

»55. srečanja mladih raziskovalcev Slovenije 2021«

NAJOPTIMALNEJŠI POGOJI PRIPRAVE ZDRAVILNEGA ŠIPKOVEGA ČAJA

Raziskovalno področje KEMIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: Maša Karčovnik

Mentor: Darja Kravanja

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, marec 2021

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine.....	2
Seznam slik.....	4
Seznam preglednic	5
Seznam diagramov	5
1. POVZETEK.....	6
2. ZAHVALA	6
3. UVOD.....	7
3.1. Namen raziskovalnega dela.....	7
3.2. Raziskovalno vprašanje.....	7
3.3. Hipoteze	8
HIPOTEZA 1	8
HIPOTEZA 2	8
HIPOTEZA 3:	8
HIPOTEZA 4	8
HIPOTEZA 5:	8
4. PREGLED LITERATURE.....	10
4.1. Zdravilne rastline.....	10
4.1.1. Fitoterapija	10
4.1.2. Šipek	11
OSNOVNI PODATKI.....	11
ZDRAVILNOST IN UPORABA.....	11
PRIPRAVA ČAJA	12
KEMIČNA SESTAVA PLODOV.....	12
4.2. Antioksidanti	13
PRIMARNI ANTIOKSIDANTI.....	13
SEKUNDARNI ANTIOKSIDANTI.....	14
TERCIARNI ANTIOKSIDANTI	14
4.2.1. Delovanje antioksidantov	15
4.2.2. Pomen antioksidantov.....	15
4.2.3. Vitamin C	15
ZGODOVINA	15
LASTNOSTI.....	16
ZGRADBA.....	16
VLOGA VITAMINA C V TELESU	17
VIRI VITAMINA C.....	17

PRIPOROČEN DNEVNI VNOS.....	18
POMANJKANJE IN PRESEŽEK VITAMINA C.....	19
4.2.4. Fenolne spojine	19
FLAVONOIDI	19
ANTOCIANIDI.....	20
FLAVANONI	21
FLAVONI	21
4.3. Metoda dela	21
4.3.1. Metoda z radikalom DPPH.....	21
4.3.2. Titracija z reagentom DI (2,6-diklorofenol-indofenol)	22
5. PRAKTIČNI DEL.....	24
5.1. Načrt.....	24
5.2. Metoda dela	24
5.2.1. Priprava koncentriranega šipka	24
5.2.2. Priprava vzorcev (čajev).....	25
5.2.2.1. Vzorci z nabranim šipkom.....	25
5.2.2.2. Vzorec s kupljenim šipkom	26
5.2.3. Titracija.....	27
5.2.3.1. Priprava raztopine 2-6 diklorofenol-indofenola (DI).....	27
5.2.3.2. Standardizacija DI raztopine	27
5.2.3.3. Izvedba titracije	27
5.2.4. Določevanje vsebnosti fenolov s spektrofotometrično metodo	28
5.2.4.1. Priprava reagentov	28
5.2.4.2. Priprava umeritvene krivulje	28
5.2.4.3. Določanje skupnih fenolov v vzorcih	31
5.2.5. Določanje antioksidativnosti z radikalsko metodo	32
5.2.5.1. Priprava raztopine DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).....	32
5.2.5.2. Priprava vzorcev	32
6. REZULTATI MERITEV.....	33
6.1. Titracija.....	33
6.2. Določanje skupnih fenolov	35
6.3. Določanje antioksidativnosti z radikalom DPPH	37
7. RAZPRAVA	39
7.1. Titracija.....	39
HIPOTEZA 1	40
HIPOTEZA 2	43

HIPOTEZA 3:	44
7.2. Določanje skupnih fenolov	45
HIPOTEZA 4	46
7.3. Določanje antioksidativnosti z radikalom DPPH	48
7.4. Primerjava rezultatov meritev	51
HIPOTEZA 5:	52
8. ZAKLJUČEK.....	54
9. DRUŽBENA ODGOVORNOST	56
10. VIRI IN LITERATURA	57

Seznam slik

Slika 1: Prikaz hiperoksidnega, superoksidnega in peroksidnega radikala	14
Slika 2: Strukture flavonoidov	20
Slika 3: Redukcija DPPH radikala (levo) v DPPH ₂ (desno). Donorska molekula je označena z AH in prosti radikal z A•	22
Slika 4: Reakcija 2,6-diklorofenol-indofenola z askorbinsko kislino.....	24
Slika 5: Šipkovi plodovi v terilnici..	25
Slika 6: Plodovi nabranega šipka (levo), kupljen šipek (desno).....	25
Slika 7: Segrevanje vzorca z gorilnikom (levo) in vzorec potem ko smo ga precedili (desno) .	26
Slika 8: Titracija vzorca do svetlo roza obarvanja.	28
Slika 9: Bučke od 1 do 6 ter reagenta A in B.	31
Slika 10: Absorbanca v odvisnosti koncentracije galne kisline.	31
Slika 11: Segrevanje raztopin vzorcev.	331
Slika 12: Raztopina vzorca v kivetu (levo) in spektrofotometer (desno).	331
Slika 13: Vzorci A, B, C in D v steklenih čašah.....	48

Seznam preglednic

Preglednica 1: Priporočen dnevni vnos vitamin C po starostnih skupinah.....	19
Preglednica 2: Volumen porabljene raztopine DI pri titracijah.	28
Preglednica 3: Volumen reagenta C in množinska koncentracija galne kisline v bučkah 1 – 7.	30
Preglednica 4: Volumen porebljene raztopine DI med titracijo, temperatura vzorcev in izračunana količina vitamina C v vzorcih A – F.....	35
Preglednica 5: Izmerjena absorbanca in izračunana koncentracija fenolov v vzorcih A - F. ...	38
Preglednica 6: Izmerjena absorbanca in izračunana inhibicija v vzorcih A - E.....	38

Seznam diagramov

Diagram 1: Količina vitamina C v vseh vzorcih.	39
Diagram 2: Količina vitamina C, ki se je iz šipkovih plodov prenesel v čaj.	41
Diagram 3: Količina vitamina C v vzorcih iz nabranega šipka, pripravljenih v steklenih čašah	42
Diagram 4: Količina vitamina C v vzorcih D in F.	43
Diagram 5: Koncentracija fenolov v vzorcih iz nabranega šipka, pripravljenih v steklenih čašah.	45
Diagram 6: Koncentracija fenolov v vzorcih D, E, F.....	47
Diagram 7: Odstotek fenolov, ki so se iz plodov prenesli v vzorce.	50
Diagram 8: Določanje inhibicije vzorcev iz nabranega šipka pripravljenih v steklenih čašah.	49
Diagram 9: Določanje inhibicije vzorcev D in E.	50
Diagram 10: Primerjava vseh treh meritev vzorcev iz nabranega šipka.	51
Diagram 11: Primerjava vzorca prepravljenega iz nabranega z vzorcem iz kupljene šipka.	52

1. POVZETEK

Šipek je ena najpomembnejših zdravilnih rastlin. V sklopu raziskovalne naloge smo proučevali, kakšni so optimalni pogoji priprave šipkovega čaja, da bo vsebnost vitamina C, fenolnih spojin in ostalih antioksidantov najvišja. Preverjali smo vpliv temperature, časa namakanja in kuhanja šipka v vodi ter vpliv materiala posode. Rezultate smo primerjali z vsebnostjo snovi v čaju iz kupljenega pripravka. Skupno antioksidativnost smo določali s spektrofotometrično metodo z radikalom DPPH, za določanje skupnih fenolov spektrofotometrično metodo z raztopino Folin-Ciocalteu reagenta, natrijevim karbonatom in galno kislino. Koncentracijo vitamina C smo ugotavljali s titracijo z radikalom DI. Ugotovili smo, da z višanjem temperature in časom vretja čaja koncentracija vitamina C upada, koncentracija skupnih fenolov pa narašča in da je čaj bolje pripraviti v stekleni kot v kovinski posodi. Na osnovi tega smo podali navodilo za pripravo najbolj zdravilnega šipkovega čaja.

KLJUČNE BESEDE: šipek, čaj, vitamin C, fenolne spojine

2. ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, ki me je usmerjala skozi raziskovanje, mi pomagala, me vzpodbujala in uspešno pripeljala do zaključka naloge. Hvaležna sem tudi laborantki, ki mi je bila pri delu v laboratoriju pripravljena pomagati in odgovoriti na vsa moja vprašanja ter staršem, ki so mi pomagali pri nabiranju šipka, mi stali ob strani ter me vzpodbujali pri delu.

3. UVOD

Ker pozimi pogosteje zbolimo, smo si želeli pripraviti nekaj zdravilnega in predvsem naravnega, s čemer bi lahko zaščitili svoje zdravje. Ob prebiranju člankov smo ugotovili, da imajo vitamin C in flavonoidi pozitiven učinek na naše telo, saj okrepijo imunski sistem in s tem preprečujejo ter omilijo obolenja. Spraševali smo se, v katerih rastlinah bi lahko našli največje količine obojega. Odločili smo se za šipek.

Šipek je do tri metre visok bodičast grm, ki raste ob gozdnih poteh, v grmovnatih krajih in na skalnatih območjih od Evrope do osrednje Azije. Zaradi močno rdečih plodov med sprehodi pogosto pritegne našo pozornost, nekoliko težje ga je nabirati zaradi gostih bodičastih vej. Preučili smo, kakšni so zdravilni učinki in načini priprave ter shranjevanja plodov te rastline, ki velja za eno najpomembnejših in najbolj poznanih zdravilnih rastlin v fitoterapiji. Ugotovili smo, da je uporaba šipkovih plodov zelo razširjena. Odločili smo se, da iz nabranih plodov pripravimo čaj, ker bo tako izdelek ostal najbolj naraven in zaželen pozimi, ko pogosto posežemo po toplih napitkih. Prebrali smo številne recepte priprave šipkovega čaj in nismo vedeli, katerega bi izbrali, da bi čaj ohranili čim več zdravilnih učinkovin.

3.1. Namen raziskovalnega dela

V sklopu raziskovalne naloge smo želeli ugotoviti, kakšni so optimalni pogoji priprave šipkovega čaja, da bo vsebnost vitamina C, fenolnih spojin in ostalih antioksidantov najvišja. Preučevati smo želeli vpliv temperature vode, časa namakanja šipka in materiala posode, v kateri se pripravlja čaj, na vsebnost teh snovi. Rezultate smo primerjali tudi z vsebnostmi vitamina C in ostalih antioksidantov v čaju iz kupljenega pripravka.

Skupno antioksidativno aktivnost smo določali s spektrofotometrično metodo z radikalom DPPH, skupne fenole s spektrofotometrično metodo z raztopino Folin – Ciocalteu reagenta, natrijevim karbonatom in galno kislino. Za določanje količine vitamina C smo uporabili titracijo z radikalom DI (2-6 diklorofenol-indofenola).

3.2. Raziskovalno vprašanje

Kako je potrebno pripraviti šipkov čaj, da bo vseboval največji delež snovi z zdravilnimi učinkovinami?

3.3. Hipoteze

HIPOTEZA 1: Po odstavitvi čaja z gorilnika se vsebnost vitamina C prvih 30 minut ne spreminja.

- Čeprav je vitamin C občutljiv na svetlobo in temperaturo ter relativno hitro razpade, se tudi v posušeni in na različne načine predelanih plodovih šipka ohrani relativno veliko vitamina C tudi čez zimo, torej se v tridesetih minutah količina ne bo bistveno spremenila (Klemenc, 2009).

HIPOTEZA 2: Vsebnost vitamina C je najvišja, če vodo s šipkom segrejemo do 80 °C. Če segrevamo do 100 °C ali če vremo nekaj minut, se vsebnost C vitamina manjša.

- Denaturacija vitamina C se začne že pri 30 °C. Negativen učinek toplote se poveča pri 60 °C in še bolj pri 80 °C, kar pomeni, da se z višanjem temperature povečuje tudi delež denaturacije. Torej bo pri daljši izpostavljenosti večji toploti količina vitamina C manjša (Igwemmar, Kolawole, & Imran, 2013).

HIPOTEZA 3: Vsebnost vitamina C je nižja, če čaj pripravimo v kovinski posodi.

- Kovine pospešujejo razpad vitamina C zaradi elektronskega oblaka značilnega za kovinsko vez. Ker je vitamin C antioksidant bo reagiral z elektroni in njegova vsebnost bo nižja (Hieng).

HIPOTEZA 4: Vsebnost fenolnih spojin v čaju je višja, če šipek najprej namakamo.

- Fenolne spojine so topne v vodi, vendar z molekulami vode tvorijo šibkejše vezi, kot molekule vode med sabo, torej ne dobimo takoj nasičene raztopine. Iz tega sledi, da vsebnost fenolnih spojin v vodi počasi narašča (Peršič, 2019).

HIPOTEZA 5: V kupljenem čaju je vsebnost fenolnih spojin višja kot v nabranem šipku, medtem ko je vsebnost vitamina C nižja.

- V zorečih plodovih se od septembra do novembra, v času ko se nabira plodove, vsebnost vitamina C in fenolov spreminja. Najprej narašča, nato začne upadati. Mi smo plodove nabrali novembra, takrat bi naj bilo v plodovih relativno veliko fenolov in vitamina C. V nalogi smo želeli primerjati sveži šipek s posušeni, vendar smo zaradi epidemioloških razmer morali čakati tri mesece (do februarja), zato sklepamo, da se je količina vitamina C in fenolov v nabranem šipku zaradi vpliva svetlobe, temperature in ostalih dejavnikov

občutno zmanjšala. Čaj pripravljen iz našega šipka smo primerjali s čajem iz kupljenega šipka, ki pa je bil posušen. Čeprav na embalaži proizvajalec ni navedel, kako so sušili šipek, navadno postopek traja 6 do 8 ur in v tem času so plodovi izpostavljeni visokim temperaturam (40 do 80 ° C ponekod tudi do 100 °C). Vitamin C se začne razgrajevati že pri 30 °C, zato sklepamo, da se je pri sušenju šipka izgubilo veliko vitamina C, medtem ko fenoli niso tako občutljivi na temperaturne spremembe pod 100 °C. Potem ko šipek posušimo, je rok trajanja izdelka približno dve leti, v tem času se njegova sestava spreminja minimalno, zato sklepamo, da se je ohranilo relativno veliko fenolnih spojin (Belitz & Grosch, 1999, str. 857 - 860).

4. PREGLED LITERATURE

4.1. Zdravilne rastline

Zdravilna rastlina je po definiciji slovenskega terminološkega slovarja rastlina, ki se uporablja za preprečevanje ali zdravljenje bolezni. Najstarejši ohranjeni zapisi o zdravilnih sredstvih se nanašajo predvsem na zdravilne rastline (Saupe, 2002).

Učinkovine v zdravilnih rastlinah so snovi, ki nastajajo med razvojem rastline in se potem shranjujejo v njenih različnih delih. Največkrat rastline vsebujejo več različnih zdravilnih snovi, ena od njih pa v precejšnji meri določa zdravilne lastnosti in možnosti njene uporabe (Pahlow, 1987).

Količina zdravilnih snovi v rastlinah je lahko zelo različna; odvisna je od rastišča, časa obiranja in nadaljnje obdelave nabranih rastlin (Pahlow, 1987).

Ena najpomembnejših in najbolj poznanih zdravilnih rastlin je šipek.

4.1.1. Fitoterapija

Fitoterapija je zdravljenje bolezni z rastlinami, njihovimi deli in pripravki na podlagi znanstvenih spoznanj. Zdravila za fitoterapijo imenujemo fitoterapevtiki. Mednje spadajo pripravki iz ene rastline ali kombinirani pripravki v obliki čajev, tinktur, kopeli, mazil, obkladkov ..., ne prištevamo pa čistih učinkovin, izoliranih iz rastlin ali njihovih sintetično pridelanih derivatov. Po navadi ljudje fitoterapevtike bolje prenašajo kot sintetično zdravila, zato jih pogosto uporabljajo pri kroničnih težavah in za lajšanje simptomov, medtem ko jih zelo redko uporabljajo pri zdravljenju težjih obolenj. Uporaba za zdravljenje je zaradi naraščanja kemijsko pridelanih snovi desetletja upadala, v zadnjem času pa se odnos do zdravilnih rastlin spreminja in je zdravljenje z njimi ponovno vse bolj priljubljeno (Schönfelder & Schönfelder, 2006).

Pri fitoterapiji imamo veliko opravka z drogami, ki pa niso povezane z mamili, temveč ta izraz označuje posušene dele rastlin, ki so izhodiščna surovina za izdelavo zdravilnih pripravkov.

Če želimo doseči zdravilni učinek čaja, moramo poznati pravilen način uporabe, ki pa je lahko za isto zdravilno rastlino pri različnih boleznih, različen. Vsak čaj ima glavno drogo (latinsko *remedium cardinae*), ki ji lahko dodamo tudi pomožne (latinsko *remedium adjuvans*) (Saupe, 2002).

4.1.2. Šipek

OSNOVNI PODATKI

Navadni šipek, lahko tudi divja roža, babji zob, bavec, vodenik, šipečje, zobatka ali latinsko *Rosa canina*, spada v družino rožnic (*Rosaceae*), kamor prištevamo več kot 100 vrst rastlin. Med najpogostejše domače divje vrste šipka, ki jih najdemo predvsem v zmernih in subtropskih predelih severne poloble, štejemo navadni, bodičast, njivni, hostni, žametni, rjasto rdeči, cimetov, francoski šipek ... (Schönfelder & Schönfelder, 2006).

Do tri metre visok bodičast grm raste ob gozdnih robovih, v grmovnatih krajih in na skalnatih območjih v Evropi do osrednje Azije. Olistan je s tri ali pet krat pernato deljenimi listi na lokastih visečih vejah z močnimi upognjenimi bodicami. Rastlina cveti od maja do julija z velikimi, dišečimi, rožnatimi do belimi cvetovi s premerom do pet centimetrov. Listi odpadejo še preden plodovi dozori. Čas zorenja plodov je od septembra do novembra in jih uporabljamo predvsem zaradi visoke vsebnosti vitamina C in ostalih antioksidantov. Zreli šipek je navidezni (birni) plod, rdeče barve, goli, jajčasto do okroglasto oblikovani, z dlačicami v notranjosti, ima aromatičen saden vonj in kiselkast, malce trpek okus. Sestavljen je iz omesenelega cvetišča in drobnih plodov, ki jih pogosto zamenjamo za semena (Schönfelder & Schönfelder, 2006).

ZDRAVILNOST IN UPORABA

Za zdravilne namene uporabljamo zrele, rdeče navidezne plodove navadnega šipka s »semeni« (plodovi) ali brez njih. Plodove nabiramo od septembra do novembra in jih uporabimo sveže, zmrznjene ali sušene. Če uporabljamo sušene, jih moramo pred sušenjem razrezati, nato pa jih posušimo čim hitreje. Shranjujemo jih dobro tesnečih posodah (Pahlow, 1987).

Zaradi številnih zdravilnih učinkovin, ki jih pripisujemo predvsem visoki vsebnosti vitamina C in tudi mineralnih snovi, sadne kisline, čreslovine, flavona, pektina, se šipek pogosto uporablja za pripravo marmelad, zdravilnih čajev, sokov, izvlečkov, vitaminskih pripravkov ali olj za nego telesa.

Pripravke uporabljamo za zdravljenje bolezni dihal, dvig odpornosti (pri boleznih z vročino, gripi, prehladu), pri težavah z mehurjem in ledvicami, pri uravnavanju delovanja nadledvične

žleze, pri preprečevanju težav zaradi pomanjkanja vitamina C, kot blago sredstvo za izločanje seča (kar čisti kri in preprečuje nastajanje ledvičnih kamnov, peska in odlaganje soli sečne kisline) in odvajalo (sadne kisline in pektin naj bi bili odgovorni za učinek, ki pa ni dovolj močan za uporabo v zdravljenju) (Oman, 2019).

Starejši ljudje naj bi šipkov čaj pili redno, saj so zaradi manj učinkovite prebave, ki njihovemu telesu ne omogoča tolikšnega vsrkavanja iz hrane, podvrženi večji možnosti pomanjkanja vitamina C, prav tako bi naj njegovo uživanje povečale nosečnice in doječe matere, da zvišajo količino vitamina C v mleku, saj je izredno pomemben za razvoj in zdravje dojenčka (Pahlow, 1987).

PRIPRAVA ČAJA

- Eno zvrhano čajno žličko posušenih plodov prelijemo z vrelo vodo in po 10 – 15 minutah odcedimo (Schönfelder & Schönfelder, 2006).
- Dve polni čajni žlički zdrobljenega čaja damo v $\frac{1}{4}$ litra vode, zavremo in kuhamo 10 minut. Vir navaja, da v tem čaju ostane količina vitamina C nespremenjena še več ur po pripravi, zato je zelo primeren za shranjevanje v termovkah (Pahlow, 1987).

KEMIČNA SESTAVA PLODOV

Kemična sestava plodov je različna in je odvisna od podnebja, onesnaženosti okolja, stopnje zrelosti, tipa prsti, količine temperature in svetlobe, načina obiranja in skladiščenja, zato so podatki v virih različni.

Po podatkih, dostopnih na spletni strani Gorenjskih lekarn, naj bi plodovi navadnega šipka vsebovali 25 % pektina, 30 % fruktoze, veliko mineralnih snovi, čreslovine, flavonoide (predvsem rutin), okoli 0,3 % vitamina C (askorbinske kisline), karotinoide in druge vitamine (Oman, 2019).

Vsekakor pa velja, da je šipek eden najbogatejših virov vitamina C, ki se v največji meri nahaja v mesnatem ovoju ploda. Tudi v posušeni in na različne načine predelanih plodovih se ohrani relativno veliko vitamina C, za katerega je sicer značilno, da hitro razpade. Največ vitamina je v zrelih plodovih, ki se še niso zmeččali in izgubili živo rdeče barve.

Žal je vsebnost vitamina C v pripravkih, ki so bili v Evropi pregledani, večinoma nižja od predpisanih za uporabo v medicinske namene. Redki čaji vsebujejo 0,3 % vitamina C, kot zahteva nemška farmakopeja, oziroma 0,2 % po zahtevah francoske (Klemenc, 2009).

4.2. Antioksidanti

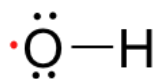
Prosti radikali so nestabilne in zelo reaktivne oblike spojin s samskimi elektroni. Nastanejo pri presnovi hrane in ob izpostavljenosti kajenju, sevanju, pesticidom ali organskim topilom ter so odgovorni za proces staranja, degenerativne bolezni, rak, ishemijo, kardiovaskularne bolezni, aterosklerozo, zmanjšan imunski odziv in številna druga obolenja (Potočnik, 2009).

Antioksidanti delujejo proti prostim radikalom (upočasniyo ali preprečujejo oksidacijo drugih molekul – preprečijo prenos elektronov iz ene snovi na drugo) in preprečujejo oziroma zmanjšujejo rast tumorjev. Vplivajo na srčno žilne bolezni in artritis (Wax, Zieve, MD, MHA, & Medical Director, 2019). Delovanje posameznega antioksidanta je torej odvisno od pravilnega delovanja ostalih komponent antioksidativnega sistema. Po reakciji s prostimi radikali se spremenijo v stabilnejše spojine in se iz telesa izločijo ali se celo obnovijo in ponovno delujejo proti prostim radikalom. Tako ima vitamin C ob redukciji vodikovega peroksida antioksidantno delovanje, hkrati pa lahko reducira tudi kovinske ione (Kuhar Glišić, 2015).

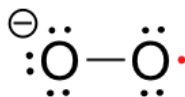
Antioksidante delimo glede izvora na endogene, ki jih tvori naš organizem, in eksogene, ki jih dobimo s hrano. Lahko jih delimo tudi na primarne, sekundarne in terciarne (Potočnik, 2009).

PRIMARNI ANTIOKSIDANTI

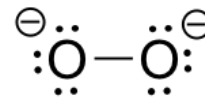
Primarni antioksidanti, nastajajo v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi. Preprečujejo tvorbo prostih radikalov, tako da jih spremenijo v bolj stabilne produkte – spojine, ki oddajo svoj vodilni elektron radikalom, ki bi lahko povzročil reakcijo avtooksidacije in s tem tvorbo hiperoksidov ali peroksidnih radikalov, ki lahko povzročijo poškodbo proteinov, peroksidacijo lipidov poškodbe DNA in posledično celično smrt (Poredoš, 2006).



Hiperoksidni radikal



Superoksidni ion



Peroksid

Slika 1: Prikaz hiperoksidnega, superoksidnega in peroksidnega radikala (Reusch, 2009).

Superoksid in hiperoksid uvrščamo med reaktivne kisikove zvrsti. Superoksidni anioni O_2^- so radikali in so zelo razširjeni v naravi, ker nastanejo z redukcijo kisika O_2 . Zaradi odvečnega elektrona je hiperoksid prosti radikal in je eden izmed glavnih povzročiteljev oksidativnega stresa, je precej toksičen. Naš imunski sistem ga proizvaja za obrambo pred mikroorganizmi (Hayyan, Hashim, & AlNashef, 2016). Primarni antioksidanti so encimi katalaza, superoksid dismutataza ter številne spojine iz skupin flavonoidov in fenolov (Klemenc, 2009).

SEKUNDARNI ANTIOKSIDANTI

Sekundarni antioksidanti ob prisotnosti drugih spojin izboljšajo učinkovitost primarnih antioksidantov, tako da nevtralizirajo novonastale proste radikale, reagirajo s kovinskimi ioni (katalizatorji oksidacije), odvzamejo kisik iz medija, razgrajujejo hiperokside do komponent, ki niso radikali, absorbirajo UV svetlobo, deaktivirajo aktivni kisik. Delimo jih na odjemalce kisika (prosti kisik odstranijo iz reakcije, tako da jih oksidirajo - to so askorbinska kislina, encim katalaza, flavonoidi, karatenoidi, sulfiti, polifenoli), odjemalce radikalov (preprečijo tvorbo hiperoksidov in tako preprečujejo verižne reakcije radikalov – to so flavonoidi, polifenoli, karoteni, tokoferoli), sinergiste (niso antioksidanti, vendar elektronski par v strukturi sinergista pospešuje tvorbo kelatov;¹ tvorbo stabilnih kompleksov s kovinskimi ioni - to so citronska kislina, lecitin, vinska kislina, polifosfati) (Potočnik, 2009).

TERCIARNI ANTIOKSIDANTI

Terciarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo škodo, ki jo povzročajo prosti radikali glede strukture celic (Potočnik, 2009).

¹ Kelati so koordinacijske spojine; anorganski kompleks

4.2.1. Delovanje antioksidantov

Antioksidanti preprečujejo verižno reakcijo oksidacije na dva načina. Lahko oddajo vodikov atom radikal, ki bi sicer tvoril peroksidni radikal, in tako nastane stabilnejša spojina, lahko pa onesposobi prosti radikal s prenosom elektrona. Učinkovitost antioksidanta je odvisna od redukcijskega potenciala in ostalih fizikalno kemijskih značilnosti (polarnost, kako se določen antioksidant absorbira v organizmu, jakost vezi z vodikom...) (Potočnik, 2009).

4.2.2. Pomen antioksidantov

Antioksidanti imajo pomembno vlogo v vseh živih bitjih; v rastlinah nastajajo kot sekundarni metaboliti in jo varujejo pred prostimi radikali, napadi virusov, bakterij in gliv. Ljudje jih večinoma zaužijemo s hrano rastlinskega izvora – eksogeni. Najdemo jih v sadju, zelenjavi, stročnicah, začimbah, oreških. Pomembno vlogo imajo tudi v samih živilih, saj jih varujejo pred oksidacijskim kvarjenjem. Organizem ščitijo pred poškodbami, ki jih povzročijo prosti radikal in vodijo v kronične in degenerativne bolezni, kot so rak in kardiovaskularne bolezni. Najpomembnejši naravni oksidanti so fenolne spojine, askorbinska kislina, citronska kislina, tokoferoli, flavonoidi, karatenoidi in drugi. Poznamo tudi sintetične, vendar je zaradi morebitne toksičnosti potrebna pazljivost pri uporabi (Potočnik, 2009).

4.2.3. Vitamin C

ZGODOVINA

Začetki raziskovanja o vitaminu C so povezani predvsem s skorbutom, boleznijo, ki je med mornarji in raziskovalci zaradi pomanjkanja hrane in njene enoličnosti, zahtevala veliko smrtnih žrtev. Že v 16. stoletju je Jack Cartier začel preučevati možnost zdravljenja skorbuta z limoninim sokom. V 18. stoletju je James Lind, angleški zdravnik, močno pripomogel k zmanjšanju umrljivosti zaradi skorbuta (Britannica, 2020). V začetku 20. stoletja sta Axel Holst in Theodor Frølich s poskusom na morskih prašičkih dokazala, da nekateri sesalci ne moremo sami tvoriti vitamina C (Grav, 2002). Prvi, ki je izoliral heksuronsko kislino (askorbinsko kislino), je bil madžarski biokemik Albert Szent-Györgyi. Dokazal je, da je identična vitaminu C, ki sta ga raziskovala Holst in Frølich. Leta 1937 je za odkritja v zvezi z vlogo vitamina C pri oksidaciji hranil v celicah prejel Nobelovo nagrado za fiziologijo ali medicino (Britannica, 2020). Danes vitamin C velja za enega izmed najbolj raziskanih in največkrat omenjenih vitaminov.

LASTNOSTI

Vitamin C oziroma L-askorbinska kislina je najmočnejši oksidant med vodotopnimi vitamini (Medič-Šarić, 2000), ki ni odporen na svetlobo, toploto in kisik, zato se vsebnost vitamina C v živilih s toplotno obdelavo (lahko tudi do 50 % prvotne vsebnosti), predvsem pa dolgoročnim shranjevanjem, izgublja. Njegova vsebnost se prav tako zmanjšuje z rezanjem, lupljenjem in podobno mehansko obdelavo, zaradi delovanja encimov (Pustišek, brez datuma). Na njegovo stabilnost vplivajo tudi embalažni materiali, izpostavljenost zraku, temperatura zraka in način shranjevanja (Kotnik, 2014). Za človeško telo je esencialen, saj ga zaradi pomanjkanja encima gulonolakton oksidaza ne more sama oblikovati, čeprav ga nekateri sesalci lahko. Najpogosteje ga v telesu najdemo kot askorbinsko kislino, predvsem v kislem okolju, kjer je najbolj stabilna, lahko pa tudi kot kalcijev askorbat z nevtralnimi pH-jem, zaradi česar odgovarja tudi osebam z občutljivim želodcem, prav tako se dlje časa zadrži v levkocitih, kar močno poveča vsebnost vitamina C v teh celicah, v primerjavi z askorbinsko kislino, kar je pomembno za naš imunski sistem (Mittmesser, Ye, Mal, & Maile, 2016) (Pustišek, brez datuma).

ZGRADBA

L-askorbinska kislina ali aldono-1,4 lakton heksuronska kislina skupaj z dehidroaskorbinsko kislino ali γ -lakton treo-2,3-heksadiluskonsko kislino predstavlja vitamin C, ker se v telesu reverzibilno pretvarja z redoks reakcijo. Oblika je odvisna predvsem od pH-ja okolja in izpostavljenosti oksidativnemu stresu, zato lahko na podlagi meritev deleža posamezne kisline ugotovimo izpostavljenost oksidativnemu stresu. L-askorbinska kislina ima delokalizirane atome na drugem in tretjem C-atomu (kjer je dvojna vez), ki stabilizirajo molekulo in povzročijo močno kislost hidroksilne skupine na tretjem C atomu. Zato je pri nevtralnem pH v obliki L-dehidroaskorbinske kisline (Poredoš, 2006). V tej obliki prehaja v celice stene tankega črevesa in se absorbira v kri. V eritrocitih se s pomočjo encima pretvori v askorbinsko kislino.

Denaturacija vitamina C se začne že pri 30 °C. Negativen učinek toplote se poveča pri 60 °C in še bolj pri 80 °C.

VLOGA VITAMINA C V TELESU

Ob običajnih vnosih se v tankem črevesu preko aktivnega transportnega sistema absorbira 70 do 90 odstotkov zaužitega vitamina C, z uživanjem večjih količin pa se ta odstotek bistveno zmanjša in se z urinom izloča iz telesa (NIJZ, brez datuma).

Vitamin C je dober antioksidant, kar pomeni, da pomaga preprečiti škodljive učinke oksidativnega stresa na DNA; pomaga preprečiti nastanek raka, srčno žilne bolezni, artritis z odvzemanjem prostih radikalov (tvorijo se pri presnovi hrane, izpostavljenosti tobačnemu dimu in sevanju). Pridobivanje naravnih vitaminov je vsekakor boljše kot s pomočjo prehranskih dopolnil.

Telesu pomaga tvoriti kolagen, ki pomaga obnavljati in ščititi mišice, kite, ligamente in ostala vezivna tkiva, ki so pomembna pri ohranjanju zdravih organov, kot so srce, jetra ter trebušna slinavka (Pustišek, brez datuma) (Wax, Zieve, MD, MHA, & Medical Director, 2019).

Vitamin C prav tako vzpodbuja celjenje ran, oblikuje protein, ki ima pomembno vlogo pri izgradnji kože, kit, ligamentov in krvnih žil, popravlja in ohranja hrustanec, kosti in zobe, pomaga pri absorpciji železa (Wax, Zieve, MD, MHA, & Medical Director, 2019).

Vitamin C ima pomembno vlogo tudi pri delovanju imunskega sistema (vendar ne preprečuje prehladov, lahko jih le skrajša), živčnega sistema, pri zmanjšanju utrujenosti in izčrpanosti. Ena njegovih glavnih vlog je zaščita imunskih celic pred imunskim stresom ob okužbi (Pustišek, brez datuma).

VIRI VITAMINA C

Naše telo ga ni sposobno tvoriti ali shranjevati, zato je pomembno, da prehrana vsakodnevno vsebuje veliko z vitaminom C bogatih živil. To so surova oziroma toplotno in mehansko neobdelana sadje in zelenjava, predvsem jagodičevje, citrusi in zelena zelenjava: črni ribez (117 mg/ 100 g), melona, limona, goji jagode, kivi, mango, rdeči ribez, papaja, jagode, maline, borovnice, kaki, brusnice, šipek, zelje, brstični ohrovt, brokoli, cvetača, rdeča paprika, špinača, zelje, paradižnik, grah, krompir (Inštitut za intricionistiko; Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2019).

PRIPOROČEN DNEVNI VNOS

Količino priporočenega dnevnega vnosa je s pestro in uravnoteženo prehrano preprosto doseči, zato jemanje dodatkov ni potrebno, saj številne raziskave kažejo na zmožnost pro-oxidativnega delovanja sintetičnih antioksidantov (Bobroff & Valentín-Oquendo, 2001) (Poljšak, Lampe, Ostan, & Rospor, 2007).

Preglednica 1: Priporočen dnevni vnos vitamin C po starostnih skupinah.

Starost [leta]	Ž [mg]	M [mg]
Otroci		
1-9	20 - 45	
10-14	65 - 85	
Mladostniki		
15-18	90	105
Odrasli		
19-65	95	110
Nosečnice	105	
Doječe matere	125	
Kadilci		155
Starejši		
> 65	95	110

(Referenčne vrednosti za energijski vnos ter vnos hranil, 2020)

Večjo potrebo po vitaminu C imajo kadilci, fizično zelo aktivne osebe, osebe izpostavljene duševnemu in umskemu stresu (ker se aktivnost adrenalina poveča in se poveča njegovo izločanje z urinom), osebe, ki prekomerno uživajo alkohol, osebe z visokim krvnim tlakom, nekateri bolniki (sladkorna bolezen, ledvične bolezni ...) (Mitmesser, Ye, Mal, & Maile, 2016).

POMANJKANJE IN PRESEŽEK VITAMINA C

Resnejše posledice prevelikega vnosa vitamina C so redke, ker ga naše telo ne shranjuje in se izloča z urinom ter blatom, vendar vrednosti večje od 2000 mg na dan niso priporočljive, saj lahko dražijo želodec in črevo, vodijo k slabosti, driski, trebušnim krčem in drugim prebavnim motnjam, ki so posledica osmotskega učinka neabsorbiranih količin vitamina C v telesu. Motena je tudi absorpcija bakra in povečana je možnost nastanka za ledvične kamne, ki so posledica presnove približno 1 % neabsorbirane askorbinske kisline v oksalat (do 40 mg/dan).

Pomanjkanje vitamina C, ki je v Evropi zelo redko, pa lahko ima za naše telo hujše posledice. Kot že omenjeno je ena najpogostejših bolezni pomanjkanja vitamina C skorbut, ki se pojavi po 45 do 80 dneh primanjkovanja vitamina. Bolezen se začne z otekanjem dlesni, izpadanjem zob. Pojavijo se tudi slabost, bolečine v nogah, kožni izpuščaji, psihološke motnje in bolezen lahko kmalu vodi v smrt (Poredoš, 2006). Pri dojenčkih pa je najpogostejša Moeller-Barlowa bolezen. Pomanjkanje lahko vodi tudi v nastanek številnih drugih obolenj in simptomov, kot so anemija, krvavenje dlesni, močno poslabšanje imunskega sistema, daljše obdobje celjenja ran, suhi lasje z razcepljenimi konjicami, krvavitve iz nosu, povečanje teže (zaradi slabšega metabolizma), suha, razpokana koža, bolečine v sklepih, slaba zobna sklenina ... (Wax, Zieve, MD, MHA, & Medical Director, 2019).

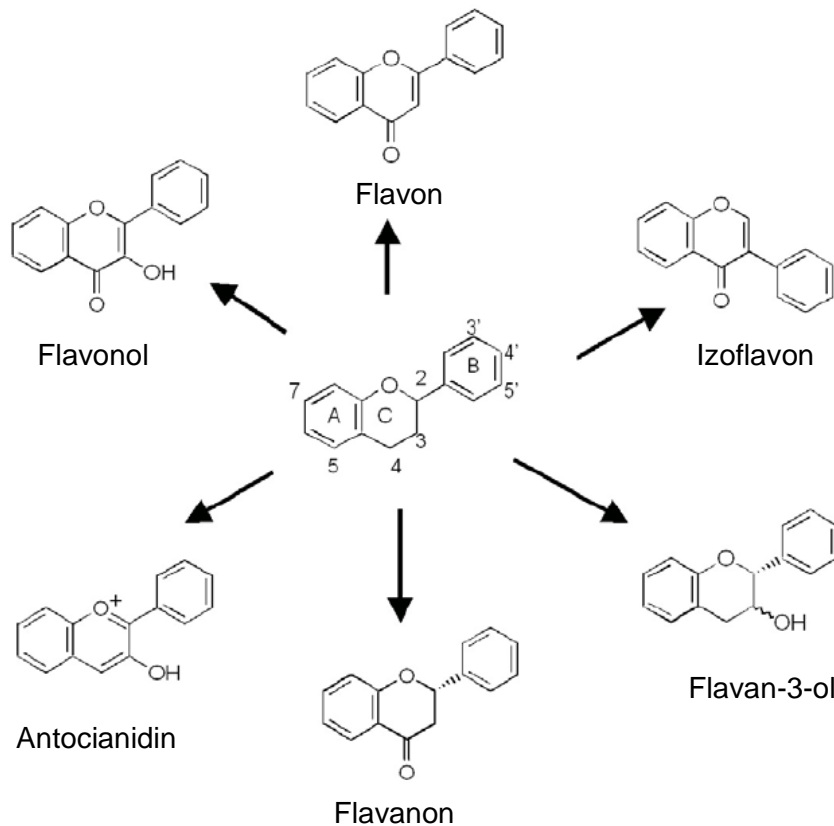
4.2.4. Fenolne spojine

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, prisotni v vseh rastlinah v vakuolah ali kloroplastih in nastanejo iz fenilalanina ali šikimske kislinske. Imajo aromatski obroč z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Njihov položaj vpliva na antioksidativne lastnosti spojine. Ostale molekule ščitijo pred oksidacijo, so antipatogene, sodelujejo pri pigmentaciji, varujejo rastlino pri poškodbah rastlinskega tkiva, vplivajo na vonj, okus in hranilno vrednost rastlin. V nižjih koncentracijah ščitijo živila pred kvarjenjem, višje koncentracije polifenolov pa lahko vplivajo na spremembo barve živil ali znižujejo njihovo hranilno vrednost živil, kadar reagirajo s proteini, ogljikovimi hidrati ali minerali (Klemenc, 2009).

FLAVONOIDI

Flavonoidi so spojine s 15 C-atomi in osnovno strukturo (C₆-C₃-C₆). So velika in zelo razširjena podskupina derivatov pirana, vodotopni, ločijo se po stopnji oksidacije obroča. V rastlinah

najpogostejši so antocini, katehini, procianidi, flavoni, flavonoli; to so rdeči, beli in rumeni pigmenti. Zaradi absorpcije UV svetlobe delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki (Klemenc, 2009). Pogosto nastopajo v glikozidnih oblikah. Vsebujejo barvilni del (aglikon s flavansko strukturo) in ogljikov hidrat, najpogosteje monosaharid ali disaharid. To jim topnost v vodi še poveča (Vrtačnik, Zmazek, & Boh, 2014, str. 318).



Slika 2: Strukture flavonoidov (Nishiumi, Miyamoto, & Kawabata, 2011).

ANTOCIANIDI

Antocianidini so vodotopne spojine in so najobsežnejša skupina flavonoidov. Nahajajo se v različnih vrstah sadja, zelenjavi in zelišč ter jim dajejo modro, rdečo in vijolično barvo. Struktura antocianidov in s tem tudi barva se spreminja s pH (pri pH manjšem od ena so rdeči, med štiri in pet so brezbarvni, šest in sedem vijolični, sedem in osem temno modri, sedem in osem rumeni) (Belitz & Grosch, 1999, str. 769). V naravi so vezani na sladkorje in tvorijo glikozide antocianine. Glikozilacija jim izboljša stabilnost in topnost. Na sladkorni del antocianinov se večkrat vežejo tudi fenolne in sadne kisline (Vrtačnik, Zmazek, & Boh, 2014, str. 318).

FLAVANONI

Flavanoni se po navadi pojavljajo kot glikozidi v citrusih. Njihova kislost je odvisna položaja funkcionalnih skupin. Nekateri nevtralni in kisli glikozidi flavanonov se lahko z odprtjem obroča spremenijo v sladke spojine, ki jih lahko stabiliziramo s hidrogeniranjem (Belitz & Grosch, 1999, str. 774).

FLAVONI

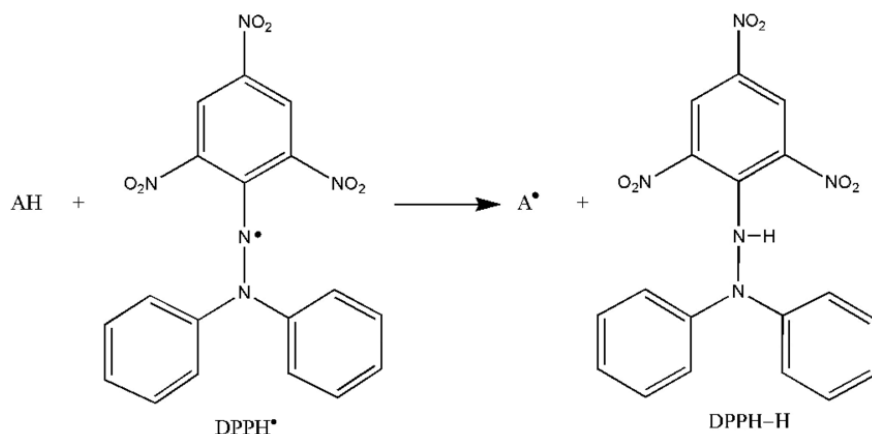
V organizmih se nahajajo v obliki aglikonov in glikozidov. Značilna je dvojna vez med 2. in 3. mestom v C obroču. Čeprav so brezbarvni, se pogosto nahajajo v cvetovih.

4.3. Metoda dela

4.3.1. Metoda z radikalom DPPH

Metodo s prostim radikalom DPPH• ali difenilpikrilhidrazilom, ki jo je prvič predstavil Marsden Blois na Univerzi Stanford leta 1958, uvrščamo med najstarejše indirektno metode za določanje antioksidativne lastnosti in je še zmeraj pogosto uporabljena. Molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila je stabilen prosti radikal zaradi delokaliziranih prostih elektronov v molekuli kot celoti, tako da ne tvori dimerov, kot bi se to zgodilo v primeru ostalih radikalov. Zaradi delokalizacije je radikal močno vijoličen. V metanolni raztopini ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 515 nm. Ko je raztopina DPPH pomešana s snovjo, ki lahko donira vodikov atom, se DPPH reducira v difenilpikrilhidrazina (DPPH₂) in vijolična barva izgine ter se spremeni v svetlo rumeno zaradi prisotnosti pikrilne kisline. S spektrofotometrom merimo spremembo barve pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma in tako spremljamo spremembo koncentracije DPPH, ki je posledica reakcije med DPPH in antioksidantom.

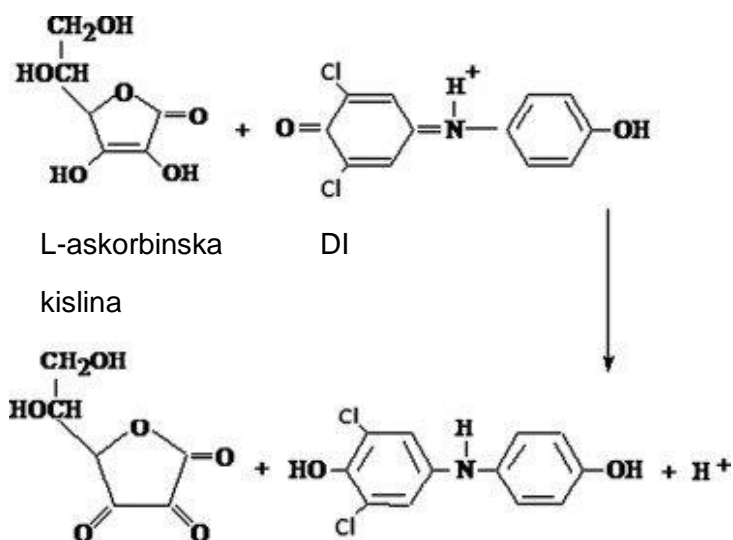
Prosti radikal (A•) bo nato podvržen nadaljnjim reakcijam, ki nadzorujejo število molekul DPPH, ki jih bo reduciral en reductent. Zgornja reakcija je namenjena za zagotavljanje povezave z reakcijami v oksidacijskem sistemu, kot so avtooksidacija lipidov ali drugih nenasičenih snovi. Molekula DPPH predstavlja prosti radikal v sistemu, katerega aktivnost zavira snov AH.



Slika 3: Redukcija DPPH radikala (levo) v DPPH₂ (desno). Donorska molekula je označena z AH in prosti radikal z A• (Güder, 2016).

4.3.2. Titracija z reagentom DI (2,6-diklorofenol-indofenol)

2,6-diklorofenolindofenol (DI) je kemična spojina, ki se uporablja kot redoks barvilo. Oksidiran je močno modre barve, zato ga v raztopine dodajamo v zelo majhnih količinah. Uporablja se lahko za merjenje hitrosti fotosinteze in kot indikator vitamina C. V redukciji z askorbinsko kislino postane brezbarven, zato titracijo izvajamo do trenutka, ko se spojina obarva roza. Obstojnost roza barve je nekaj več kot 15 sekund (Khorassani, Maghsoodlou, Ebrahimi, & Shahraki, 2011).



Slika 4: Reakcija 2,6-diklorofenol-indofenola z askorbinsko kislino (Khorassani, Ebrahimi, Maghsoodlou, & Shahraki, 2011).

Skupni fenoli vključujejo preproste fenole in fenolne kisline (derivate benzojske, flavonoide, hidrolizirane in kondenzirane tanine, lignane in lignine ...). Čeprav kvantitativno določanje

polifenolov ovira njihova strukturna zapletenost in raznolikosti, obstaja več metod za določanje polifenolov v rastlinskih izvlečkih. Pogosto se uporabljajo kolorimetrični testi, pri katerih je pomembna uporaba referenčne snovi, saj tako metoda meri celotno koncentracijo fenolnih hidroksilnih skupin v rastlinskem ekstraktu. Polifenoli v rastlinskih izvlečkih reagirajo z redoks reagentom (reagent Folin-Ciocalteu) tako, da tvorijo modri kompleks, ki ga je mogoče količinsko opredeliti s spektrofotometrijo vidne svetlobe. Reakcija tvori moder kompleks, katerega absorpcijski maksimum je odvisen od koncentracije fenolnih spojin. Reagent se hitro razgradi v alkalnih raztopinah, zato ga je potrebno uporabljati v presežku, da dobimo popolno reakcijo. Ta presežek lahko povzroči oborine in visoko motnost, kar oteži nemoteno spektrofotometrično analizo, zato k reakciji dodamo natrijev karbonat. Pomembno je tudi, da Folin-Ciocalteu reagent hranimo na hladnem, da ne pride do razgradnje še pred pričetkom reakcije (Blainski, Lopes, & Palazzo de Mello, 2013).

5. PRAKTIČNI DEL

5.1. Načrt

Poskuse smo opravili v šolskem laboratoriju, saj smo imeli na voljo vse potrebne pripomočke, pribor in kemikalije. Ker smo uporabljali nevarne kemikalije, smo se zaščitili s haljo, zaščitnimi rokavicami in očali. Po končanem delu smo okolju nevarne odpadke odlili v posode namenjene nevarnim odpadkom, ki jih nato pristojne službe ustrezno odstranijo.

Osnova za raziskovalno delo, so bile zgoraj omenjene titracija z reagentom DI za ugotavljanje vitamina C, spektrofotometrična metoda z radikalom DPPH za določanje antioksidativnosti in spektrofotometrična metoda z reagentom Folin-Ciocalteu, natrijevim karbonatom ter galno kislino za določanje skupnih fenolov. Pri spektrofotometričnih reakcijah smo dobili podatke kvantitativno, saj smo kiveto z vzorcem vstavili v spektrofotometer, ki je na računalniškem zaslonu izpisal vrednost absorbance, zato ni prišlo do tako velikih napak, medtem ko smo pri titraciji kvalitativno določali, kdaj se je raztopina obarvala do odtenka, ki smo ga določili, zato je prišlo do večjih napak. Zaradi subjektivnosti rezultatov titracije smo vsak vzorec trikrat titrirali. Želeli smo ugotoviti tudi, ali se prve pol ure po pripravi čaja količina vitamina C spreminja, zato smo titracije izvedli 10, 18 in 26 minut, potem ko smo vzorce odstavili z gorilnika.

5.2. Metoda dela

5.2.1. Priprava koncentriranega šipka

Šipku smo odstranili črne kapice, saj se v njih nahaja največ motečih drobnih dlačic. Nato smo ga strli s pestilom v terilnici in odtehtali 5,0 g, dodali 50 mL vode, dobro premešali in precedili. Dobili smo 42 mL raztopine.



Slika 5: Šipkovi plodovi v terilnici (osebni arhiv).

5.2.2. Priprava vzorcev (čajev)



Slika 6: Plodovi nabranega šipka (levo), kupljen šipek (desno) (osebni arhiv).

5.2.2.1. Vzorci z nabranim šipkom

Za vsak vzorec smo natehtali 10,0 g nabranega šipka, ki smo mu predhodno odstranili črne kapice, ter prelili z 250 mL vode.

- Vzorec A: Vzorec smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja, nato smo čaj odstavili z gorilnika.

- Vzorec B: Vzorec smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja ter pustili vreti 5 minut, nato smo čaj odstavili z gorilnika.
- Vzorec C: Vzorec smo najprej 10 min namakali v hladni vodi, nato segreli do zavretja in odstavili z gorilnika.
- Vzorec D: Vzorec smo najprej 10 min namakali v hladni vodi, nato segreli do 80 °C in odstavili z gorilnika.

Vzorci A, B, C in D smo pripravljali v steklenih čašah.



Slika 7: Segrevanje vzorca z gorilnikom (levo) in vzorec potem ko smo ga precedili (desno) (osebni arhiv).

- Vzorec F: Vzorec smo pripravili na enak način kot vzorec D (10 min namakali v hladni vodi, nato segreli do 80° C in odstavili z gorilnika), le da smo namesto steklene čaše uporabili železno posodo.

5.2.2.2. Vzorec s kupljenim šipkom

Natehtali smo 10,0 g kupljenega čaja in ga prelili z 250 mL vode.

- Vzorec E: Vzorec smo pripravljali na enak način kot vzorec D (10 min namakali v hladni vodi, nato segreli do 80° C in odstavili z gorilnika). Pripravljali smo ga v stekleni čaši.

5.2.3. Titracija

Titracijo smo izvedli po navodilih učnega gradiva, ki je nastalo v okviru projekta Munus 2 (Leskovšek & Lidija, 2010).

5.2.3.1. Priprava raztopine 2-6 diklorofenol-indofenola (DI)

400 mg DI smo raztopili v 16 mL vrele destilirane vode, prelili v 1 L merilno bučko in do oznake napolnili v destilirano vodo. Bučko smo ovili v aluminijasto folijo.

5.2.3.2. Standardizacija DI raztopine

Raztopino, ki vsebuje 0,24 mg askorbinske kisline v 1,0 mL smo pripravili tako, da smo 0,120 g askorbinske kisline raztopili v 500 mL destilirane vode v merilni bučki. 5,0 mL te raztopine (1,2 mg askorbinske kisline) smo odpipetirali v erlenmajerico, dodali 150 mL destilirane vode, 5,0 mL 10 % očetne kisline in titrirali z DI raztopino.

Pri titraciji smo porabili 6,3 mL raztopine DI.

Preglednica 2: Volumen porabljene raztopine DI pri titracijah.

	1. meritev	2. meritev	3. meritev
$V_{(DI)}$ [mL]	6,2	6,3	6,3

Iz tega smo izračunali sorazmernostni faktor DI (2,6 diklorofenol-indofenola) potreben za izračun mase vitamina C v čaju:

$$f_{DI} = \frac{5,0 \text{ ml}}{V_{(DI)}} = \frac{5,0 \text{ ml}}{6,3 \text{ ml}} = 0,79$$

5.2.3.3. Izvedba titracije

Vsak vzorec smo, potem ko smo ga odstavili z gorilnika, pustili 10 minut, nato smo ga precedili in izmerili temperaturo. V tri erlenmajerice s po 150 mL destilirane vode in 5,0 mL 10 % očetne kisline smo odpipetirali 5,0 mL vzorca in titrirali z reagentom DI do obstojne svetlo roza barve.



Slika 8: Titracija vzorca do svetlo roza obarvanja (osebni arhiv).

Postopek smo ponovili še dvakrat; 18 minut in 26 minut, za tem ko smo čaj odstavili z gorilnika.

5.2.4. Določevanje vsebnosti fenolov s spektrofotometrično metodo

Titracijo smo izvedli po navodilih diplomske naloge (Kogelnik, 2018).

Absorbanco nastalega barvnega kompleksa smo merili pri valovni dolžini 763,7 nm. Kot standard smo uporabili galno kislino.

5.2.4.1. Priprava reagentov

- Reagent A: v bučko smo odpipetirali 10 mL Folin-Ciocalteu reagenta in dodali 100 mL destilirane vode.
- Reagent B: v bučko smo dodali 7,5 g Na_2CO_3 in dodali 100 mL destilirane vode.
- Reagent C: v 25 mililitrsko bučko smo dodali 10 mg galne kisline in do oznake napolnili z destilirano vodo.

5.2.4.2. Priprava umeritvene krivulje

- Pripravili smo šest 25 mililitrskih bučk z različnimi koncentracijami galne kisline.
- Izračunali smo koncentracije galne kisline v bučkah (1-6);

Množinska koncentracija galne kisline v reagentu C:

$$c_c = \frac{m_{(\text{galna kislina})}}{M_{(\text{galna kislina})} \times V_{(\text{raztopina})}} = \frac{10 \text{ g mol}}{170,12 \text{ g} \times 0,025 \text{ L}} = 2,351 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Množinska koncentracija galne kisline v bučki 1:

$$c_1 = \frac{c_c \times V_{(\text{reagent c})}}{0,025 \text{ mL}} = \frac{2,351 \text{ mol} \times 0,25 \text{ mL}}{\text{L } 25 \text{ mL}} = 0,02351 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

S to enačbo smo izračunali množinske koncentracije galne kisline tudi v ostalih bučkah.

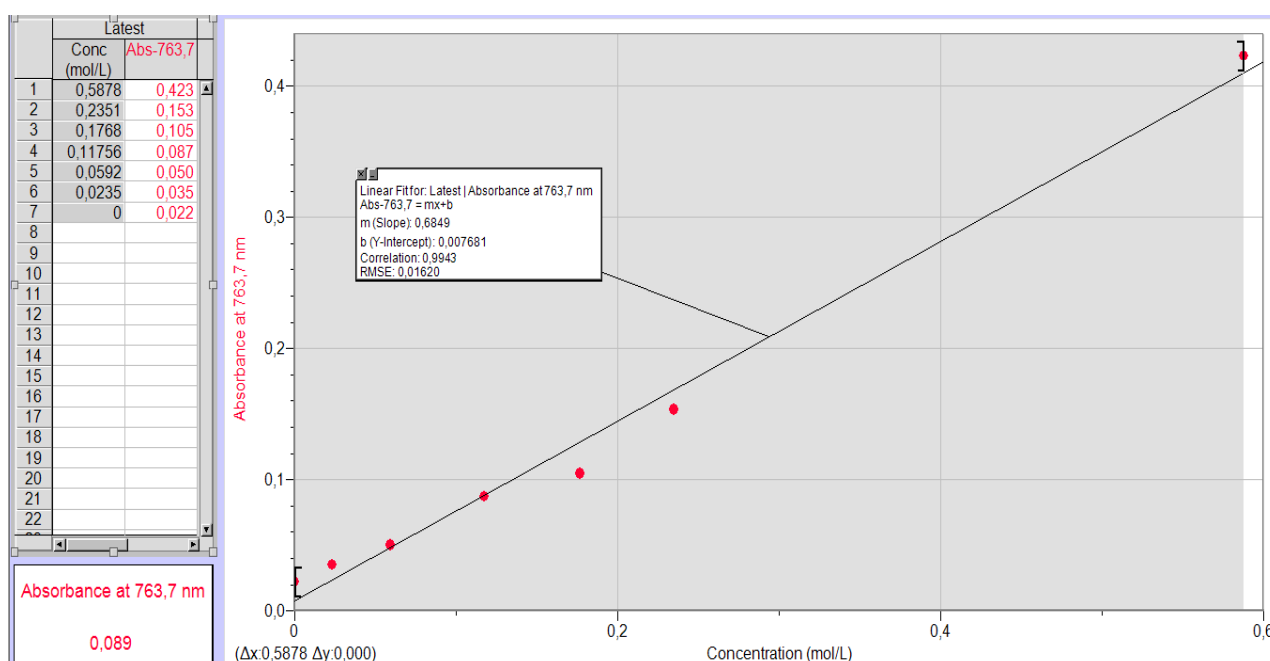
Preglednica 3: Volumen reagenta C in množinska koncentracija galne kisline v bučkah 1 – 7.

Oznaka bučke	Volumen reagenta C [mL]	Množinska koncentracija galne kisline [mol/l]
Bučka 1	0,25	0,024
Bučka 2	0,63	0,059
Bučka 3	1,25	0,118
Bučka 4	1,88	0,177
Bučka 5	2,50	0,235
Bučka 6	6,25	0,588
Bučka 7	0,00	0,000



Slika 9: Bučke od 1 do 6 ter reagenta A in B (osebni arhiv).

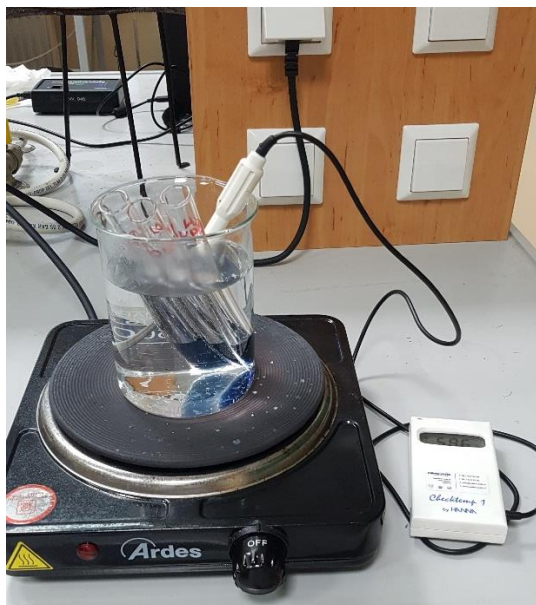
- 5,0 mL raztopine galne kisline v bučkah 1 – 6 smo odpipetirali v šest epruvet (vsako raztopino v svojo epruveto). V sedmo epruveto smo namesto galne kisline dodali 5,0 mL destilirane vode.
- V vsako epruveto smo dodali 2,5 mL reagenta A in 2,0 mL reagenta B, jih dobro premešali in za 10 minut postavili v vodno kopel s temperaturo 60 °C.
- Za tem smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco raztopin pri valovni dolžini 763,7 nm.
- Na podlagi izmerjenih absorbanc smo narisali diagram.



Slika 30: Absorbanca v odvisnosti od koncentracije galne kisline.

5.2.4.3. Določanje skupnih fenolov v vzorcih

- Test za določanje skupnih fenolov v vzorcih smo opravili na enak način kot z raztopinami galne kisline v bučkah 1-6, le da smo tokrat odpipetirali 0,5 mL raztopine vzorca in mu dodali 2,5 mL reagenta A ter 2,0 mL reagenta B. Vzorce smo premešali in postavili v vodno kopel pri 60 °C za 10 minut.



Slika 41: Segrevanje raztopin vzorcev (osebni arhiv).

- Vzorce smo nalili v kivete in izmerili absorbance pri valovni dolžini 763,7 nm, vendar smo pri tem morali biti pozorni, da vrednosti niso preveč presegle vrednosti umeritvene krivulje, zato smo vzorce A, C, D in F razredčili v razmerju 1: 10 (1 mL vzorca in 10 mL destilirane vode), vzorce B, E in M pa v razmerju 1: 40 (1,0 mL vzorca in 40 mL destilirane vode).
- Za umerjanje spektrofotometra smo uporabili destilirano vodo.



Slika 52: Raztopina vzorca v kivetu (levo) in spektrofotometer (desno) (osebni arhiv).

5.2.5. Določanje antioksidativnosti z radikalsko metodo

5.2.5.1. Priprava raztopine DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

- V 100 mL bučko smo natehtali 2,36 mg DPPH in do oznake razredčili z metanolom.

5.2.5.2. Priprava vzorcev

- V kivete smo odpipetirali 1,5 mL vzorcev A, B, C, D, E, F in M. V vsako kiveto smo dodali 1,5 mL DPPH, jih zavili v aluminijasto folijo in termostatirali pri sobni temperaturi 15 minut.
- Slep vzorec smo pripravili z 1,5 mL metanola in 1,5 mL DPPH.
- Spekofotometer smo kalibrirali s 3,0 mL metanola.
- Nato smo izmerili abosrbance pripravljenih vzorcev pri valovni dolžini 515 nm.

6. REZULTATI MERITEV

6.1. Titracija

Maso vitamina C v čaju v mg na 1 L čaja izračunamo z enačbo:

$$\frac{m_{(\text{vitamin } C)}[\text{mg}]}{1L_{(\text{čaja})}} = \frac{V_{(DI)} \cdot f_{(DI)} \cdot 0,24}{5,0 \text{ ml}_{(\text{čaja})}} \cdot 1000$$

Izračun mase vitamina C v mg na 1 L čaja v vzorcu A po desetih minutah. Po dvotretjinskem pravilu smo izločili vrednost, ki je najbolj izstopala in za izračun vzeli aritmetično sredino preostalih dveh vrednosti količine porabljene raztopine DI.

$$V_1 = 0,8 \text{ mL}$$

$$V_2 = 1,0 \text{ mL}$$

$$V_3 = 0,8 \text{ mL}$$

$$V_{(DI)} = 0,8 \text{ mL}$$

$$\begin{aligned} \frac{m_{(\text{vitamin } C)}[\text{mg}]}{1L_{(\text{čaja})}} &= \frac{(0,8 \pm 0,0) \cdot (0,8 \pm 0,0) \cdot 0,24}{5,0(1 \pm 0,02) \text{ mL}_{(\text{čaja})}} \cdot 1000 \\ &= \frac{0,8 \left(1 \pm \frac{0,0}{0,8}\right) \cdot 0,8 \left(1 \pm \frac{0,0}{0,8}\right) \cdot 0,24}{5,0(1 \pm 0,02) \text{ mL}_{(\text{čaja})}} \cdot 1000 = 30,72 (1 \pm 0,02) \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\ &= (30,72 \pm 0,61) \frac{\text{mg}}{\text{L}} \end{aligned}$$

S primerjavo masne koncentracije vitamina C v koncentriranem šipku z masno koncentracijo vitamina C v vzorcih smo izračunali, kolikšen delež vitamina C se je raztopil in ohranil v čajih (vzorcih).

Izračun za vzorec A ²po 10 minutah:

$$\begin{aligned} w &= \frac{\text{masna koncentracija vitamina } C \text{ v vzorcu}}{\text{masna koncentracija vitamina } C \text{ v koncentriranem šipku}} = \frac{30,7 \pm 0,6}{130,6 \pm 60,2} \\ &= \frac{30,7(1 \pm 0,0195)}{130,6(1 \pm 0,4609)} = 0,235(1 \pm 0,4804) = 23,5 \% \pm 0,113 \end{aligned}$$

Rezultati ostalih meritev so prikazani v preglednici 4.

² Vzorec A smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja. Nato smo čaj odstavili z gorilnika.

Preglednica 4: Volumen porabljene raztopine DI med titracijo, temperatura vzorcev in izračunana količina vitamina C v vzorcih A – F.

	Čas po odstitvi z gorilnika	V (raztopine DI) [mL]			V – povprečno [mL]	Temp. [°C]	Masna koncentracija (vitamin C) [mg/L]	Odstotek vitamina C, ki se je iz plodov prenesel v čaj ³
		3,3	4,9	2,1				
Koncentriran šipek ⁴	/	3,3	4,9	2,1	3,4 ± 1,5	/	130,6 ± 60,2	/
Vzorec A	10 min	0,8	1,0	0,8	0,8 ± 0,0	73,2	30,7 ± 0,6	23,5 ± 11,3
	18 min	0,9	1,0	1,0	1,0 ± 0,0	58,0	38,4 ± 0,8	
	26 min	0,8	0,7	0,9	0,8 ± 0,1	51,8	30,7 ± 4,5	
Vzorec B	10 min	0,9	0,9	0,9	0,9 ± 0,0	70,5	34,6 ± 0,7	23,5 ± 14,3
	18 min	0,7	0,8	0,9	0,8 ± 0,1	55,1	30,7 ± 4,5	
	26 min	0,7	0,8	0,9	0,8 ± 0,1	48,7	30,7 ± 4,5	
Vzorec C	10 min	0,6	0,6	0,7	0,6 ± 0,0	71,4	23,0 ± 0,5	20,6 ± 11,4
	18 min	0,7	0,6	0,9	0,7 ± 0,05	62,9	26,9 ± 2,5	
	26 min	0,8	0,7	0,6	0,7 ± 0,1	51,5	26,9 ± 4,4	
Vzorec D	10 min	1,0	1,0	1,1	1,0 ± 0,0	62,6	38,4 ± 0,8	29,4 ± 14,2
	18 min	0,9	1,0	1,0	1,0 ± 0,0	54,3	38,4 ± 0,8	
	26 min	0,8	1,2	0,8	0,8 ± 0,0	47,8	30,7 ± 0,6	
Vzorec E	10 min	1,3	1,4	1,4	1,4 ± 0,0	68,0	53,8 ± 1,1	/
	18 min	1,2	1,2	1,4	1,2 ± 0,0	52,7	46,1 ± 0,9	
	26 min	1,1	1,2	1,3	1,2 ± 0,1	47,3	46,1 ± 4,9	
Vzorec F	10 min	0,7	0,8	0,9	0,8 ± 0,1	60,1	30,7 ± 4,5	23,5 ± 14,3
	18 min	0,8	0,7	0,9	0,8 ± 0,1	47,5	30,7 ± 4,5	
	26 min	0,9	0,7	0,8	0,8 ± 0,1	44,0	30,7 ± 4,5	

³ Za računanje odstotka vitamina C, ki se je ohranil, smo odstranili odstopajočo vrednost in za izračun vzeli povprečje preostalih dveh vrednosti masne koncentracije vitamina C v vzorcih.

⁴ Pri vzorcih, pri katerih so bila odstopanja velik ali sta bili pozitivna in negativna napaka, smo vzeli vse tri vrednosti in za napako navedli največjo razliko vrednosti meritve od povprečja.

Iz masne koncentracije vitamina C v raztopini koncentriranega šipka lahko izračunamo povprečno maso vitamina C na 100 g plodov, kot se to običajno navaja na živilih:

$$\begin{aligned} \frac{m_{(\text{vitamin } C)}}{100 \text{ g}} &= \frac{\text{masna koncentracija vitamina } C \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \cdot V_{(\text{koncentrirani šipek})} \cdot 100}{1000} \\ &= \frac{(130,6 \pm 60,2) \text{ mg}}{1000} \cdot \frac{(42,0 \pm 0,1) \text{ mL} \cdot 100}{(5,00 \pm 0,01) \text{ g}} \\ &= \frac{130,6(1 \pm 0,4609) \text{ mg}}{1000} \cdot \frac{42,1(1 \pm 0,002) \text{ mL} \cdot 100}{5,00(1 \pm 0,002) \text{ g}} \\ &= 109,7 (1 \pm 0,464) \frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} = (109,7 \pm 51,0) \frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \end{aligned}$$

Iz mase šipka na 100 g plodov lahko izračunamo še njegov delež:

$$w_{(\text{vitamin } C)} = \frac{m_{(\text{vitamin } C)}}{m_{(\text{raztopina})}} = \frac{0,1097 \text{ g}}{100,1097 \text{ g}} = 1,10 \%$$

6.2. Določanje skupnih fenolov

Na podlagi umeritvene krivulje (slika 5) smo dobili enačbo za izračun absorbanca pri valovni dolžini 763,7 nm:

$$\text{absorbanca}_{(\text{pri } 763,7 \text{ nm})} = 0,6849 \cdot c + 0,007681$$

Izračun koncentracije:

$$c \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{\text{absorbanca} - 0,007681}{0,6849}$$

Izračun koncentracije (c_2) fenolov raztopine vzorca A:

$$c_2 = \frac{\text{absorbanca } 2 - 0,007681}{0,6849} = \frac{0,400 - 0,007681}{0,6849} = 0,573 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Absorbanca 2 je absorbanca raztopine 1,0 mL vzorca in 10 mL destilirane vode.

Izračun koncentracije fenolov v čaju:

$$c_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{V_1} = \frac{c_2 \cdot 11 \text{ mL}}{1,0 \text{ mL}} = 6,301 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

V vzorcih, v katerih je bila absorbanca več kot 1,00, kar je že veliko odstopanje od vrednosti umeritvene krivulje, smo vzorce bolj razredčili, in sicer 1,0 mL čaja smo dodali 40 mL

destilirane vode in ponovno izmerili absorbanco (3). V tem primeru smo koncentracijo fenolov izračunali tako, da smo za V_2 vstavili 41 mL:

$$c_1 = \frac{c_3 \cdot V_2}{V_1} = \frac{c_3 \cdot 41 \text{ mL}}{1,0 \text{ mL}}$$

Izračun koncentracije fenolov za vzorec B:

$$c_1 = \frac{c_3 \cdot V_2}{V_1} = \frac{0,923 \cdot 41 \text{ mL}}{1,0 \text{ mL}} = 37,433 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

S primerjavo molske koncentracije skupnih fenolov v koncentriranem šipku z molsko koncentracijo fenolov v vzorcih smo izračunali, kolikšen delež fenolov se je raztopil in ohranil v čajih (vzorcih).

Izračun za vzorec A:

$$w = \frac{\text{molska koncentracija fenolov v vzorcu}}{\text{molska koncentracija fenolov v koncentriranem šipku}} = \frac{6,301}{60,002} \\ = 10,5 \%$$

Rezultati ostalih meritev so podani v spodnji preglednici.

Preglednica 5: Izmerjena absorbanca in izračunana koncentracija fenolov v vzorcih A - F.

	Absorbanca 2 (pri valovni dolžini 763,7 nm)	Absorbanca 3 (pri valovni dolžini 763,7 nm)	Koncentracija $c_2 \left[\frac{mol}{L}\right]$	Koncentracija $c_3 \left[\frac{mol}{L}\right]$	Koncentracija $c_1 \left[\frac{mol}{L}\right]$	Odstotek fenolov, ki so se iz plodov prenesli v čaj
Koncentriran šipek	2,5	1,00	/	1,46	60,002	/
Vzorec A	0,400	/	0,573	/	6,301	10,5
Vzorec B	1,094	0,633	/	0,913	34,433	57,3
Vzorec C	0,473	/	0,679	/	7,473	12,5
Vzorec D	0,225	/	0,317	/	3,490	6,3
Vzorec E	0,416	/	0,596	/	24,443	/
Vzorec F	0,171	/	0,238	/	2,623	4,4

6.3. Določanje antioksidativnosti z radikalom DPPH

S pomočjo izmerjene absorbance slepega vzorca (A_0), ki znaša 0,634, in izmerjene absorbance vzorcev lahko izračunamo odstotek inhibicije, pri čemer vzorec, ki dosega 50 % inhibicijo štejejo kot dober antioksidant.

Izračun inhibicije:

$$inhibicija [\%] = \frac{A_0 - A_v}{A_0}$$

Izračun inhibicije za vzorec A:

$$inhibicija = \frac{0,634 - 0,054}{0,634} = 91,5 \%$$

Rezultati ostalih meritev so podani v spodnji preglednici.

Preglednica 6: Izmerjena absorbanca in izračunana inhibicija v vzorcih A - E.

	Absorbanca ((pri valovni dolžini 515 nm)	Inhibicija [%]
Koncentriran šipek	0,801	-27,8
Vzorec A	0,054	91,5
Vzorec B	0,107	83,1
Vzorec C	0,109	82,8
Vzorec D	0,076	88,0
Vzorec E	0,166	73,8

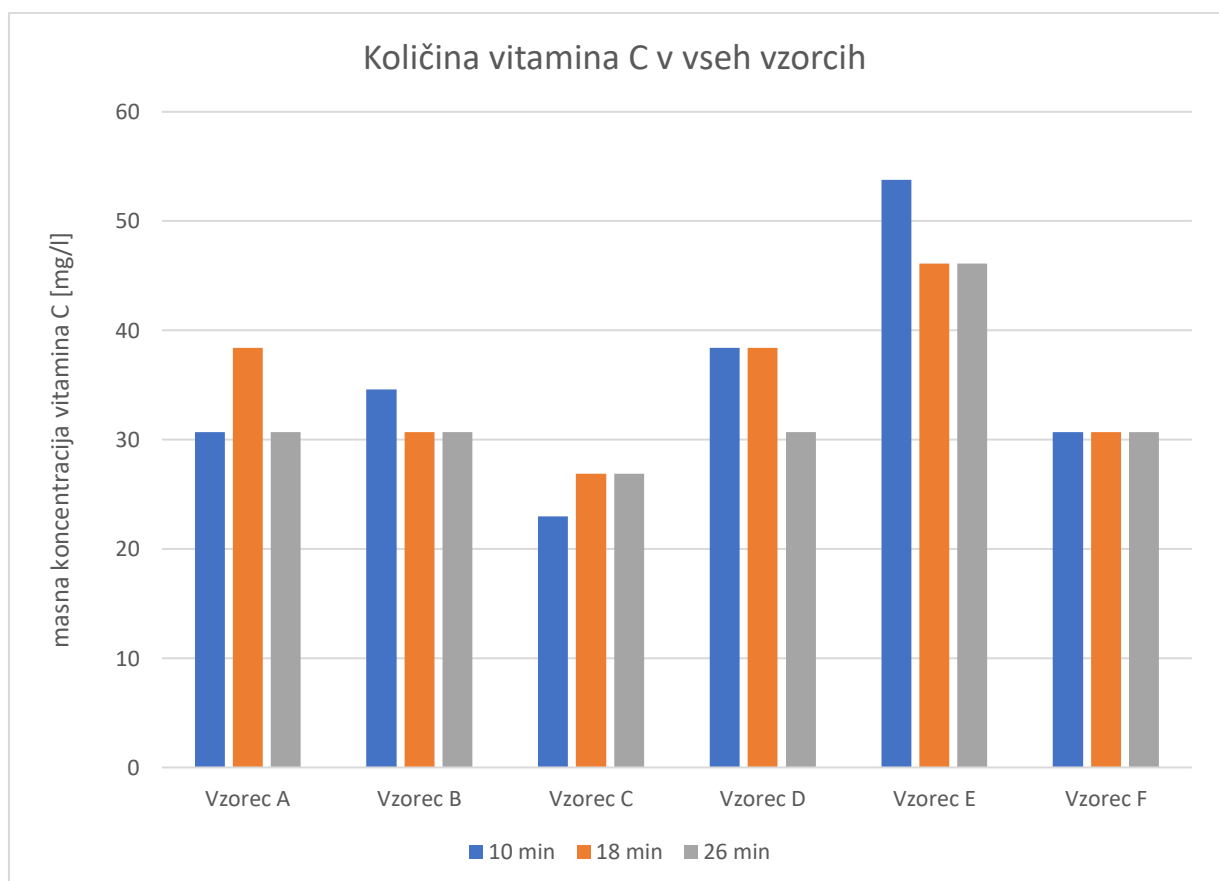
7. RAZPRAVA

7.1. Titracija

Izračunali smo, da je v nabranih plodovih $(109,7 \pm 51,0) \frac{mg}{100g}$ vitamina C, kar predstavlja približno 1,10 %. Napaka meritev je velika, skoraj 50 %, saj je relativno težko določiti, kdaj raztopina preseže barvno mejo, ki smo jo določili, še posebej v raztopini koncentriranega šipka, ki je bila sama po sebi že kar močno obarvana. Dobljeni podatki se skladajo s podatki zapisanimi v literaturi, ki navajajo, da je odstotek vitamina C v plodovih med 0,11 in 2,71 %. (Vlaicu, Turcu, & Paneite, 2020).

Pri ostalih meritvah je bila napaka manjša, do največ 16,3 %, ker se bile raztopine vzorcev pred titriranjem skoraj popolnoma prozorne in je bilo lažje primerjati barve. Zaradi boljše preglednosti smo vrednosti v diagramih prikazovali brez napak.

Diagram 1: Količina vitamina C v vseh vzorcih.



S pomočjo diagrama 1 lahko primerjamo koncentracijo vitamina C v vseh vzorcih; vzorec A smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja. Nato smo čaj odstavili z gorilnika.

Tudi vzorec B smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja ter pustili vreti 5 minut, vzorca C in D smo najprej 10 minut namakali pri sobni temperaturi in nato segreli; vzorec C do zavretja (100 °C) ter vzorec D do 80 °C. Vzorca E in F smo pripravili na enak način kot vzorec D, le da smo v vzorcu E namesto nabranega šipka uporabili kupljenega, vzorec F pa smo kuhali v kovinski posodi.

Iz diagrama je razvidno, da na povezavo med količino vitamina C in časom po katerem smo titrirali ne moremo sklepati, čeprav zadnja titracija (po 26 minutah) nikoli nima največje vrednosti.

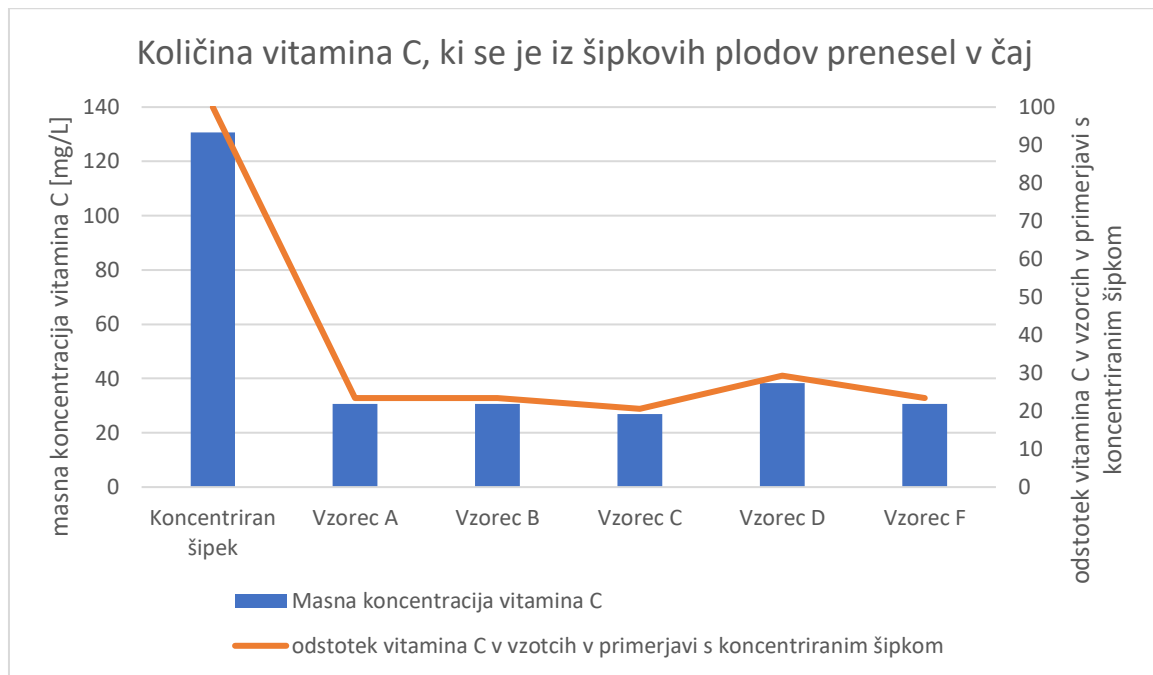
HIPOTEZA 1: Po odstavitvi čaja z gorilnika se vsebnost vitamina C prvih 30 minut ne spreminja.

Čeprav so vse tri vrednosti enake samo pri vzorcu F, sta pri vseh ostalih vzorcih dve vrednosti enaki, ena vrednost pa odstopa, vendar je odstopanje pri povprečni porabi raztopine DI pri titriranju samo 0,1 mL, kar je premajhna razlika, v primerjavi z natančnostjo naših rezultatov, da bi lahko sklepali, da se prve pol ure koncentracija vitamina C spreminja. Pri različnih vzorcih odstopa vrednost po različnih časih. Pri vzorcih B, C in E odstopa prva vrednost, pri vzorcih B in E je za 0,1 mL porabljenega DI večja, pri vzorcu C pa za 0,1 mL manjša. Pri vzorcu B ima najvišjo vrednost vitamina C titracija po 18 minutah (38,4 mg/l), pri vzorcu D pa ima titracija po 26 minutah najmanjšo porabo raztopine DI (0,8 mL). Kljub majhnemu odstopanju vrednosti opazimo, da koncentracija vitamina C ni nikoli bila največja po 26 minutah (kvečjemu je enaka ali manjša). Iz tega lahko sklepamo, da se ob izpostavljenosti svetlobi in visoki temperaturi (ki se sicer zmanjšuje, ker se čaj hladi, vendar je ves čas nad 30 °C, pri kateri temperaturi vitamin C začne razpadati) količina vitamina C, čeprav minimalno, po odstavitvi z gorilnika še vedno zmanjšuje, a da bi to lahko trdili, bi morali meritve še večkrat ponoviti.

Problem se je pojavil tudi, ker smo zaradi subjektivnosti pri določanju odtenka roza barve vse titracije pri vseh časih ponovili trikrat. Za tri titracije smo v povprečju porabili pet minut, kar pomeni, da nismo isti vzorec trikrat titrirali točno po 10 minutah, ampak po 10 – 15 minutah. Enako velja za titracije po 18 oziroma 26 minutah.

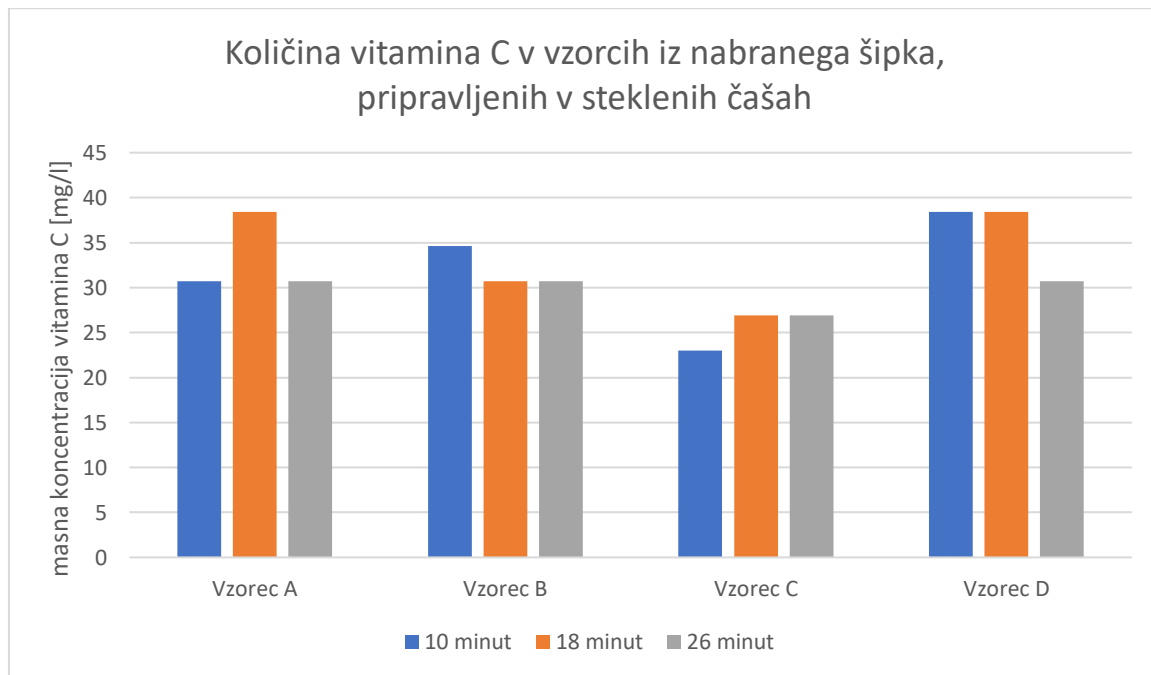
- Hipotezo 1 lahko **delno potrdimo**.

Diagram 2: Količina vitamina C, ki se je iz šipkovih plodov prenesel v čaj.



Iz zgornjega diagrama vidimo, da se je v vodi raztopilo in ohranilo med 20 in 30 % vitamina C, kar pomeni, da ga je kar 70 % ostalo v plodovih ali razpadlo pri segrevanju. Če primerjamo vzorca A in C, ki smo ju segrevali do enake temperature (100 °C), vendar smo vzorec C predtem 10 minut namakali, ugotovimo, da glede na naše meritve predhodno namakanje ni imelo velikega vpliva na količino, ker je topnost pri sobni temperaturi relativno nizka. Če primerjamo vzorec D z ostalimi vzorci pa ugotovimo, da je veliko vitamina C razpadlo zaradi segrevanja nad 80 °C, torej naši izračuni kažejo, da je bila pri količini vitamina C temperatura bistvenega pomena (Klemenc, 2009).

Diagram 3: Količina vitamina C v vzorcih iz nabranega šipka, pripravljenih v steklenih čašah



S pomočjo diagrama 3 lahko primerjamo prve štiri vzorce, ki smo jih pripravili v steklenih čašah; vzorec A smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja. Nato smo čaj odstavili z gorilnika, tudi vzorec B smo takoj po pripravi dali na gorilnik in segreli do zavretja ter pustili vreti 5 minut, vzorca C in D smo najprej 10 minut namakali v hladni vodi in nato segreli; vzorec C do zavretja (100 °C) ter vzorec D do 80 °C. Med vzorcema A in B v koncentraciji vitamina C ni velike razlike, čeprav je povprečje vseh treh vrednosti vzorca A prikazanih v diagramu (33,3 mg/l) višje od povprečja vzorca B (32,0 mg/l), iz česar bi lahko sklepali, da se je, medtem ko je čaj vrel 5 minut, denaturiralo še nekaj vitamina C, vendar je razlika pri dobljenih podatkih premajhna, da bi to lahko potrdili. Večje razlike so, če vzorca A in B primerjamo z vzorcema C in D, ki smo ju predhodno namakali. Vzorec C ima izmed vseh štirih vzorcev najmanjšo koncentracijo vitamina C. Vzorec D ima nasprotno največjo koncentracijo vitamina C, ker vitamin C najbolj razpade pri 60 °C, drugi večji preskok pa je pri 80 °C (Igwemmar, Kolawole, & Imran, 2013). Ker smo vzorec D segreli do temperature 80 °C in ga takoj zatem začeli ohlajati, je bila denaturacija manjša. Da se je zaradi 10 minutnega predhodnega namakanja več vitamina C iz šipka raztopilo v vodi, pa iz dobljenih podatkov ne moramo sklepati, ker je koncentracija vitamina C v vzorcu C, ki smo ga segrevali do enake temperature kot vzorec A, nižja kot v vzorcu A. Iz tega lahko sklepamo, da je vitamin C pri sobni temperaturi slabše topen. S segrevanjem se njegova topnost povečuje, vendar se ga tudi več

denaturira, tako da njegova koncentracija z naraščanjem temperature nekaj časa narašča, nato pa začne upadati.

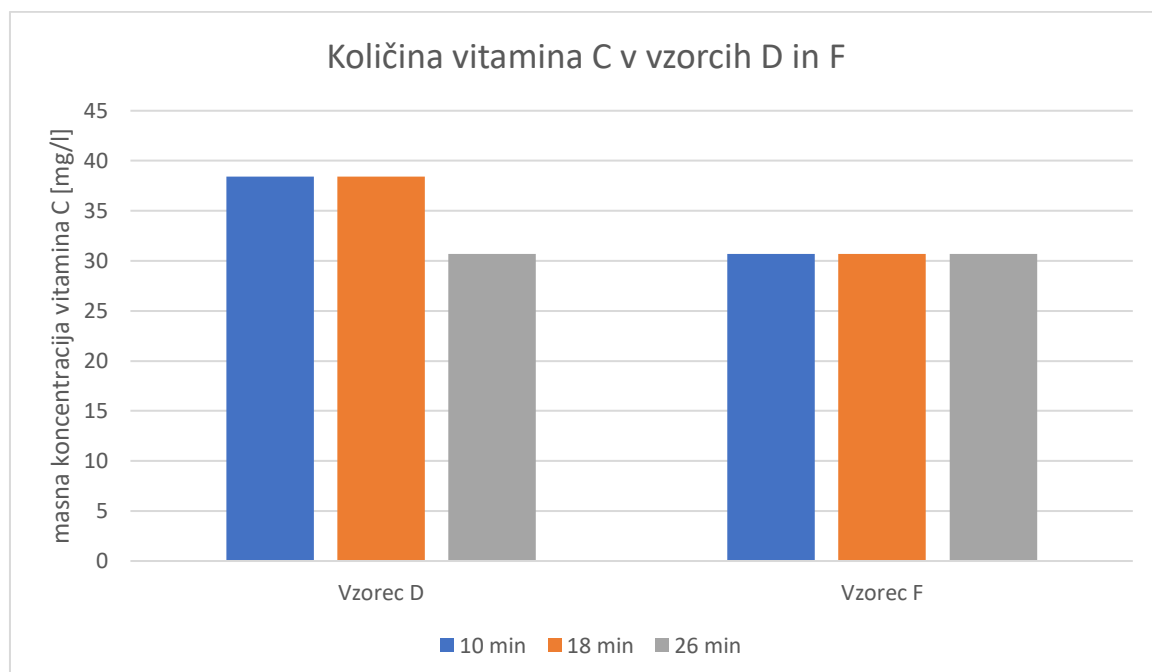
HIPOTEZA 2: Vsebnost vitamina C je najvišja, če vodo s šipkom segrejemo do 80 °C. Če segrevamo do 100 °C ali če vremo nekaj minut, se vsebnost C vitamina manjša.

V drugi hipotezi smo sklepali, da bo koncentracija vitamina C največja v vzorcu D, nato v vzorcu A in najmanjša v vzorcu B.

Prvi del hipoteze lahko z dobljenimi podatki potrdimo, ker je vsebnost vitamina C v vzorcu D ($\overline{35,8}$ mg/L) za 2,5 mg/L višja od vsebnosti vitamina C v vzorcu A $\overline{33,3}$ mg/L. Da je koncentracija vitamina C v vzorcu A večja od koncentracije v vzorcu B pa ne moremo trditi, čeprav dobimo pri izračunu razlike povprečne vrednosti pri vzorcu A za 1,3 mg/L večjo številko. Če bi z dvotretjinskim pravilom najbolj odstopajoče vrednosti izbrisali, bi bili koncentraciji enaki. Iz tega lahko sklepamo, da se največ vitamina C uniči pri segrevanju od 80 °C do 100 °C, medtem ko se ga v petih minutah pri 100 °C denaturira manj (Bobroff & Valentín-Oquendo, 2001).

- Hipotezo 2 lahko **delno potrdimo**.

Diagram 4: Količina vitamina C v vzorcih D in F.



S pomočjo diagrama 4 lahko primerjamo vzorca D in F, pri pripravi katerih smo uporabili nabran šipek in čaj po 10 minutnem namakanju segrevali do 80 °C. Razlika je le v materialu, iz katerega je posoda, v kateri smo pripravljali čaj, narejena. Vzorec D smo kuhali v stekleni, vzorec F pa v kovinski posodi.

HIPOTEZA 3: Vsebnost vitamina C je nižja, če čaj pripravimo v kovinski posodi.

Iz diagrama je razvidno, da je pri vseh treh časih koncentracija vitamina C v vzorcu F manjša (Po 10 in 18 minutah je manjša za 7,7 mg/L) ali enaka kot v vzorcu D. Iz dobljenih podatkov lahko potrdimo, da kovinska posoda vpliva na količino vitamina C, zaradi vpliva elektronov kovinske veti, ki pospešijo razpad C-vitamina.

- Hipotezo 3 lahko **potrdimo**.

Iz preglednice 5 vidimo, da se tudi temperatura ni pri vseh vzorcih enakomerno spreminjala (pri vzorcu A se je od prvega do zadnjega merjenja spremenila za 21,8 °C, medtem ko se je pri vzorcu F zmanjšala za zgolj 16 °C), kar je samoumevno, ker vzorcev nismo segrevali do iste temperature in ker smo uporabili različne materiale posod. Prav tako sta imela vzorca D in E, ki smo ju pripravljali na enak način, v posodah iz istega materiala, po desetih minutah različni temperaturi – vzorec D 62,6 °C in vzorec E 68°C, ker nismo uporabili toplotno izoliranih posod in je toplota nenadzorovano uhajala v okolico.

S pomočjo izmerjenih masnih koncentracij vitamina C smo izračunali njegov delež v čaju in to vrednost primerjali z vrednostmi predpisanimi v uporabo za medicinske namene. Za izračun smo vzeli vzorec D z največjo koncentracijo vitamina C (38,4 mg/l).

Če predpostavimo, da ima en liter pripravljenega čaja maso 1 kg, lahko izračunamo masni delež vitamina C:

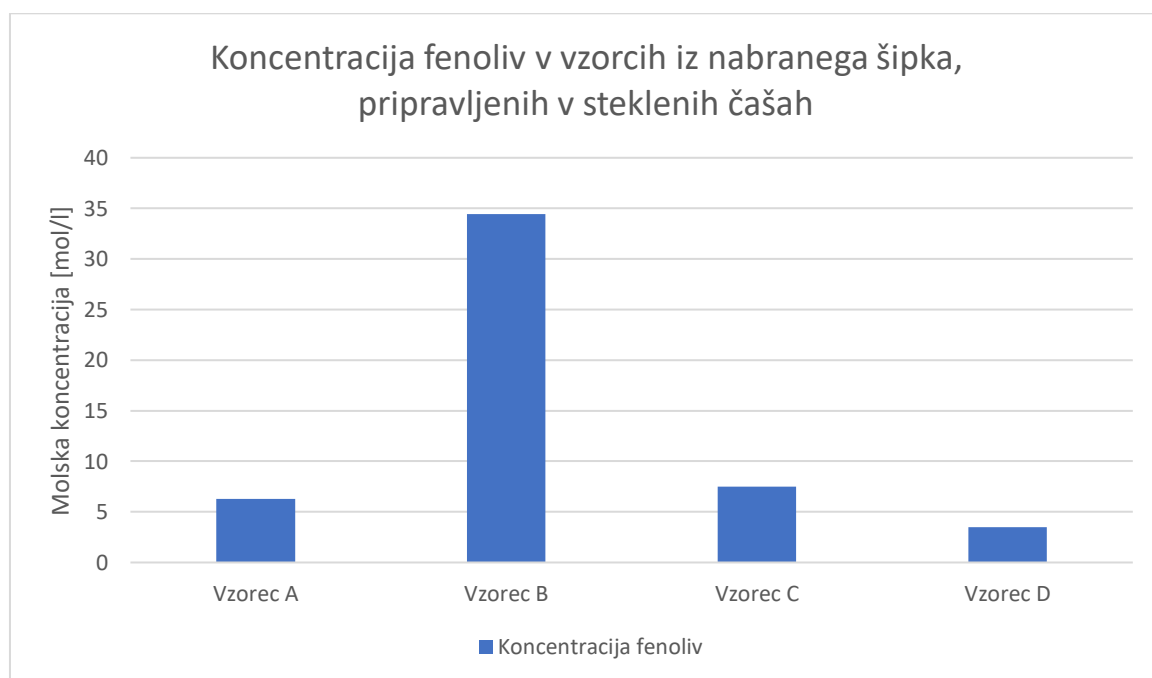
$$w_{(\text{vitamin C})} = \frac{\text{masa vitamina C}}{\text{masa čaja}} = \frac{38,4 \text{ mg}}{1\,000\,000 \text{ mg}} = 0,0000384 = 0,00385 \%$$

Izračunana vrednost je mnogo manjša od predpisane za uporabo v medicinske namene, ki po predpisih nemške farmakopeje znaša 0,3 % vitamina C, oziroma 0,2 % po zahtevah francoske (Klemenc, 2009).

Z uporabo svežih šipkovih plodov, večje mase le teh v čaju in dodatkom limone ali ostalih virov vitamina C, bi bil njegov delež višji, vendar najverjetneje ne bi bilo tako enostavno doseči vrednosti predpisane v medicinske namene, saj bi potrebovali skoraj 100 krat večji delež.

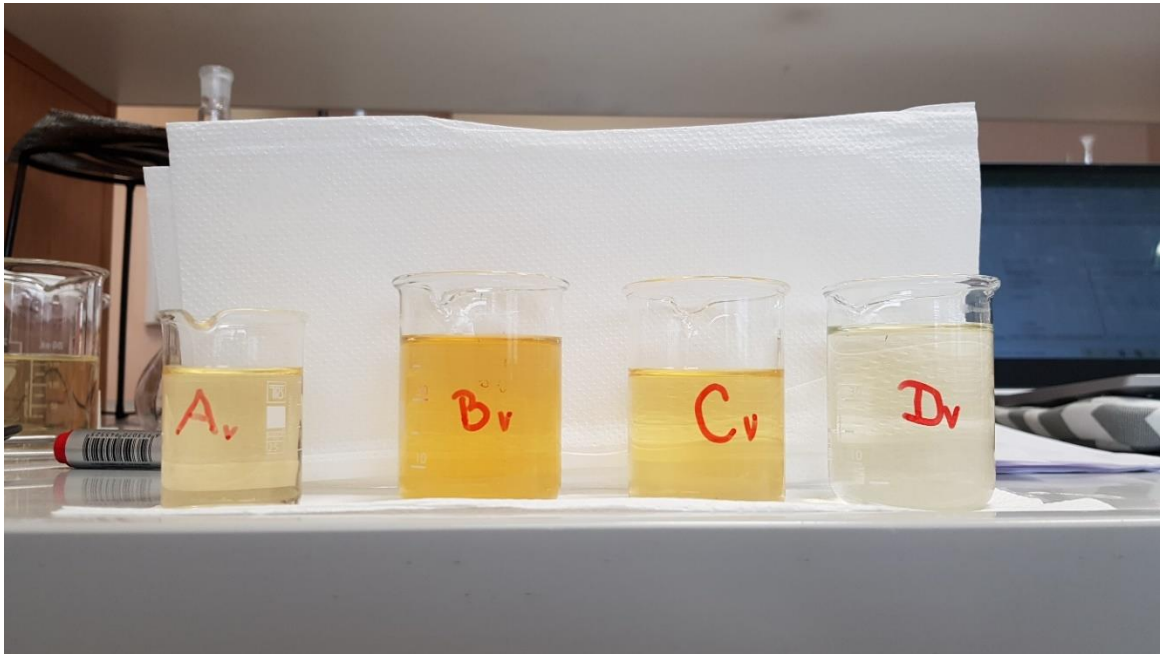
7.2. Določanje skupnih fenolov

Diagram 5: Koncentracija fenolov v vzorcih iz nabranega šipka, pripravljenih v steklenih čašah.



Iz podatkov v diagramu je dobro vidno, da je bilo največ fenolov v vzorcu B (34,433 mol/l), ki smo ga 5 minut pustili vreti. Ko primerjamo vzorca A in C, ki smo ju segreli do zavretja (100 °C), ugotovimo, da je v vzorcu C, ki smo ga predhodno namakali, več fenolnih spojin kot v vzorcu A. V vzorcu D pa je, kljub temu da smo ga predhodno 10 minut namakali, najmanj fenolnih spojin (2,623 mol/l), ker smo ga segrevali samo do 80 °C. Iz tega lahko sklepamo, da se fenolne spojine pri temperaturi do 100 °C še zelo stabilne, kar je skladno s številnimi raziskavami. Nekateri fenoli začnejo razpadati šele pri 120 °C, če so tej temperaturi izpostavljeni več kot 90 minut ali 150 °C za 30 minut (Xu, Ye, Chen, & Liu, 2007). Večja kot je bila temperatura, več fenolnih spojin iz šipka se je raztopilo v vodi, ker s temperaturo narašča

topnost, posledično je bila tudi molska koncentracija višja. Ker se fenolne spojine v vodi počasi raztapljajo, je bila njihova koncentracija v vzorcu C višja kot v vzorcu A, ker so imeli za raztapljanje 10 minut več (Memnune, Hilal, & Arzu, 2014).



Slika 13: Vzorci A, B, C in D v steklenih čašah (osebni arhiv).

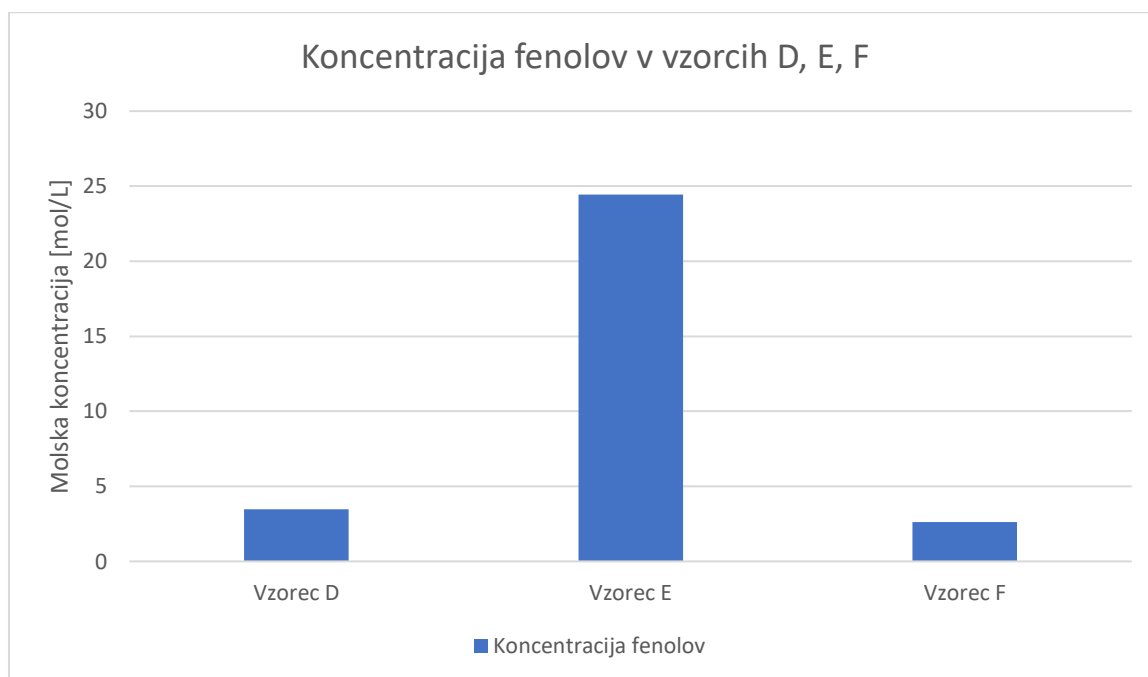
Rezultate bi lahko predvideli tudi iz barve vzorcev, ker so fenolne spojine barvila, ki jih je v šipku največ, (Vrtačnik, Zmazek, & Boh, 2014, str. 318) torej je intenziteta obarvanosti čajev sorazmerna z njihovo koncentracijo (vzorec B je najintenzivneje rumen, medtem ko je vzorec D skoraj prozoren. Iz slike je razvidno tudi, da je vzorec C močnejše obarvan kot vzorec A).

HIPOTEZA 4: Vsebnost fenolnih spojin v čaju je višja, če šipek najprej namakamo.

Če primerjamo vzorca A, ki ima koncentracijo fenolov $6,301 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, in vzorec C s koncentracijo $7,473 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$, ki smo ju segrevali do enake temperature, ugotovimo, da je v vzorcu C, ki smo ga predhodno namakali za $1,172 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ več fenolnih spojin. Razlika ni velika, ker s temperaturo topnost narašča, mi pa smo namakali pri sobni temperaturi, medtem ko smo ju segrevali enako dolgo, vendar se je tudi pri sobni temperaturi že nekaj fenolnih spojin raztopilo (Peršič, 2019).

- Hipotezo 4 lahko **potrdimo**.

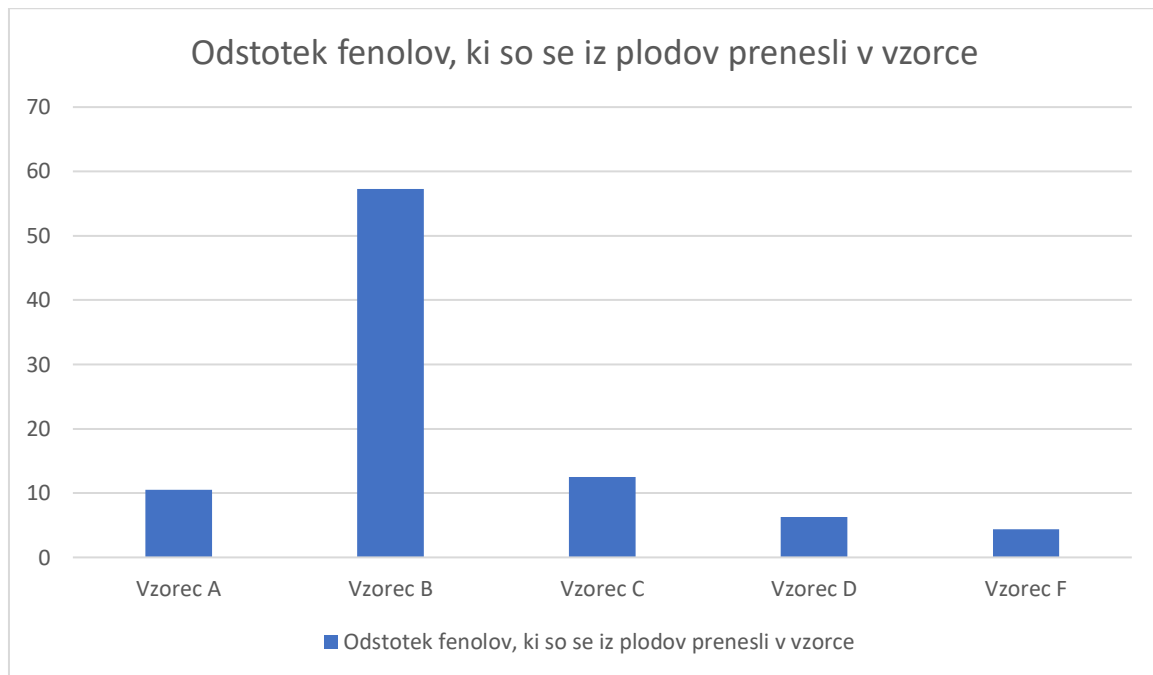
Diagram 6: Koncentracija fenolov v vzorcih D, E, F.



Kot kaže diagram je bila koncentracija fenolnih spojin v vzorcu E pripravljenem iz kupljenega čaja za $20,953 \frac{mol}{l}$ višja kot v vzorcu D iz nabranega šipka, čeprav smo oba najprej deset minut namakali in nato segreli do $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kar lahko pojasnimo s pomočjo diplomskega dela Sandre Potočnik, ki je raziskovala vpliv zorenja na vsebnost antioksidantov v plodovih šipka. Ugotovila je, da se je koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka od konca septembra do novembra v povprečju zviševala, nato pa je začela padati. Čeprav smo šipek nabrali novembra, ko bi naj bila vsebnost fenolov v njegovih plodovih najvišja, smo poskuse zaradi razmer opravili šele konec februarja in v tem času je, kot kažejo rezultati poskusov, vsebnost fenolov v nabranih plodovih močno upadla.

Presenetila pa nas je primerjava vsebnosti fenolnih skupine med vzorcema D in F, ker nismo pričakovali razlike, a je koncentracija v vzorcu F za $0,873$ manjša kot v vzorcu D. Čeprav so fenoli močni oksidanti, bi morali meritve večkrat ponoviti, da bi lahko sklepali na povezavo med materialom iz katerega je posoda narejena in količino fenolnih spojin. Razlika skupnih fenolov v obeh vzorcih je premajhna, da bi lahko z gotovostjo potrdili vpliv, prav tako nismo nikjer v prebrani literaturi zasledili podatkov o morebitni odvisnosti.

Diagram 7: Odstotek fenolov, ki so se iz plodov prenesli v vzorce.



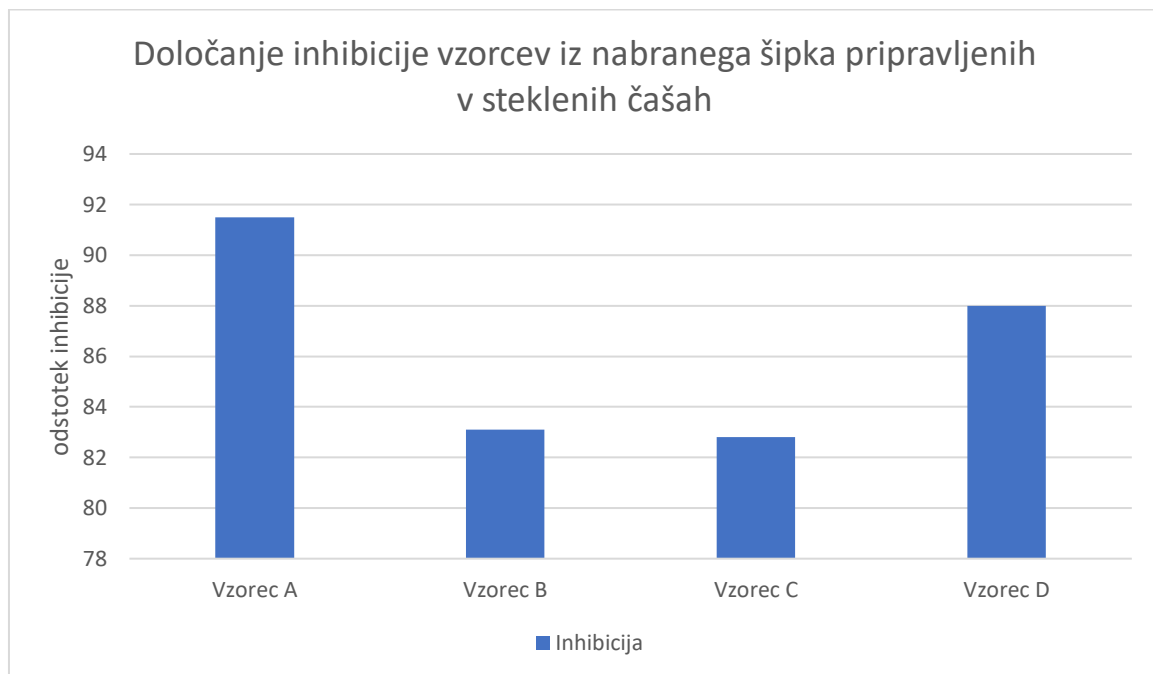
Iz diagrama smo razbrali, da delež skupnih fenolov mnogo bolj variira kot delež vitamina C, saj se tukaj številke med 4,4 % (vzorec F) in 57,3 % (vzorec B). S primerjavo vzorcev A in C opazimo tudi, da je namakanje vplivalo na vsebnost fenolnih spojin, saj jih je v vzorcu A za 2,0 % manj kot v vzorcu C. Še bolj od predhodnega namakanja je na vsebnost fenolnih spojin vplivala temperatura, saj smo opazili da je bilo v vzorcu B, ki smo ga najdlje pustili vreti, delež raztopljenih fenolnih spojin občutno večji od ostalih, saj se je v njem raztopila več kot polovica vseh fenolnih spojin iz plodov.

7.3. Določanje antioksidativnosti z radikalom DPPH

Iz rezultatov podanih v preglednici 6 je razvidno, da je pri določanju antioksidativnosti koncentriranega šipka prišlo do napake, ker je bila absorpcija večja kot v slepem vzorcu in posledično izračunana inhibicija negativna. S primerjavo rezultatov meritev vseh vzorcev smo opazili, da so tudi pri ostalih meritvah rezultati nenavadni in večine niti s pomočjo literature nismo znali interpretirati. Do tega je lahko prišlo, ker smo antioksidativnost določali sedem dni po pripravi vzorce, medtem ko smo vitamin C in fenole določali v obdobju treh dni. Čeprav smo vzorce ovili v aluminijasto folijo, da na njih svetloba ni imela vpliva, jih dobro zatesnili in jih hranili v hladilniku, ko jih nismo uporabljali, so se v tem času lahko začele razvijati bakterijske združbe, saj vzorcev nismo sterilizirali, ker bi to bilo nesmiselno, ker čajev, ki jih vsakodnevno uživamo, ne steriliziramo. Za potrditev rezultatov bi meritve morali ponoviti z

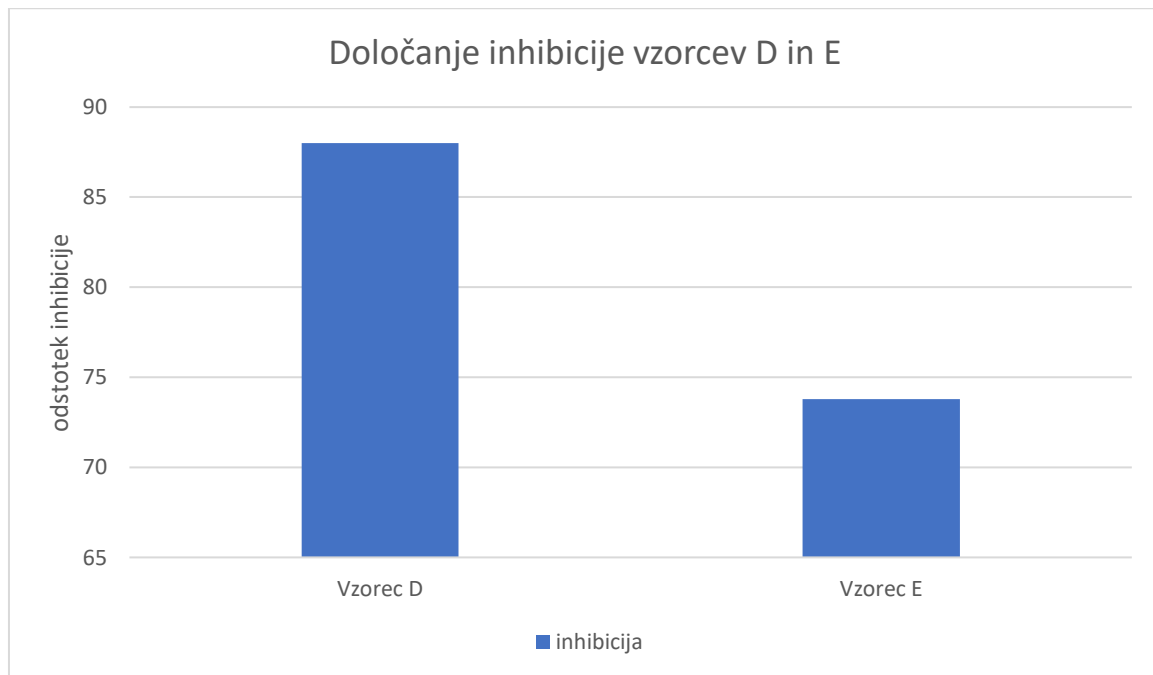
novimi vzorci, a če bi pripravili nove vzorce, bi morali na teh vzorcih ponoviti tudi titracijo in določanje fenolov, da bi lahko meritve nato med seboj primerjali. Če bi vso laboratorijsko delo želeli opraviti v krajšem času, bi potrebovali več ljudi, kar pa ni bilo mogoče. V drugačnih pogojih bi delo lahko opravili v štirih dneh, vendar zaradi strahu pred ponovno karanteno smo z delom pričeli takoj, ko je bilo mogoče in tako razporeditev časa ni bila najboljša.

Diagram 8: Določanje inhibicije vzorcev iz nabranega šipka pripravljenih v steklenih čašah.



Iz diagrama je razvidno, da smo izmerili največji odstotek inhibicije v vzorcu A (91,5 %), medtem ko je bil odstotek inhibicije vzorca C najmanjši (82,8 %). Takšnega rezultata nismo pričakovali, saj smo oba vzorca segreli do zavretja, vzorec C pa še predhodno namakali, zato bi njuna antioksidativnost naj bila zelo podobna oziroma bi naj imel vzorec C večji odstotek inhibicije kot vzorec A. S pregledom literature dobljenih podatkov nismo znali pojasniti, zato sklepamo, da je pri meritvah prišlo do napake. Kot opisano zgoraj, smo spektrofotometrično meritev z radikalom DPPH opravili en teden po pripravi vzorcev, zato so vzorci lahko bili pokvarjeni. S primerjavo vzorcev B, C in D bi lahko sklepali, da količina antioksidantov z večanjem temperature nekaj časa upada, saj snovi, ki so občutljive na temperaturo do 100 °C razpadajo, pri daljši izpostavljenosti temperaturi vrelišča pa zaradi večanja topnosti odstotek antioksidantov ponovno narašča, vendar to bi lahko bila hipoteza za nadaljnjo raziskovanje.

Diagram 9: Določanje inhibicije vzorcev D in E.

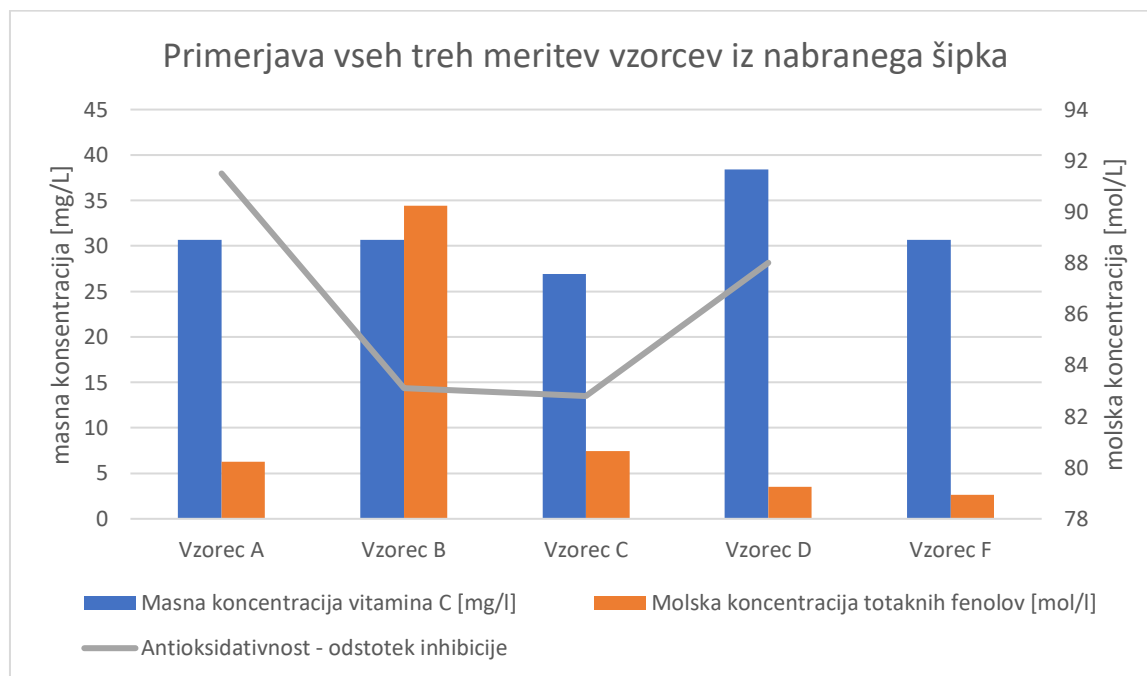


S pomočjo diagrama 9 lahko primerjamo antioksidativnost čaja iz nabranega šipka in kupljenega. Ker oba vzorca presegata vrednost 50 %, pomeni da sta dobra antioksidanta, a je bila inhibicija nabranega šipka skoraj 15 % večja kot kupljenega. Takšen rezultat bi bil pričakovan, če bi poskuse z nabranim šipkom opravili že novembra oziroma še v istem tednu, kot smo ga nabrali, mi pa smo poskuse opravili februarja (tri mesce kasneje), zato bi pričakovali, da se je v tem času antioksidativnost in koncentracija številnih pomembnih komponent v plodovih občutno zmanjšala. Iz tega razloga recepti pogosto navajajo, da naj bi šipek posušili najkasneje v treh dneh, od takrat ko ga naberemo (Hieng). Da bi lahko spremljali, kako se vsebnost različnih komponent s časom spreminja, bi morali od novembra opravljati poskuse, s katerimi bi ugotavljali vsebnost posameznih komponent. Čeprav na kupljenem čaju ni navedeno, kako so ga pripravili, lahko sklepamo, da so ga segrevali nad 30 °C in pri tej temperaturi se že začne razgradnja vitamina C. Običajno pa sušimo šipek pri mnogo višjih temperaturah. Recepti navajajo, da ga lahko sušimo v pečici, predhodno segreto na vsaj 40 °C ali celo 70 – 80 oziroma do 100 °C. Ta postopek naj traja 7-8 ur (Kako hraniti posušene šipek pozimi). Iz tega bi lahko sklepali, da se v procesu sušenja denaturira veliko vitamina C in ostalih na toploto občutljivih snovi, kar bi lahko bil vzrok, da je imel čaj, pripravljen iz nabranega šipka, večjo antioksidativnost. Vendar, kot opisano zgoraj, tudi to so samo predpostavke, ki bi jih v

prihodnje želeli podrobneje raziskati, saj zaradi starosti vzorcev nismo dobili zanesljivih rezultatov glede skupne antioksidativnosti.

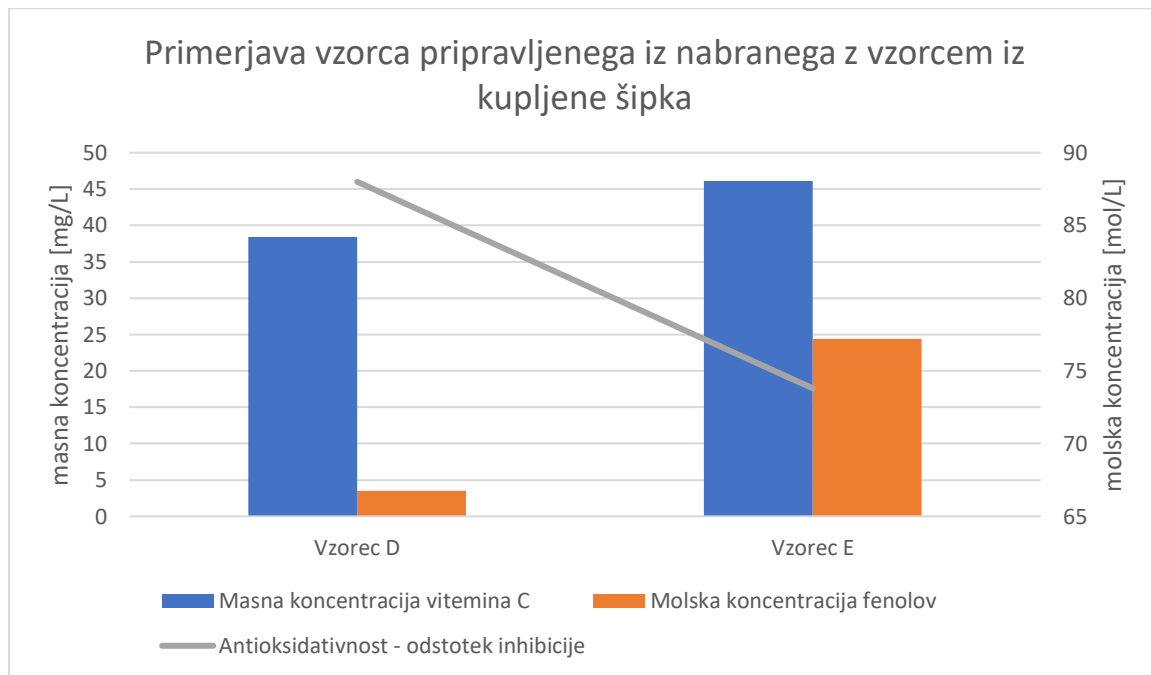
7.4. Primerjava rezultatov meritev

Diagram 10: Primerjava vseh treh meritev vzorcev iz nabranega šipka.



S pomočjo diagrama 10 smo sklepali, kako pripraviti šipkov čaj z največ zdravilnimi učinkovinami. Če želimo ohraniti karseda veliko vitamina C, čaj pripravljamo v stekleni posodi oziroma v posodi, ki ni iz kovine. Dobro je, če čaj predhodno 10 minut namakamo, saj s tem povečamo količino fenolov in vitamina C, vendar to ni bistvenega pomena, saj se koncentraciji minimalno spremenita. Največ vitamina C se ohrani, če čaj segrevamo samo do 80 °C (vzorec D), a se pri tako nizki temperaturi raztopi najmanj fenolnih spojin. Največ fenolnih spojin je bilo v vzorcu, ki smo ga segreli do 100 °C in pustili pet minut vreti, a v tem vzorcu je bilo manj vitamina C. Torej če želimo imeti čaj z karseda veliko vitamina C, ga segrejemo do 80 °C, če pa želimo največ vitamina C in fenolnih spojin, bi bil najboljši način, da čaj segrejemo do 100 °C in pustimo vreti 5 minut, saj se v tem času količina vitamina C zmanjša samo za slabih 10 %, medtem ko se količina fenolnih spojin poveča za kar dobrih 50 %. S primerjavo naših smernic za pripravo šipkovega čaja z navodili za pripravo navedenih na embalaži kupljenega čaja smo ugotovili, da so zelo podobne. Na embalaži zeliščnega čaja Šipek, proizvajalca Good Nature je navedeno: „1 veliko žlico plodov šipka prelijte z 250 mL vrele vode in pustite vreti 3 do 5 minut, nato odstavite. Pokrito pustite stati 10 minut, nato čaj precedite. Pijte sveže pripravljen čaj“ (Zeliščni čaj Šipek, Good Nature (100 g)). Razlika je samo v tem, da smo mi vodo segrevali skupaj s plodovi šipka, torej jih nismo prelili z že vrelo vodo, saj smo ugotavljali tudi, ali predhodno namakanje vpliva na koncentracijo snovi v čaju.

Diagram 11: Primerjava vzorca pripravljene iz nabranega z vzorcem iz kupljene šipka.



S pomočjo diagrama 11 smo primerjali vzorca D in E ter ugotovili, da je koncentracija vitamina C za 7,7 mg/L in fenolov za 20,94 mol/L večja v kupljenem čaju kot v nabranem, medtem ko je njegova skupna antioksidativnost nižja kot v nabranem.

HIPOTEZA 5: V kupljenem čaju je vsebnost fenolnih spojin višja kot v nabranem šipku, medtem ko je vsebnost vitamina C nižja.

Iz zgornjega diagrama je razvidno, da lahko prvi del hipoteze potrdimo, saj je bila vsebnost fenolnih spojin v kupljenem čaju sedemkrat (za 20,94 mol/L) večja kot v čaju iz nabranega šipka, v katerem se je raztopilo samo 3,49 mol/L fenolnih spojin. Torej se je v treh mesecih, ko je šipek stal nabran v vrečki, vsebnost fenolov zelo zmanjšala, medtem ko se šipku, potem ko ga posušimo, sestava ne spreminja več tako hitro, saj je njegov rok uporabe dve leti, medtem ko bi naj svežega uporabili v roku treh dni. Drugi del hipoteze smo ovrgli, saj je v čaju iz kupljenega šipka (vzorcju E) večje tudi količina vitamina C, sicer je razlika manjša, vendar je bila v vzorcju E, v katerem je bilo raztopljenega 46,1 mg/L šipka, vsebnost tega vitamina za 7,7 mg/L manjša kot v vzorcju D. Iz tega smo sklepali, da se je v treh mesecih v nabranem šipku ohranilo mnogo manj vitamina C, kot smo predvidevali, ker bi v svežem šipku morale biti več vitamina C kot v posušenem, ki je zagotovo bil izpostavljen temperaturam nad 30 °C. Možno je tudi, da se v procesu sušenja denaturira manj šipka, kot bi sklepali glede na postopke sušenja, ki

navajajo temperature 70 – 80 °C ponekod tudi 100 °C, ali da je proizvajalec uporabil drugačen način sušenja (pri nižji temperaturi) (Mitmesser, Ye, Mal, & Maile, 2016).

- Hipotezo lahko **delno potrdimo**

8. ZAKLJUČEK

V okviru naše raziskave smo ugotovili, da na vsebnost vitamina C, fenolnih spojin in ostalih antioksidantov vplivata tako način priprave čaja in temperatura do katere ga segrevamo kot tudi posoda, v kateri čaj pripravljamo. Če šipek najprej namakamo, se vsebnosti vitamina C in fenolnih spojin minimalno poveča. Z višanjem temperature topnost vitamina C narašča, zato namakanje ni dosti vplivalo na njegovo količino, ker je topnost pri sobni temperaturi majhna. Temperatura višja od 30 °C negativno vpliva nanj, saj se začne denaturirati, kar smo potrdili z našimi poskusi, ker je imel vzorec, ki smo ga segrevali samo do 80 °C največjo vrednost vitamina C, medtem ko je bila pri ostalih nekoliko manjša. Na vsebnost fenolnih spojina pa ima višja temperature pozitiven učinek, saj se njihova razgradnja začne pri mnogo višjih temperaturah. Z višanjem temperature se povečuje njihova topnost in s tem koncentracija v čaju. Če želimo imeti v čaju največ vitamina C, ga moramo segreti samo do 80 °C, vendar je pri tej temperaturi količina fenolnih spojin zelo majhna, zato je optimalneje, če čaj zavremo in pustimo vreti 5 minut, saj v tem času izgubimo slabih 10 % vitamin C, medtem ko pridobimo več kot 60 % fenolnih spojin. Temu bi se morda lahko izognili, če bi čaj pripravljali v dveh delih. Najprej bi ga lahko segreti do 80 °C in čaj bogat z vitaminom C odlili, nato bi na plodove ponovno nalili vodo in 5 minut vreli, da bi se raztopilo še čim več fenolov. S tem bi dobili čaj bogat s fenoli in vitaminom C. Takega načina priprave čaja sicer nismo zasledili nikjer v literaturi, zato bi ga bilo zanimivo raziskati.

Pozorni moramo biti tudi na posodo v kateri pripravljamo čaj, saj smo opazili, da sta bili koncentraciji vitamina C in fenolov v železni posodi manjši kot v stekleni.

Navodila za pripravo čaja z največ zdravilnimi učinkovinami, glede na dobljene rezultate v naši raziskavi:

- 10 g šipkovih plodov prelijte z 250 mL vode in ga namakajte 10 minut pri sobni temperaturi v stekleni posodi.
- Segrevajte čaj do zavretja ter ga pustite vreti 5 minut, nato odstavite.
- Čaj pustite stati 10 minut, nato ga precedite in čaj je pripravljen.

Priporočljivo je, da čaj po pripravi čimprej spijemo, saj se v desetih minutah, ko šipek namakamo, dovolj ohladi, da je primeren za pitje. Tako zaužijemo največ zdravilnih učinkovin,

a ni nič narobe, če si čaj pripravimo „za zraven“, saj se njegova sestava zelo počasi in minimalno spreminja.

Čeprav smo ugotovili veliko korelacij, so se med raziskovanjem pojavila še številna vprašanja, na katera bi si v prihodnje želeli poiskati odgovore. Zanimivo bi bilo izvesti poskuse s čaji v posodah iz še več različnih materialov, še posebej z emajliranimi posodami, saj v njih najpogosteje pripravljamo čaj. Ugotavljali bi lahko tudi, kako dodatek ingverja, sladkorja, limone ali cimeta vpliva predvsem na vsebnost vitamina C, za katerega vemo, da je ugodnejši nižji pH (kislo okolje), ali bi lahko morda dodali katero drugo snov, da bi se ohranilo in raztopilo več vitamina C, saj ga je bilo v čaju manj kot 30 % od tega, kar je bilo na voljo v plodovih. Zanima nas tudi, ali je toliko vitamina C razpadlo, ali se samo ni raztopil, kar bi lahko ugotovili z analizo ostankov plodov (potem ko smo čaj precedili). Ker smo opazili, da je bila količina vitamina C največja pri najnižji temperaturi, bi lahko čaj segrevali samo do 70/60 °C (ali še manj) ter preverili, ali bi bila njegova koncentracija še večja ali bi bila morda njegova topnost premajhna. Sandra Potočnik je v sklopu svojega diplomskega dela ugotovila, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin, antioksidantov in vitamina C v zgodnji jeseni povečuje, v pozni jeseni (začetek decembra) pa se njihova vsebnost ponovno znižuje, zato bi lahko od septembra do decembra pripravljali čaje iz svežih plodov in ugotavljali, ali se s spreminjanjem snovi v plodovih spreminja tudi koncentracija snovi tudi v čaju ali so razlike premajhne. Dobili bi podatke, ali je bolje, da ves čas nabiramo sveži šipek, ali da plodove, ko imajo največ zdravilnih učinkovin, posušimo. Preizkusili bi lahko tudi druge metode shranjevanja plodov (v hladilniku, zmrzovalniku, v obliki marmelad oziroma ekstraktov, ki bi jih nato samo raztopili v vodi).

Med izvajanjem poskusov in pri analizi podatkov smo opazili, da bi lahko marsikje z drugačnim pristopom prišli do natančnejših rezultatov. Pri titraciji bi lahko uporabili bolj izolirane posode, s tem bi bil vpliv okolice manjši, vendar je to zelo težko, ker potrebujemo zaradi ugotavljanja barve spojine prozorno posodo in tudi čajev doma nikoli ne pripravljamo v izoliranih posodah. Da bi lahko enakomerneje določali točno količino, koliko reagenta smo porabili, bi si lahko narisali barvno lestvico, vendar bi to bilo zelo težko, ker bi potrebovali popolnoma belo površino in zmeraj bi morali titracijo izvajati pri enaki svetlobi, ker je tako težko določiti odtenek, saj se odtenek spremeni že, če pogledamo iz drugega zornega kota. Lahko bi uporabili kolorimetrično metodo, s čimer bi se izognili subjektivnim napakam pri določanju barve. Koristila bi nam tudi uporaba luminiscenčne metode za določanje

antioksidativne aktivnosti, vendar v šoli nismo imeli na voljo vseh potrebnih aparatov. Problematično je lahko bilo tudi to, da so vzorci stali, čeprav zaščiteni pred svetlobo in toploto, več dni in niso bili sterilizirani, kar je predstavljalo možnost za razvoj različnih bakterijskih kultur, vendar bi sterilizacija bila nesmiselna, saj tako ne bi dobili čaja, ki ga lahko vsakodnevno zaužijemo. Zaradi dolgotrajnosti postopkov in količine dela ni bilo mogoče vseh poskusov opraviti v krajšem času, za to bi potrebovali več ljudi, kar pa seveda ni bilo mogoče. Kljub temu smo večinoma dobili željene rezultate, s katerimi smo si odgovorili na zastavljena vprašanja in pripravili recept, kar je bil cilj našega raziskovanja.

9. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Pri poskusih smo se trudili, da bi čim manj onesnažili okolje, zato smo vestno ločevali vse odpadke. Presežke reaktantov, ki so še bili uporabni, smo shranili v šolskem laboratoriju za morebitno nadaljnjo uporabo ostalih dijakov. S svojo raziskovalno nalogo smo želeli pomagati še komu odgovoriti na vprašanja povezan s šipkom, čaji in njihovimi zdravilnimi učinki. Zavedamo se, da si brez zdravil in napredka v kemiji ter medicini življenja več ne znamo predstavljati, hkrati pa vse manj ljudi zaupa sintetičnim zdravilom („kemiji“), predvsem zaradi strahu pred neželenimi stranskimi učinki. Pogosto lahko ta problem rešimo s preventivnim uživanjem zdravilnih čajev, ki delujejo kot blaga zdravila in so povsem naravni. Z uživanjem šipkovega čaja lahko preprečimo ali vsaj umilimo različna obolenja povezana predvsem s srčno-žilnim sistemom, ledvicami in imunskim sistemom. Največja prednost šipkovega čaja je, da tako rekoč skoraj nima neželenih učinkov, ker je najpogosteje zastopan antioksidant vitamin C, ki pa je vodotopen vitamin in se, če ga zaužijemo več, kot ga naše telo potrebuje, z urinom izloči iz našega telesa, tako da preveč šipkovega čaja skoraj ne moremo popiti. Za tiste, ki ne marajo vode, je lahko šipkov čaj odlična ideja za zdrav in dober napitek. Pomemben je tudi ta starejše ljudi, kadilce, nosečnice in bolnike, saj njihovo telo porabi manjši delež zaužitega vitamina C oziroma ga telo porabi zelo veliko, zato so lahko hitro podvrženi njegovemu pomanjkanju. S pogostim pitjem šipkovega čaja pa lahko to preprečijo in tako zmanjšajo tudi možnost za dehidracijo.

10. VIRI IN LITERATURA

Belitz, E., & Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*. Berlin: Springer.

Blainski, A., Lopes, G. C., & Palazzo de Mello, J. C. (2013). *Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L.* Pridobljeno 27. marec 2021 iz *Molecules*:
www.mdpi.com/journal/molecules

Bobroff, L. B., & Valentín-Oquendo, I. (junij 2001). Facts about Vitamin C. *University of Florida*. Pridobljeno 21. december 2020 iz
<https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/FY/FY21500.pdf>

Eastwood, M. (1997). *Principles of Human Nutrition*. London: Chapman & Hall.

Godiyal, S. (1. avgust 2015). *Natural news*. Pridobljeno 21. december 2021 iz Eating more vitamin C can help you live longer:
https://www.naturalnews.com/050618_vitamin_C_longevity_health.html

Grav, H. J. (1. junij 2002). *Axel Holst and Theodor Frolich--pioneers in the combat of scurvy*. Pridobljeno 12. februar 2021 iz Europe PMC:
<https://europepmc.org/article/med/12555613>

Güder, A. (januar 2016). Influence of Total Anthocyanins from Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn.) as Antidiabetic and Radical Scavenging Agents. *Iranian journal of pharmaceutical research*. Pridobljeno 3. februar 2021 iz
<https://www.researchgate.net/publication/307969741/figure/fig2/AS:616469507371013@1523989192432/Reaction-scheme-between-antioxidant-AH-and-DPPH-radical.png>

Hayyan, M., Hashim, M., & AlNashef, I. (2016). *Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications*. Pridobljeno 21. december 2020 iz *Chemical reviews*:
<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.chemrev.5b00407>

Hickey, S., & Saul, A. W. (2020). *Izvrstna naravno zdravilo: vitamin C*. Ljubljana: Ara.

Hieng, B. (brez datuma). Šipek – priljubljena zdravilna rastlina pri gripi in prehladu. *Bodieko*. Pridobljeno 20. marec 2021 iz <https://www.bodieko.si/sipek-vitamin-c>

Igwemmar, N., Kolawole, S., & Imran, I. (11. november 2013). Effect Of Heating On Vitamin C Content Of Some Selected Vegetables. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC & TECHNOLOGY RESEARCH VOLUME 2*. Pridobljeno 20. marec 2021 iz
<https://www.ijstr.org/final-print/nov2013/Effect-Of-Heating-On-Vitamin-C-Content-Of-Some-Selected-Vegetables.pdf>

Inštitut za intricijonistiko; Nacionalni inštitut za javno zdravje. (3. maj 2019). Vitamin C. Pridobljeno 12. november 2020 iz Nacionalni portal o hrani in prehrani:
<https://www.prehrana.si/sestavine-zivil/vitamini/vitamin-c>

- Junttila, H. (14. maj 2009). *Natural news*. Pridobljeno 11. februar 2021 iz Vitamin C Stops the Growth of Some Cancerous Tumors in Mice: <https://www.naturalnews.com/026262.html>
- Kako hraniti posušene šipke pozimi. (brez datuma). *Glavni*. Pridobljeno 26. marec 2021 iz <https://sl.vomturmhaus.com/kako-hraniti-posusene-sipke-pozimi>
- Khorassani, S. M., Maghsoodlou, M., Ebrahimi, A., & Shahraki, M. (2011). A novel high performance stopped-flow apparatus equipped with a special constructed mixing chamber containing a plunger under inert condition with a very short dead-time to investigate very rapid reactions. *Arabian Journal of Chemistry*. Pridobljeno 27. marec 2021 iz https://www.researchgate.net/figure/The-reduction-of-2-6-dichlorophenolindophenol-DCPI-by-l-ascorbic-acid-used-as-a-test_fig23_251717379/actions#reference
- Khorassani, S., Ebrahimi, A., Maghsoodlou, M., & Shahraki, M. (februar 2011). A novel high performance stopped-flow apparatus equipped with a special constructed mixing chamber containing a plunger under inert condition with a very short dead-time to investigate very rapid reactions. *ResearchGate*. Pridobljeno iz https://www.researchgate.net/figure/The-reduction-of-2-6-dichlorophenolindophenol-DCPI-by-l-ascorbic-acid-used-as-a-test_fig23_251717379
- Klemenc, Ž. (2009). Vpliv okoljskih dejavnikov na vsebnost polifenolnih spojin in vitamina C ter na antioksidativno aktivnost plodov šipka. Ljubljana. Pridobljeno 11. november 2020 iz Vpliv okoljskih dejavnikov na vsebnost polifenolnih spojin in vitamina C ter na antioksidativno aktivnost plodov šipka: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_klemenc_ziga.pdf
- Kogelnik, R. (september 2018). Določevanje prisotnosti proteinov in aktivnosti nekaterih encimov v figah. *Diplomsko delo*. Pridobljeno 5. december 2020 iz <https://core.ac.uk/download/pdf/161591911.pdf>
- Kolar, M. (2008). Osnove kvantitativne analize kemije I. *Prenovljena elektroska izdaja navodil za vaje*. Maribor. Pridobljeno 14. december 2020 iz <https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/mitjakolarvajeakiskripta.pdf>
- Kotnik, M. (2014). Vitamin C v prehrani mladostnikov. Maribor, Slovenija. Pridobljeno 8. december 2020 iz <https://dk.um.si/Dokument.php?id=67743>
- Kuhar Glišić, A. (5. december 2015). ABCzdravja. *ABC antioksidantov*. Pridobljeno 23. januar 2021 iz <https://www.abczdravja.si/hrana/abc-antioksidantov/>
- Leskovšek, & Lidija. (2010). Kemija v prehrani. Pridobljeno 27. marec 2021 iz <https://munus2.scng.si/files/2016/01/gradivo.pdf>
- Medič-Šarić, M. B. (2000). Vitamini i minerali, istine i predrasude. Zagreb, Hrvaška. Pridobljeno 22. januar 2021

- Memnune, Ş., Hilal, Y., & Arzu, K. (2014). The Effect of Cooking on Total Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Selected Vegetables. *International Journal of Food Properties*. Pridobljeno 22. marec 2021 iz <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080%2F10942912.2011.619292>
- Mitmesser, S. H., Ye, Q., Mal, E., & Maile, C. (25. julij 2016). *Determination of plasma and leukocyte vitamin C concentrations in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with Ester-C®*. *SpringerPlus* 5, 1161. Pridobljeno 8. december 2020 iz <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2605-7>
- Molyneux, P. (november 2003). The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating. *Članek v Songklanakar Journal of Science and Technology*. Pridobljeno 22. marec 2021 iz https://www.researchgate.net/publication/237620105_The_use_of_the_stable_radical_Diphenylpicrylhydrazyl_DPPH_for_estimating_antioxidant_activity
- NIJZ. (brez datuma). *Ocena tveganja za zdravje ljudi v povezavi z uživanjem prehranskih dopolnil, ki vsebujejo 1000 ali več mg vitamina C v dnevnem odmerku*. Pridobljeno 8. december 2020 iz Nacionalni inštitut za javno zdravje: https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/vitamin_c_0.pdf
- Nishiumi, S., Miyamoto, S., & Kawabata, K. (junij 2011). Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. Pridobljeno 22. januar 2021
- Oberbeil, K. (2004). *Z vitamini do zdravja*. Ljubljana: Prešernova družba.
- Oman, L. (november 2019). *Gorenjske lekarne*. Pridobljeno 23. december 2020 iz Šipek - navadni: <https://www.gorenjske-lekarne.si/svetovanje-clanek/sipek-navadni>
- Pahlow, M. (1987). *Velika knjiga o zdravih rastlinah*. Ljubljana: Cankarjeva založba.
- Pavčič, M. (januar 2016). Maščobne kisline in njihov vpliv na zdravje. *Za srce*. Pridobljeno 6. marec 2021 iz https://zasrce.si/clanek/mascobne_kisline_in_njihov_vpliv_na_zdravje/
- Peršič, M. (2019). Vsebnost in sinteza oligomernih proantocianidov in drugih nizkomolekularnih spojin iz skupine taninov v organih različnih sadnih vrst. *Doktorska disertacija*. Ljubljana. Pridobljeno 20. marec 2021 iz <https://core.ac.uk/download/pdf/185523069.pdf>
- Poljšak, B., Lampe, T., Ostan, I., & Rospor, P. (december 2007). Antioksidanti v prehrani: varnost, zdravje in potencialna tveganja. Pridobljeno 22. januar 2021 iz http://manus.zf.uni-lj.si/~ri/publikacije/hrana2007/8_Poljsak.pdf
- Popova, A. (oktober 2019). The effect of heating on the vitamin C content of selected vegetables. Pridobljeno 8. december 2020 iz https://www.researchgate.net/publication/336915722_The_effect_of_heating_on_the_vitamin_C_content_of_selected_vegetables

- Poredoš, T. (2006). Stabilnost askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kislinske kisline v vodnih raztopinah. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Slovenija. Pridobljeno 10. januar 2021 iz http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_poredos_tomaz.pdf
- Potočnik, S. (2009). Vpliv zorenja na vsebnost antioksidantov v plodovih šipka. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Slovenija. Pridobljeno 12. november 2020 iz http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_potocnik_sandra.pdf
- Pustišek, N. (brez datuma). *Podrobneje o vitaminu C*. Pridobljeno 8. december 2020 iz Lekarnar: <https://www.lekarnar.com/clanki/podrobneje-o-vitaminu-c>
- Referenčne vrednosti za energijski vnos ter vnos hranil*. (22. april 2020). Pridobljeno 23. januar 2021 iz Nacionalni inštitut za javno zdravje: <https://www.nijz.si/sl/referencne-vrednosti-za-energijski-vmnos-ter-vmnos-hranil>
- Reusch, W. (2009). Radical reactions in practice. *Organic Chemistry II*. Pridobljeno 29. marec 2021 iz <https://courses.lumenlearning.com/suny-potsdam-organicchemistry2/chapter/18-4-radical-reactions-in-practice/>
- Saupe, J. (2002). *Naravni zdravnik*. Ljubljana: Slovenska knjigarna.
- Schlieper, C., Gregory, E., & Linder, G. (1997). *Pravilna prehrana, Hranoslovje*. Ljubljana: Mohorjeva založba.
- Schönfelder, I., & Schönfelder, P. (2006). *Zdravine rastline - vodnik*. Kranj: S knjigo v naravo.
- Uredniki enciklopedije Britannica. (9. julij 2020). *James Lind, British physican*. Pridobljeno 23. november 2020 iz Encyclopædia Britannica: <https://www.britannica.com/biography/James-Lind>
- Uredništvo enciklopedije Britannica. (18. oktober 2020). *Albert Szent-Györgyi*. Pridobljeno 23. november 2020 iz Encyclopædia Britannica: <https://www.britannica.com/biography/Albert-Szent-Gyorgyi>
- Vlaicu, A. P., Turcu, R., & Paneite, D. (11-15. april 2020). *Sciendo*. Pridobljeno 23. november 2020 iz Rosehip (Rosa canina) as a Beneficial Dietary Feed in Poultry Nutrition: file:///C:/Users/C340%20i5%20622122/Downloads/Rosehip_Rosa_canina_as_a_Beneficial_Dietary_Feed_i.pdf
- Vrtačnik, M., Zmazek, B., & Boh, B. (2014). Kemija. *i-učbenik za kemijo v 3. letniku gimnazije*. Ljubljana. Pridobljeno 12. marec 2021 iz <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1284/index4.html>
- Wax, E., Zieve, D., MD, MHA, & Medical Director, B. C. (2. februar 2019). Vitamin C. Pridobljeno 22. februar 2021 iz <https://medlineplus.gov/ency/article/002404.htm>
- Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Agric Food Chem*. Pridobljeno 22. marec 2021 iz

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17227062/#:~:text=In%20addition%2C%20FGs%20may%20be,antioxidant%20capacity%20of%20citrus%20peel.>

Zeliščni čaj Šipek, Good Nature (100 g). (brez datuma). *lekarnar.com*. Pridobljeno 27. marec 2021 iz <https://www.lekarnar.com/izdelki/zeliscni-caj-sipek-good-nature-100-g#productTabs>

Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti. (brez datuma). Pridobljeno 12. november 2020 iz Inštitut za slovenski jezik Frana Removška - Terminologišče.