiziranim uzorcima pH vrijednost izmjerena prije same spektrofotometrijske analize iznosila je $3,1 \pm 0,1$.

4.4. Dodatak standarda

Metoda dodatka standarda provedena je u svrhu provjere točnosti same spektrofluorimetrijske metode. Postupak je izvršen na 4 različita uzorka jednog energetskog napitka (ED 1). Prilikom pripreme uzoraka pretpostavlja se da je točna koncentracija riboflavina u energetskom piću ona koja je dobivena tijekom ovog eksperimenta u koraku određivanja koncentracije spektrofluorimetrijskom metodom. Spomenuta koncentracija za energetski napitak na kojem je provedena metoda dodatka standarda iznosi $(2,16 \pm 0,16) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Pripremljene su 4 otopine za analizu. Koncentracije otopina iznosile su redom $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ te $4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, pri čemu svaki idući uzorak sadrži dvostruko veću koncentraciju od prethodnog. Pritom je vrlo važan upravo taj odnos koncentracija u uzorcima kako bi nakon analize odnos izmjerenih maksimuma relativnih intenziteta fluorescencije bio usporediv. Pretpostavka je da će se relativni intenziteti fluorescencije izmjereni spektrofluorimetrom odnositi jednako kao i koncentracije riboflavina, odnosno da će navedene veličine biti proporcionalne. Ukoliko je koncentracija drugog uzorka dvostruko veća od koncentracije prvog, sukladno hipotezi, relativni intenzitet fluorescencije drugog uzorka bit će također dvostruko veći nego za prvi uzorak. Opisani odnos potvrdio bi točnost spektrofluorimetrijske metode jer dokazuje da relativni intenzitet fluorescencije koji bilježi spektrofluorimetar potječe isključivo od riboflavina.

Za svaki od 4 uzorka te svako mjerenje istog uzorka na osnovu izmjerenog relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini od 525 nm pomoću eksplicitne jednadžbe pravca baždarnog dijagrama (Jednadžba 3.) izračunata je odgovarajuća koncentracija. Koncentracija riboflavina u otopinama uzorka izračunata u ovom koraku eksperimenta stavljena je u omjer s ranije poznatom koncentracijom riboflavina u otopini koja je pripravljena za analizu te je omjer izražen kao postotak (Tablica 2.). Ukoliko je spektrofluorimetrijska metoda valjana, spomenute koncentracije trebale bi biti jednake. To bi značilo da je korištenjem spektrofluorimetrijske metode dobivena koncentracija koja je po iznosu jednaka onoj koja je pripravljena. Takav ishod mjerenja smatra se potvrdom točnosti same metode.

Tablica 2. Rezultati metode dodatka standarda

c_p (ED) / mol dm ⁻³	rel. int. fluo (525 nm)	c_r (ED) / mol dm ⁻³	$((c_r/c_p) \cdot 100) / \%$
5×10^{-7}	51,26351	$5,17 \times 10^{-7}$	103,4
	50,57064	$5,10 \times 10^{-7}$	102,0
	49,59504	$5,00 \times 10^{-7}$	100,0
1×10^{-6}	94,09478	$9,62 \times 10^{-7}$	96,2
	93,26624	$9,53 \times 10^{-7}$	95,3
	92,07078	$9,41 \times 10^{-7}$	94,1
2×10^{-6}	194,09978	$2,00 \times 10^{-6}$	100,0
	193,04558	$1,99 \times 10^{-6}$	99,5
	190,08158	$1,96 \times 10^{-6}$	98,0
4×10^{-6}	373,73198	$3,86 \times 10^{-6}$	96,5
	372,00451	$3,85 \times 10^{-6}$	96,3
	372,32984	$3,85 \times 10^{-6}$	96,3

c_p (ED) – koncentracija riboflavina u energetskom piću dobivena na osnovu relativnog intenziteta fluorescencije izmjenog u koraku spektrofluorimetrijskog određivanjem koncentracije; c_r (ED) – pripremljena koncentracija riboflavina u uzorku

Hipotezu da točno određena koncentracija riboflavina povećava relativan intenzitet fluorescencije za točno određenu vrijednost potvrdila bi vrijednost omjera $((c_r/c_p) \cdot 100)$ koja iznosi 100%. S obzirom da su omjeri dobiveni eksperimentom u rasponu od $98,13 \pm 2,72\%$, na temelju dobivenih rezultata pretpostavka se može smatrati potvrđenom.

Svim analiziranim uzorcima izmjen je pH koji iznosi $3,1 \pm 0,1$.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitivana je spektrofluorimetrijska metoda za određivanje koncentracije riboflavina u energetskim napitcima:

1. Riboflavin ima sposobnost fluorescencije zbog prisutnosti π -konjugiranih elektrona u izoaloksazinskom prstenu strukturne osnove.
2. Grafičkim prikazom ovisnosti relativnih intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini $\lambda_{\max} = 525$ nm o koncentraciji riboflavina konstruiran je baždarni dijagram riboflavina.
3. Koncentracija riboflavina određivana je spektrofluorimetrijskom metodom.
4. Točnost spektrofluorimetrijske metode potvrđena je rezultatima metode dodatka standarda.
5. Rezultati spektrofluorimetrijskog određivanja koncentracije riboflavina u energetskim pićima u pravilu potvrđuju koncentracije na deklaracijama (za energetska pića koja imaju deklariranu koncentraciju).
6. Spektrofluorimetrijska metoda jednostavna je i učinkovita za određivanje koncentracije fluorescirajućeg analita.

6. POPIS LITERATURE

Anonymous 1 (2022) Structure of riboflavin, <<https://www.molinstincts.com/structure/riboflavin-cstr-CT1002288471.html>> Pristupljeno 14. travnja 2023.

Anonymous 2 (2007) Diagram Jablonski, <https://www.researchgate.net/figure/101-Fluorescence-fundamentals-Jablonski-diagram-displaying-the-energy-states-of-a_fig1_23236997>. Pristupljeno 7. travnja 2023.

Britannica (2023) Fluorescence, <<https://www.britannica.com/science/fluorescence>>. Pristupljeno 7. travnja 2023.

ChEBI (2020) Ribitol, <<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:48505>>. Pristupljeno 6. travnja 2023.

Ghann, W. E. (2008) Studies of Surfactants Effect on Riboflavin Fluorescence and Its Determination in Commercial Food Products and Vitamin Tablets, School of graduate studies, East Tennessee State University.

HARVARD T.H. CHAN (2020) Caffeine, <<https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/caffeine/>>. Pristupljeno 24. travnja 2023.

HARVARD T.H. CHAN (2020) Energy drinks, <<https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/energy-drinks/>>. Pristupljeno 24. travnja 2023.

Hofmann, A. (2010) Spectroscopic Techniques: I Spectrophotometric Techniques, Griffith University.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2021) Riboflavin, <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=52734>>. Pristupljeno 6.

travnja 2023.

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža (2021) Vitamini, <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=64892>>. Pristupljeno 13. travnja 2023.

HZJZ (2023) „Energetska pića nisu za mlada bića” – promotivno-edukativni materijali. HZJZ–Hrvatski zavod za javno zdravstvo, <<https://www.hzjz.hr/sluzba-skolska-medicina-mentalno-zdravlje-prevenција/energetska-pica-2023/>>. Pristupljeno 24. travnja 2023.

Internetska nutricionistička enciklopedija (2015) Vitamin B₂, <<https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/vitamin-b2/fizikalno-kemijska-svojstva/>>. Pristupljeno 7. travnja 2023.

Nežić, M. (2018) Optimiziranje spektrofotometrijske metode za određivanje malondialdehida u urinu (diplomski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

NIH (2005) Riboflavin. NIH - National Library of Medicine, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=riboflavin>>. Pristupljeno 6. travnja 2023.

Riboflavin, <<https://www.priyamstudycentre.com/2021/12/riboflavin.html>>. Pristupljeno 6. travnja 2023.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2016) Principles of Instrumental Analysis, 7. izd., Cengage Learning, Boston, str. 120-143.

Izjava o izvornosti

Ja Tea Žugec izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat
mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u
njemu navedeni.

Tea Žugec
Vlastoručni potpis

