

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific:
Conf. dr. Dana MANIU

Absolvent:
Denisa-Monica SUNYA

UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE FIZICĂ
SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

DETECȚIA PRIN FLUORESCENȚĂ A VITAMINEI B2 DIN PROBE REALE

Coordonator științific:
Conf. dr. Dana MANIU

Absolvent:
Denisa-Monica SUNYA

Cuprins

ABSTRACT	4
INTRODUCERE	5
Capitolul 1 NOȚIUNI TEORETICE	6
1.1 Diagrama Perrin-Jablonski	6
1.2 Spectrometria de fluorescență	9
1.3 Legea Beer-Lambert	13
1.4 Vitamina B2 (Riboflavin)	16
Capitolul 2 METODE EXPERIMENTALE	20
2.1 Aparatura experimentală	20
2.2 Prepararea probelor	25
Capitolul 3 REZULTATE	28
3.1 Curba de calibrare	28
3.2 Determinarea vitaminei B2 în probe reale	33
CONCLUZII	38
Bibliografie	39

ABSTRACT

In this experiment, it has been proposed the finding of some energy drink concentrations such as Hell, Monster, respectively Slang. First of all, there have been registered the fluorescence spectras of 9 riboflavin solutions with known concentration ($0.8 \cdot 10^{-5}$, $1.6 \cdot 10^{-5}$, $2.4 \cdot 10^{-5}$, $3.2 \cdot 10^{-5}$, $4.0 \cdot 10^{-5}$, $4.8 \cdot 10^{-5}$, $5.6 \cdot 10^{-5}$, $6.4 \cdot 10^{-5}$, $7.2 \cdot 10^{-5}$) for 2 excitation wavelengths (390 nm and 470 nm). The intensity of fluorescence emissions have been determined at the maximum emission wavelength (~ 530 nm). For that, the calibration curves were determined for each single case.

The fluorescence spectra was registered for each of the three selected energy drinks (Hell, Slang and Monster) at the two wavelengths of excitation beam. The intensity of fluorescence emissions have been determined at the maximum emission wavelength (~ 530 nm).

Using the calibration curves, there have been determined the riboflavin concentrations of the energy drinks. The values thus obtained were compared to the ones found on the label of the used products and an approximate consistency between the reported and the experimental-measured values has been observed. For the obtained spectra it has been used an excitation LED that had a wavelength of 470 nm.

INTRODUCERE

Am ales această temă deoarece întotdeauna m-am întrebat dacă etichetele produselor sunt 100% reale și prin ce mecanisme sunt determinate calitatea și cantitatea ingredientelor din băuturile din comerț.

Fluorescența este fenomenul de emisie a unei cuante luminoase în urma dezexcitării radiative (cu emisia unui foton) a unei molecule de pe un nivel excitat pe un nivel fundamental. Emisia de fluorescență apare după un timp foarte scurt de la absorbție, iar aceasta se inițiază întotdeauna de pe nivelul vibrațional fundamental al primei stări excitate electronic de singlet.

Riboflavina (Vitamina B2) este o vitamină hidrosolubilă și o componentă integrală a unor coenzime necesare respirației celulare, constituind un rol important în producerea de energie aerobă.

Lucrarea de față s-a axat pe determinarea concentrațiilor de riboflavină din probe reale. Pentru aceasta au fost înregistrate spectrele de fluorescență pentru două soluții de riboflavină cu diferite concentrații. Probele au fost excitate cu două lungimi de undă pentru a determina care dintre cele două este mai potrivită. Din spectrele obținute s-au construit curbe de etalonare ce au fost folosite la determinarea concentrațiilor de riboflavină din trei energizante.

S-au ales aceste trei energizante deoarece au cele mai mari cantități de riboflavină de pe piața actuală.

Capitolul 1

NOȚIUNI TEORETICE

1.1 Diagrama Perrin-Jablonski

Luminiscenta este un fenomen relativ neobișnuit. Termenul de luminiscentă își are originea în limba latină (lumen=lumină). Acesta a fost introdus pentru prima oară ca "luminescentz" de către fizicianul german Eilhard Wiedemann în 1888 și clasifica toate fenomenele de lumină care nu sunt condiționate doar de creșterea temperaturii, adică până la incandescență. Înainte de acest lucru, se remarcă faptul că definiția actuală a termenul de luminiscentă este "o emisie spontană de radiații de la o specie excitată electronic sau vibrațional care nu se află în echilibru termic cu mediul." [1] [2] [3]

Diferitele tipuri de luminiscentă sunt clasificate în funcție de modul de excitație. Știm că fotoluminiscenta este emisia de lumină care rezultă din fotoexcitația directă a speciei care emite. Fotoluminiscenta poate lua următoarele forme și anume: fluorescență (starea excitată electronic este o stare de singlet, spinii celor doi electroni sunt pereche, au aceeași orientare, paraleli), fosforescență (starea excitată este o stare de triplet, spinii celor doi electroni sunt nepereche, antiparaleli) și fluorescență întârziată (starea excitată electronic este o stare de singlet). Celelalte tipuri de luminiscentă (în funcție de modul de excitație) sunt:

- chemiluminiscentă;
- bioluminiscentă;
- electroluminiscentă;
- catodoluminiscentă;
- radioluminiscentă;
- sonoroluminiscentă;
- termoluminiscentă;
- triboluminiscentă.

După o lungă perioadă de timp de la introducerea termenului de fluorescență de către George Gabriel Stokes [4] la mijlocul secolului al XIX-lea, distincția între fluorescență și fosforescență s-a bazat pe durata emisiei după sfârșitul excitației. Fluorescența a fost considerată emisia de lumină care se sfârșește odată cu încetarea excitației, iar fosforescența un fenomen persistent și după sfârșirea excitației. Nu s-a luat în considerare faptul că există fluorescențe cu durată lungă de viață cum ar fi în sărurile bivalente de europiu, precum și fosforescențe cu durată scurtă de viață (de exemplu fotoluminiscenta violetă a sulfurii de zinc) ale căror durate sunt comparabile (câteva sute de nanosecunde).

Condiția pentru a distinge aceste două fenomene este că în fosforescență, speciile excitate trec printr-o stare intermediară înainte de emisie, după cum a declarat pentru prima oară Francis Perrin în 1929.[5] Mai exact, în cadrul fotochimiei¹ moleculare, se poate afirma că multiplicitatea stării de spin rămâne neschimbată în cazul fluorescenței, în timp ce fosforescența implică schimbarea multiplicității, în mod normal de la triplet, la singlet și viceversa.

Majoritatea materialelor se dezexcită prin căi non-radiative (adică fără emisia unui foton). În moleculele fotoluminiscente (PL-Photoluminescence), tranzițiile radiative permise prin rotație, de la o stare excitată de singlet (S1) la o stare fundamentală de singlet (S0) sunt de obicei rapide (având ordinul a 10^{-9} - 10^{-8} s) și oferă fluorescență.

Pe de altă parte, tranzițiile radiative interzise de la o stare de triplet excitat (T1) la o stare fundamentală de singlet (S0), pot duce la luminiscentă. Fosforescența are un timp de viață îndelungat și se petrece lent (cu ordinul a 10^{-3} - 10^2 s pentru o moleculă organică tipică). În soluție la temperatura camerei, căile de relaxare non-radiative fac fosforescența aproape imposibil de observat.

Fazele procesului de fluorescență sunt:

- **Faza 1: ABSORBȚIA:** Sau fenomenul prin care se excită electronii unei molecule. După cum se poate observa în figura 1.1, în urma absorbției luminii, un electron este excitat, prin urmare va trece pe un nivel vibrațional superior al stării electronice (exemplu în figura 1.1 va trece de pe nivelul 0 al stării electronice S0 pe nivelul vibrațional 4 al stării electronice S1). În unele cazuri, poate să apară și absorbția S0-S2. În starea excitată, electronul se află pe un orbital de anti-legătură, atomii din gruparea excitată (cromofor) încep să vibreze deoarece sunt într-o stare de neechilibru, iar în starea excitată, molecula se află pe un nivel vibrațional diferit de cel pe care a fost în starea fundamentală. ($v_{final} \neq v_{inițial}$).
- **Faza 2: RELAXAREA VIBRAȚIONALĂ:** În această fază, energia vibrațională a moleculei poate să se modifice prin două tipuri de procese, și anume:
 - **Relaxare vibrațională:** Dacă inițial molecula era excitată electronic, după relaxarea vibrațională, aceasta rămâne excitată electronic cu excepția faptului că trece pe un nivel vibrațional fundamental al stării electronice (exemplu în figura 1.1 de pe nivelul 5 al stării S1 pe nivelul 0 al stării S1). Energia vibrațională este transformată în energie cinetică sau termică.
 - **Conversie internă:** În cazul suprapunerii nivelelor vibraționale a două stări electronice cu aceeași multiplicitate, molecula poate trece de pe un nivel vibrațional excitat (S2) pe un nivel vibrațional al altei stări electronice (S1) (sau de pe S1 poate trece pe S0). Această trecere are loc isoenergetic (fără pierdere de energie).
- **Faza 3: EMISIA DE FLUORESCENȚĂ (RELAXAREA RADIATIVĂ):** Molecula emite fotoni trecând de pe nivelul vibrațional fundamental ($v=0$) al stării excitate electronice (S1) pe care se află pe un nivel vibrațional al stării electronice fundamentale (S0). Se produce o tranziție electronică. Fotonii emiși au energia egală cu energia pe care o pierde molecula în procesul de dezexcitare. Prin procesul de relaxare radiativă se produce o tranziție verticală în care se păstrează geometria inițială a nucleelor; molecula ajunge într-o stare de neechilibru și începe să vibreze. Ca urmare a acestor

¹Fotochimia este știința care se ocupă cu interacțiunea dintre lumină și materie, formarea intermediarilor de reacție și a produșilor de reacție.[6][7][8]

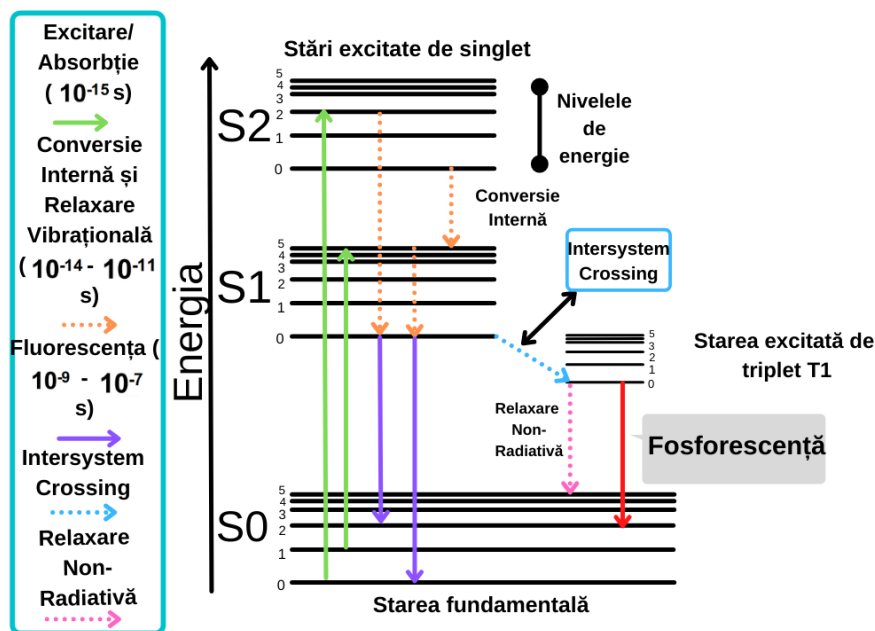


Figura 1.1: Diagrama Perrin-Jablonski

fenomene, energia fotonului emis este mai mică decât energia fotonului absorbit, iar lungimea de undă emisă este mai mare decât lungimea de undă absorbită. (energia este invers proporțională cu lungimea de undă).

Majoritatea moleculelor sunt în stare de singlet în starea lor fundamentală deoarece tranzițiile singlet-triplet sunt interzise la rotație. Așadar, stările excitare de triplet pot fi populate numai prin intersistem crossing (ISC) din stările de singlet excitare. Procesele implicate în fotoluminescență sunt reprezentate folosind diagrame Perrin-Jablonski (Figura 1.1). Absorbția radiației din domeniul UV și Vizibil este reprezentată în imagine prin săgeți verzi. Odată excitată molecula, ea poate suferi o conversie internă între stările excitare și între nivelurile vibraționale ale unei stări excitare, așa cum se poate observa în schemă prin săgeata punctată portocalie.

Fluorescența și anume tranziția de pe nivelul S1 excitat pe nivelul S0, cel fundamental este reprezentată cu săgeată violetă. Tranziția de pe nivelul S1 de singlet pe nivelul T1 de triplet este indicată de săgeata albastră punctată. În cele din urmă, fosforescența (tranziția de pe T1 pe S0), relativ lentă, este dată de săgeata roșie. Alte căi non-radiative pe S0 sunt caracterizate de săgeata roz punctată.

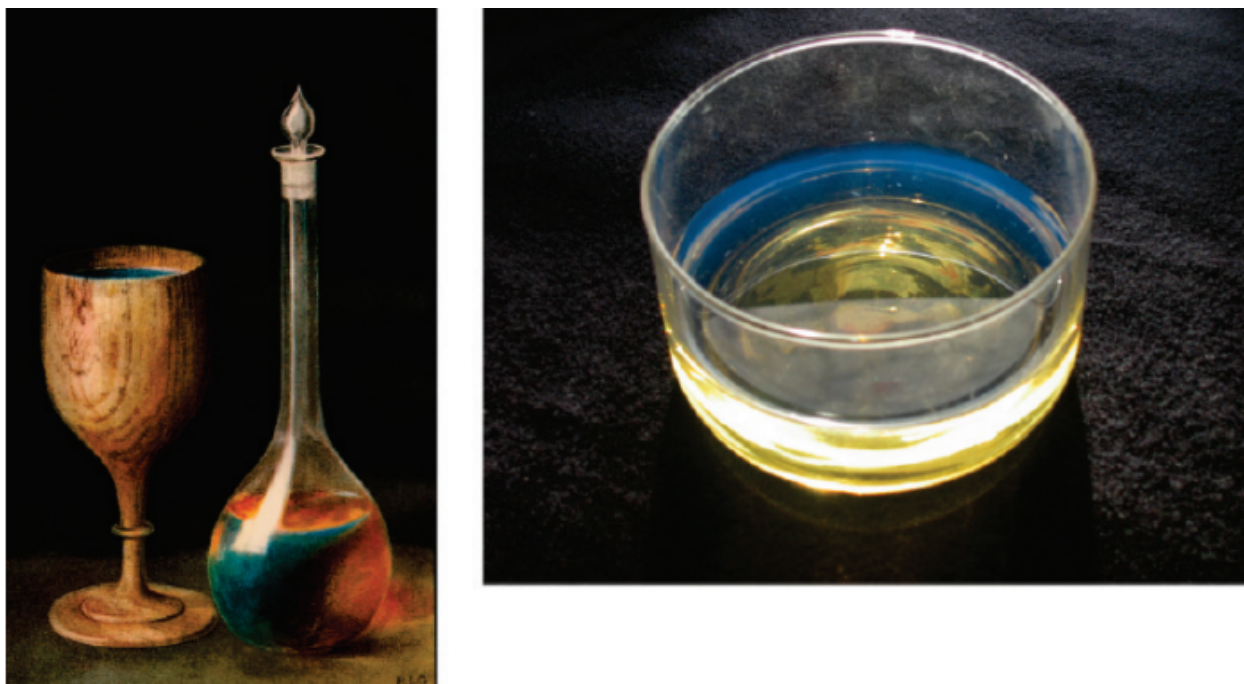


Figura 1.2: Absorbția și fluorescența infuziei de *L. Nephriticum* în radiația solară.

1.2 Spectrometria de fluorescență

În Grecia antică, fosforul era vechiul nume dat planetei Venus pentru că aceasta apărea ca o stea de dimineață și anunța răsăritul. Termenul de fosfor a fost folosit și în Evul Mediu pentru a desemna materialele care străluceau în întuneric după ce acestea erau expuse la lumina solară. Mai târziu, același nume de fosfor a fost dat elementului Fosfor (P) izolat de Brandt în 1677 deoarece, atunci când acesta era expus la aer, ardea și elibera vapori strălucitori. (exemplu de chemiluminiscență).[9][10][11]

În 1565, un medic și botanist spaniol, a observat culoarea albastră specifică infuziei (Figura 1.2) unei specii de lemn din Mexic pe care o folosea în tratarea unor boli urinare și renale.[12] [13] [14] [15] Acest tip de lemn (denumit mai târziu *Lignum Nephriticum*) a fost un medicament rar și scump.[15]

Oamenii știau de proprietățile miraculoase pe care acest medicament le avea, așa că au încercat să facă negoț cu specii contrafăcute. De interes atunci era să se detecteze lemnul falsificat prin punerea acestuia în apă și observarea culorii apei, dacă aceasta era albastră atunci lemnul era bun, iar dacă lemnul făcea apa să fie de o culoare galbenă atunci era contrafăcut. Această metodă de detectare a unui obiect contrafăcut poate fi considerată ca prima aplicație a acestui fenomen, mai târziu numit fluorescență. [15]

Astăzi, fenomenul de luminiscență este un termen general folosit pentru a descrie emisia de lumină (emisia unui foton) de o anumită lungime de undă în urma dezexcitării de pe o stare energetică excitată (o stare superioară) înapoi pe starea fundamentală.

Fluorescența este fenomenul prin care se emit fotoni ca urmare a absorbției de radiație din domeniul UV-Vis. Emisia de fluorescență apare după un timp foarte scurt de la absorbție, iar aceasta se inițiază întotdeauna de pe nivelul vibrațional fundamental al primei stări excitate electronic de singlet (S_1 și $v=0$). [16]

Caracteristicile florescenței sunt:

- Deplasarea Stokes: Reprezintă diferența dintre maximul de fluorescență și maximul de absorbție al unei substanțe.[16]

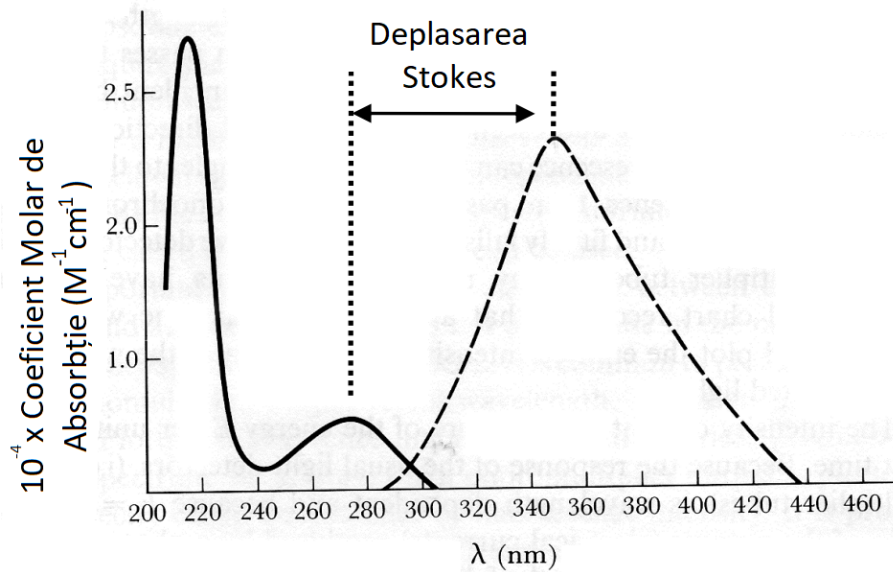


Figura 1.3: Spectrul de absorbție, respectiv de fluorescență al tryptophan-ului. Linia continuă - Coeficientul de absorbție molar ca funcție de lungimea de undă. Linia punctată - Spectrul de emisie în unități arbitrare.

Deplasarea Stokes depinde de natura substanței. Dacă deplasarea este mare, emisia de fluorescență se poate observa mai ușor după cum putem vedea în figura 1.3 Deplasarea Stokes are formula 1.2.1

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_{max}^{fluo} - \bar{\nu}_{max}^{abs} \quad (1.2.1)$$

- Spectrul de fluorescență este independent de lungimea de undă excitatoare (datorită proceselor de relaxare foarte rapide); În figura 1.4 este reprezentată intensitatea de emisie, respectiv energia de excitație în funcție de lungimea de undă.
- Spectrul de fluorescență este imaginea în oglindă a spectrului de absorbție. (figura 1.5 dreapta) Spectrul de absorbție reprezintă structura vibrațională a stării excitate, iar

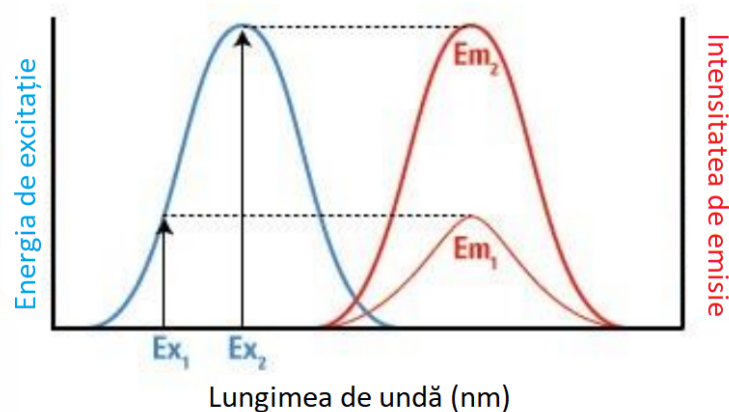


Figura 1.4: Diferența dintre spectrul de emisie și excitație

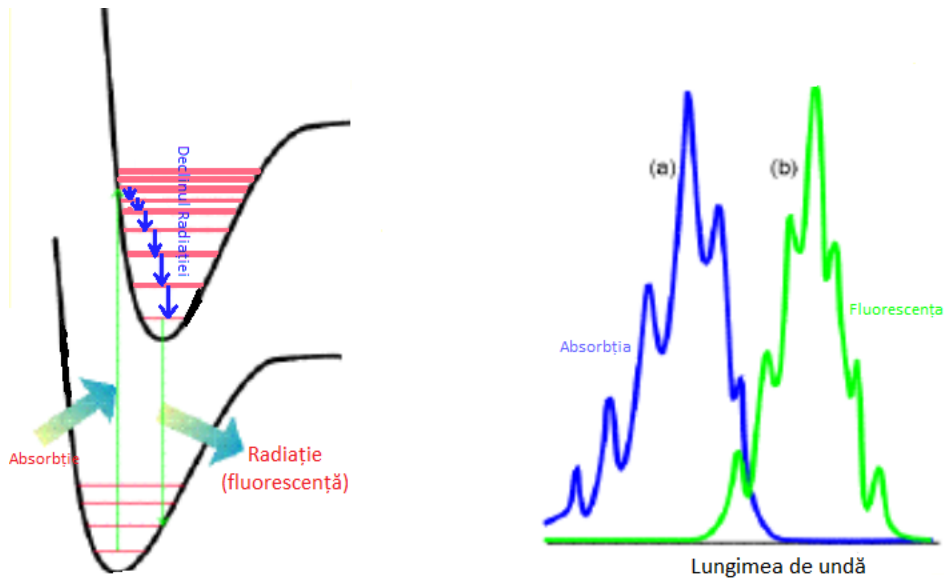


Figura 1.5: Structura vibrațională a stării excitate(stânga), Spetrele de absorbție, respectiv fluorescență (dreapta)

spectrul de fluorescență redă structura vibrațională a stării fundamentale (figura 1.5 stânga).

- Timpul de viață caracterizează timpul cât electronul rămâne în starea electronică excitată. Acesta are o valoare specifică și unică pentru fiecare moleculă în parte. Cel mai direct mod de a observa dezactivarea stării excitate a unei molecule este prin monitorizarea intensității fluorescenței în timp după ce lumina de excitație a fost oprită. Fluorescența se va descompune exponențial cu starea excitată precum în figura 1.6 după legea 1.2.2. Tehnica de măsurare a timpilor de viață (prezentă în experimentul din figura 1.6) ale diferitelor molecule este fluorescența rezolvată temporal (prin excitație cu pulsuri laser). [29]

$$k_f + k_{nf} + k_{isc} = k_f + k_{nf} = \frac{1}{\tau} \quad (1.2.2)$$

unde am introdus $k_{nf} = k_{nf} + k_{isc}$ ca sumă a tuturor ratelor proceselor care nu duc la fluorescență. Inversul acestei rate τ , este timpul necesar până când intensitatea detectată a atins $\frac{1}{e}$ din valoarea inițială (figura 1.6 (b)). Constantele din formula 1.2.2 reprezintă:

- k_{nf} - rata de producere a dezactivării non-radiative
- k_f - rata de producere a fenomenului de fluorescenței
- k_{isc} - rata de producere a fenomenului de intersystem-crossing

- Randamentul de fluorescență reprezintă raportul dintre numărul de fotoni emiși și numărul de fotoni absorbiți. Acest număr caracterizează eficiența cu care un fluorofor este capabil de a converti lumina absorbită în emisie de fluorescență. Randamentul se determină comparând rezultatele obținut cu standardele din literatură.

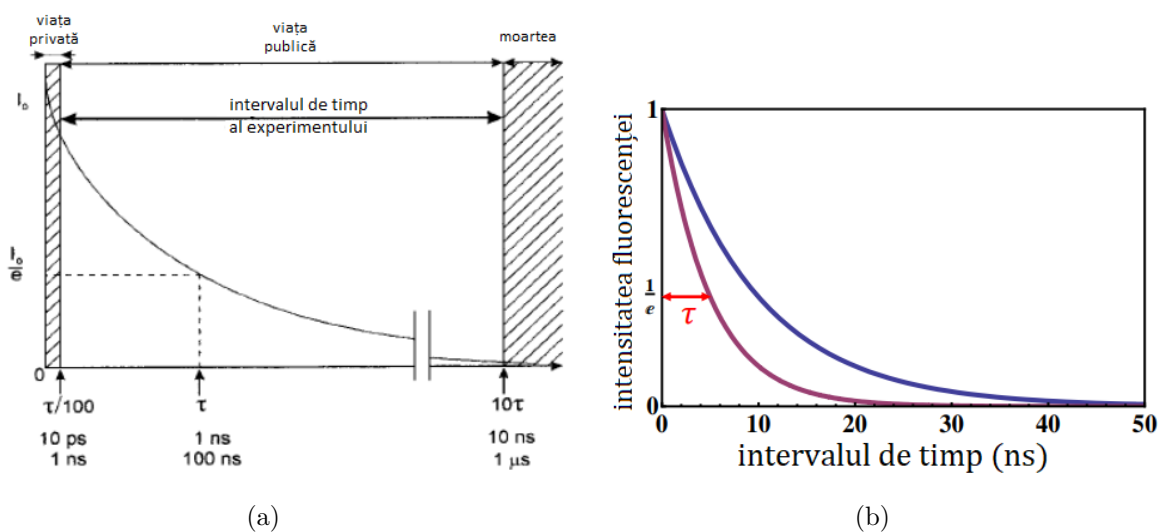


Figura 1.6: (a) Descreșterea emisiei de fluorescență/Timpul de viață al fluorescenței (b) Intensitatea de fluorescență ca funcție de intervalul de timp după ce lumina de excitație a fost oprită. Timpul de viață τ este momentul în care se observă $\frac{1}{e}$ din fluorescența inițială.
Albastru: $\tau = 10$ ns; Roșu: $\tau = 5$ ns

Interval lungime de undă (nm)	Compus chimic	Temperatura $^{\circ}C$	Solvent	Φ_F	Ref.
270-300	Benzene	20	Cyclohexane	0.05 ± 0.02	[17]
300-380	Tryptophan	25	H_2O (pH 7.2)	0.14 ± 0.02	[18]
300-400	Naphthalene	20	Cyclohexane	0.23 ± 0.02	[19]
315-480	2-Aminopyridine	20	$0.1 \text{ mol } L^{-1}$	0.60 ± 0.05	[20]
360-480	Anthracene	20	Ethanol	0.27 ± 0.03	[17][21]
400-500	9,10-diphenylanthracene	20	Cyclohexane	0.90 ± 0.02	[22][23]
400-600	Quinine sulfate dihydrate	20	$0.5 \text{ mol } L^{-1}$	0.546	[21][23]
600-650	Rhodamine	20	Ethanol	1.0 ± 0.02	[24]
600-650	Cresyl violet	20	Methanol	0.54 ± 0.03	[26]

Tabelul 1.1: Standardele pentru randamentul de fluorescență în funcție de compusul chimic.

1.3 Legea Beer-Lambert

Transmitanța soluției, notată cu T în formula 1.3.3, este definită ca raportul dintre intensitatea transmisă, intensitatea fasciculului refractat, I și intensitatea fasciculului incident I_0 .

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1.3.3)$$

Aceasta ia valori în intervalul $[0,1]$, dar în cele mai multe cazuri este exprimată în procente, după cum este redată în formula 1.3.4.

$$T(\%) = 100 \cdot \frac{I}{I_0} \quad (1.3.4)$$

Absorbanța soluției, notată cu A , este proporțională cu minus logaritmul zecimal al transmitanței și cu intensitățile incidentă, respectiv transmisă prin relațiile 1.3.5, respectiv 1.3.6.

$$A = \log_{10} \cdot \frac{I}{I_0} \quad (1.3.5)$$

$$A = -\log_{10} \cdot T \quad (1.3.6)$$

O absorbanță de 0 este corespunzătoare unei transmitanțe de 100% și o absorbanță de 1 corespunzătoare unei transmitanțe de 10%. În tabelul 1.2 sunt redate valorile suplimentare ale perechilor transmitanță-absorbanță pentru trei soluții de riboflavină de diferite concentrații solvate în acid acetic.

Un exemplu este cel din figura 1.7 (a), (b), respectiv (c) în care se poate vedea efectul pe care absorbanța îl are asupra unei lumini de atenuare care străbate un mediu, unde sursa de lumină este un led de lungime de undă 390 nm din domeniul UV, iar probele sunt de concentrații diferite. În exemplul acesta se poate observa și intensitatea de fluorescență care are o dependență liniară de concentrația probei după cum este evidențiată în formula 1.3.8.

Legea Beer-Lambert (formula 1.3.7) dependentă de absorbanță se caracterizează printr-o relație între atenuarea luminii printr-o soluție/substanță și proprietățile acelei substanțe. Presupunem o undă de lumină monocromatică care este transmisă printr-o soluție cu o intensitate a fasciculului incident I_0 și o intensitate transmisă I ca în figura 1.9.

La concentrații mici ale soluției, este relevantă relația 1.3.8 este o relație liniară între intensitatea de fluorescență și concentrație, coeficientul de absorbție molar și grosimea cuvei în care este pusă soluția de interes. La concentrații mari apare fenomenul numit quenching. Aceste criterii sunt relevate în figura 1.8. [27] Fenomenul de quenching sau stingerea fluorescenței este un proces fizico-chimic în care intensitatea luminii emise de moleculele fluorescente este scăzută. O variantă comună a acestui proces este quenching-ul de triplet și se manifestă în condițiile în care un donor este inițial în starea T1. Stările excitate ale unor quencheri tipici, de exemplu ionul negativ de iod, I^- au de obicei exces de energie și nu sunt eficiente în transferul de energie de la fluoroforii care emit în vizibil. Acest lucru permite

transferul de electroni dirijați de la o moleculă la alta în timpul fenomenului de quenching reductiv sau reacție de reducere a fluorescenței. Se transferă un electron la molecula excitată, care se oprește din fluorescență. [28]

Coeficientul de absorbție molar este o mărime dependentă de soluția/substanța dată și este o caracteristică a puterii de absorbție a mediului la lungimea de undă a fasciculului. Concentrația este egală cu cantitatea de moli dizolvată în soluție. Lungimea cuvei este de obicei 1 cm și cu ajutorul acesteia se poate măsura absorbanta.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1.3.7)$$

Unde:

- A- Absorbanta
- ϵ - Coeficientul de absorbție molar [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]
- c - concentrația molară [M]
- l - lungimea cuvei în care se află soluția/lungimea drumului parcurs de unda luminoasă [cm]

Legea Beer-Lambert generalizată este cea din ecuația 1.3.8 care depinde de intensitatea fasciculului incident și cel final, de grosimea cuvei și de un coeficient care depinde de proprietățile substanței examinate. Intensitatea de fluorescență

$$I = I_0 \cdot k \cdot l \cdot c \quad (1.3.8)$$

Unde:

- I- intensitatea de fluorescență
- I_0 - intensitatea fasciculului excitator
- c - concentrația molară
- l - lungimea cuvei în care se află soluția/lungimea drumului parcurs de unda luminoasă [cm]
- k - coeficient dependent de natura substanței (randamentul cuantic, absorbativitatea)

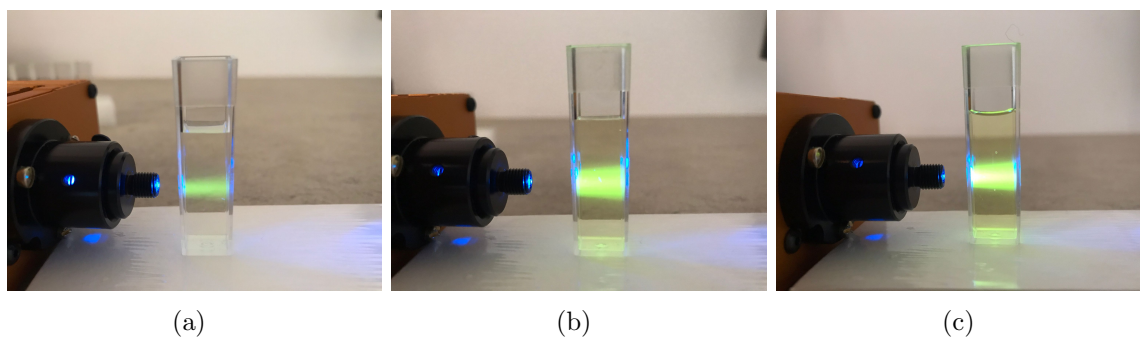


Figura 1.7: (a) Soluția de absorbantă 5 (b) Soluția de absorbantă 4 (c) Soluția de absorbantă 1

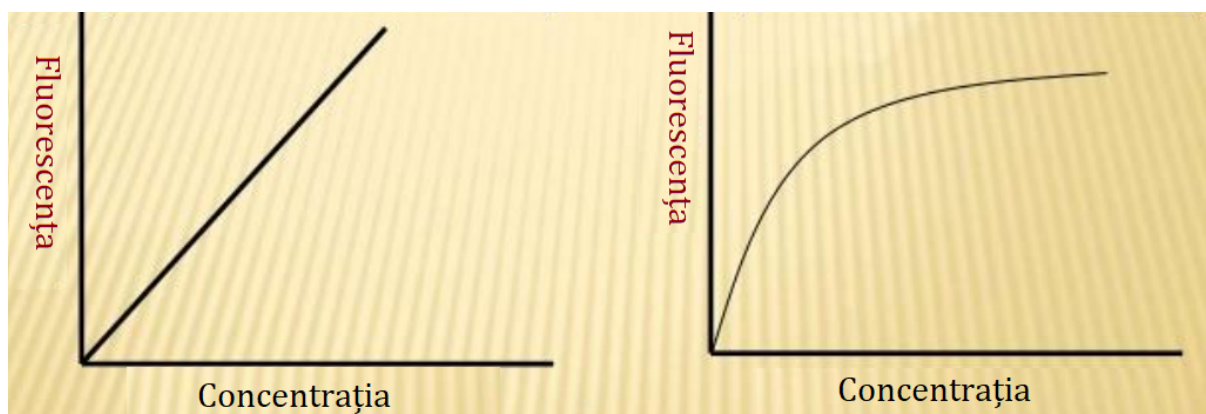


Figura 1.8: Curbele de calibrare pentru concentrații mici ale substanței de interes (stânga), respectiv concentrații mari ale acesteia (dreapta).

Conform relației lui Beer-Lambert din formula 1.3.7, absorbanta radiației depinde de:

- intensitatea fascicului incident
- grosimea stratului de substanță prin care a trecut fascicului incident (grosimea cuvei)
- concentrația speciilor absorbante
- coeficientul de absorbție molar

Prin măsurarea fluorescenței unui set de soluții de concentrații cunoscute, se poate crea o curbă de calibrare ce caracterizează sensibilitatea instrumentului (intensitatea fotonului) la schimbările de concentrație. Mai apoi, răspunsul spectrometrului la soluțiile / soluția de concentrație necunoscută se poate compara cu datele inițiale, respectiv cu răspunsul instrumentului la soluțiile de concentrație cunoscută și astfel putem determina concentrația / concentrațiile soluției / soluțiilor de interes. Ecuația 1.3.8 permite determinarea concentrației soluției necunoscute.

Absorbanța	Transmitanța
0	100%
1	10%
2	1%
3	0.1%
4	0.01%
5	0.001%

Tabelul 1.2: Corespondența între Absorbanță și Transmitanța.

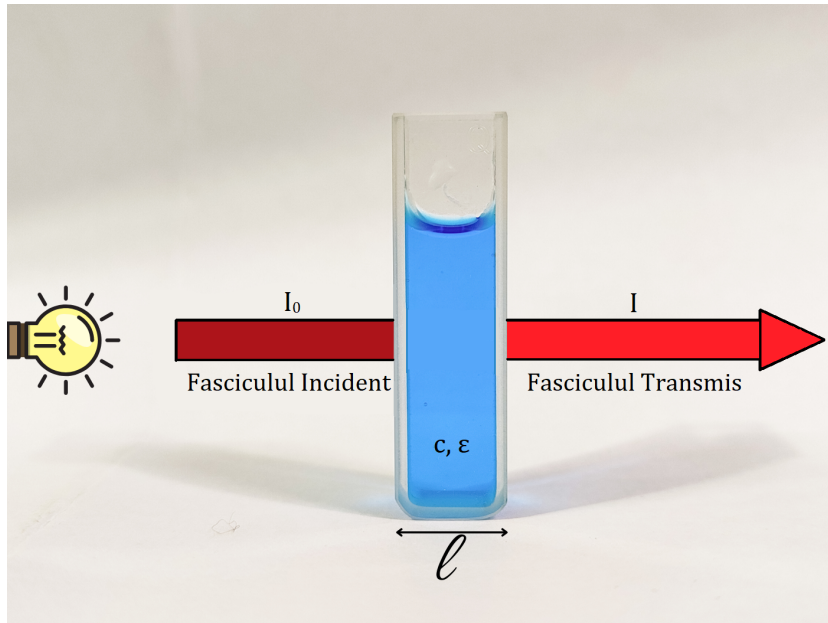


Figura 1.9: Legea Beer-Lambert

1.4 Vitamina B2 (Riboflavin)

Riboflavina, cunoscută și sub numele de Vitamina B2, este o vitamină hidrosolubilă și o componentă integrală a unei multitudini de coenzime necesare pentru respirația celulară. Este necesară pentru ca organismul uman să funcționeze la parametrii optimi. [30]

Cele mai mari concentrații de riboflavină din organism se găsesc în ficat, rinichi și în inimă. Este prezentă în produse lactate, carne, pește, precum și în anumite fructe și legume, în special legume verzi/verdețuri. [33] Este un precursor important pentru două coenzime și anume flavin adenine dinucleotide (FAD sau FADH2) și flavin mononucleotide (FMN) care sunt implicate în producția de energie și în procese metabolice. Constituind un rol important în producerea de energie aerobă (pe bază de oxigen), această vitamină este foarte importantă mai ales pentru inimă. [34] [32]

Vitamina B2 este absorbită la nivelul părții centrale a intestinului subțire, și anume la nivelul jejunului.

Pe lângă rolul pe care această vitamină o are în funcțiile corpului, ea aduce beneficii potențiale și pentru sănătate cum ar fi: [30]

- reducerea cataractei legată de vârstă;
- reducerea severității migrenei;

- faptul că reprezintă un factor de creștere pentru organismele mai tinere;
- necesitatea acesteia pentru buna funcționare a altor vitamine din categoria celor B: B3, B6, B9;
- intervenția în metabolismul fierului;
- influența vitaminei la adaptarea la lumina crepusculară ori de una singură, ori în combinație cu vitamina A;
- implicarea în detoxifiere pentru unii compuși asigurând menținerea homeostaziei celulare;
- ajutorul la menținerea nivelurilor normale ale homocisteină, un aminoacid din sânge.

În studii mai recente s-ar sugera că vitamina B2 are potențiale beneficii în domeniul cardiovascular și posibile intervenții în prevenirea cancerului.

Deficitul de riboflavină are efecte negative asupra căilor metabolice și poate duce la apariția preeclampsiei ² la femeile însărcinate. Atunci când dieta de zi cu zi este una precară apar carențe ale vitaminei B2. Manifestările deficitului sunt: [33]

- tulburări oculare - sensibilitate la lumină puternică, roșeață/inflamare locală, mâncărime, arsură oculară;
- deficit de creștere - dacă mama nu își asigură doza recomandată de vitamina B2 pe zi, riscă dezvoltarea întârziată a fătului/bebelușului;
- afecțiuni dermatologice - simptome precum buze crăpate, piele uscată, inflamație a mucoasei gurii etc.;
- anemie - cu deficit de fier;
- tulburări digestive și nervoase - se manifestă prin apariția sau înmulțirea stărilor de anxietate și depresie, reacții mentale lente.

Vitamina B2 este fluorescentă natural atunci când este expusă la lumina ultravioletă și vizibilă; acestea din urmă pot activa ușor riboflavina. Sensibilitatea la lumina UV și vizibilă poate duce la deficit de vitamina B2 în rândul nou-născuților prin expunerea acestora la lumina UV deoarece această lumină este folosită în tratarea icterului sau a unor tulburări de piele. Deoarece peak-urile riboflavinei se găsesc la lungimea de undă de 440 nm, este adecvat să se excite proba în intervalul spectral 405-500 nm. [39]

O măsură a dozei de riboflavină utilizată la scară largă este măsurarea fluorometrică a excreției în 24 de ore (exprimată ca și cantitate totală de riboflavină excretată sau în raport cu cantitatea de creatinină excretată). Deoarece organismul poate stoca doar cantități mici de vitamină B2, excreția reflectă aportul alimentar până când țesuturile sunt saturate. Excreția totală de riboflavină la adulții sănătoși este de cel puțin 120 mg/zi, iar o rată mai mică de 40 mg/zi indică deficiență. [32]

Recomandările privind consumul de riboflavină sunt furnizate în Dietary Reference Intakes(DRIs) elaborate de Food and Nutrition Board (FNB) de la Institute of Medicine of the National Academies. DRI este un termen general folosit pentru un set de valori de referință care marchează evaluarea aportului de nutrienți ale persoanelor sănătoase. Aceste valori din tabelul 1.3 variază în funcție de vârstă și sex. [36]

²Preeclampsia este o boală definită ca hipertensiune arterială și prezența în urină a unor proteine în exces după săptămâna 20 de sarcină.

Vârsta	Bărbați	Femei	Sarcină
0-6 luni	0.3 mg	0.3 mg	
7-12 luni	0.4 mg	0.4 mg	
1-3 ani	0.5 mg	0.5 mg	
4-8 ani	0.6 mg	0.6 mg	
9-13 ani	0.9 mg	0.9 mg	
14-18 ani	1.3 mg	1.0 mg	1.4 mg
19-50 ani	1.3 mg	1.1 mg	1.4 mg
Peste 51 ani	1.3 mg	1.1 mg	

Tabelul 1.3: Recomandările privind consumul de riboflavină în funcție de vârstă și sex.
[36]

Alimente	Porție	Riboflavină (mg)
Ficat de vită	3 uncii(aprox. 90 ml)	2.9
Cereale cu lapte	1 porție	1.3
Terci de ovăz, instant, gătit cu apă	1 porție	1.1
Iaut fără grăsimi	1 cană	0.6
Lapte, 2 la sută grăsime	1 cană	0.5
Carne de vită, file, dezosată, cu grăsime, la grătar	85 grame	0.4
Scoici, specii mixte, fierte	85 grame	0.4
Ciuperci, portabella, feliate la grătar	1/2 cană	0.3
Migdale prăjite	1 g	0.3
Cașcaval	85 g	0.3
Piept de pui la rotisor	85 g	0.2
Ou L întreg		0.2
Quinoa gătită	1 cană	0.2
Bagel (un sortiment de pâine evreiască)	1 porție	0.2
Somon conserve	85 g	0.2
Spanac crud	1 cană	0.1
Măr cu coajă		0.1
Fasole roșie, conservă	1 cană	0.1
Paste Melci din făină integrală fierte	1 cană	0.1
Pâine integrală	1 felie	0.1
Pește Cod Atlantic, fiert	85 g	0.1
Semințe de floarea soarelui, prăjite	1g	0.1
Roșii zdrobite, conservă	1/2 cană	0.1
Orez alb, bob lung, fiert	1/2 cană	0.1
Orez brun, bob lung, fiert	1/2 cană	0

Tabelul 1.4: Cantitatea de riboflavină dintr-o serie de alimente.
[37]

Exercițiile fizice accentuează căile metabolice ceea ce duce la necesitatea unei cantități mai mare de vitamine B, inclusiv a riboflavinei. Prin urmare, necesitatea acestor vitamine poate fi crescută la sportivi și la persoanele active. Acest lucru face ca riboflavina să fie un compus atractiv pentru a-l adăuga în băuturile energizante atât din punct de vedere al marketing-ului, cât și din punct de vedere medical. Multe băuturi energizante, cum ar fi Monster, Rockstar, Red Bull și altele conțin doza zilnică recomandată de 1.3 - 1.4 mg sau mai mult per porție. Tabelul 1.5 din literatura de specialitate are ca scop vizualizarea dozelor de riboflavină dintr-o gamă de băuturi energizante. [38]

Băutura energizantă	Cantitatea de riboflavină (mg) per 100 ml	Cantitatea de riboflavină per o porție tipică (mg)
ROCKSTAR	1.6	3.84
ROCKSTAR Sugar Free	1.417	3.4
MONSTER	0.70	(per 500 ml) 1.7
HELL	0.6	1.48
SLANG	0.6	1.5
RED BULL Sugar Free	0.575	1.44

Tabelul 1.5: Lista dozelor de Riboflavină din băuturile energizante per 100 g.
[38]

Capitolul 2

METODE EXPERIMENTALE

2.1 Aparatura experimentală

Pentru detecția fluorescenței unei probe, se folosește ca aparatură spectrometrul de fluorescență. Acesta are următoarele componente principale:

- 2 surse (UV, Viz);
- 2 monocromatoare (unul pentru excitare, iar altul pentru emisie);
- piese optice pentru transmiterea luminii;
- suport pentru probă (cuvă);
- detector (fotomultiplicator);
- componente electronice care au rolul de a procesa semnalul electric.

Schemele de funcționare a unui astfel de spectrofotometru de absorbție, respectiv fluorescență sunt redată în figurile 2.1, respectiv figura 2.2. În figura 2.3 este reprezentat, schematic, mersul razelor de lumină într-un fluorimetru. Monocromatoarele sunt înlocuite cu filtre.

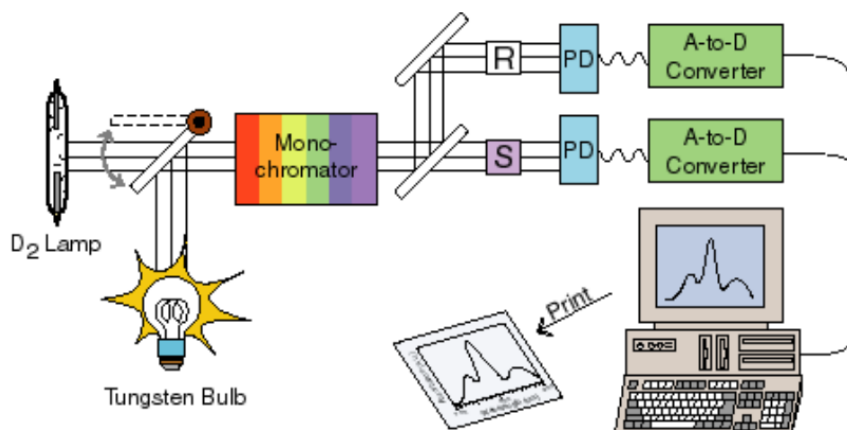


Figura 2.1: Schema unui spectrofotometru de absorbție

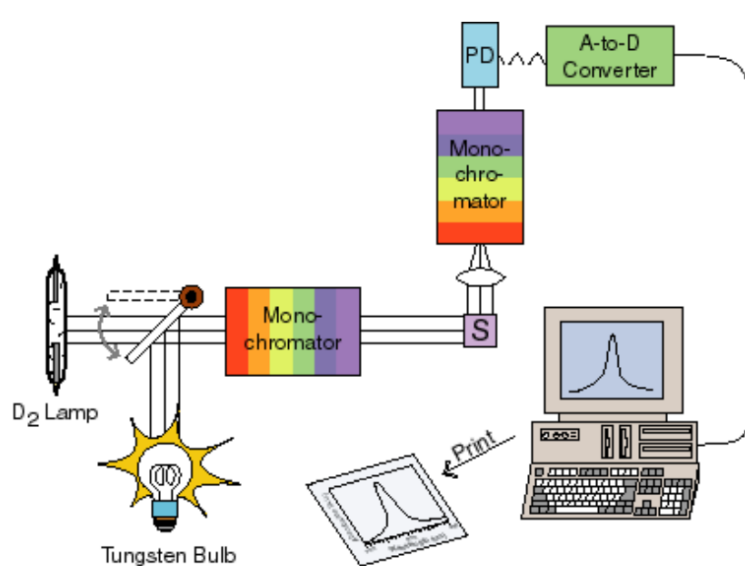


Figura 2.2: Schema unui spectrofotometru de fluorescență

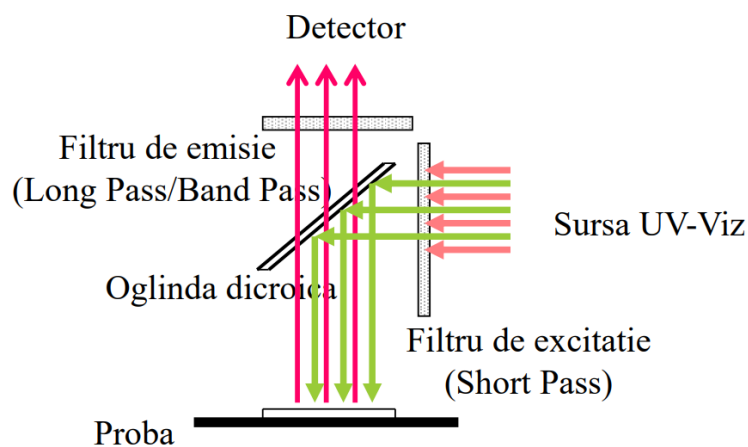


Figura 2.3: Mersul razelor într-un fluorimetru.

Pentru înregistrarea spectrului de absorbție al riboflavinei din luna martie, am folosit un spectrofotometru portabil T100 (figura 2.4) care are specificațiile din tabelul 2.4.

Pentru înregistrarea spectrelor de fluorescență am folosit un mini spectrometru de fluorescență produs de firma StellarNet Inc. (figura 2.5) care are specificațiile din tabelul 2.2. Ca sursă de excitație sunt folosite diferite LED-uri, cu emisia în UV și Vizibil:

- LED - 390 nm;
- LED - 470 nm;
- LED - 502 nm;
- LED - 590 nm;
- LED - 660 nm.

Parametrii	Specificații	Parametrii	Specificații
Min/Max Interval (Output-ul Fizic Analog)	Min: 0-50 ppb Scară Completă Max: 0-20000 ppb Scară Completă (selectabil, gamă dublă acceptată)	Span Drift	< 0.5% scară completă (la temperatură și tensiune constante) /24 hours Specificații
Unități de măsură	ppb, ppm, $\mu g/m^3$	Lag Time	20 secunde
Zgomot Zero	<0.2 ppb (RMS)	Timpul de urcare/coborâre	<100 secunde la 95%
Zgomot de deschidere	< 0.5% citire (RMS) peste 50 ppb	Precizia	0.5% la citire până la 50 ppb
Limita inferioară detectabilă	< 0.4 ppb	Consumul mediu de putere	140 - 165 W
Zero Drift	< 0.5 ppb (la temperatură și tensiune constante) /24 hours	Dimensiuni	178 x 432 x 597 mm

Tabelul 2.1: Specificațiile tehnice pentru modelul spectrofotometrului de absorbție T100. [40]



Figura 2.4: Spectrofotometrul de absorbție T100

Parametrii	Specificații	Parametrii	Specificații
Intervalul dinamic	2000:1 cu 6 decade	Dimensiuni	25x75x125 mm
Rezoluția optică	0.2 nm	Greutate	396 g
Tipul detectorului	CDD sau PDA, 2k/3k pixeli	Consumul de curent	<100 mA cu USB port
Intervalul de detecție	280 - 900 nm	Interfața	USB-2 sau USB-2 Hub
Mărimea pixelilor	14x200 μm sau 7x200 μm	Integrarea detectorului	1 ms - 65 s
Rețea de difracție	Holografic CONCAV	Dimensiune fantă	50 μm
Constanta rețelei de difracție g/mm	300, 600,1200,1800, 2400	Reflexiile de lumină	<.1% at 435nm;<.05% at 600nm
Spectrograf	f/4, SymX-Czerny-Turner	Input-ul fibrei optice	SMA905 0.22na fibră singulară
Ordinea filtrelor de sortare	Integrate și Filtru Trece-Sus	Sistemele de operare	Win9x, WinXP, Vista
Raportul semnal-zgomot	1000:1	Digitalizare	16-bit

Tabelul 2.2: Specificațiile tehnice pentru modelul minispectrometrului de fluorescență StellarNet.

[41]

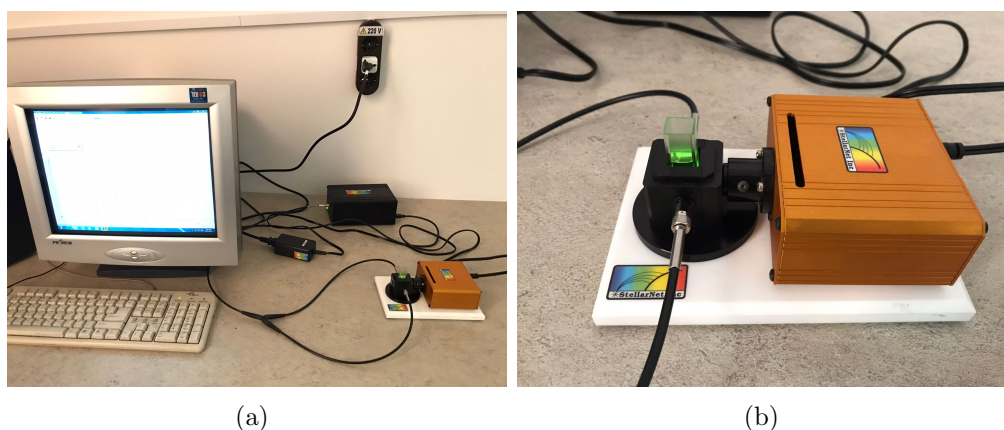


Figura 2.5: (a) Aparatura folosită pentru înregistrarea spectrelor de fluorescență. (b) Spectrometrul de fluorescență StellarNet Inc.

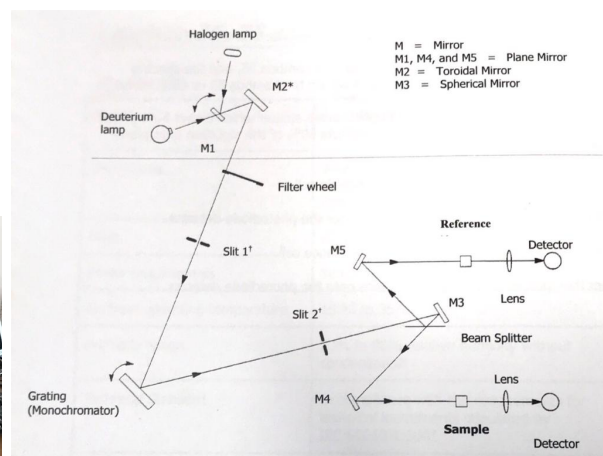
Pentru înregistrarea spectrelor din luna mai a soluțiilor de interes, am folosit un spectrometru de absorbție Lambda 35 (figura 2.6) (a). Specificațiile sunt cele din tabelul 2.3, iar schema optică este cea din figura 2.6 (b).

Parametrii	Specificații
Intervalul (nm)	190-1100
Operare cu Fascicul Dublu	DA
Lărgimea de bandă (nm)	0.5-4 (Variabilă)
Premonocromator	NU
Aplicații	Testare UV/Vis de rutină Analize pe lichide Probă solidă, pudră sau pulbere
Interval de absorbanță	3.2 A

Tabelul 2.3: Specificațiile tehnice pentru modelul spectrometrului de absorbție Lambda 35. [42]



(a)



(b)

Figura 2.6: (a) Spectrometrul de absorbție Lambda 35.

(b) Schema optică a spectrometrului Lambda 35.

2.2 Prepararea probelor

Mai întâi trebuie să determinăm dreapta de calibrare folosind un set de soluții standard cunoscute. Pentru a determina concentrația de riboflavină a băuturilor energizante trebuie să folosim câteva soluții de concentrație cunoscută. Întâi, am preparat soluția stock (figura 2.7) cu concentrația $8 \cdot 10^{-5}$ M riboflavină. Soluția stock a fost preparată folosind ca solvent o soluție având 1% acid acetic.

Folosind o pipetă, am pus într-o cuvă cantitatea de riboflavină în mililitri cu o cantitate de acid acetic de 1%, dorind să obținem o soluție de 3 mL volum total. Apoi, din soluția stock am preparat mai multe soluții cu diferite concentrații de riboflavină, conform tabelului 2.4.

Utilizând formula 2.2.1 am determinat volumul soluției stock cu concentrația dorită ($8 \cdot 10^{-5}$ M), știind că am pornit de la o cantitate de 4.5 mg riboflavină pulbere. Într-un recipient potrivit (20 ml) am pus pulberea de riboflavină și peste am adăugat acid acetic 1% până când am obținut o soluție cu volumul rezultat din calculul de mai jos.

$$V = \frac{m}{C \cdot M} \quad (2.2.1)$$

unde:

- $m = 4.5$ mg - masa de riboflavină
- $C = 8 \cdot 10^{-5}$ Mol/L - concentrația de riboflavină
- $M = 376.36$ g/mol - masa molară a riboflavinei

De asemenea, folosind formula 2.2.2, formula diluției, am calculat concentrațiile finale ale celorlalte 9 soluții.

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} \quad (2.2.2)$$

unde:

- $V_1 = 0.3$ mL, 0.6 mL, 0.9 mL, 1.2 mL, 1.5 mL, 1.8 mL, 2.1 mL, 2.4 mL, 2.7 mL - volumul de riboflavină de concentrație $8 \cdot 10^{-5}$ Mol/L
- $C_1 = 8 \cdot 10^{-5}$ Mol/L - concentrația de riboflavină
- $V_2 = 3$ mL - volumul total al fiecărei soluții

Nr.soluție	Concentrația soluției stock (M)	Volumul de riboflavină (mL)	Volumul de acid acetic 1% (mL)	Volumul total standard (mL)	Concentrația finală de riboflavină (M)
C1	$8 \cdot 10^{-5}$	0.3	2.7	3	$0.8 \cdot 10^{-5}$
C2	$8 \cdot 10^{-5}$	0.6	2.4	3	$1.6 \cdot 10^{-5}$
C3	$8 \cdot 10^{-5}$	0.9	2.1	3	$2.4 \cdot 10^{-5}$
C4	$8 \cdot 10^{-5}$	1.2	1.8	3	$3.2 \cdot 10^{-5}$
C5	$8 \cdot 10^{-5}$	1.5	1.5	3	$4.0 \cdot 10^{-5}$
C6	$8 \cdot 10^{-5}$	1.8	1.2	3	$4.8 \cdot 10^{-5}$
C7	$8 \cdot 10^{-5}$	2.1	0.9	3	$5.6 \cdot 10^{-5}$
C8	$8 \cdot 10^{-5}$	2.4	0.6	3	$6.4 \cdot 10^{-5}$
C9	$8 \cdot 10^{-5}$	2.7	0.3	3	$7.2 \cdot 10^{-5}$

Tabelul 2.4: Volumele de riboflavină ($8 \cdot 10^{-5}$ M) și acid acetic (1%) folosite pentru obținerea celor 9 soluții de concentrații diferite de riboflavină.

[43] [43]

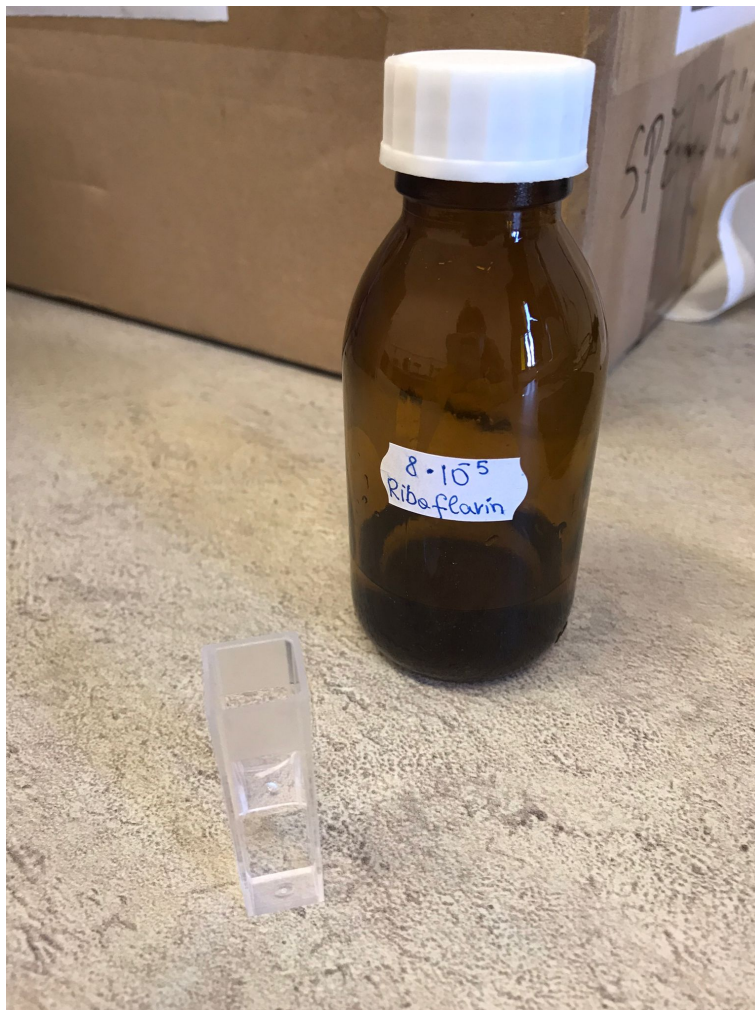
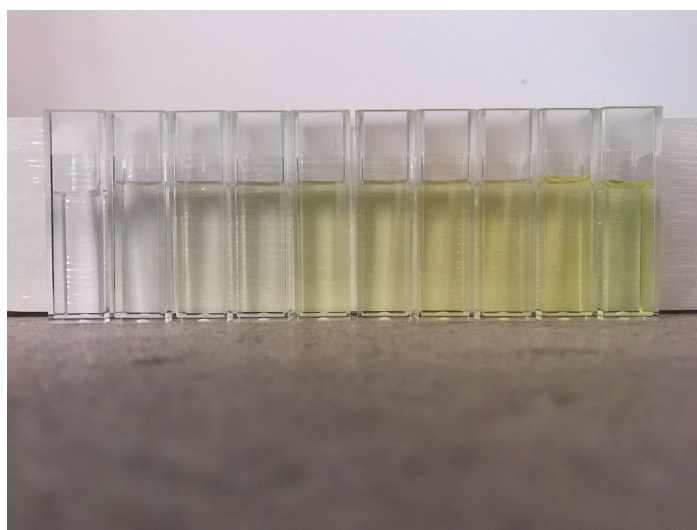


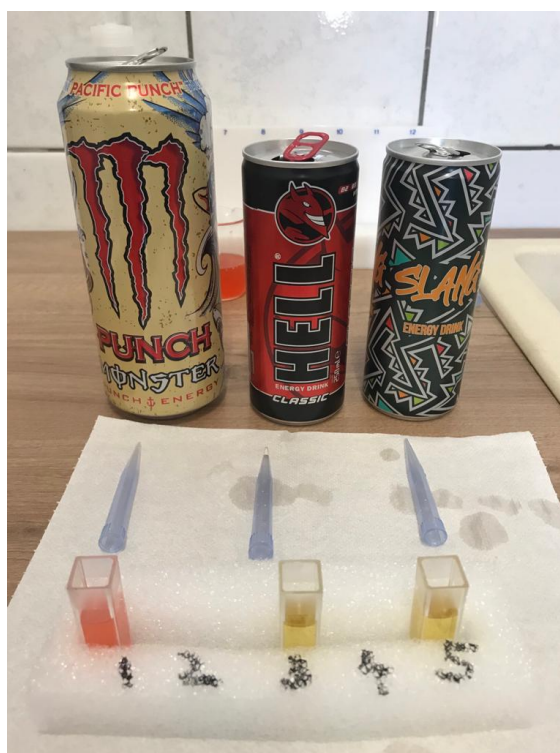
Figura 2.7: Soluția stock

După ce am efectuat procedura de umplere a fiecărei cuve cu soluție de riboflavină de concentrații diferite, am evidențiat concentrațiile acestora în figura 2.8 (a).

Următorul pas a fost să pun probele, și anume energizantele, pe rând în cuve separate precum în figura 2.8 (b).



(a)



(b)

Figura 2.8: (a) Soluțiile de concentrații C1-C9 cunoscute.
(b) Probele de interes și anume băuturile energizante (Monster, Hell, respectiv Slang).

Capitolul 3

REZULTATE

3.1 Curba de calibrare

Probele de concentrații cunoscute au fost puse pe rând în spectrofluorimetrul StellarNet Inc pentru a înregistra spectrele de fluorescență. Întâi de toate am efectuat o măsurătoare de absorbție a soluției de concentrație C9, concentrație de riboflavină nediluată folosind spectrofotometrul de absorbție T100. Am obținut spectrul din figura 3.1 (a). În figura 3.1 (b) este prezentat, pentru comparație, spectrul de absorbție și de fluorescență al riboflavinei luat din literatura. [44].

Se observă că spectrul de absorbție al riboflavinei are maximul la 455 nm, atât în spectrul înregistrat în laborator cât și în spectrul preluat din literatură.

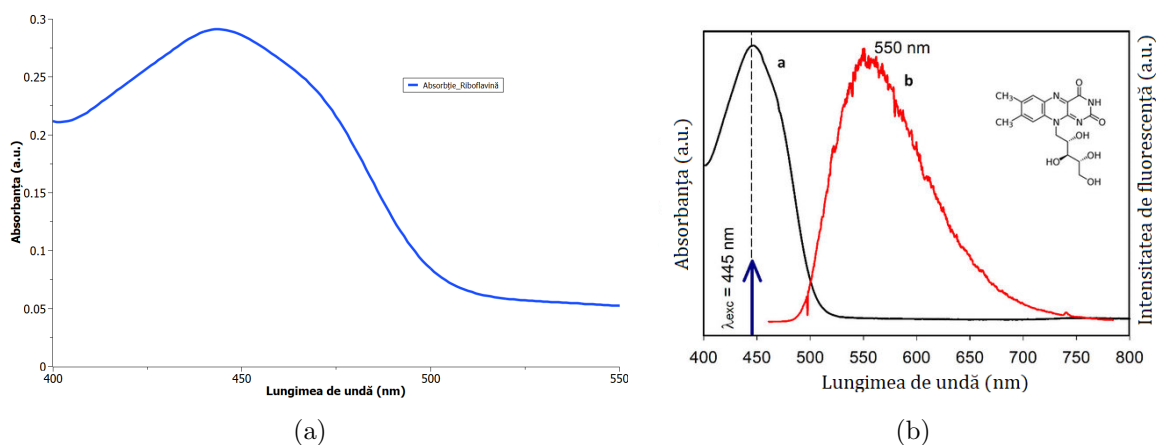


Figura 3.1: (a) Spectrul de absorbție al riboflavinei obținut experimental
(b) Spectrul de absorbție calculat al riboflavinei. [44]

Pentru a obține fluorescența celor 9 soluții, am folosit pentru excitație două surse luminoase, și anume un LED cu lungimea de undă de 390 nm folosit pentru absorbția în domeniul UV, respectiv un LED cu lungimea de undă de 470 nm folosit, de altfel, pentru absorbția în domeniul Vizibil. Am folosit aceste două surse de lumină pentru ca excitația să fie cât mai aproape de maximul de absorbție și anume 455 nm.

Diferența dintre emisia de fluorescență a fiecărei soluții de concentrație diferită se poate observa în figura 3.2. De asemenea, pentru obținerea fluorescenței soluțiilor din figura 3.2, am folosit ca sursă luminoasă un LED cu lungimea de undă de 390 nm.

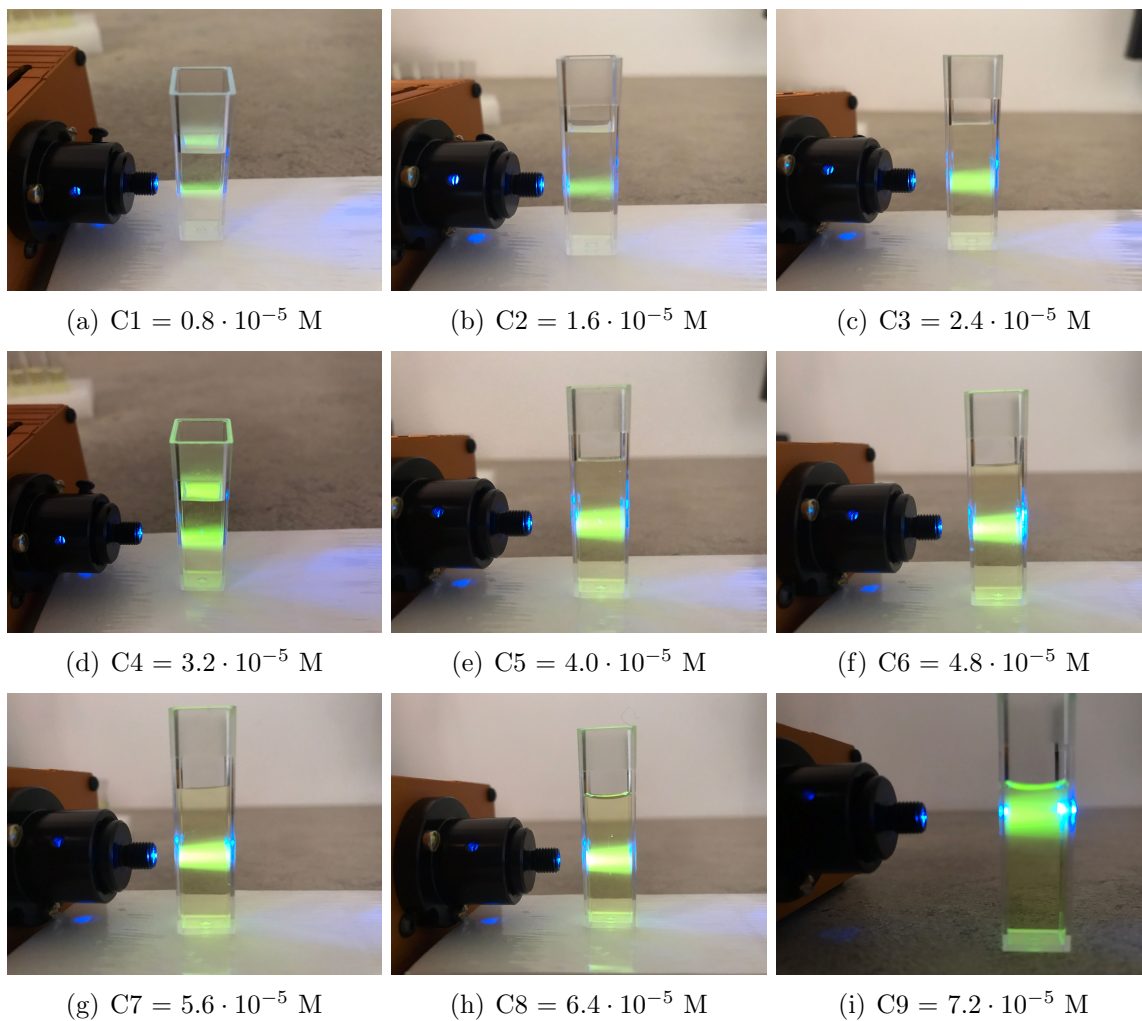


Figura 3.2: Fluorescența soluției de concentrații diferite.

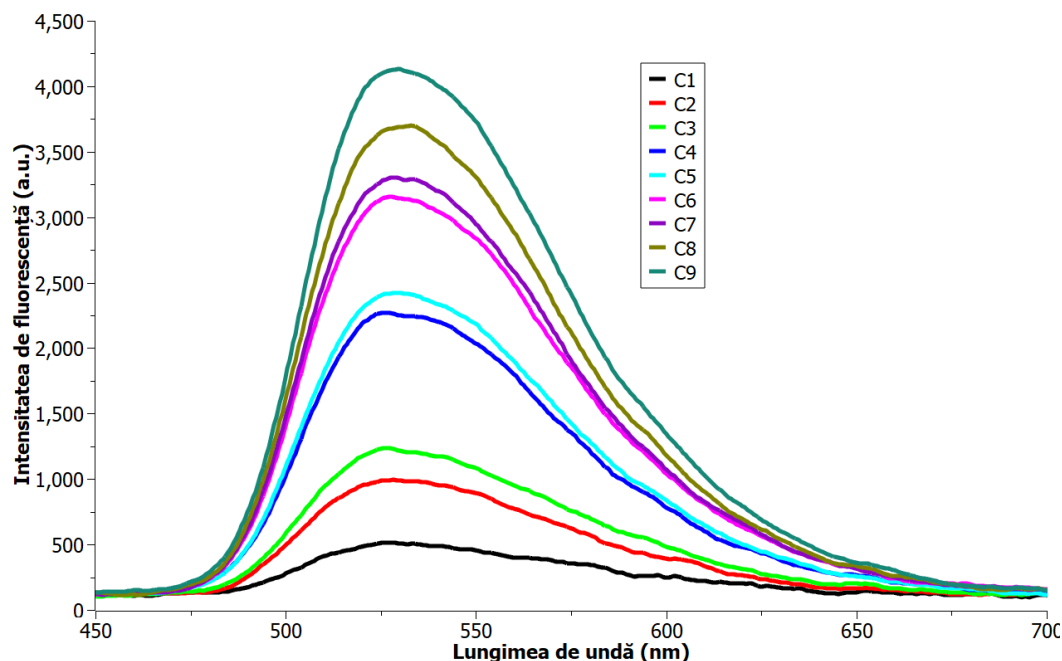


Figura 3.3: Spectrele soluțiilor C1-C9 la lungimea de undă de excitație de 390 nm

În figurile 3.3 și 3.4 sunt prezentate spectrele de fluorescență ale celor 9 soluții de riboflavină, cu concentrații cunoscute, excitate cu două lungimi de undă: 390 nm, respectiv 470 nm.

În figura 3.3 se observă că, pentru excitarea la 390 nm, spectrul de fluorescență corespunzător celei mai concentrate soluții de riboflavină ($C9 = 7.2 \cdot 10^{-5}$ M) are intensitate maximă. La polul opus, soluția de concentrație $C1 = 0.8 \cdot 10^{-5}$ este aceea care este cea mai săracă în concentrație de riboflavină, în condițiile în care excităm cu o lungime de undă de 390 nm și asta ne confirmă graficul 3.3.

Observăm că toate soluțiile excitate cu lungimea de undă de 390 nm, au maximul emisiei de fluorescență la 527 nm.

Nr.soluție	Concentrația	Intensitatea de fluorescență
C1	$0.8 \cdot 10^{-5}$	511
C2	$1.6 \cdot 10^{-5}$	981
C3	$2.4 \cdot 10^{-5}$	1227
C4	$3.2 \cdot 10^{-5}$	2259
C5	$4.0 \cdot 10^{-5}$	2425
C6	$4.8 \cdot 10^{-5}$	3147
C7	$5.6 \cdot 10^{-5}$	3294
C8	$6.4 \cdot 10^{-5}$	3701
C9	$7.2 \cdot 10^{-5}$	4129

Tabelul 3.1: Intensitățile de fluorescență pentru fiecare substanță de concentrație diferită la lungimea de undă de excitație 390 nm.

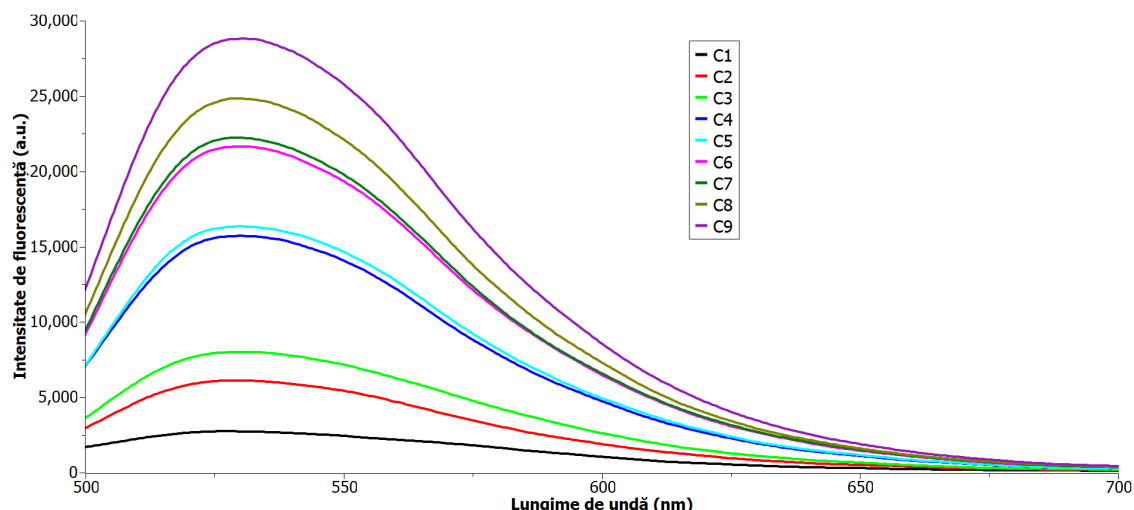


Figura 3.4: Spectrele soluțiilor C1-C9 la lungimea de undă de excitație de 470 nm

În figura 3.4 se observă că, pentru excitarea la 470 nm, spectrul de fluorescență corespunzător celei mai concentrate soluții de riboflavină ($C9 = 7.2 \cdot 10^{-5}$ M) are intensitate maximă, iar soluția de concentrație $C1 = 0.8 \cdot 10^{-5}$ are intensitatea cea mai puțin intensă și are o valoare corespunzătoare 2731.5 a.u. în condițiile în care excităm cu o lungime de undă de 470 nm.

Observăm că toate soluțiile excitate cu lungimea de undă de 470 nm, au maximul emisiei de fluorescență centrat la 530 nm.

Nr.soluție	Concentrația	Intensitatea de fluorescență
C1	$0.8 \cdot 10^{-5}$	2742
C2	$1.6 \cdot 10^{-5}$	6119
C3	$2.4 \cdot 10^{-5}$	7989
C4	$3.2 \cdot 10^{-5}$	15720
C5	$4.0 \cdot 10^{-5}$	16320
C6	$4.8 \cdot 10^{-5}$	21630
C7	$5.6 \cdot 10^{-5}$	22220
C8	$6.4 \cdot 10^{-5}$	24820
C9	$7.2 \cdot 10^{-5}$	28770

Tabelul 3.2: Intensitățile de fluorescență pentru fiecare substanță de concentrație diferită la lungimea de undă de excitație 470 nm.

Conform tabelelor 3.1 și 3.2, am realizat curbele de calibrare (figura 3.5) cu ajutorul programului Excel pentru cele două lungimi de undă amintite mai sus. Ecuațiile curbelor de calibrare sunt cele din formulele 3.1.1, respectiv 3.1.2.

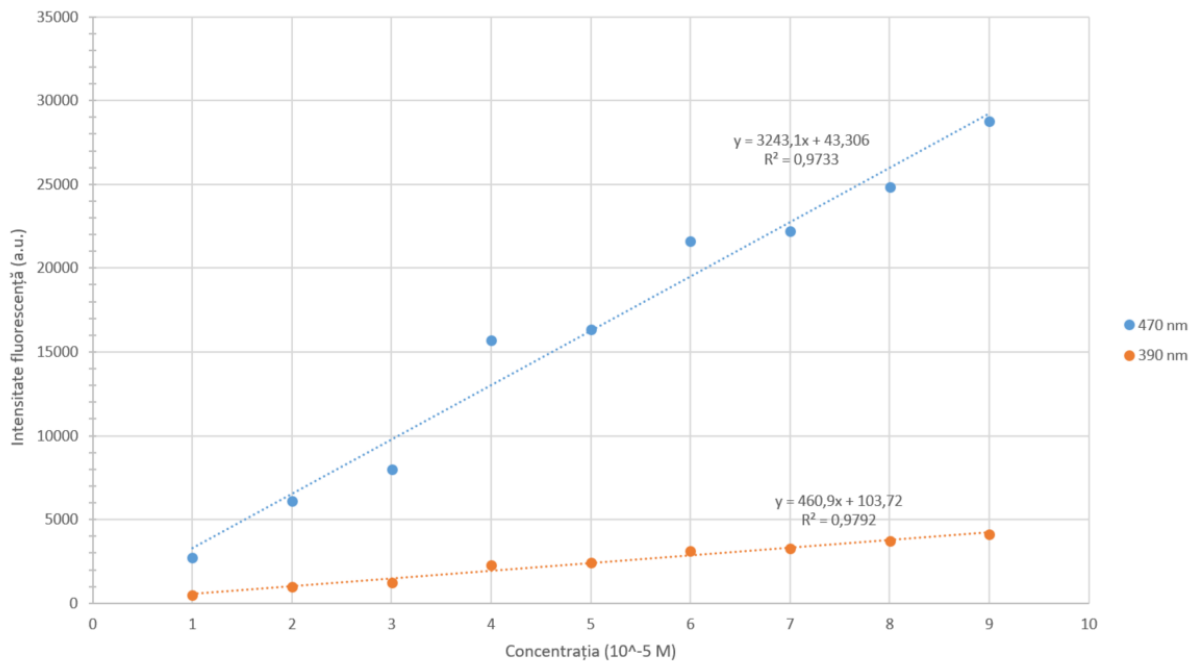


Figura 3.5: Curbele de calibrare pentru soluțiile C1-C9 la lungimile de undă de excitație 390 nm, respectiv 470 nm.

$$y = 460.9x + 103.72 \quad (3.1.1)$$

$$y = 3243.1x + 43.306 \quad (3.1.2)$$

În ecuațiile 3.1.1 și 3.1.2, y reprezintă valoarea intensității de fluorescență la lungimea de undă corespunzătoare maximului de emisie, iar x reprezintă concentrația molară a soluției de riboflavină.

3.2 Determinarea vitaminei B2 în probe reale

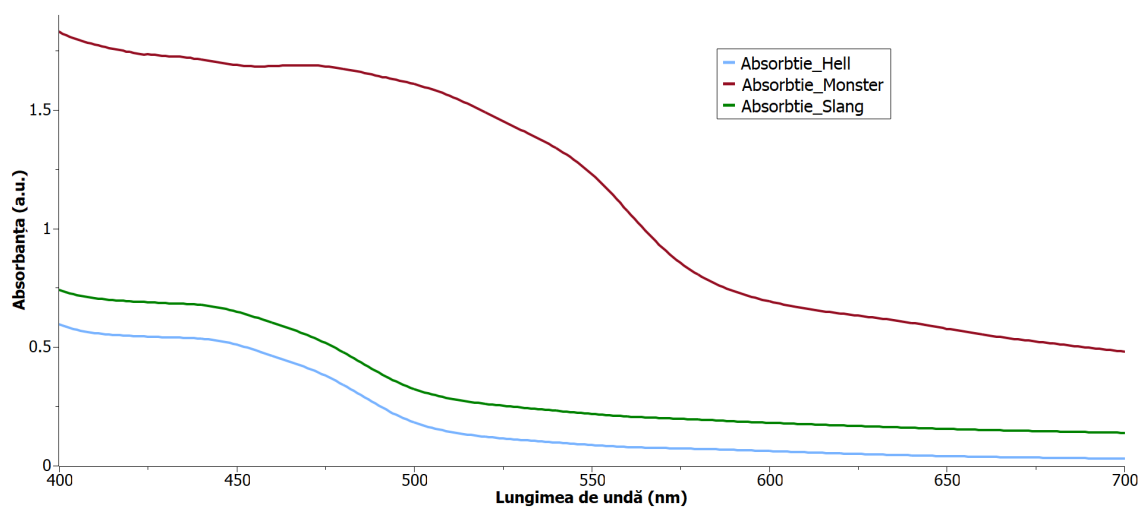


Figura 3.6: Spectrele de absorbție ale băuturilor energizante, Hell, Monster, respectiv Slang.

În figura 3.6 sunt prezentate spectrele de absorbție ale băuturilor energizante Hell, Monster, respectiv Slang folosind ca sursă de lumină un LED de 390 nm.

În figura 3.7 sunt prezentate spectrele de fluorescență ale băuturilor energizante obținute în cazul excitării cu 390 nm.

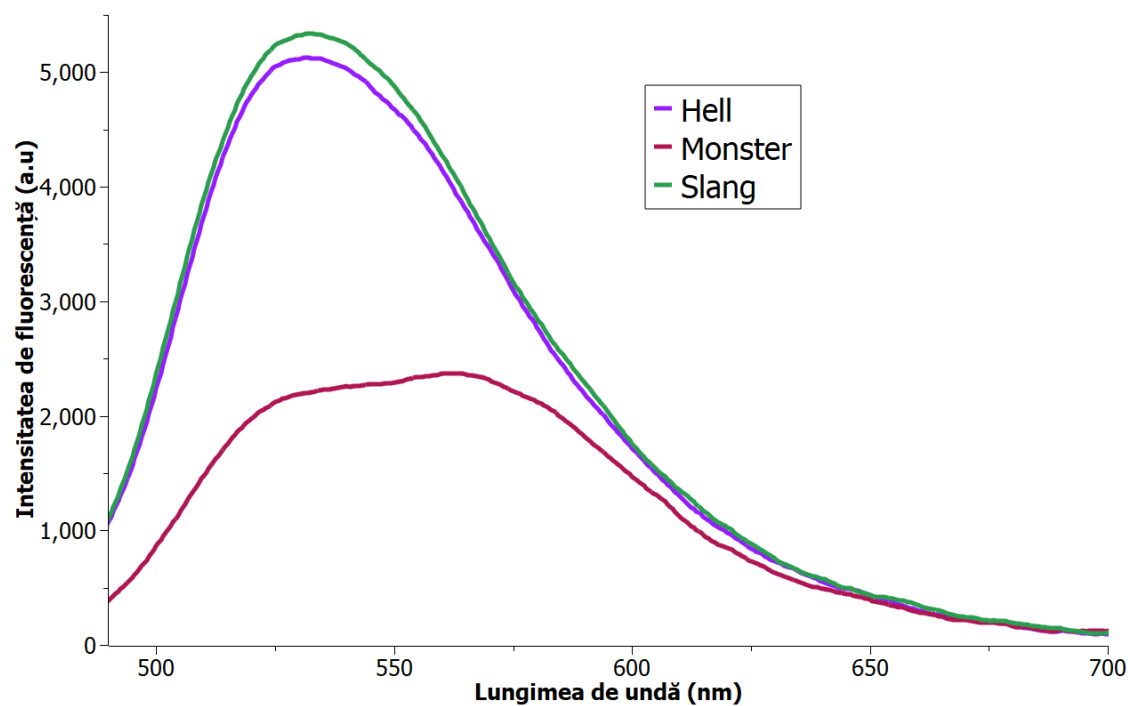


Figura 3.7: Spectrele băuturilor energizante obținute folosind ca excitație LED-ul de 390 nm

Din spectrele de fluorescență ale energizantelor (măsurate în aceleași condiții ca spectrele soluțiilor de riboflavină), se pot obține valorile intensității de fluorescență la lungimea de undă corespunzătoare maximului emisie de fluorescență.

Astfel, pentru spectrele de excitație la 390 nm am obținut valorile din tabelul 3.3:

Substanța	Hell	Slang	Monster
I_F	5125	5336	2375

Tabelul 3.3: Valorile intensității de fluorescență corespunzătoare fiecărei băuturi energizante (excitație la 390 nm).

În figura 3.8 sunt prezentate spectrele de fluorescență (excitație la 390 nm) atât ale soluțiilor de riboflavină cu concentrații cunoscute, cât și ale băuturilor energizante.

Se observă că energizantele au un spectru de fluorescență asemănător cu al soluțiilor de riboflavină și că în cazul energizantului Monster, valoarea intensității se găsește în domeniul în care au maxime spectrele soluțiilor de riboflavină. Două dintre energizante (Hell, respectiv Slang) au intensitatea maximului de fluorescență mai mare decât intensitatea celei mai concentrate soluții.

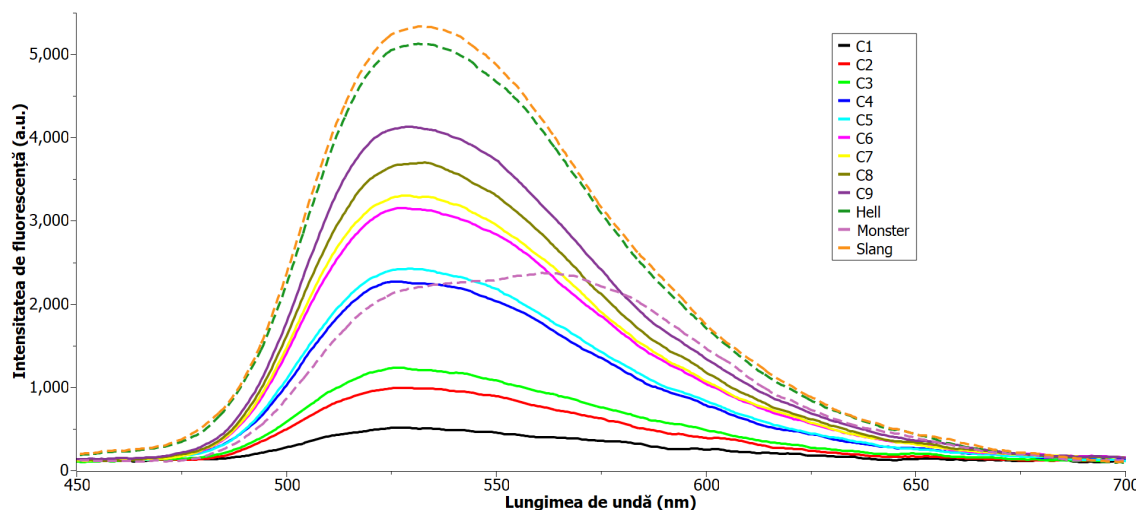


Figura 3.8: Spectrele de fluorescență ale soluțiilor de riboflavină de concentrații cunoscute și ale energizantelor (excitație la 390 nm).

Folosind ecuația dreptei de calibrare (3.1.1) și valoarea intensității emisiei de fluorescență, pentru fiecare energizant, am determinat concentrația de riboflavină din băuturile energizante. Astfel, am obținut valorile din tabelul 3.4.

	Intensitatea de Fluorescență	Concentrația (10^{-5}) Mol/L
Hell	5125	10.89
Slang	5336	11.35
Monster	2375	4.93

Tabelul 3.4: Concentrația de riboflavină în energizantele Hell, Slang, Monster, determinată din măsurători de fluorescență efectuate folosind ca excitație LED-ul cu 390 nm.

Folosind formula 3.2.3 putem afla masa de riboflavină din volumul V.

$$m = V \cdot C \cdot M \quad (3.2.3)$$

Unde:

- C - concentrațiile fiecărui energizant (din tabelul 3.4);
- V = 3 mL - volumul cuvei;
- M = 376.36 g/mol - masa molară a riboflavinei;
- m - masa de riboflavină care trebuie calculată.

În tabelul 3.5 sunt prezentate valorile maselor de riboflavină caracteristice fiecărei băuturi energizante.

	Concentrația (10^{-5}) Mol/L	Masa de riboflavină (10^{-5}) (mg)	Masa de riboflavină per 100 mL (mg)
Hell	10.89	0.123	4.1
Slang	11.35	0.128	4.26
Monster	4.93	0.056	1.86

Tabelul 3.5: Masa de riboflavină din energizantele Hell, Slang, Monster, determinată cu formula 3.2.3 (excitație la 390 nm).

În figura 3.9 sunt prezentate spectrele de fluorescență ale băuturilor energizante excitate la 470 nm.

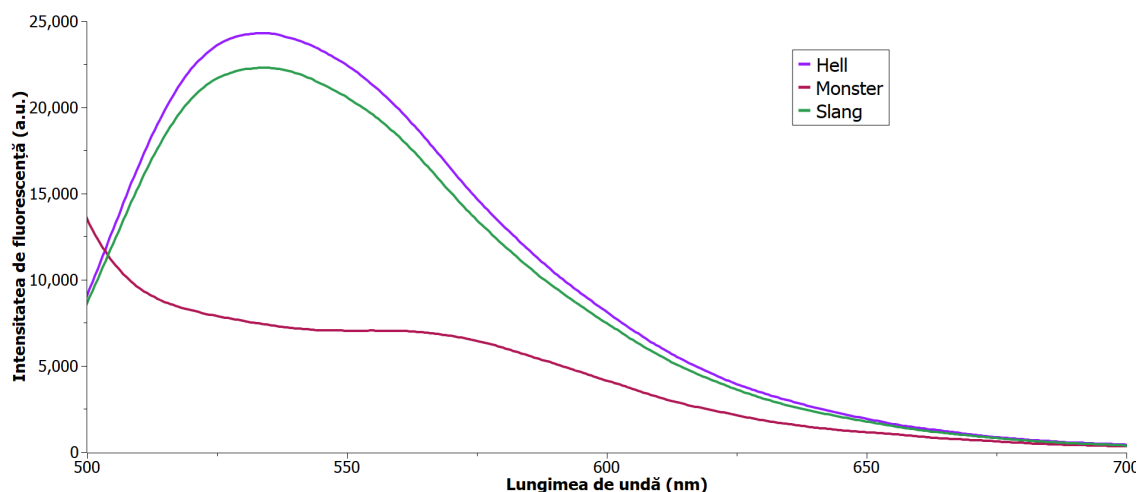


Figura 3.9: Spectrele băuturilor energizante obținute folosind ca excitație LED-ul de 470 nm

Din spectrele de fluorescență ale energizantelor (măsurate în aceleași condiții ca spectrele soluțiilor de riboflavină), se pot obține valorile intensității de fluorescență la lungimea de undă corespunzătoare maximumului emisie de fluorescență.

Astfel, pentru spectrele de excitație la 470 nm am obținut valorile din tabelul 3.6:

Substanța	Hell	Slang	Monster
I_F	24305	22312	7055

Tabelul 3.6: Valorile intensității de fluorescență corespunzătoare fiecărei băuturi energizante (excitație la 470 nm).

În figura 3.10 sunt prezentate spectrele de fluorescență (excitație la 470 nm) atât ale soluțiilor de riboflavină cu concentrații cunoscute, cât și ale băuturilor energizante.

Se observă că energizantele au un spectru de fluorescență asemănător cu al soluțiilor de riboflavină și că valorile intensităților se găsesc în domeniul în care au maxime spectrele soluțiilor de riboflavină, deci se pot determina concentrațiile energizantelor.

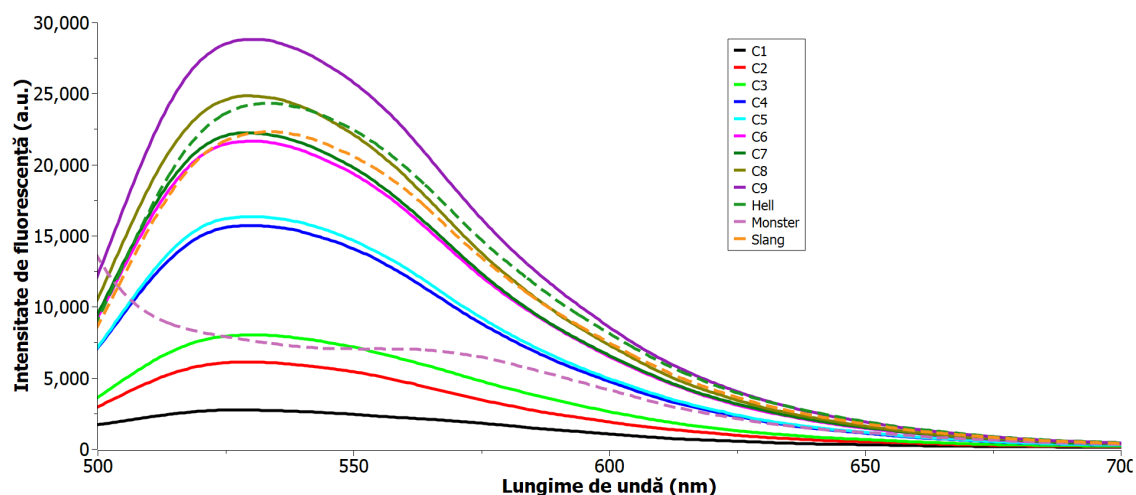


Figura 3.10: Spectrele de fluorescență ale soluțiilor de riboflavină de concentrații cunoscute și ale energizantelor (excitație la 470 nm).

Folosind ecuația dreptei de calibrare (3.1.2) și valoarea intensității emisiei de fluorescență, pentru fiecare energizant, am determinat concentrația de riboflavină din băuturile energizante. Astfel, am obținut valorile din tabelul 3.7.

	Intensitatea de Fluorescență	Concentrația (10^{-5}) Mol/L
Hell	24305	7.48
Slang	22312	6.86
Monster	7055	2.16

Tabelul 3.7: Concentrația de riboflavină în energizantele Hell, Slang, Monster, determinată din măsurători de fluorescență efectuate folosind ca excitație LED-ul cu 470 nm.

Folosind formula 3.2.4 putem afla masa de riboflavină din volumul V.

$$m = V \cdot C \cdot M \quad (3.2.4)$$

Unde:

- C - concentrațiile fiecărui energizant (din tabelul 3.7);
- V = 3 mL - volumul cuvei;
- M = 376.36 g/mol - masa molară a riboflavinei;
- m - masa de riboflavină care trebuie calculată.

În tabelul 3.8 sunt prezentate valorile maselor de riboflavină caracteristice fiecărei băuturi energizante.

	Concentrația (10^{-5}) Mol/L	Masa de riboflavină (10^{-5}) (mg)	Masa de riboflavină per 100 mL (mg)
Hell	7.48	0.084	2.8
Slang	6.86	0.077	2.56
Monster	2.16	0.024	0.8

Tabelul 3.8: Masa de riboflavină din energizantele Hell, Slang, Monster, determinată cu formula 3.2.4 (excitație la 470 nm).

Comparând masa de riboflavină obținută experimental cu cea de pe eticheta băuturilor (tabelul 1.5), observăm că valorile obținute experimental sunt un pic mai mari decât cele raportate de producător, dar în limita erorilor experimentale. Putem considera că valorile crescute de riboflavină în probele studiate se datorează eventualei evaporări a lichidului din timpul măsurătorilor deoarece probele nu au fost puse în cuve cu capac.

Observăm că spectrul energizantului Monster din figurile 3.7 (excitat cu 390 nm), respectiv 3.9 (excitat cu 470 nm) este diferit față de celelalte două băuturi deoarece în compoziția soluției este prezent, probabil, un compus care reacționează chimic cu riboflavina și determină deplasarea maximului de fluorescență spre numere de undă mai mari.

CONCLUZII

Au fost înregistrate spectrele de fluorescență pentru nouă soluții de riboflavină cu concentrații cunoscute ($0.8 \cdot 10^{-5}$, $1.6 \cdot 10^{-5}$, $2.4 \cdot 10^{-5}$, $3.2 \cdot 10^{-5}$, $4.0 \cdot 10^{-5}$, $4.8 \cdot 10^{-5}$, $5.6 \cdot 10^{-5}$, $6.4 \cdot 10^{-5}$, $7.2 \cdot 10^{-5}$) pentru două lungimi de undă ale fasciculului excitator (390 nm și 470 nm). Au fost determinate intensitățile emisiei de fluorescență la lungimea de undă corespunzătoare maximului de emisie (~ 530 nm).

Au fost determinate ecuațiile curbelor de calibrare pentru fiecare caz în parte. Au fost înregistrate spectrele de fluorescență pentru trei băuturi energizante (Hell, Slang, respectiv Monster) pentru cele două lungimi de undă ale fasciculului excitator și au fost determinate intensitățile emisiei de fluorescență la lungimea de undă corespunzătoare maximului de emisie (~ 530 nm).

Folosind ecuațiile curbelor de calibrare, au fost determinate concentrațiile de riboflavină ale energizantelor. S-au comparat valorile obținute cu valorile date pe eticheta băuturilor și s-a observat o concordanță destul de bună între valorile raportate și cele măsurate experimental pentru spectrele obținute folosind ca și excitație LED-ul ce emite lungime de undă de 470 nm. Pentru spectrele obținute folosind 390 nm ca excitație, cantitățile de riboflavină calculate pentru 100 ml sunt semnificativ mai mari față de cele raportate de producător, de asemenea concentrațiile energizantelor obținute pentru excitație la 390 nm sunt mai mari decât concentrațiile acelorași probe obținute pentru excitație la 470 nm.

Comparând rezultatele obținute pentru cele două lungimi de undă ale fasciculului excitator, s-a observat următorul lucru: curba de calibrare obținută folosind spectrele excitate la o lungime de undă mai apropiată de maximul de absorbție (470 nm) dă rezultate mai bune, permițând diferențierea unor concentrații apropiate.

În concluzie, pentru o sensibilitate bună a metodei de determinare a diferitelor concentrații, trebuie folosită pentru excitație o radiație cât mai apropiată de lungimea de undă a maximului de absorbție.

Utilitatea spectroscopiei de fluorescență se poate desprinde din doi factori principali. Semnalul fluorescent de fundal este mic deoarece majoritatea moleculelor nu prezintă fenomenul de fluorescență. Prin urmare, tehnica aceasta poate detecta doar molecule cu emisie de fluorescență. Un al doilea factor este sensibilitatea proprietăților spectrale ale emisiilor de fluorescență la mediul local cum ar fi solvent, pH, concentrație ionică etc. În cele din urmă, utilitatea fluorescenței apare și în aplicațiile în care mediile locale pot varia drastic, de exemplu în studiul sistemelor de macromolecule și în probe biologice.

Bibliografie

- [1] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002. (b) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006. (c) *Molecular Luminescence Spectroscopy*; Schulman, S. G., Ed.; Wiley Interscience: New York, 1985-1993; Parts 1-3.
- [2] (a) Valeur, B. From Well-Known to Underrated Applications of Fluorescence. In *Fluorescence of Supramolecules, Polymers and Nanosystems*; Springer Series on Fluorescence, Vol. 4; Berberan-Santos, M. N., Ed.; Springer Verlag: Berlin, 2008; pp 21-43. (b) Valeur, B. Molecular Fluorescence. In *Encyclopedia of Applied Spectroscopy*; Andrews, D., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009; pp 477-532.
- [3] Braslavsky, S. E. et al. , *Glossary of Terms used in Photochemistry*, 3rd edition (IUPAC recommendations 2006), Pure Appl. Chem. 2007
- [4] Stokes, G. G. *Philos. Trans.* 1852, 142, 463–562.
- [5] Perrin, F. *Ann. Phys. (Paris, Fr.)* 1929, 12, 169–275.
- [6] Nicholas J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, California, 1991
- [7] Nicholas J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, *Principles of Molecular Photochemistry - An introduction*, University Science Books, Sausalito, California, 2009
- [8] Norman S. Allen, *Photochemistry and Photophysics of Polymeric Materials*, Wiley, 2010
- [9] Harvey, E. N. *A History of Luminescence from the Earliest Times until 1900*; The American Philosophical Society: Philadelphia, PA, 1957; Reprinted by Dover publications.
- [10] Goldberg, M. C., Weiner, E. R. The Science of Luminescence. In *Luminescence Applications*; Goldberg, M. C., Ed.; ACS Symposium series 383, American Chemical Society: Washington DC, 1989; pp 1-22.
- [11] Valeur, B. On the origin of the terms fluorescence, phosphorescence and luminescence. In *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Application to Chemical and Life Sciences*; Valeur, B., Brochon, J. C., Eds.; Springer: Berlin, 2001; pp 3-6.
- [12] Safford, W. E. *Ann. Rep. Smithsonian Inst.* 1915, 271–298.
- [13] Partington, J. R. *Ann. Sci.* 1955, 11, 1–26.
- [14] Muyskens, M. J. *Chem. Educ.* 2006, 83, 765–768.

- [15] (a) Acuna, A. U.; Amat-Guerri, F. Early History of Solution Fluorescence: The Lignum nephriticum of Nicolas Monardes. In *Fluorescence of Supramolecules, Polymers and Nanosystems; Springer Series on Fluorescence*, Vol. 4; Berberan-Santos, M. N., Ed.; Springer Verlag: Berlin, 2008; pp 3-20. (b) Acuna, A. U. *J. Chem. Educ.* 2007, 84, 231. (c) Acuna, A. U.; Amat-Guerri, F.; Morcillo, P.; Liras, M.; Rodriguez, B. *Org. Lett.* 2009, 11, 3020–3023.
- [16] D. Maniu, *Spectroscopia de Fluorescentă*, Universitatea Babeş-Bolyai, 2021
- [17] Dawson W. R. and Windsor M. W. (1968) *J. Phys. Chem.*, 72, 3251
- [18] Kirby E. P. and Steiner R. F. (1970) *J. Phys. Chem.*, 74, 4480
- [19] Berlman I. B. (1965), *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, London
- [20] Rusakowicz R. and Testa A. C. (1968), *J. Phys. Chem.*, 72, 2680
- [21] Melhuish W. H. (1961) *J. Phys. Chem.*, 65, 229
- [22] Hamai S. and Hirayama F. (1983) *J. Phys. Chem.*, 87, 83
- [23] Meech S. R. and Phillips D. (1983) *J. Photochem*, 23, 193
- [24] Karstens T. and Kobs K. (1980) *J. Phys. Chem.*, 84, 1871
- [25] Arden-Jacob J., Marx N. J. and Drexhage K.H. (1997) *J. Fluorescence*, 7(Suppl.), 91S
- [26] Magde D., Brannon J. H., Cramers T. L. and Olmsted J. III (1979), *J. Phys. Chem.*, 83, 696
- [27] <https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/> accesat la data de 07.06.2022
- [28] J. Najbar, M. Mac, Mechanisms of fluorescence quenching of aromatic molecules by potassium iodide and potassium bromide in methanol-ethanol solutions, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1991, 87, 1523–1529
- [29] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, 2006, p. 954
- [30] Aurelia Nicoleta Cristea – *Tratat de farmacologie*, ediția I, Editura medicală București 2005
- [31] Valentin Stroescu – *Bazele farmacologice ale practicii medicale*, ediția a VII-a, Editura medicală București 2001
- [32] <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Riboflavin-HealthProfessional/> accesat la data de 08.06.2022
- [33] Russell RM, Suter PM : Vitamin and trace mineral deficiency and excess. In Harrison's *Principles of Internal Medicine*. 17th edition. Edited by AS Fauci, DL Kasper, E Braunwald, et al. New York, McGraw-Hill Book Company, 2008, 441-449.
- [34] Niculina Mitrea, Denisa Margină, Andreea Arsene et all, *Biochimie: Vitaminele în procesele metabolice*, Editura Didactică și Pedagogică București 2008
- [35] Cornelia Mircea, *Enzime și vitamine*, Editura "Grigore T. Popa", U.M.F. Iași 2010

- [36] Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, Washington, DC: National Academy Press; 1998.
- [37] U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central external link disclaimer, 2019.
- [38] <http://www.dietandfitnesstoday.com/riboflavin-in-energy-drinks.php?fbclid=IwAR3impwKOtZXBKF5L8islBKjZj2KMe76K86K0hBT0Bg1wNS3JS6KI8SoAk> accesat la data de 08.06
- [39] <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-014-9880-0>
- [40] https://www.lauper-instruments.ch/fileadmin/manuals/API/T100_Manual_NVS.pdf
- [41] <https://www.stellarnet.us/wp-content/uploads/StellarNet-Product-Catalog.pdf>
- [42] https://resources.perkinelmer.com/corporate/cmsresources/images/44-74448bro_lambda.pdf
- [43] https://www.stellarnet.us/wp-content/uploads/StellarNet-Exp3_Fluor_Riboflavin.pdf accesat la data de 11.06.2022
- [44] <https://www.mdpi.com/2079-4991/10/4/773/htm> accesat în data de 11.06.2022

DECLARAȚIE PE PROPRIE RĂSPUNDERE

Subsemnatul, SUNYA DENISA-MONICA, declar că Lucrarea de licență/diplomă pe care o voi prezenta în cadrul examenului de finalizare a studiilor la Facultatea de FIZICĂ, din cadrul Universității Babeș-Bolyai, în sesiunea IUNIE, sub îndrumarea Conf. dr. DANA MANIU, reprezintă o operă personală. Menționez că nu am plagiat o altă lucrare publicată, prezentată public sau un fișier postat pe Internet. Pentru realizarea lucrării am folosit exclusiv bibliografia prezentată și nu am ascuns nici o altă sursă bibliografică sau fișier electronic pe care să le fi folosit la redactarea lucrării.

Prezenta declarație este parte a lucrării și se anexează la aceasta.

Data,
21.06.2022

Nume,
SUNYA DENISA-MONICA
Semnătură

