



Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Prešernova ulica 34

NEKAJ SKRIVNOSTI NEKATERIH ZDRAVILNIH RASTLIN

Raziskovalna naloga

Druga področja: zdravilne rastline

Avtorici: Lejla Denša in Mia Hozjan

Mentorici: prof. Mateja Godec, univ. dipl. inž. kem. tehnol.,

dr. Darija Cör, univ. dipl. inž. kem. tehnol.

Ljutomer, 2020

ZAHVALA

Zahvaljujema se mentoricama, profesorici Mateji Godec za vse nasvete, vodenje in pomoč pri pisanju raziskovalne naloge in doktorici Dariji Cör za pomoč pri praktični izvedbi eksperimentov ter meritev. Gospodoma Igorju Makoterju in Deanu Krpiču gre zahvala za prejete vzorce industrijske konoplje in sladkega pelina, laborantki Sonji Koroša pa za pomoč pri delu v šolskem laboratoriju. Prav tako se zahvaljujema Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo univerze v Mariboru, ker nama je omogočila delo v njihovih laboratorijih. Zahvaljujema se tudi lektorici raziskovalne naloge, profesorici Klaudiji Tivadar.

Kazalo vsebine

ZAHVALA.....	1
Kazalo slik.....	3
Kazalo tabel.....	4
Kazalo grafikonov.....	4
POVZETEK.....	5
ABSTRACT.....	5
1. UVOD.....	6
2. TEORETIČNI DEL.....	7
2.1 Navadni pelin.....	7
2.1.1 Uspevanje in gojenje.....	7
2.2 Sladki pelin.....	8
2.2.1 Uspevanje in gojenje.....	9
2.3 Žajbelj.....	9
2.3.1 Uspevanje in gojenje.....	10
2.4 Industrijska konoplja.....	11
2.4.1 Uspevanje in gojenje.....	12
2.5 Tujon.....	12
2.5.1 Izomera tujona.....	13
2.5.2 Zakonodaja o vsebnosti tujona.....	13
2.6 Antioksidativnost.....	13
2.6.1 Prosti radikali.....	13
2.6.2 Oksidativni stres.....	14
2.6.3 Delitev antioksidantov.....	14
2.6.4 Vloga antioksidantov.....	14
2.7 Fenolne spojine.....	14
3. METODE DELA.....	16
3.1 Seznam laboratorijske opreme, pripomočkov in materialov.....	16
3.2 Ekstrakcija.....	17
3.2.1 Ekstrakt.....	17
3.2.2 Topila.....	17
3.2.3 Ekstrakcija po Soxhletu.....	17
3.2.4 Ločevanje z rotavaporjem.....	18
3.3 Preverjanje prisotnosti tujona v rastlinah.....	19
3.3.1 ATR – IR spektroskopija.....	19
3.4 DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	20
3.5 Določanje skupnih fenolnih spojin v ekstraktih.....	24

3.5.1 Umeritvena premica z galno kislino	24
3.5.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih	25
3.5.3 Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih navadnega pelina, sladkega pelina, konoplje in žajblja	25
4. MERITVE	27
4.1 Izkoristki ekstraktov	27
4.2 Vsebnost tujona v rastlini	28
4.3 Vsebnost antioksidativnih učinkovin v rastlini	38
4.4 Vsebnost fenolnih spojin v rastlini	40
5. INTERPRETACIJA REZULTATOV	43
6. ZAKLJUČEK	45
VIRI IN LITERATURA	46

Kazalo slik

Slika 1: Navadni pelin	7
Slika 2: Sladki pelin	9
Slika 3: Žajbelj	10
Slika 4: Konoplja	12
Slika 5: Strukturni formuli α - in β -tujona	13
Slika 6: Strukturne formule nekaterih fenolnih spojin v rastlinah	15
Slika 7: Pripravljeni tulci pred izvedbo Soxhlet ekstrakcije	17
Slika 8: Soxhletov aparat v šolskem laboratoriju	18
Slika 9: Ločitev z rotavaporjem v šolskem laboratoriju	19
Slika 10: Ekstrakt po odparitvi topila	19
Slika 11: Merjenje absorpcijskih vrednosti z IRAffinity-1S na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor	20
Slika 12: Skeletna formula DPPH	20
Slika 13: Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila (DPPH) (levo) in difenilpikrilhidrazina (DPPH ₂ , reducirana oblika) (desno)	21
Slika 14: Nepremešani vzorci, razredčeni z metanolom	22
Slika 15: Meritev absorbance referenčne raztopine	23
Slika 16: Termostatirane razbarvane raztopine po meritvi absorbance	24
Slika 17: Pripravljene raztopine pred merjenjem absorbance	25
Slika 18: Merjenje absorbance vzorcev v šolskem laboratoriju	26

Kazalo tabel

Tabela 1: Koncentracije standardnih raztopin galne kisline (GA)	24
Tabela 2: Zbrani podatki vseh ekstrakcij in njihovih izkoristkov	27
Tabela 3: Podatki za umeritveno premico tujona v metanolu	28
Tabela 4: Absorbanca vzorcev pri $\lambda_{754 \text{ nm}}$	29
Tabela 5: Absorbance referenčne raztopine in raztopin vzorcev.....	38
Tabela 6: % inhibicije vzorcev glede na referenčno raztopino	39
Tabela 7: Absorbanca standardnih raztopin galne kisline pri $\lambda_{754 \text{ nm}}$	40
Tabela 8: Absorbanca vzorcev pri $\lambda_{754 \text{ nm}}$	41
Tabela 9: Koncentracija skupnih fenolnih spojin.....	41

Kazalo grafikonov

Graf 1: Spremembe v absorpcijskem spektru (od vijolične do rumene) v reakcijah DPPH z radikali reducenti	22
Graf 2: Izkoristki vseh ekstrakcij	28
Graf 3: Umeritvena premica za tujon v metanolu	29
Graf 4: Absorpcija standardnega tujona	31
Graf 5: Absorpcija prvega vzorca navadnega pelina v metanolu	32
Graf 6: Absorpcija drugega vzorca navadnega pelina v metanolu	32
Graf 7: Absorpcija prvega vzorca sladkega pelina v metanolu	33
Graf 8: Absorpcija drugega vzorca sladkega pelina v metanolu	33
Graf 9: Absorpcija prvega vzorca žajblja v metanolu	34
Graf 10: Absorpcija drugega vzorca navadnega pelina v metanolu	34
Graf 11: Absorpcija prvega vzorca konoplje v metanolu	35
Graf 12: Absorpcija drugega vzorca konoplje v metanolu	35
Graf 13: Absorpcija vzorca navadnega pelina v heksanu	36
Graf 14: Absorpcija vzorca sladkega pelina v heksanu	36
Graf 15: Absorpcija vzorca žajblja v heksanu	37
Graf 16: Absorpcija vzorca konoplje v heksanu	38
Graf 17: Umeritvena premica z galno kislino	40
Graf 18: Koncentracija skupnih fenolnih spojin.....	42

POVZETEK

Za dokaz vsebnosti tujona in preverjanje antioksidativnih lastnosti v različnih rastlinah z zdravilnimi učinki smo pripravili 12 vzorcev. Za analizo smo uporabili 4 različne rastline: navadni pelin, sladki pelin, žajbelj in konopljo. Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali ekstrakti teh rastlin vsebujejo tujon, ali je res, da sladki pelin in konoplja edina med preučevanimi rastlinami ne vsebujeta tujona, in ali imajo navadni pelin, sladki pelin, žajbelj in konoplja antioksidativne lastnosti.

Za testiranje tujona in antioksidativnih lastnosti smo si pripravili ekstrakte teh rastlin z ekstrakcijo po Soxhletu. V ekstraktih smo nato s pomočjo ATR-IR spektroskopije določili prisotnost tujona v posameznih rastlinah. Za dokazovanje antioksidativnih lastnosti smo uporabili metodo DPPH za določanje antioksidativne aktivnosti. Prav tako smo preverili vsebnost fenolnih spojin. Prisotnost tujona smo dokazali v navadnem in sladkem pelinu ter žajblju. Antioksidativne lastnosti in prisotnost fenolnih spojin pa smo dokazali v vseh štirih rastlinah.

Ključne besede: navadni pelin, sladki pelin, žajbelj, konoplja, vsebnost tujona, preverjanje antioksidativnih lastnosti, ekstrakcija, ATR-IR spektroskopija, metoda DPPH, fenolne spojine

ABSTRACT

For proving the presence of thujon and testing antioxidant features in different plants with healing effects, we prepared 12 samples. For analysis we used 4 different plants: *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Salvia officinalis* and *Cannabis sativa*. The goal of our research was to find out if the plant extracts contain thujon, if it is true that *Artemisia annua* and *Cannabis sativa* are the only ones among analysed plants which do not contain thujon and if *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Salvia officinalis* and *Cannabis sativa* have antioxidant features.

For thujon and antioxidants testing we prepared plant extracts with Soxhlet extraction. Then we determined the presence of thujon in these extracts with the help of ATR-IR spectroscopy. For proving antioxidant features we used DPPH method. Furthermore we checked the presence of phenol compounds. We proved the presence of thujon in *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua* and *Salvia officinalis*. We proved antioxidant features and presence of phenol compounds in all four plants.

Key words: *Artemisia vulgaris*, *Artemisia annua*, *Salvia officinalis*, *Cannabis sativa*, presence of thujon, checking the antioxidant features, extraction, ATR-IR spectroscopy, DPPH method, phenol compounds

1. UVOD

V zadnjem času ljudje iščejo naravne oblike zdravljenja, zaradi tega velikokrat posežejo po zdravilnih rastlinah. Reklam za take ali drugačne zdravilne rastline je v zadnjem času zelo veliko in tudi naju je področje pritegnilo, zato sva začeli raziskovati, katere so tiste »čudežne rastline«. Veliko je takšnih, ki jim pripisujejo različne zdravilne učinke. Kmalu sva ugotovili, da mnoge rastline poleg zdravilnih vsebujejo tudi nekatere strupene učinkovine. Zato sva se odločili raziskati morebitne strupene snovi v zdravilnih rastlinah. Med iskanjem sva naleteli na učinkovino tujon, ki bi ga naj vsebovale predvsem rastline iz družine pelinovk. Tako sva za svojo raziskavo najprej izbrali sladki pelin, o katerem sva v zadnjem času veliko brali in je znana po tem, da vsebuje artemisinin, ki zdravi malarijo. Za primerjavo sva izbrali navadni pelin in žajbelj, za katera sva zasledili, da je pri uživanju potrebna pazljivost zaradi tujona.

Te rastline uvrščamo med zdravilne zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti. Med prebiranjem člankov je najino zanimanje pritegnila še konoplja in odločili sva se, da jo vključiva v najino raziskavo.

Tako sva si zadali cilj: preučiti vsebnost tujona, antioksidativne lastnosti in fenolne skupine v ekstraktih sladkega pelina, navadnega pelina, žajblja in konoplje.

Pred raziskovanjem sva si zastavili naslednje hipoteze:

1. Učinkovitejša bo ekstrakcija, večja bo vsebnost tujona v pridobljenem ekstraktu posamezne rastline.
2. Prisotnost tujona v ekstraktih rastlin bo večja v ekstraktih, pripravljenih z nepolarnim topilom, kakor v ekstraktih s polarnim topilom.
3. Žajbelj bo vseboval največ tujona v primerjavi z navadnim pelinom, sladkim pelinom in konopljo.
4. V navadnem pelinu, sladkem pelinu, žajblju in konoplji bomo dokazali antioksidativne učinkovine.
5. V navadnem pelinu, sladkem pelinu, žajblju in konoplji bomo dokazali vsebnost fenolnih spojin.
6. Za antioksidativne lastnosti rastlin so v glavnem odgovorne fenolne spojine.

2. TEORETIČNI DEL

2.1 Navadni pelin

Navadni pelin¹ (*Artemisia vulgaris*), ki spada med nebinovke (Asteraceae), je 60–250 cm visoka rastlina in trajnica. Čaj iz navadnega pelina sprošča in pomirja živce pri živčnosti in motnjah spanja. Pomirja krče pri menstrualnih bolečinah, pomaga tudi pri lajšanju črevesnih krčev. Spodbuja delovanje trebušne slinavke in prebavo. Lajša leno ter slabo prebavo in pomanjkanje teka. Pelinovo olje pomaga pri utrujenih stopalih in revmatizmu. Navadni pelin priporočajo za zdravljenje bakterijskih in glivičnih okužb, saj deluje antibakterijsko. Učinkovito znižuje povišano telesno temperaturo in lajša kožna vnetja. Zaradi eteričnega olja in seskviterpenskih laktonov odpravlja črevesne zajedavce, predvsem gliste.

Sestavine in učinkovine, ki gradijo navadni pelin so:

- čreslovine,
- grenčine (seskviterpenlaktoni),
- flavonoidi,
- kumarini,
- triterpeni,
- eterično olje (do 0,3 %) s cineolom in
- tujon.

V njem lahko najdemo celo vitamin C. Glavni učinkovini absintin in artabsin, ki se pojavljata predvsem v listih, povzročata grenkobo.



Slika 1: Navadni pelin

2.1.1 Uspevanje in gojenje

Raste na gozdnatih posekah, na nabrežjih, pašnikih in med grmovjem po vsej Evropi.

¹ vir 1, 3, 6, 7, 9, 11, 18

2.2 Sladki pelin

Sladki pelin² (*Artemisia annua*) je zdravilna rastlina iz družine nebinovk. Izvira iz Evrope, Azije in Severne Amerike. Kitajci, ki so znani po dolgi življenjski dobi, ga že 2000 let uporabljajo proti malariji. Na Balkan so ga prinesli Turki, ki so ga uporabljali zaradi čudovitega vonja, ki je odganjal mrčes, hkrati pa pomagal pri vročičnih stanjih in bolečinah.

Je rastlina enoletnica, katere grm lahko doseže višino tudi več kot 2 metra. Cvetovi sladko dišijo, listi so svetlo zelene barve, pernato deljeni in nazobčani. Ima močan aromatičen vonj in grenki okus.

Uporablja se kot koncentrat v obliki eteričnega olja. To so hlapne zmesi biogenih spojin, med katerimi prevladujejo mono- in seskviterpeni in aromatski fenilpropanovi derivati. Izkorišča se tudi v obliki mazil za zunanjo uporabo, iz svežih ali posušenih delov se lahko pripravi čaj. Znanstveno je potrjeno, da močno znižuje stopnjo smrtnosti pri bolnikih, okuženih z malarijo, ki je ena najpogostejših nalezljivih tropskih bolezni. Iz prakse ljudi pa so razvidni tudi mnogi drugi pozitivni učinki: pomaga pri hujšanju, znižuje povišano telesno temperaturo, mazilo pomaga pri bolečinah v sklepih, zdravi zlatenico (čisti jetra), izvleček artemizinin v kombinaciji z železom in C-vitaminom uničuje rakaste celice, je učinkovito protivnetno zdravilo, odganja mrčes, povečuje imunsko odpornost organizma, pomaga pri trebušnih krčih, uničuje širok spekter parazitov, lajša menstrualne bolečine, pomaga pri prehladu, gripi, herpesu, glivicah in premagovanju virusov ter zdravi melanholijo in depresijo, prah iz korenine pa lajša tudi epilepsijo in histerijo.

Sladki pelin vsebuje:

- kvercetin (deluje protivnetno, antibakterijsko in protiglivično),
- kafro,
- fitosterol, } (zavirajo rast sevov bakterij, ki so vzrok infekcije črevesja)
- karakol,
- artemizinin (zdravi malarijo),
- luteolin (antioksidant, ki deluje tudi protivnetno) in
- tujon.

² vir 15



Slika 2: Sladki pelin

2.2.1 Uspevanje in gojenje

Sladki pelin moramo sejati vsako leto. Vzgoja je preprosta. Rastlina najbolje uspeva v odcednih, nevtralnih oz. rahlo alkalnih ilovnatih tleh, tiste, ki pa uspevajo v slabih in sušnih tleh, pa so bolj odporne in aromatične.

Zaradi hitre rasti in prijetnega vonja se uporablja tudi v okrasnem vrtnarstvu, ponekod pa lahko postane nadležen plevel.

Sladki pelin sejemo spomladi februarja in marca. Najprej ga moramo vsaj dvakrat prepikirati in šele nato ga lahko posadimo v večjo posodo na prostem ali na vrt. Maja, ko mine nevarnost pozebe, ga lahko prenesemo na prosto. Najbolje ga je posaditi ločeno od drugih rastlin, saj jih zaradi visoke rasti lahko zasenči. Cvetove in liste za pripravo čaja nabiramo avgusta.

2.3 Žajbelj

Žajbelj³ (*Salvia officinalis*) je mnogostransko uporabna začimbna in zdravilna rastlina. Spada v družino ustnatic. Izvira iz južne Evrope in Sredozemlja. Od nekdanjega žajbelja velja za rastlino, ki človeku lahko povrne nesmrtnost, zato je bil vedno visoko cenjen. Že v času Rimljanov je bilo njegovo nabiranje povezano s številnimi obredi. Grki so ga uporabljali za lajšanje kačjih ugrizov. V ljudskem zdravilstvu ima žajbelj zares bogato zgodovino.

Po izgledu je droben vedno zelen polgrmiček s svetlo vijoličastimi cvetovi, ki se na koncu stebela zbirajo v rahel grozd, sivkastimi eliptičnimi, na kratkih pecljih ali sedečimi listi in številnimi olesenelimi stebli. Vsi nadzemni deli žajblja so prerasli z dlakastimi žleznicami, ki izločajo eterično olje, kar rastlino varuje pred izsušitvijo v toplejšem delu leta. Zraste lahko do 40 cm in ima pekoč okus.

³ vir 12, 20, 21

Žajbelj je vsestransko zelišče. Uporaben je tako v kuhinji, kjer se ga dodaja jedem kot začimbo, kot tudi v medicini. Čajni pripravek zdravi vnetja žrela, ustne votline in dlesni, omejuje in pomirja potenje ter pozitivno vpliva na črevesje in želodec. Uživanje le-tega naj bi vplivalo tudi na vrednost glukoze na tešče, prav tako pa naj bi ga tudi sicer uporabljali za zniževanje vrednosti krvnega sladkorja pri ljudeh, ki se spopadajo s tveganjem za razvoj sladkorne bolezni tipa 2. V obliki eteričnega olja razkužuje in lajša krče. Rastlina zaradi vsebnosti čreslovine in grenčine spodbuja prebavo mastne hrane oziroma delovanje jeter in žolča.

Zelo intenzivno antioksidativno delovanje ima tudi izvleček žajblja. Učinkovito deluje proti stafilokokom, šigeli in salmoneli, ki so pogosti patogeni mikrobi. Z izvlečkom lahko prav tako izboljšamo pomnjenje.

Žajbelj vsebuje predvsem antioksidante pa tudi druge snovi:

- apigenin,
- diosmetin,
- luteolin,
- čreslovino,
- grenčino in
- tujon.



Slika 3: Žajbelj

2.3.1 Uspevanje in gojenje

Žajbelj glede talne sestave ni preveč izbirčna rastlina, najbolje pa uspeva na lahkih, suhih, alkalnih ter dobro odcednih tleh. Najraje ima sončno lego, saj je občutljiv na veter in mraz, zato ga najpogosteje najdemo ravno po suhih predelih južne Evrope in po obrežjih Sredozemskega morja. Pri nas ga je mogoče zaslediti divje rastočega predvsem v obmorskih krajih na suhih in kamnitih tleh ali gojenega v gorah in domačih nasadih.

Je povsem nezahtevna rastlina, le dokler se ne ukorenini, je občutljiv na primanjkljaj vlage, zaradi tega zalivamo samo mlade sadike. Jeseni ga je potrebno zaščititi pred zimskim mrazom ali ga prenesti v prezimni neogrevan prostor.

Žajbelj spada med trajnice. Na prosto ga sejemo marca ali aprila. V maju nežne mlade sadike utrjujemo in jih kasneje presadimo.

2.4 Konoplja

Konoplja⁴ (*Cannabis sativa*) je dvodomna rastlina družine konopljevok (*Cannabaceae*). Na lastnosti konoplje vplivajo podnebje, svetloba, prst in hranila.

Konoplja vsebuje kanabinoide, ki so terpenofenolne kemične spojine, ki aktivirajo kanabinoidne receptorje, razprstrte po celotnem telesu. Njeni listi so ozki, veje so maloštevilne in cvetovi so rahli. Njeno steblo je razvejano in pokončno, rastlina pa je visoka od 0,5 do 5 metrov. Njen življenjski cikel traja približno od 100 do 150 dni.

Ker je konoplja biorazgradljiv material, se lahko v celoti reciklira. Zamenja lahko nerazgradljive, plastične in sintetične materiale, ki so v današnjem času sporni.

Konoplja je uporabna na mnogih področjih. V prehrani so pomembna olja iz konoplje, njena semena, moka, proteini, pridobljeni iz nje, in čaji. Konopljino olje in semena so bogati z omega maščobnimi kislinami, beljakovinami, prehranskimi vlakninami, minerali in vitamini. Iz rastline se lahko pridelata tudi moka in konopljini proteini. Uporablja se tudi v obliki čaja, ki je lahko pripravljen iz različnih delcev rastline. Njihove učinkovine so odvisne od dela konoplje, iz katere je pridelan čaj, tako lahko pripomorejo k razstrupljanju telesa ter izboljšujejo prebavo. Odpravljajo težave, lajšajo simptome in preprečujejo nastanek aken, astme, debelosti, migren, shizofrenije, rakavih obolenj, slabosti itd. Esencialne maščobne kisline krepijo imunski sistem, srce in ožilje ter povečujejo dovod kisika do celic. Deluje tudi protivnetno in antibakterijsko. Zaradi tega se uporablja tudi v kozmetiki in medicini. Pomembna je tudi v tekstilni industriji, kjer je pomembna zaradi svoje vzdržljivosti in odpornosti. Njena vlakna so najmočnejša in najtrpežnejša med vsemi rastlinami na planetu. Dejavniki, ki še vplivajo na njeno vlogo na tem področju, so, da je lahko pridelana na ekološki način, je hipoalergena in njena vlakna so zračna ter ščitijo pred UV-žarki. V gradbeništvu se iz industrijske konoplje izdelujejo zidaki, bloki, beton in izolacija. Nastopa tudi v papirni in avtomobilski industriji, saj je lahko tudi surovina za pogonsko gorivo. Iz nje se lahko izdelata več kot 50 000 izdelkov.

⁴ vir 7, 14, 17

Konoplja je vir več kot 2000 substanc, od teh so najpomembnejše:

- kanabinoidi (najpomembnejša sta THC (povzroča omamo zaradi delovanja na centralno živčevje) in CBD (deluje na periferno živčevje in ni psihoaktivno, ne povzroča omotice ali drugih neželenih učinkov),
- esencialne maščobne kisline,
- številna makro- in mikrohranila in
- fenolne spojine (med njimi predvsem flavonoidi, kanflavini in tudi nekateri predstavniki stilbenov ter lignanov).



Slika 4: Industrijska konoplja

2.4.1 Uspevanje in gojenje

Ima dober hektarski donos, ob ugodnih pogojih se lahko žanje tudi dvakrat letno. Rahlja zemljo in ni težavna rastlina, saj ne potrebuje niti pesticidov niti zahtevne obdelave. Odlična je za fitoremediacijo, ki pa je ena izmed oblik bioremediacije, pri kateri se uporabljajo rastline za odstranjevanje kovin, organskih kemikalij (bencina, nafte, pesticidov, mazil, topil) oz. splošno onesnaževalcev iz prsti in vode. Dokazano je, da konoplja očisti zemljo vseh težkih kovin, radioaktivnih elementov in fitofarmaceutskih sredstev. Poleg tega je pomembna poljščina v kolobarju.

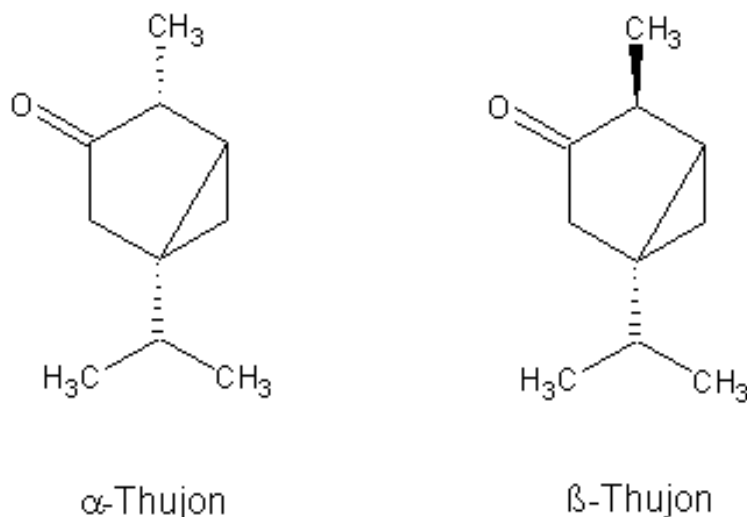
Primeren čas za setev je od začetka aprila do sredine maja. Odlično uspeva na sveži njivi ali travniku.

2.5 Tujon

Tujon⁵ ali po IUPAC-u 4-metil-1-(1-metiletil)biciklo[3.1.0]heksan-3-on, z molekulske formulo $C_{10}H_{16}O$, je monoterpenski keton. Brezbarvna tekočina z molsko maso 152,236 g/mol ima vrelišče pri 474–475 K. Topi se v etru in kloroformu, ne pa tudi v vodi.

⁵ vir 6, 16

Tujon spada med živčne strupe, še posebej škodljiv je za osrednje živčevje, pri dolgotrajni uporabi lahko povzroči občutek vročine in omotičnosti, pospešeno bitje srca ter epileptične krče. Je sestavina številnih eteričnih olj, med drugim pelina in žajblja, pri živalih deluje kot konvulziv, zmanjša odzivnost na bolečinske dražljaje. Skupaj z eteričnimi olji povzroča splav.



Slika 5: Strukturni formuli α - in β - tujona

2.5.1 Izomera tujona

Poznamo dve obliki tujona, α - in β -, ki skupaj definirata tujon.

2.5.2 Zakonodaja o vsebnosti tujona

Po predpisih Evropske unije je največja dovoljena vrednost α - in β -tujona v prehrabnih izdelkih in brezalkoholnih napitkih 0,5 mg/kg, v alkoholnih pijačah z do 25 vol.% alk. 5 mg/kg in dvakrat toliko v alkoholnih pijačah z več kot 25 vol.% alk. Prehrana iz pripravkov, osnovanih na žajblju, lahko vsebuje 25 mg/kg α - in β -tujona, grenčice pa 35 mg/kg.

2.6 Antioksidativnost

2.6.1 Prosti radikali

Med antioksidante⁶ spadajo vse molekule, ki lahko povsem preprečijo ali vsaj upočasnijo oksidacijo drugih molekul. Pri kemični reakciji oksidacije pride do prenosa elektrona iz ene substance na spojino, ki se oksidira, ali z drugimi besedami reductent. Pri tovrstni reakciji obstaja možnost nastanka prostih radikalov. Med proste radikale spadajo vsi atomi, molekule ali ioni z vsaj enim neparnim elektronom. So zelo reaktivne molekule, ki v telesu sprožijo verižne radikalske reakcije, kar lahko vodi do poškodb celičnih struktur. V telesu lahko delujejo tako endogeno kot tudi eksogeno, reagirajo lahko z DNK, proteini in lipidi. Povzročena škoda v živih celicah lahko povzroči mnoge kronične bolezni, kot so na

⁶ vir 2, 5, 10

primer rak, kap, Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, ateroskleroza, staranje, demenca in druge degenerativne bolezni.

2.6.2 Oksidativni stres

Pojem, ki ga je leta 1978 prvi omenil Fridovich, definiramo kot moteno ravnotežje med nastajanjem reaktivnih kisikovih spojin oziroma prostih radikalov in delovanjem antioksidantov, katerih naloga je nevtraliziranje oksidantov. Kadar je oksidativni stres povečan, to pomeni povišano vsebnost prostih radikalov v celicah in tkivih.

V organizmih so se postopoma razvili neencimski (mikrorudnine, katehini, bioflavonoidi, betakaroteni, vitamini (A, C, E), tioredoksini, glutation) in encimski (glutationska peroksidaza, superoksidna dismutaza, katalaza) antioksidacijski obrambni mehanizmi, da bi preprečili ali vsaj zmanjšali proste radikale.

2.6.3 Delitev antioksidantov

Antioksidante glede na njihov izvor delimo na naravne in sintetične.

V najini raziskovalni nalogi sva odkrivali vsebnost naravnih antioksidantov v različnih rastlinah. Antioksidanti naravnega izvora se najpogosteje nahajajo v rastlinah kot askorbinska kislina, fenolne komponente (tokoferoli, alkoholi, fenolne kisline, flavonoidi) in kartenoidi. Lahko jih zasledimo v katerem koli delu rastline, tako v stebelu, listih, cvetu, plodu kot tudi v semenih.

2.6.4 Vloga antioksidantov

Vloga antioksidantov je preprečitev oksidativnega stresa. Reagirajo s prostimi radikali in jih na ta način nevtralizirajo, saj odstranijo intermediate s prostimi radikali, s tem pa preprečijo oksidacijo drugih molekul. Hkrati s tem pomagajo pri ohranjanju senzoričnih lastnosti (videza, barve, vonja in okusa) snovi, na katero vplivajo.

2.7 Fenolne spojine

Fenolne spojine⁷, znane tudi pod imenom fenilpropanoidi, so ena najbolj razširjenih sekundarnih metabolitov, najdenih v rastlinah. Mednje spadajo tudi fenolne kisline, kot sta benzojska in hidroksicinamična kislina, flavonoidi, stilbenoidi in lignani. V rastlini opravljajo različne naloge. Rastlino ščitijo pred rastlinojedci, patogenimi organizmi in neugodnimi vremenskimi razmerami ter privabljajo opraševalce in raznašalce semena.

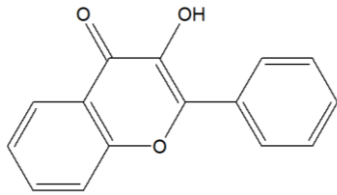
Velika količina fenolnih snovi daje sadju, še posebej nezrelemu, trpek okus. To varuje rastlino pred objedanjem, ko semena še niso popolnoma razvita. Količina sekundarnih metabolitov vpliva na

⁷ vir 19

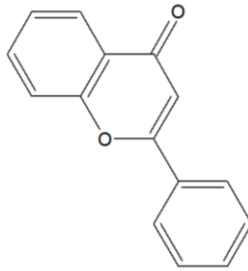
Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin

odpornost na bolezni in škodljivce. Količina fenolnih spojin v tkivih in organih ter med različnimi vrstami, sortami se razlikuje. Nahajajo pa se tudi v predelanih izdelkih, kot so sokovi in vina.

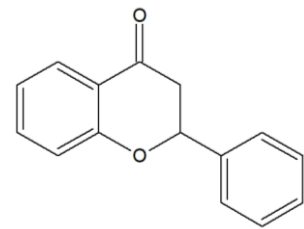
Antioksidativne lastnosti imajo mnogi fenoli, zaradi česar spremenijo redoks stanje v celici. Te spojine ščitijo celice pred oksidativnim stresom, kar preprečuje razvoj bolezni. Nekateri zavirajo ksantin oksidaze in druge encime, ki so vpleteni v proizvodnjo škodljivih spojin. Vezava prehranskih fenolov na receptorje je estrogenska aktivnost številnih izoflavonov in sorodnih molekul, ki je ena najpomembnejših učinkovin. Molekule se vežejo na estrogenske receptorje ter jih tako aktivirajo.



flavonol



flavon



flavonon

Slika 6: Strukturne formule nekaterih fenolnih spojin v rastlinah

3. METODE DE LA

3.1 Seznam laboratorijske opreme, pripomočkov in materialov

Laboratorijski inventar:

- kapalka
- steklena paličica
- avtomatske pipete
- čaša
- merilne bučke
- kivete
- analitska tehtnica
- Soxlet ekstraktor
- rotavapor
- IRAffinity-1S
- Spektrofotometer.

Pripomočki:

- aluminijasta folija
- tulec
- vata.

Kemikalije:

- etanol
- metanol
- heksan
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)
- Folin-Ciocalteujev reagent
- natrijev (V) karbonat (Na_2CO_3)
- galna kislina.

Vzorci rastlin:

- navadni pelin – čaj, kupljen v trgovini,
- sladki pelin – posušeni listi, cvetovi in stebela dobljeni od pridelovalca Deana Korpiča,
- žajbelj – čaj, kupljen v trgovini,
- konoplja – posušeni listi, dobljeni od pridelovalca Igorja Makoterja.

3.2 Ekstrakcija

3.2.1 Ekstrakt

Med ekstrakte uvrščamo trdne (suhe ekstrakte), poltrdne (goste ekstrakte in oljne smole) ali tekoče (tekoči ekstrakti in tinkture) pripravke, pridobljene iz živalskih materialov ali rastlinskih drog, običajno posušenih. Za najino raziskovanje sva pripravljali ekstrakte, pri katerih smo odstranili topila.

3.2.2 Topila

V raziskovalni nalogi smo uporabili za topilo etanol, s katerim smo naredili po dve ekstrakciji za vsako rastlino, in heksan, s katerim smo naredili eno ekstrakcijo za vsako rastlino.

Etanol⁸, tudi etilni alkohol, s kemijsko formulo C_2H_5OH je brezbarvna, gorljiva tekočina in osnova alkoholnih pijač. Molekulska masa EtOH je 46,07 g/mol, pri 293 K ima gostoto 0,79 g/cm³, pri 101,31 kPa ima tališče pri 129 K, vrelišče pa pri 351 K. Pri najinem eksperimentu smo ga uporabili kot polarno topilo.

Heksan je nasičen alkan z molekulsko formulo C_6H_{14} . Pri običajnih reakcijskih pogojih je reaktivna spojina, ki se meša z vodo v vseh razmerjih. Njegova molekulska masa je 86,172 g/mol, gostota pa 655 kg/m³, pri 341 K ima vrelišče. Pri eksperimentu smo ga uporabili kot nepolarno topilo.

3.2.3 Ekstrakcija po Soxhletu

Najprej smo dali v tulce suhe rastline. Za to smo uporabili posušene dele rastlin. Tako pripravljene tulce smo dali v Soxhletov aparat in začeli z ekstrakcijo.



Slika 7: Pripravljene tulci pred izvedbo Soxhlet ekstrakcije

⁸ vir 13

Soxhlet ekstrakcijo smo izvedli s pomočjo Soxhletovega aparata, s katerim smo iz zmletih trdih delcev dobili ekstrakt. Aparat sestavljajo: destilirka, povratni hladilnik in cilindrični del. Ekstrakcijo smo izvedli pri malo višji temperaturi od vrelišča topila. Z etanolom smo reakcijo izvedli pri 353 K. V bučki, ki smo jo zaradi čim manjše toplotne izgube pokrili z aluminijasto folijo, se je na vodni kopeli segrevalo topilo. Pare so po cevi potovale do hladilnika, kjer je potekla kondenzacija in je čisto topilo kapljalo na zmes v filtrirnem papirju. V ekstrakcijski komori se je zbiral ekstrakt. Ko je bila ekstrakcijska komora z raztopino napolnjena do višine odtoka, je ta stekla po principu natege nazaj v bučko. V bučki se je nabirala ekstrahirana spojina, v filtrirnem papirju pa netopne primesi. Reakcija je potekala tako dolgo, da so potekali 4 cikli ekstrakcije, torej približno pet ur.



Slika 8: Soxhletov aparat v šolskem laboratoriju

3.2.4 Ločevanje z rotavaporjem

Topilo smo po končani Soxhlet ekstrakciji od ekstrakta ločili z rotavaporjem. Takrat smo postopek izvajali pri nižji temperaturi (323-333 K) kot pri ekstrakciji po Soxhletu. S pomočjo vrtenja se je povečala površina vzorca in na ta način se je izboljšal prenos toplote. Preko vakuumske črpalke smo dovajali še podtlak. Ločitev je potekala vse do popolne ločitve topila od topljenca, torej nastanka ekstrakta, ki ni vseboval ostankov topila.



Slika 10: Ločitev z rotavaporjem v šolskem laboratoriju



Slika 9: Ekstrakt po odparitvi topila

3.3 Preverjanje prisotnosti tujona v rastlinah

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg vzorca ter ga razredčili do oznake z metanolom. Vzorec smo dobro premešali in dali na ultrazvočno kopel, da se je ekstrakt raztopil.

Prisotnost tujona smo želeli dokazati z merjenjem absorbance z napravo Cary 50 verzija 3.00 pri valovni dolžini 273 nm. Ta metoda se je izkazala za neučinkovito, saj je napravo motila zelena barva pripravljenih vzorcev rastlin. Zaradi tega so bili rezultati vseh meritev zelo podobni. To je vodilo v odločitev za uporabo metode ATR-IR spektroskopije, s katero smo preverjali prisotnost tujona v ekstraktih, pripravljenih s polarnim topilom in nato še z nepolarnim topilom.

3.3.1 ATR-IR spektroskopija

Infrardeča (IR) spektroskopija je ena najpomembnejših in hkrati najpogosteje uporabljenih analitskih metod, s katero se lahko razloži kemijska struktura snovi in določijo njene funkcionalne skupine. Infrardeča spektroskopija se primarno uporablja kot kvalitativna tehnika za določanje in preverjanje čistih snovi. Spektre z visoko intenziteto dodatno zagotavlja tudi prodorna globina IR-žarkov, ki znaša nekaj μm . V tem primeru se IR-žarki ne odbijejo samo od površine vlaken, temveč prodrejo skozi vlakno, kar še dodatno ojača signal.

V tujonu so prisotne vezi med atomi ogljika in vodika (C-H vez) v alkanih, vezanih na obroč in v obroču ter vezi med atomi ogljika in kisika (C=O vez), ki je kot funkcionalna skupina vezana na obroč.

Absorpcijska vrednost za keton (karbonilno skupino) se pojavi med 1655 in 1760 cm^{-1} . Drug, relativno močan signal, lahko pričakujemo tudi med 2850 in 2965 cm^{-1} , kar kaže na C-H vez.

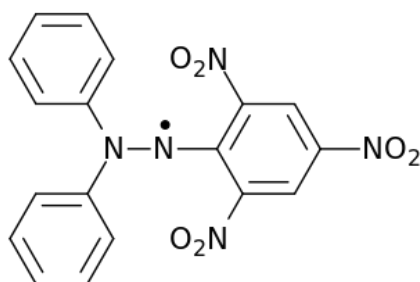
Absorpcijske vrednosti smo merili v ekstraktih z napravo IRAffinity-1S.



Slika 11: Merjenje absorpcijskih vrednosti z IRAffinity-1S na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor

3.4 Metoda DPPH za določanje antioksidativne aktivnosti

Za določanje antioksidativnih⁹ lastnosti tujonovega ekstrakta smo uporabili metodo DPPH. Prvi je tovrstno metodo za določanje antioksidativnega potenciala s prostim radikalom DPPH predstavil Marsden Blois na Univerzi Stanford. Kot modelni antioksidant je uporabil cisten, ta metoda spada med eno izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativnega potenciala.



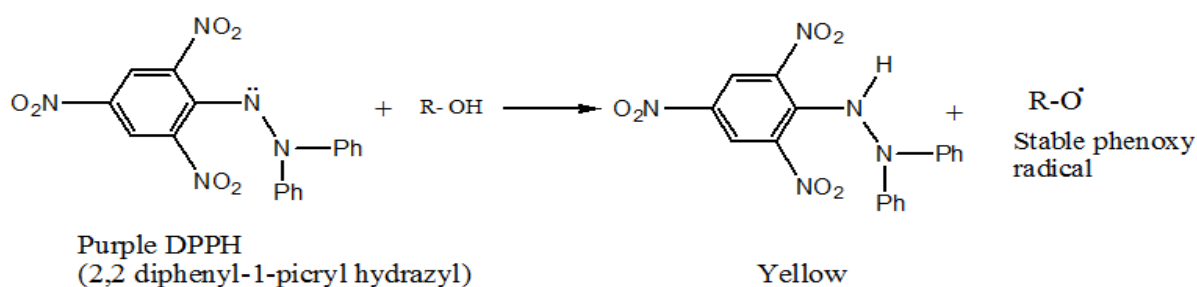
Slika 12: Skeletna formula DPPH

Z okrajšavo DPPH označujemo organsko kemijsko spojino 2,2-difenil-1-pikrylhidrazil. Kristalni prah temne barve sestavljajo stabilne molekule prostih radikalov. Pri uporabi v laboratorijskih raziskavah ima dve glavni vlogi: ena je nadzor kemijskih reakcij, ki vključujejo radikale, predvsem je to skupni

⁹ vir 8

antioksidativni test in drugi je standard položaja in intenzitete elektronskih paramagnetnih resonančnih signalov.

DPPH je poleg tega, da je dobro znan radikal, tudi "čistilec" za druge radikale. Zmanjšanje hitrosti kemijske reakcije po dodatku DPPH zato lahko uporabimo kot pokazatelj radikalne narave te reakcije. Omenjen prosti radikal je stabilen in zaradi delokalizacije prostega elektrona okoli molekule le-ta za razliko od mnogih drugih radikalov ne tvori dimer. Zaradi delokalizacije se raztopina DPPH obarva močno vijolično. Absorpcijski maksimum je pri valovnih dolžinah približno 520 nm. Ob mešanju raztopine in snovi, ki lahko odda vodikov atom, nastane reducirana oblika molekule difenilpikrilhidrazin (DPPH₂), raztopina pa se razbarva v brezbarvno ali blede rumeno barvo. Razbarvanje je posledica prisotnosti pikrilne skupine. Zaradi te lastnosti lahko reakcijo spremljamo vizualno, število začetnih radikalov pa lahko računamo na podlagi spremembe optične absorpcije pri 520 nm ali iz EPR-signala DPPH. Pomembno je še poudariti, da je pred izvedbo potrebno odstraniti anorganske ione nizkih valenc.

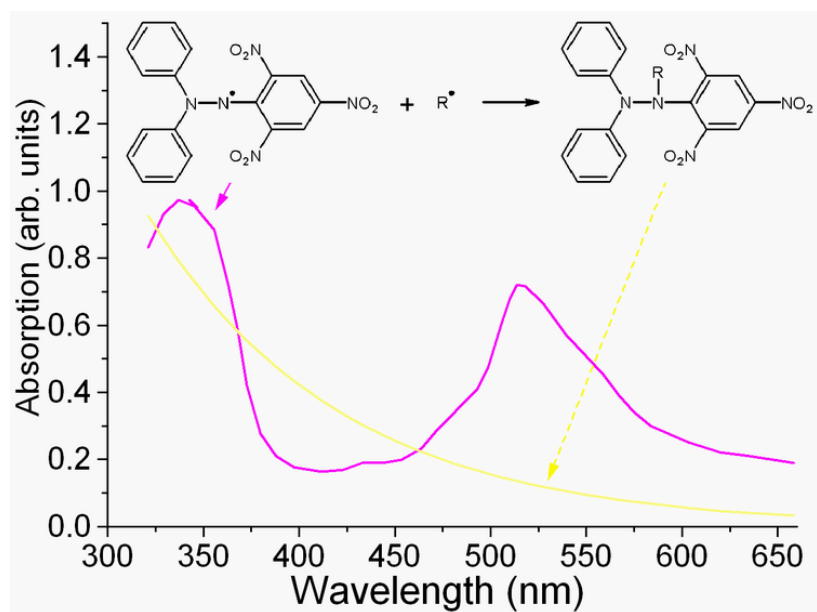


Slika 13: Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila (DPPH) (levo) in difenilpikrilhidrazina (DPPH₂, reducirana oblika) (desno)

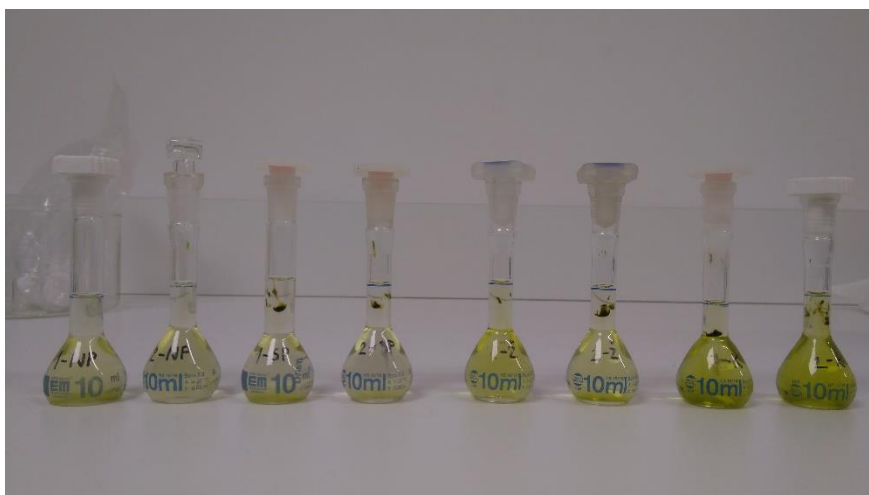
Metoda je zelo pogosto uporabljena za določanje antioksidativnega potenciala posameznih spojin in njihovih zmesi, saj je hitra, enostavna in hkrati poceni. Bistvo reakcije je spektrometrično merjenje spremembe koncentracije DPPH. Posledica reakcije med antioksidantom in radikalom DPPH je zmanjšanje koncentracije DPPH. V proučevalnem sistemu merilo za antioksidativni potencial določene spojine predstavlja količina preostalega DPPH¹⁰.

¹⁰ vir 4

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



Graf 1: Spremembe v absorpcijskem spektru (od vijolične do rumene) v reakcijah DPPH z radikali reducenti



Slika 14: Nepremešani vzorci, razredčeni z metanolom

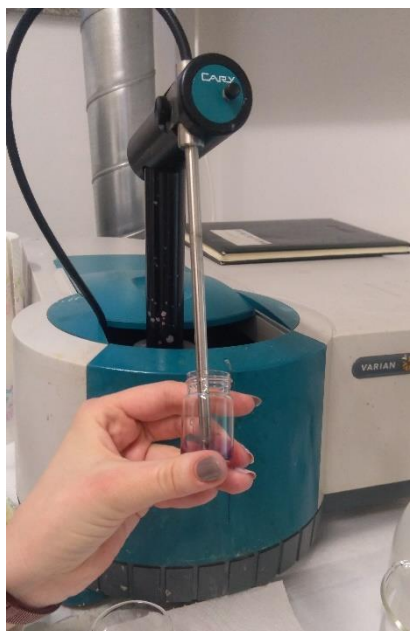
Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin

V 10 mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg vzorca ter ga razredčili do oznake z metanolom. Vzorec smo dobro premešali in dali na ultrazvočno kopel, da se je ekstrakt raztopil. Pripravili smo tudi 6×10^{-5} M raztopino DPPH v metanolu. V temno stekleničko smo odpipetirali 3 mL raztopine DPPH in 77 μ L raztopine ekstrakta, zmešali ter tako pripravljen vzorec termostatirali 15 min pri sobni temperaturi v temnem prostoru. Nato smo izmerili absorbanco raztopine pri 515 nm. Referenčno raztopino smo pripravili enako kot vzorec, le da smo namesto raztopine vzorca odpipetirali 77 μ L metanola in absorbanco raztopine izmerili takoj. Antioksidativna aktivnost vzorca je podana kot % inhibicije glede na referenčno raztopino in smo jo izračunali po enačbi:

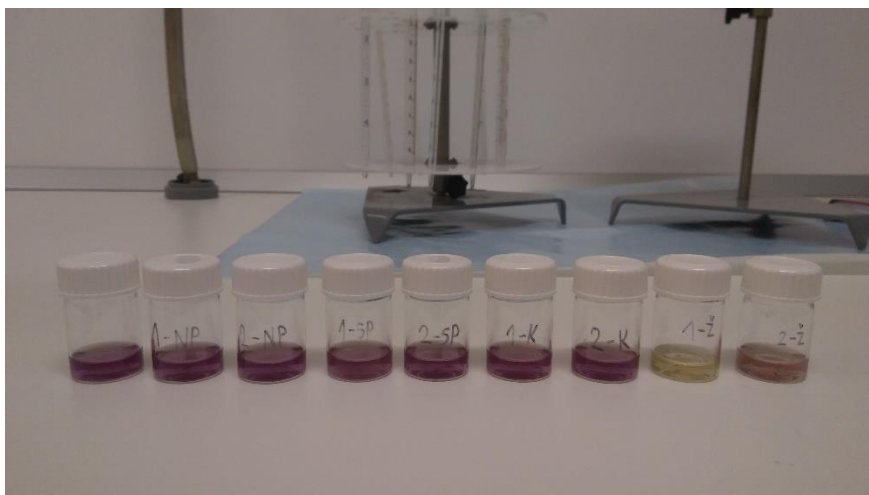
$$\% \text{ inhibicije} = \left(\frac{A_{0c} - A_{15s}}{A_{0c}} \right) \cdot 100$$

Kjer je A_{0c} absorbanca referenčne raztopine v času 0 min,

A_{15s} absorbanca raztopine vzorca v času 15 min.



Slika 15: Meritev absorbance referenčne raztopine



Slika 16: Termostatirane razbarvane raztopine po meritvi absorbance

3.5 Določanje skupnih fenolnih spojin v ekstraktih

3.5.1 Umeritvena premica z galno kislino

V pet 10 mL merilnih bučk smo s pomočjo 10 mL pipete odpipetirali naslednje prostornine osnovne raztopine galne kisline: 0,65 mL (bučka z oznako 1); 2,50 mL (bučka z oznako 2); 3,75 mL (bučka z oznako 3); 5,00 mL (bučka z oznako 4); in 7,5 mL (bučka z oznako 5) ter do meniskusa dopolnili bučke z destilirano vodo in dobro premešali. Tako smo pripravili standardne raztopine z naslednjimi koncentracijami:

Tabela 1: Koncentracije standardnih raztopin galne kisline (GA)

Standardna raztopina	Koncentracija GA (mg/L)
1	50
2	200
3	300
4	400
5	600
6	800

V 10 mL merilne bučke smo s pomočjo mikropipete dodali 0,1 mL GA-raztopine ter s pomočjo birete še 0,5 mL FCR-raztopine in po 5–8 minutah 1,5 mL 20 %-raztopine Na_2CO_3 . Vsebino smo rahlo pretresli in z destilirano vodo dopolnili do oznake 10 mL. Nato smo bučke ovili z aluminijasto folijo in jih 120 min pustili na sobni temperaturi. Nato smo izvedli meritev absorbance pri valovni dolžini

maksimalne absorbcije – 754 nm¹¹. Na osnovi teh meritev smo izrisali graf (*Abs*) v odvisnosti od koncentracije GA (mg/L). Na podlagi izrisanega grafa smo izračunali enačbo premice, s katero smo nato izračunali, koliko skupnih fenolnih spojin vsebuje posamezen ekstrakt, izraženo kot ekvivalent galne kisline/L (mg EGK/L).

3.5.2 Določanje vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih

Vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih smo določili po istem postopku kot za galno kislino. V 10 mL bučke smo odmerili 0,1 mL ekstrakta, z bireto dodali približno 0,6 mL destilirane vode, nato dodali 0,5 mL Folin-Ciocalteujevega reagenta (razredčenega v razmerju 1 : 3) in v časovnem intervalu med 30 sekund in 8 minut dodali še 1,5 mL 20 %-raztopine Na₂CO₃. Raztopino smo premešali, dopolnili do oznake z destilirano vodo in pustili stati na sobni temperaturi 120 min. Po pretečenem času smo raztopine ponovno premešali, nalili v kivete in izmerili njihovo absorbanco pri 754 nm valovne dolžine. Poleg tega smo izmerili tudi absorbanco kontrolne raztopine, pripravljene na enak način, vendar brez dodanega vzorca.

3.5.3 Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih navadnega pelina, sladkega pelina, konoplje in žajblja

Izmerjeno absorbanco standardnih raztopin galne kisline pri λ_{754} prikazujemo v sledeči preglednici, s spodaj narisanim grafom pa odvisnost absorbanco vzorcev galne kisline od njihove koncentracije.



Slika 17: Pripravljene raztopine pred merjenjem absorbanco

¹¹ To je valovna dolžina, pri kateri je spektrometer kazal najvišjo absorbanco. Literatura sicer navaja 760 nm. Proizvajalec opreme navaja, da se natančnost meritev v tem območju giblje med +- 7 nm, zato smo predpostavili, da izbira λ_{max} pri 754 ne bo odločilno vplivala na natančnost naših rezultatov.

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



Slika 18: Merjenje absorbance vzorcev v šolskem laboratoriju

4. MERITVE

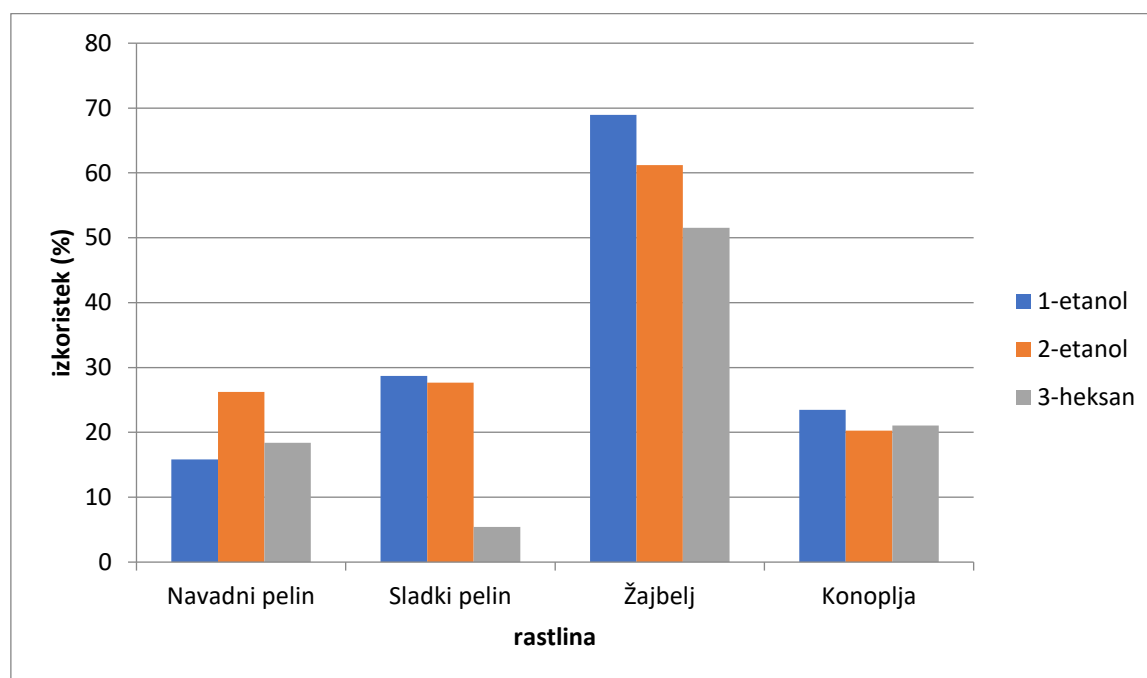
4.1 Izkoristki ekstraktov

Vsak dan smo izvedli eno ekstrakcijo po Soxhletu. Naredili smo dve ekstrakciji z etanolom in eno z heksanom z vsako rastlino. Skupaj smo izvedli 12 ekstraktov.

Tabela 2: Zbrani podatki vseh ekstraktov in njihovih izkoristkov

Vzorec ID	Topilo	Masa topila (g)	Masa suhega materiala (g)	Masa prazne bučke (g)	Masa bučke z ekstraktom (g)	Masa ekstrakta (g)	Izkoristek (%)
1-NP	EtOH	100	5,57	128,6237	129,5068	0,8831	15,85
2-NP	EtOH	100	5,35	128,7007	130,1048	1,4041	26,24
1-SP	EtOH	100	3,20	130,0435	130,9622	0,9187	28,71
2-SP	EtOH	100	3,10	130,0434	130,9005	0,8571	27,65
1-Ž	EtOH	100	4,46	128,6244	131,7000	3,0756	68,95
2-Ž	EtOH	100	4,17	130,0432	132,5956	2,5524	61,21
1-K	EtOH	100	3,52	128,6278	129,4531	0,8253	23,45
2-K	EtOH	100	3,88	130,0421	130,8291	0,7870	20,28
3-NP	heksan	100	5,81	130,1172	131,1852	1,068	18,38
3-SP	heksan	100	4,94	130,0464	130,3145	0,2681	5,43
3-Ž	heksan	100	4,40	130,0392	132,3080	2,2688	51,56
3-K	heksan	100	4,60	128,0188	128,9872	0,9684	21,05

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



Graf 2: Izkoristki vseh ekstrakcij

Prvi dve ekstrakciji za vsako rastlino smo naredili s polarnim topilom in vzorce označili s številka 1 in 2, kjer je 1 prva ekstrakcija ter 2 druga ekstrakcija. S številko 3 smo označili vzorce, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo z nepolarnim topilom.

NP – navadni pelin

SP – sladki pelin

Ž – žajbelj

K – konoplja

Največji izkoristek ekstrakcij je pri žajblju, relativno visok izkoristek je tudi pri sladkem pelinu, vendar samo v vzorcih 1-SP in 2-SP. Izkoristki ekstrakcij pri vseh rastlinah pa so bistveno nižji pri ekstrakcijah, opravljenih s heksanom kot z etanolom.

4.2 Vsebnost tujona v rastlini

Najprej smo poskusili dokazati tujon v rastlinah s pomočjo naprave Cary 50 verzije 3. 00. Dobili smo naslednje meritve. Še pred tem smo izdelali umeritveno krivuljo za tujon v metanolu.

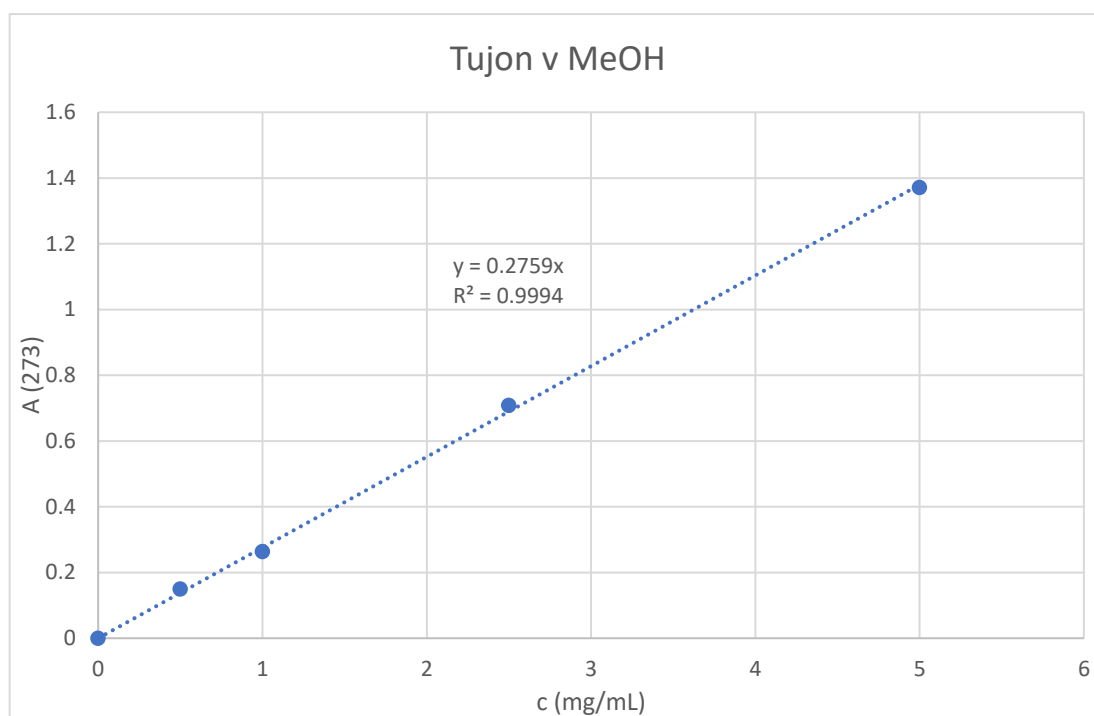
Tabela 3: Podatki za umeritveno premico tujona v metanolu

C = 10 mg/mL

V	c (mg/mL)	A (273 nm)
0,5	0,5	0,1503
1	1	0,2635

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin

2,5	2,5	0,7086
5	5	1,3711



Graf 3: Umeritvena premica za tujon v metanolu

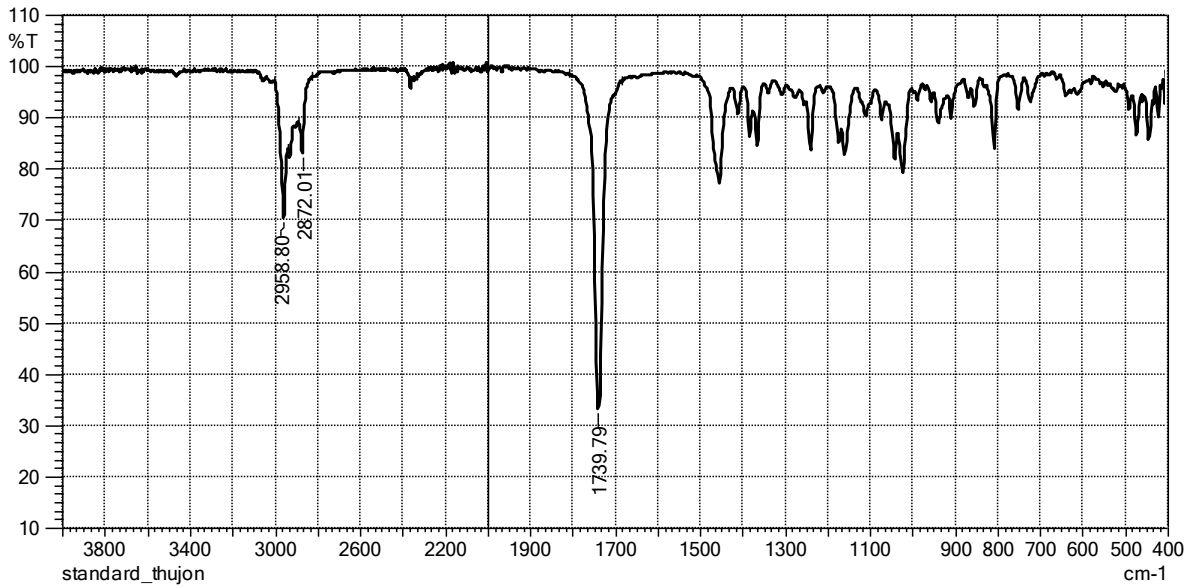
Tabela 4: Absorbanca vzorcev pri λ_{273} nm

Vzorec	Absorbanca pri λ_{273} nm
1-NP	2,5356
	2,4789
	2,4717
	2,3895
	2,4667
2-NP	2,3219
	2,3739
	2,3031
	2,2859
	2,3163
1-SP	2,5060
	2,4714
	2,4688

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin

	2,4763
	2,4056
2-SP	ni bilo opravljene meritve
1-Ž	2,4521
	2,5597
	2,4984
	2,4315
	2,4570
2-Ž	2,4628
	2,4650
	2,4572
	2,4570
	2,5759
1-K	2,5693
	2,4476
	2,4831
	2,3892
	2,391
2-K	2,4101
	2,4443
	2,4449
	2,5677
	2,5596

Ker so podatki zelo podobni, iz njih ni mogoče izpeljati nobenega sklepa o prisotnosti tujona v rastlinah. Predvidevamo, da je napravo motila zelena barva raztopin ekstraktov. Po tem smo izvedli še ATR-IR spektroskopijo, s katero smo dobili naslednje rezultate.

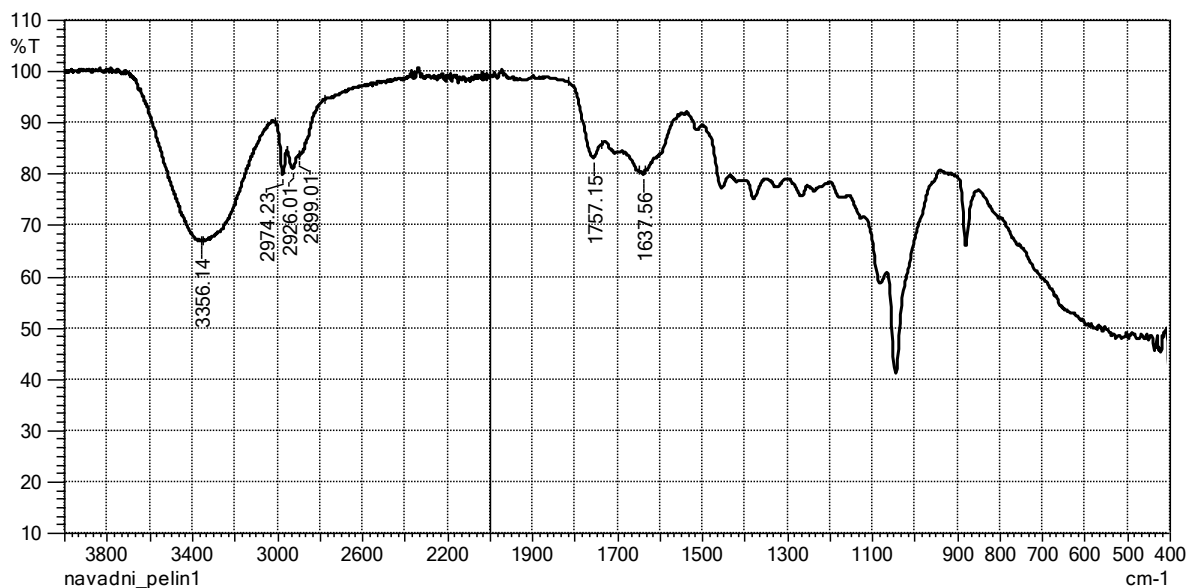


Graf 4: Absorpcija standardnega tujona

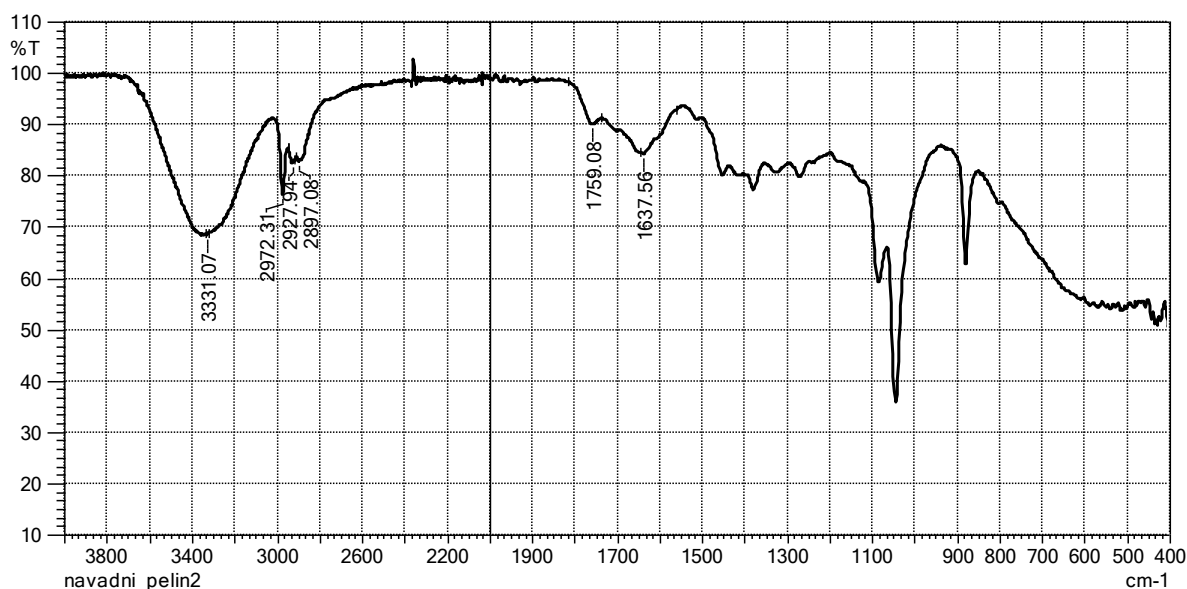
Z ATR-IR spektroskopijo smo najprej izmerili absorpcijo standardnega tujona. Najbolj izstopajoči valovi so bili pri 2958,80; 2872,01, ki so značilni za C-H vez in 1739,79 cm^{-1} , kar pripisemo karbonilni skupini. Ob prisotnosti tujona bi morali spektri vsebovati vse te vrhove. Le-te smo potem iskali pri naslednjih meritvah pripravljenih vzorcev.

Prvič smo uporabili ekstrakte, ki smo jih naredili s topilom etanol.

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



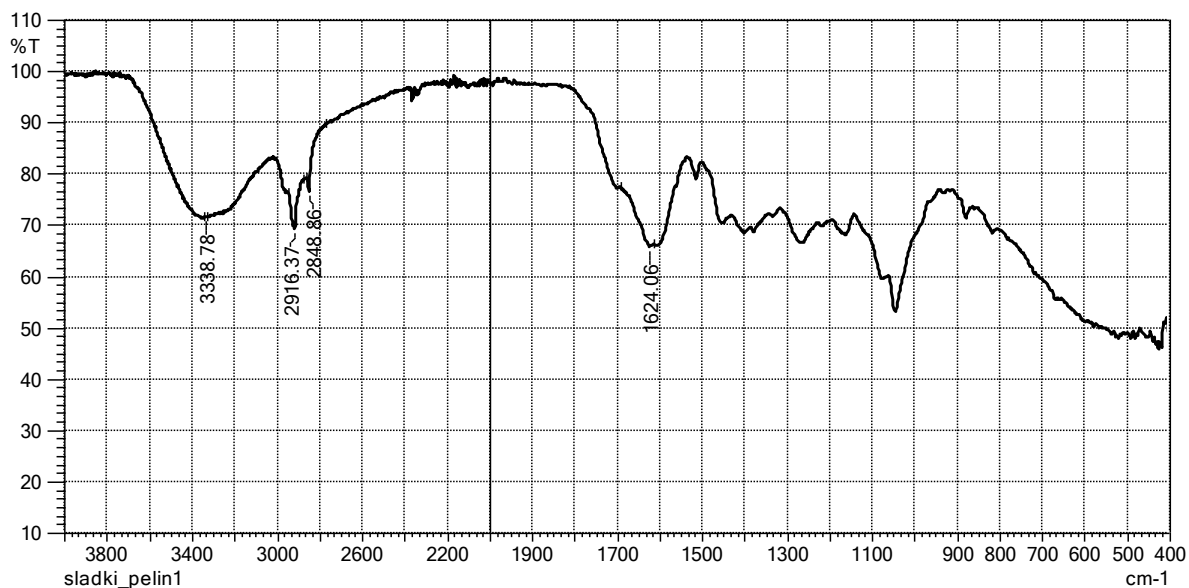
Graf 5: Absorpcija prvega vzorca navadnega pelina v etanolu



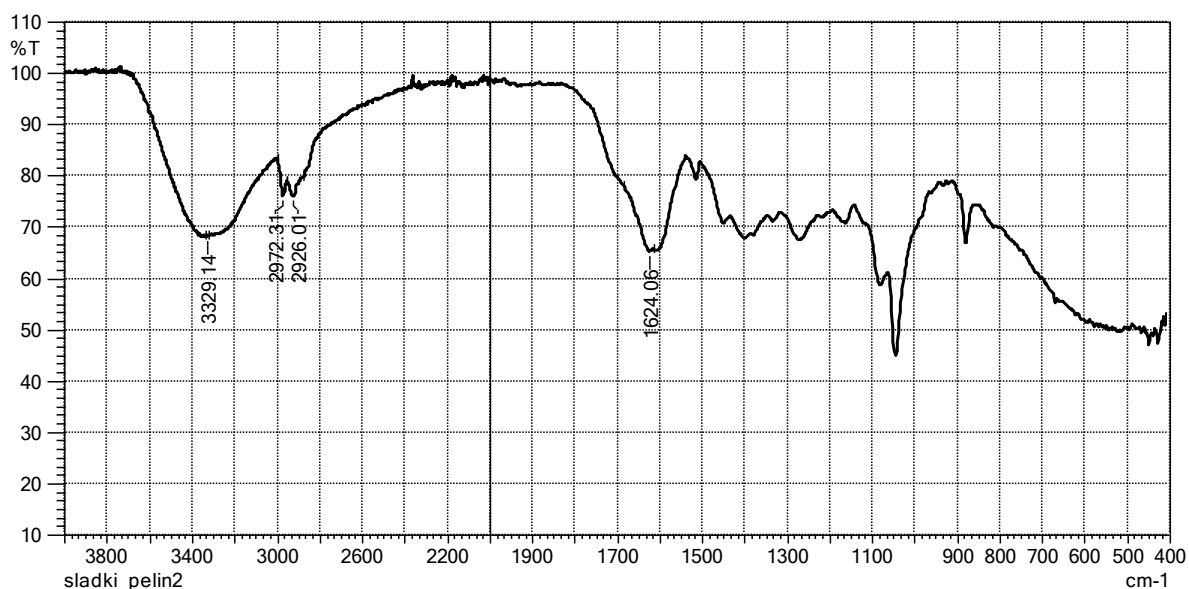
Graf 6: Absorpcija drugega vzorca navadnega pelina v etanolu

Grafa prikazujeta absorpcijo navadnega pelina. Prvi prikazuje meritve vzorca 1-NP, drugi pa 2-NP. Oba imata izmerjenih 6 močnih vrhov. Izmed teh so trije pri vsakem primerljivi z značilnimi valovi tujona. Le-ti se gibljejo od 2897,08 do 2974,23 cm⁻¹ in kažejo na prisotnost C-H vezi, medtem ko vrha, značilnega za karbonilno skupino, ni, iz česar sklepamo, da tujon v našem ekstraktu ni prisoten.

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



Graf 7: Absorpcija prvega vzorca sladkega pelina v etanolu



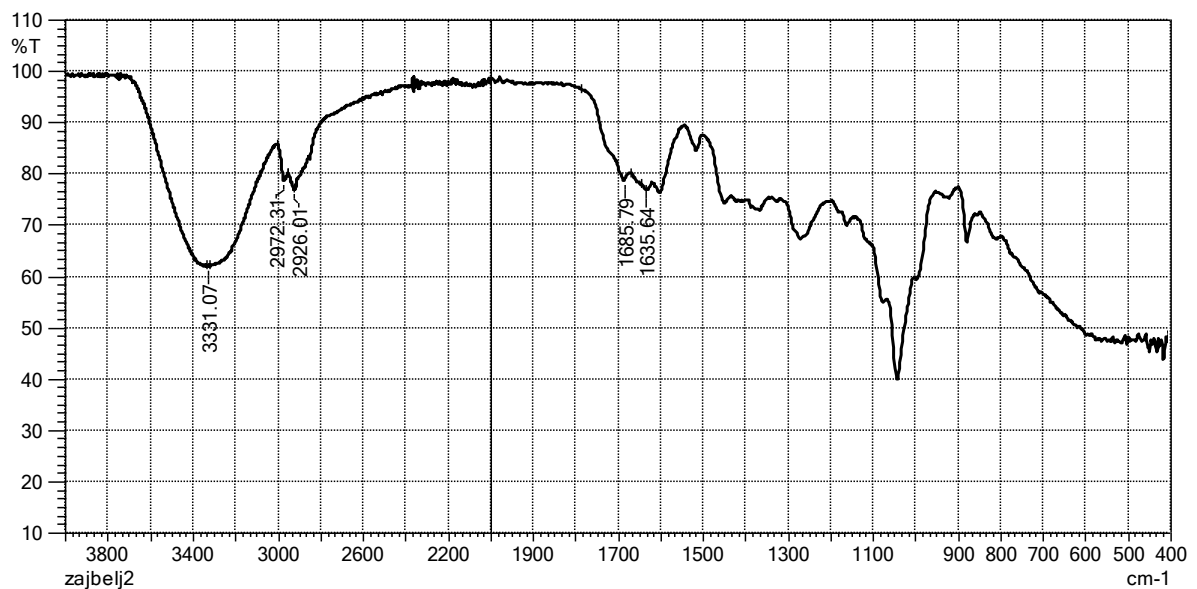
Graf 8: Absorpcija drugega vzorca sladkega pelina v etanolu

Zgornja grafa prikazujeta meritve, opravljene na vzorcih sladkega pelina, 1-SP in 2-SP. Tudi tu, podobno kot pri navadnem pelinu, se najmočnejši vrhovi, primerljivi s tujonom, gibljejo od 2916,37 do 2972,31 cm⁻¹, značilni za vezi C-H, vrhov, značilnih za C=O, pa ni, torej tudi tujona ni.

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



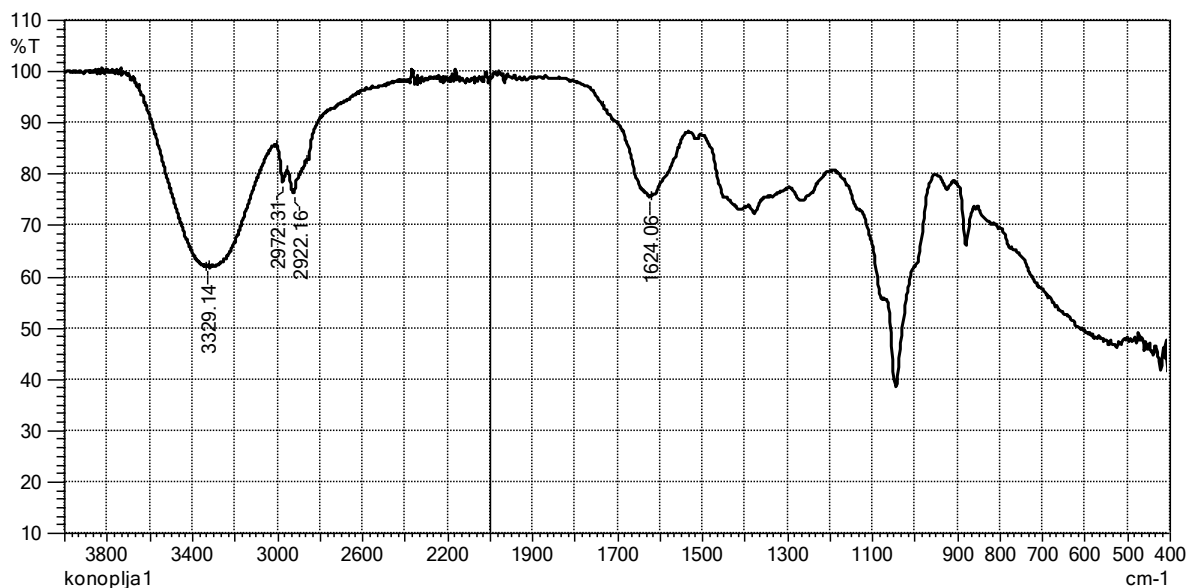
Graf 9: Absorpcija prvega vzorca žajblja v etanolu



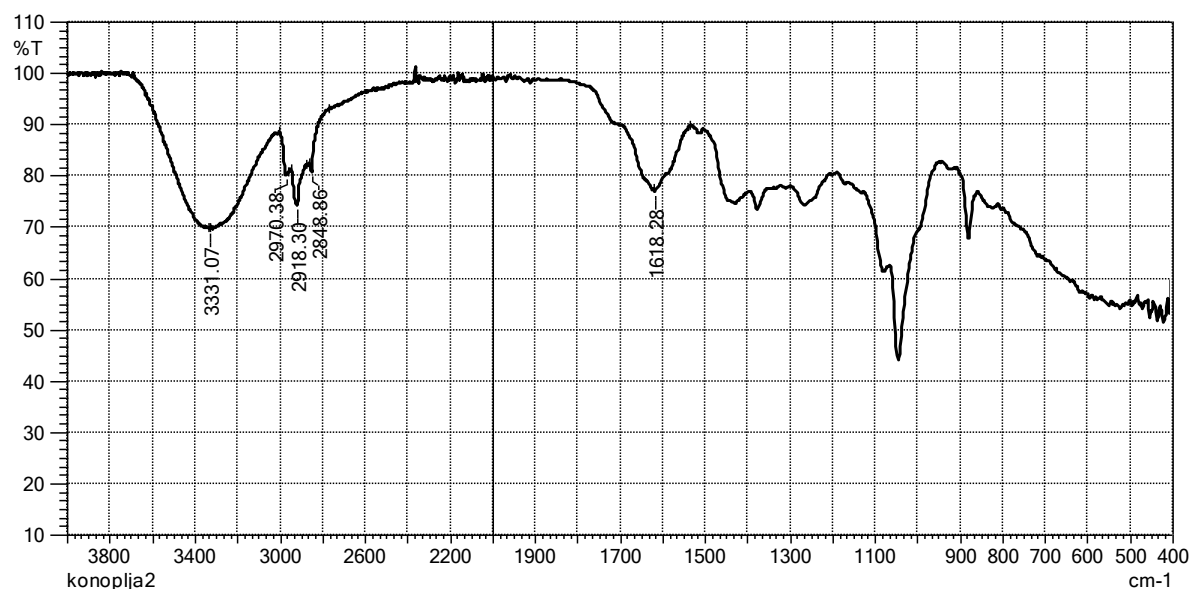
Graf 10: Absorpcija drugega vzorca žajblja v etanolu

V vzorcih žajblja 1-Ž in 2-Ž je bilo zaznanih pet močnih valov, med katerimi tudi ni valov nad 1700 cm⁻¹. To dejstvo nas je presenetilo, saj smo v ekstraktih žajblja pričakovali prisotnost tujona. Na osnovi formule tujona sklepamo, da je le-ta netopen v polarnih topilih in ga zato nismo zaznali v ekstraktu, dobljenem z etanolom.

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



Graf 11: Absorpcija prvega vzorca konoplje v etanolu



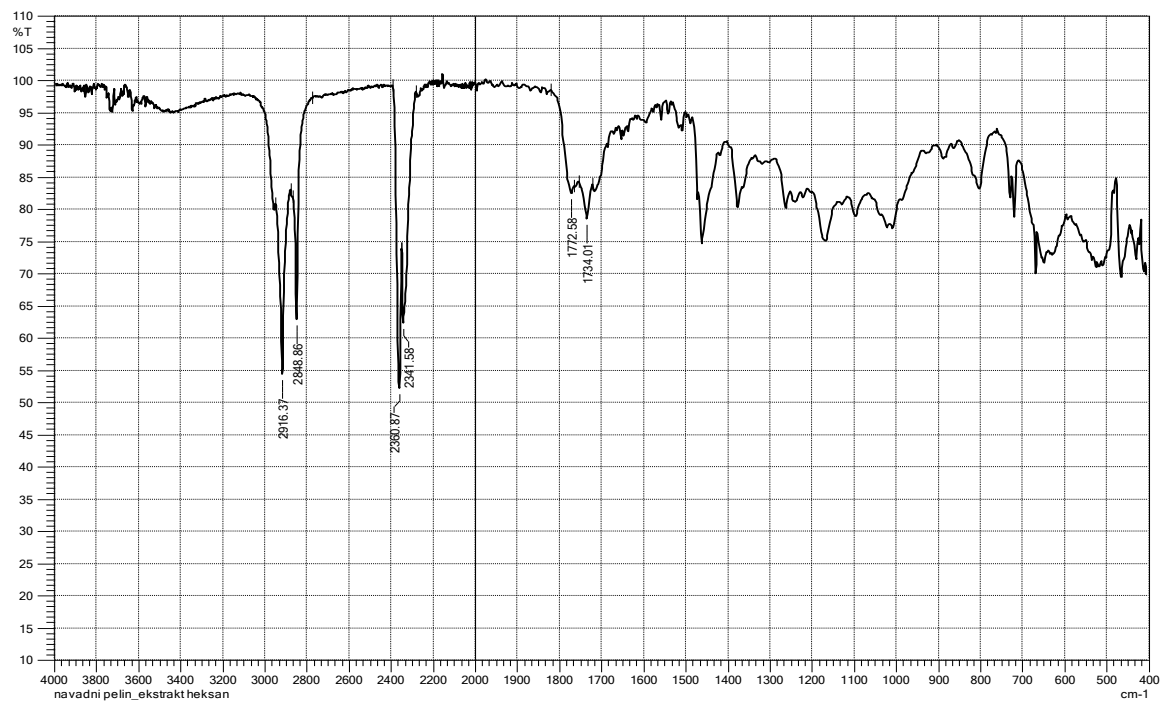
Graf 12: Absorpcija prvega vzorca konoplje v etanolu

V obeh vzorcih konoplje, 1-K in 2-K, so bili zaznani vrhovi, podobno kot v ostalih vzorcih, torej med 2848,86 in 2970,38 cm^{-1} , kar ponovno potrjuje prisotnost vezi C-H, vrha, značilnega za karbonilno skupino, pa ni bilo.

Niti v enem vzorcu torej ni bilo vseh vrhov, značilnih za tujon. Največ je bilo valov z izmerjeno dolžino nad 2800 in 2900 cm^{-1} , vendar nobena meritev ni pokazala vala nad 1700 cm^{-1} .

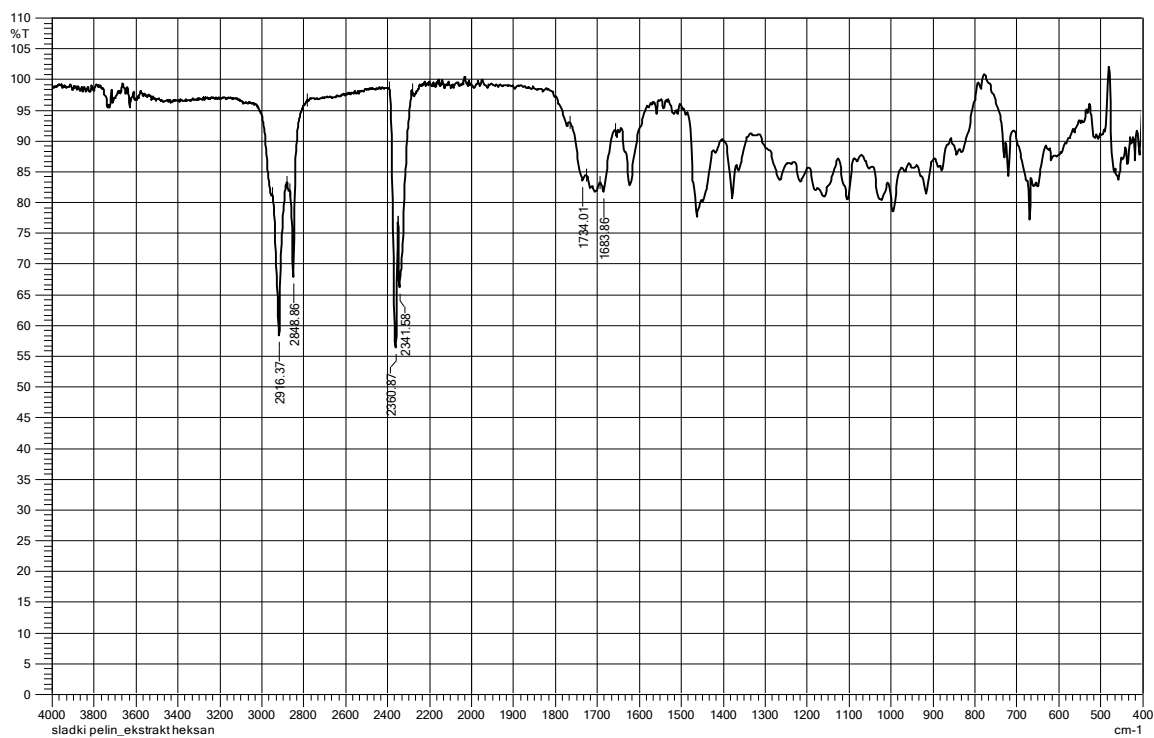
Odločili smo se ponoviti ekstrakcijo in meritve z uporabo nepolarnega topila. Uporabili smo heksan.

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin



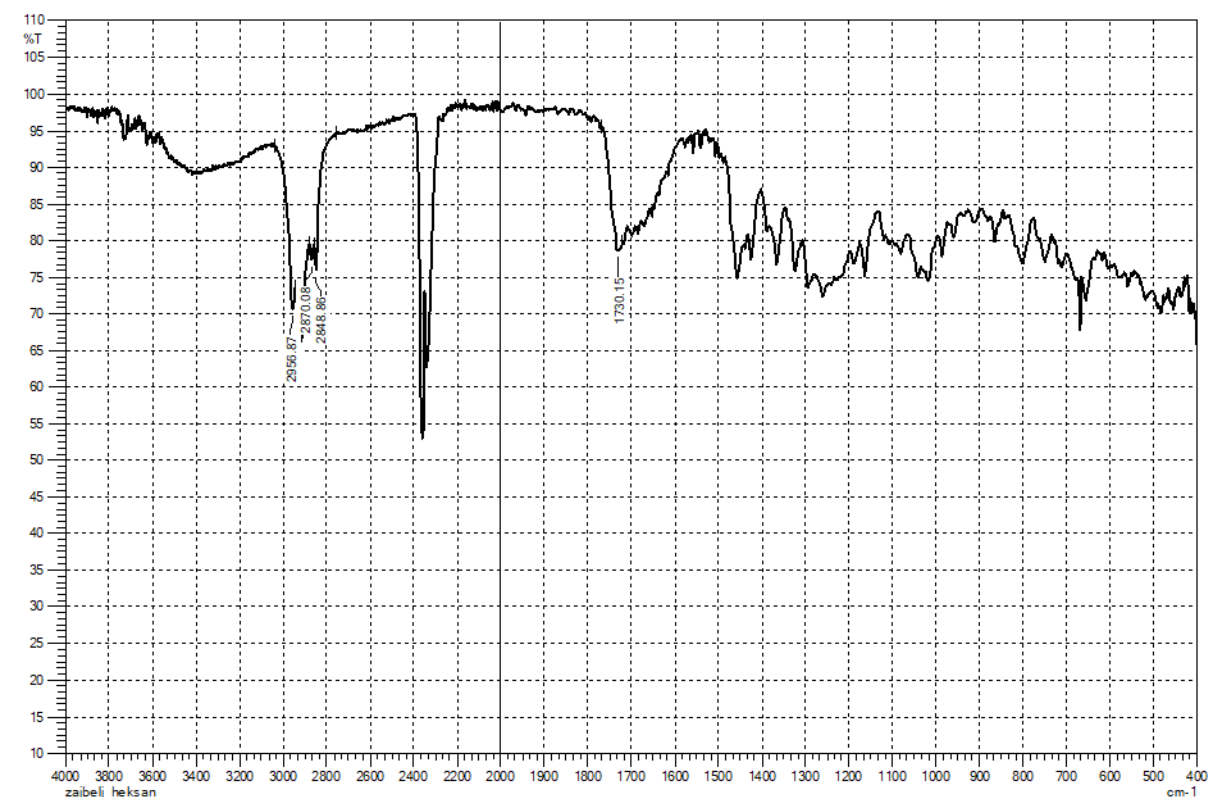
Graf 13: Absorpcija vzorca navadnega pelina v heksanu

Meritev absorpcije navadnega pelina, pripravljene z ekstrakcijo s heksanom, je pokazala tri valove, podobne tujonovim. To so 2916,37; 2848,86 in 1734,01 cm⁻¹, zato sklepamo, da je v vzorcu prisoten tujon.



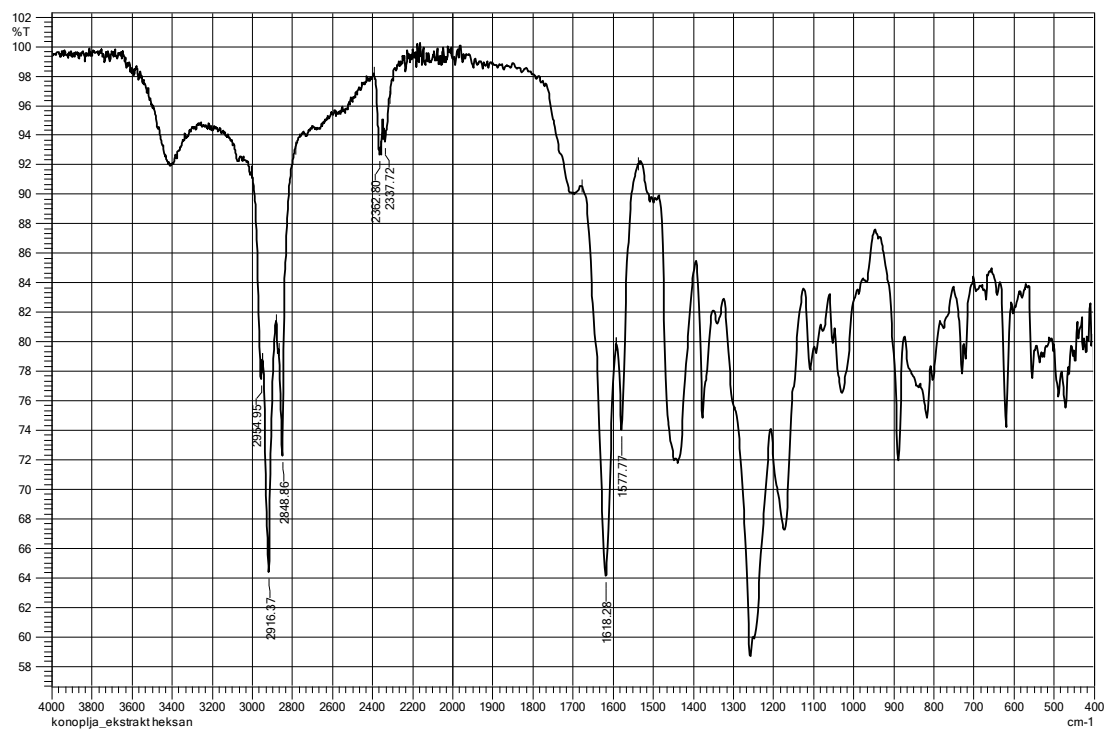
Graf 14: Absorpcija vzorca sladkega pelina v heksanu

Graf sladkega pelina je zelo podoben grafu navadnega pelina. Tudi tukaj najdemo vse vrhove značilne za tujon. Razlika je le ta, da je pri navadnem pelinu pik 1740 cm^{-1} izrazitejši kot pri sladkem pelinu, kar se vidi na IR spektru. Zato je v navadnem pelinu več tujona kot v sladkem pelinu.



Graf 15: Absorpcija vzorca žajblja v heksanu

V grafu žajblja so prisotni vsi karakteristični piki za tujon. Graf je še najbolj podoben grafu navadnega pelina, torej vsebujeta podobno količino tujona, ki pa je večja kot v sladkem pelinu, saj so tam piki veliko manj izraziti.



Graf 16: Absorpcija vzorca konoplje v heksanu

Na grafu konoplje je vidno, da je veliko izmerjenih vrhov, podobne najdemo pri dolžinah, značilnih za C-H vez, tistih s karbonilno skupino pa ni, torej sklepamo, da tujon ni prisoten.

V vseh vzorcih se je pokazal močan signal med 2850 in 2965 cm^{-1} , kar kaže na vez med ogljikovim in vodikovim atomom. Glede na to, da vse rastline vsebujejo organske spojine, je jasno, da se ti piki pojavljajo v vseh testiranih ekstraktih. Signal za keton pa se pojavi med 1655 in 1760 cm^{-1} . Ta signal se je prikazal pri treh rastlinah, navadnem in sladkem pelinu ter žajblju. V vseh treh primerih so bili piki majhni, iz česar sklepamo, da je prisotne karbonilne skupine malo. Le pri konoplji tega značilnega pika ni bilo.

4.3 Vsebnost antioksidativnih učinkovin v rastlini

Tabela 5: Absorbance referenčne raztopine in raztopin vzorcev

A_c^0	A_s^{15}
0,7629	1-NP: 0,6420
	2-NP: 0,6302
	1-SP: 0,5991
	2-SP: 0,6041

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin

	1-K: 0,6424
	2-K: 0,6271
	1-Ž: 0,1142
	2-Ž: 0,3053

V tabeli je na desni strani prikazana absorbanca referenčne raztopine v času 0 min, na levi pa absorbance raztopin vseh pripravljenih vzorcev v času 15 min. Vrednosti absorbance so precej visoke pri raztopinah vzorcev dveh rastlin; navadnega pelina in konoplje. Malce nižje se gibljejo te vrednosti pri vzorcu z raztopljenim ekstraktom sladkega pelina, medtem ko se pri vzorcih z žajbljem te še najbolj razlikujejo, saj so za več kot polovico nižje. Iz teh vrednosti smo izračunali % inhibicije.

Tabela 6: % inhibicije vzorcev glede na referenčno raztopino

Vzorec	% inhibicije glede na referenčno raztopino
1-NP	15,85
2-NP	17,39
1-SP	21,47
2-SP	20,82
1-Ž	85,03
2-Ž	59,98
1-K	15,79
2-K	17,80

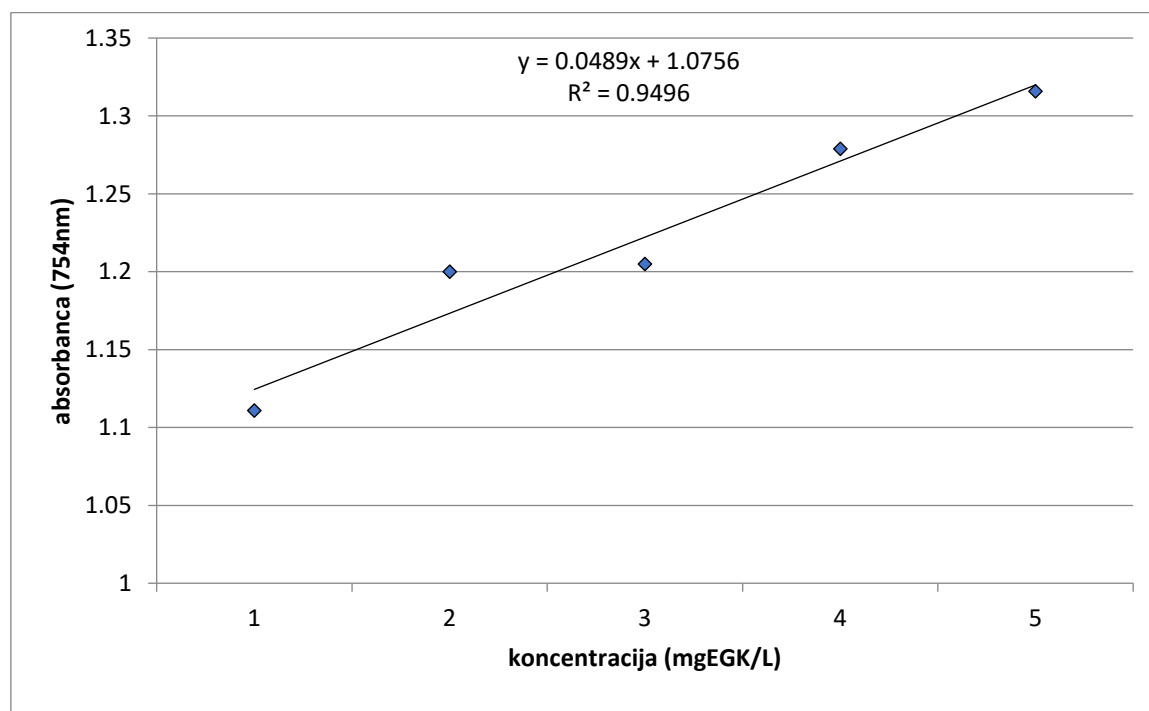
V tabeli so prikazani izračunani % inhibicije glede na referenčno raztopino za vsak vzorec posebej. Velja, da višji je sam % inhibicije, večja je antioksidativna aktivnost vzorca, torej več antioksidativnih učinkovin vsebuje posamezna rastlina. Najnižji % inhibicije in s tem tudi najmanj antioksidativnih lastnosti smo dokazali pri navadnem pelinu in konoplji. Ta vrednost je bila nekoliko višja pri sladkem pelinu, najvišja pa pri žajblju. Žajbelj torej vsebuje največ antioksidativnih učinkovin in je posledično najbolj antioksidativno aktiven med vsemi proučevanimi rastlinami.

4.4 Vsebnost fenolnih spojin v rastlini

Tabela 7: Absorbanca standardnih raztopin galne kisline pri λ_{754} nm

Koncentracija (mgEGK/L)	Absorbanca pri λ_{754} nm
50	1,111
200	1,200
300	1,205
400	1,279
600	1,315

Na podlagi zgornje preglednice smo izrisali spodnji graf:



Graf 17: Umeritvena premica z galno kislino

Korelacijski faktor (R^2) je 0,9196. Za izračun vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktih pa smo uporabili enačbo premice $y = 0,0489x + 1,0756$, kjer y predstavlja absorbanco in x koncentracijo. Iz tega sledi izračun koncentracije skupnih fenolnih spojin v ekstraktih:

$$\text{koncentracija (gGAE / L)} = \frac{A}{0,0489}$$

Tabela št. 9 prikazuje absorbanco vzorcev ekstraktov pri λ_{754} .

Nekaj skrivnosti nekaterih zdravilnih rastlin

Tabela 8: Absorbanca vzorcev pri λ 754 nm

Vzorec	Absorbanca pri λ 754 nm
Kontrola	1,087
1-NP	1,188
2-NP	1,214
1-SP	1,193
2-SP	1,263
1-Ž	1,413
2-Ž	1,313
1-K	1,283
2-K	1,213

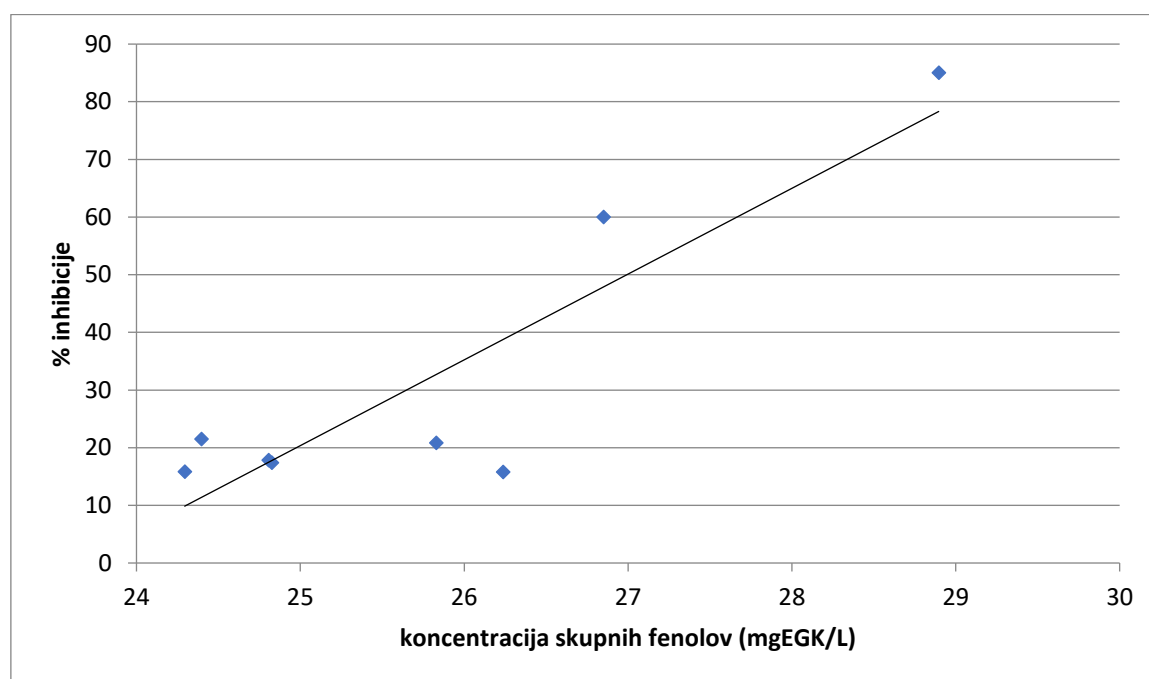
V tabeli št. 9 so prikazane izračunane koncentracije skupnih fenolnih spojin.

Tabela 9: Koncentracija skupnih fenolnih spojin

Vzorec	Koncentracija skupnih fenolnih spojin kot mgEGK/L
1-NP	24,2945
2-NP	24,8262
1-SP	24,3967
2-SP	25,8282
1-Ž	28,8957
2-Ž	26,8507
1-K	26,2372
2-K	24,8057

Razvidno je, da smo najnižjo vsebnost fenolnih spojin zabeležili pri ekstraktih navadnega pelina. Nekoliko višji je delež fenolnih spojin v ekstraktih, pripravljenih s sladkim pelinom in s konopljo. Najvišja pa je ta vrednost pri vzorcih z vsebujočim žajbljem, kar pomeni, da le-ta vsebuje največ fenolnih spojin. Opazna korelacija med deležem fenolov in antioksidativno učinkovitostjo govori v prid hipotezi, da so za antioksidativne lastnosti ekstraktov posameznih rastlin v veliki meri odgovorne fenolne spojine.

Da bi preverili, kolikšna je korelacija med skupnimi fenolnimi spojinami in antioksidativno učinkovitostjo, ki jo te izkazujejo, smo izrisali graf % inhibicije DPPH proti koncentraciji skupnih fenolov, izraženih kot mgEGK/L.



Graf 18: Koncentracija skupnih fenolnih spojin

Z grafa je možno razbrati, da je korelacija med skupnimi fenolnimi spojinami in antioksidativno učinkovitostjo kar precejšnja. Pri rastlinah, v katerih smo dokazali največjo vsebnost antioksidativnih učinkovin, smo namreč dokazali tudi najvišjo koncentracijo skupnih fenolov in obratno. Pri tem je najbolj izstopal žajbelj, pri katerem so bile vrednosti precej višje kot pri navadnem pelinu, sladkem pelinu in konoplji.

5. INTERPRETACIJA REZULTATOV

1. hipoteza: Učinkovitejša bo ekstrakcija, večja bo vsebnost tujona v pridobljenem ekstraktu posamezne rastline. **OVRŽENA**

Izkoristki ekstraktij se zelo razlikujejo, kar je prikazano v tabeli št. 6. Izkoristki iste rastline v več izvedbah so med seboj primerljivi. Največji izkoristek je bil dosežen pri rastlini žajblja z etanolom, izkoristek ekstrakcije žajblja s heksanom pa je bil bistveno nižji. Prva ekstrakcija žajblja, 1-Ž, je imela med vsemi največji izkoristek, in sicer 68,95 %, vendar v tem vzorcu nismo dokazali tujona. V vzorcu žajblja, 3-Ž, pa je bil izkoristek nizek, dokazali pa smo prisotnost tujona. Iz tega sledi, da med izkoristkom ekstrakcije in vsebnostjo tujona ni nujne povezave, vsebnost tujona je precej bolj odvisna od topila, v katerem se tujon raztaplja. Topilo sicer vpliva na izkoristek, saj različno topilo raztaplja različne komponente v rastlini.

2. hipoteza: Prisotnost tujona v ekstraktih rastlin bo večja v ekstraktih, pripravljenih z nepolarnim topilom, kakor v ekstraktih s polarnim topilom. **POTRJENA**

Naredili smo dve vrsti ekstrakcije, s polarnim topilom etanolom in nepolarnim topilom heksanom. Nobena meritev, izvedena z ATR-IR spektroskopijo na vzorcih rastlin, ki smo jih pripravili z ekstrakcijo z etanolom, ni pokazala prisotnosti tujona.

3. hipoteza: Žajbelj bo vseboval največ tujona v primerjavi z navadnim pelinom, sladkim pelinom in konopljo. **DELNO POTRJENA**

To hipotezo lahko le delno potrdimo. V žajblju smo našli tujon. Njegove količine sicer ne vemo, vendar smo iz literature ugotovili, da omenjena rastlina vsebuje največ te snovi in tudi pik v grafu je večji kot pik v grafih pelinov, ki imata pike na isti valovni dolžini. Torej smo majhne količine tujona zaznali v sladkem in navadnem pelinu, kar dokazujeta grafa št. 12 in 13. Konoplja je edina rastlina, ki tujona sploh ne vsebuje, kar lahko najdemo tudi v raznovrstni literaturi.

4. hipoteza: V navadnem pelinu, sladkem pelinu, žajblju in konoplji bomo dokazali antioksidativne učinkovine. **POTRJENA**

Iz tabele št. 6 je razvidno, da smo v vzorcih vseh štirih rastlin dokazali antioksidativno aktivnost in s tem vsebujoče antioksidativne učinkovine. Najmanj antioksidativnih učinkovin naj bi vsebovala navadni pelin in konoplja, nekoliko več sladki pelin, največ pa žajbelj.

5. hipoteza: V navadnem pelinu, sladkem pelinu, žajblju in konoplji bomo dokazali vsebnost fenolnih spojin. **POTRJENA**

V tabeli št. 9 so zbrane količine vsebnosti fenolnih spojin. V prav vseh vzorcih navadnega pelina, sladkega pelina, žajblja in konoplje smo dokazali določeno vsebnost fenolov. Le da se te vrednosti od

rastline do rastline nekoliko razlikujejo. Najmanj smo jih dokazali pri vzorcih navadnega pelina, največ pa pri ekstraktih žajblja.

6. hipoteza: Za antioksidativne lastnosti rastlin so v glavnem odgovorne fenolne spojine.

POTRJENA

V grafu št. 18 smo prikazali korelacijo med skupnimi fenolnimi spojinami in antioksidativno učinkovitostjo. Izkazalo se je, da več skupnih fenolnih spojin vsebuje vzorec, večja je skladno s tem tudi njegova antioksidativna učinkovitost. Torej so za to, da preučevane rastline delujejo antioksidativno, ključne fenolne spojine, ki jih te rastline vsebujejo.

6. ZAKLJUČEK

Raziskali smo nekaj skrivnosti štirih zdravilnih rastlin in si razjasnili njihovo delovanje na človeka in zakaj tako delujejo ob uporabi. Ugotovili smo, da zdravilne rastline pomagajo pri mnogih boleznih in bolečinah, vendar vsebujejo tudi strupene učinkovine.

Z raziskovalno nalogo smo v prvih osmih ekstraktih navadnega pelina, sladkega pelina, žajblja in konoplje, dobljenih z ekstrakcijo po Soxhletu v etanolu, dokazali, da tujona ne vsebujejo. Sklepamo, da je vzrok v tem, da se tujon v polarnih topilih ne topi. Njegovo prisotnost smo namreč dokazali v ekstraktih, ki smo jih z ekstrakcijo po Soxhletu pripravili z nepolarnim topilom. Iz tega sklepamo, da čaj, pripravljen iz katere koli od teh štirih rastlin, ne bo negativno vplival na človeka. Topli napitek, ki bo pripravljen z vodo, ki je polarno topilo, podobno kot etanol, ne bo vseboval raztopljenih učinkovine tujona. Previdnost sicer ni nikoli odveč, a čaje teh rastlin lahko uživamo brez skrbi.

V vseh zdravilnih rastlinah, ki smo si jih izbrali za preučevanje, smo dokazali antioksidativne lastnosti in vsebnost fenolnih spojin. Te so v določenih rastlinah prisotne bolj v drugih manj, vendar so razlike precej majhne. Iz tega sklepamo, da je za uporabnika pravzaprav vseeno, po kateri zdravilni rastlini poseže, kar se tiče vsebnosti tujona in antioksidativnih učinkovin, saj med navadnim pelinom, sladkim pelinom, žajbljem in konopljo pri tem ni bistvenih razlik.

V prihodnje bi bilo zanimivo na podoben način raziskati še več rastlin in vsebnost še katere druge učinkovine, kot je na primer artemisinin, ki ga vsebuje sladki pelin. Glede na aktualno problematiko s koronavirusom bi lahko preverili njegovo učinkovitost tudi v tej smeri, saj smo zasledili, da naj bi proti koronavirusu učinkovito delovalo zdravilo proti malariji, artemisinin pa je že dokazano zdravilo proti malariji.

Izsledke naše raziskovalne naloge bomo poskušali širiti v javnosti. Napisali bomo članek za Raziskovalni reflektor in posneli prispevek za oddajo Aktualno na GFML, kjer bomo te svoje ugotovitve približali širši množici.

VIRI IN LITERATURA

1. BAKAN, Branko: Slikovni pregled višjih rastlin Prekmurja: prispevek k poznavanju flore Prekmurja. Lendava: Razvojni center, 2006, str.171.
2. BOČEK, Teja, 2013, Ekstrakcija antioksidativnih komponent kurkume (*Curcuma longa*): diplomska naloga [na spletu]. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo [Dostopano 7. december 2019]. Pridobljeno <https://core.ac.uk/download/pdf/67576399.pdf>
3. GUIDO FLEISCHHAUER, Steffen, et. al.: Užitne rastline iz narave: [prepoznavanje, nabiranje in uporaba 200 najpomembnejših vrst]. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2015, str. 237.
4. HODNIK Miran, 2014, Primerjava antioksidativne aktivnosti modelnih antioksidantov in pijač določene z DPPH, ABTS in folin-ciocalteu metodo: diplomska naloga [na spletu]. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo [Dostopano 6. december 2019]. Pridobljeno http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zivilstvo/dn_hodnik_miran.pdf
5. KRAKAR, Darja, 2011, Optimizacija metode za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.) : diplomska naloga [na spletu]. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo [Dostopano 5. december 2019]. Pridobljeno http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2011/Krakar_Darja_Dipl_nal_2011
6. KOCJAN–BARLE, Marta, et. al.: SLOVENSKI veliki leksikon. Ljubljana: Mladinska knjiga Založba, 2007, str. 1577, 2217.
7. PRAPROTNIK, Nada, et. al.: Rastline. Tržič: Učila International, 2008, str. 142, 232.
8. PREGELJ, Tadeja, 2009, Določanje antioksidantov v zdravilnih zeliščih: diplomska naloga [na spletu]. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo [Dostopano 8. december 2019]. Pridobljeno http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_pregelj_tadeja.pdf
9. Naravna zdravila/[prevedla Marjana Samide]. Ljubljana: Mladinska knjiga, 2007, str.156.
10. Antioksidant. 9.15, 11. september 2018. Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Antioksidant>. (citirano dne: 2. 1. 2020)
11. Bodi eko. Pelin pomaga pri prebavnih težavah in razstruplja jetra. Dostopno na: <https://www.bodieko.si/pelin>. (citirano dne: 3. 1. 2020)
12. Bodi eko. Žajbelj – zdravilna rastlina z bogato zgodovino. Dostopno na: <https://www.bodieko.si/zajbelj>. (citirano dne: 3. 1. 2020)
13. Kemija. Strupene snovi – Etanol. Dostopno na: https://kemija.net/e-gradiva/nevarne_snovi/1_1_Strupene_snovi/etanol.html. (citirano dne 2. 1. 2020)
14. Konopko. Zakaj industrijska konoplja? Dostopno na: <http://www.konopko.si/zakaj-industrijska-konoplja>. (citirano dne: 4. 1. 2020)
15. Krajček. Sladki pelin. Dostopno na: <https://www.krajcek.si/sladki-pelin/>. (citirano dne 20. 12. 2019)

16. PubChem. Thujone. Dostopno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thujone>. (citirano dne: 20. 12. 2019)
17. Sončni raj. Industrijska konoplja BIO, ekološka pridelava. Dostopno na: <https://posestvosoncniaraj.si/industrijska-konoplja/>. (citirano dne: 4. 1. 2020)
18. Poljub narave. Navadni pelin. Dostopno na: <https://poljubnarave.si/zelisce/navadni-pelin/>. (citirano dne: 3. 1. 2020)
19. Strokovno sadjarsko društvo Slovenije. Sadje in fenolne snovi. Dostopno na: <http://sadjar.si/sadje-in-fenolne-snovi-robort-veberic/>. (citirano dne 15. 2. 2020)
20. Vrt in narava. Žajbelj. Dostopno na: <https://www.vrtnarava.si/rastline/opisi/zelisca/zajbelj>. (citirano dne: 3. 1. 2020)
21. Zeleni svet. Žajbelj. Dostopno na: <https://zelenisvet.com/zajbelj/>. (citirano dne: 3. 1. 2020)
- slika 1: Navadni pelin. Dostopno na: <https://www.visia.si/navadni-pelin/>. (citirano dne: 20. 12. 2019)
- slika 2: Sladki pelin
- slika 3: Žajbelj. Zeleni svet. Dostopno na: <https://zelenisvet.com/zajbelj/>. (citirano dne: 20. 12. 2019)
- slika 4: Industrijska konoplja
- slika 5: Strukturni formuli α - in β -tujona. Pijani tvor. Dostopno na: <https://www.pijanitvor.com/threads/tanini-saponini-glikozidi-gorke-tvari.25855/page-2>. (citirano dne: 22. 12. 2019).
- slika 6: : Strukturne formule nekaterih fenolnih spojin v rastlinah. Lastni arhiv, narisano z aplikacijo ChemSketch (citirano dne 25. 2. 2020).
- slika 7: Pripravljeni tulci pred izvedbo Soxhlet ekstrakcije. Lastni arhiv (citirano dne: 20. 1. 2020).
- slika 8: Soxhletov aparat v šolskem laboratoriju. Lastni arhiv (citirano dne: 20. 1. 2020).
- slika 9: Ločitev z rotavaporjem v šolskem laboratoriju. Lastni arhiv (citirano dne: 20. 1. 2020).
- slika 10: Ekstrakt po odparitvi topila. Lastni arhiv (citirano dne: 20. 1. 2020).
- slika 11: Merjenje absorpcijskih vrednosti z IRAffinity-1S na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor. Lastni arhiv (citirano dne: 21. 2. 2020).
- slika 12: Skeletna formula DPPH.
- slika 13: Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila (DPPH) (levo) in difenilpikrilhidrazina (DPPH₂, reducirana oblika) (desno).
- slika 14: Nepremešani vzorci razredčeni z metanolom. Lastni arhiv (citirano dne: 15. 2. 2020).

slika 15: Meritev absorbance referenčne raztopine. Lastni arhiv (citirano dne: 15. 2. 2020).

slika 16: Termostatirane razbarvane raztopine po meritvi absorbance. Lastni arhiv (citirano dne: 15. 2. 2020).

slika 17: Pripravljene raztopine pred merjenjem absorbance. Lastni arhiv (citirano dne: 20. 2. 2020).

slika 18: Merjenje absorbance vzorcev v šolskem laboratoriju. Lastni arhiv (citirano dne: 20. 2. 2020).