

»Mladi za napredek Maribora 2013«

31. srečanje

**SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE VSEBNOSTI
FENOLOV V VODNIH EKSTRAKTIH ČRNEGA, BELEGA IN
ZELENEGA ČAJA**

BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO, ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga



Maribor, januar 2014

KAZALO

1. POVZETEK	5
2. ZAHVALA	5
3. UVOD	6
3.1 Raziskovalno vprašanje	6
3.2 Hipoteze	7
4. TEORETIČNO OZADJE	7
4.1 Črni čaj	7
4.2 Zeleni čaj	7
4.3 Beli čaj	8
4.4 Antioksidanti	8
5. METODA IN PRIPOMOČKI	8
5.1 Uporabljeni instrumenti	8
5.2 Ekstrakcija čajnih vzorcev	9
5.3 Slepri vzorec	9
5.4 Standardi	9
5.5 Inkubacija vzorcev, slepih raztopin in standardov	10
5.6 Priprava kemikalij	10
5.7 Statistična obdelava podatkov (SPSS,ORIGIN, EXCEL)	11
6. REZULTATI	11
6.1 Statistična analiza	12
7. INTERPRETACIJA PRIDOBLENIH REZULTATOV	15
8. DISKUSIJA	15
9. ZAKLJUČEK	16
10. Priloga	17
10.1 Določeni standardi in spektrofotometrično določanje koncentracij fenolov	17
11. VIRI IN LITERATURA	19

KAZALO TABEL

Tabela 1: Standardi, koncentracije in izmerjene vrednosti fenolov	9
Tabela 2: Vzorci, št. ponovitev in skupni fenoli z odkloni	14

KAZALO SLIK

Slika 1: Vloge antioksidantov (vir: Cortese).....	6
Slika 2: Vzorci različnih vrst čajev	10
Slika 3: Inkubiranje vodnih ekstraktov različnih vrst čajev.....	11

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Vsebnost fenolov v izbranih čajih	12
Graf 2: Vsebnost fenolov v črnem čaju treh proizvajalcev	13
Graf 3: Vsebnost fenolov v belem čaju treh proizvajalcev	13
Graf 4: Vsebnost fenolov v zelenem čaju treh proizvajalcev	15

1. POVZETEK

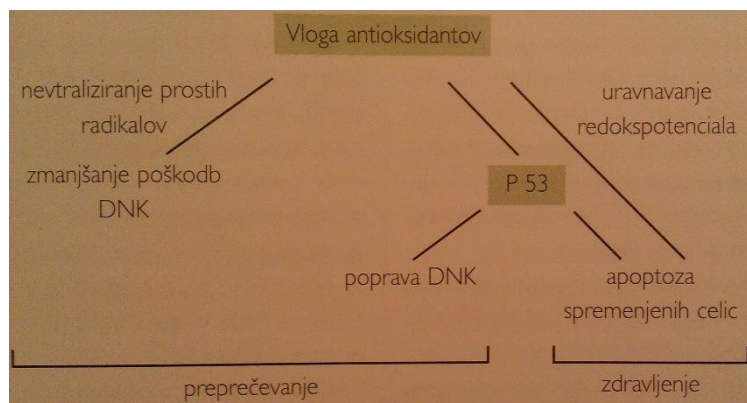
Namen naloge je bil določiti in med seboj primerjati vsebnosti fenolov v čajih. Primerjal sem čaje treh proizvajalcev in treh vrst, beli, zeleni ter črni čaj. Na podlagi prebrane literature me je zanimalo, ali zeleni čaj res vsebuje najvišjo vsebnost fenolov. Prav tako sem želel ugotoviti, ali vsebnosti teh fenolov v različnih vrstah čajev variira. Vsebnost fenolov sem določal s pomočjo metode, prilagojene po Ainsworth in Gillespie (2007). Spektrofotometrična analiza je prikazala najvišjo vsebnost fenolov v zelenem čaju. Čajem ene vrste in treh proizvajalcev nisem mogel določiti statistično značilne zveze. V črnem čaju smo skupne fenole določili v skupnem območju med 12,94 in 35,34 mg/g suhe snovi, v zelenem med 14,66 in 35,96 mg/g suhe snovi in belem med 10,03 in 27,66 mg/g suhe snovi. Izmerjene vsebnosti fenolov med seboj variirajo, za natančnejšo in objektivnejšo raziskavo pa bi moral te vrednosti izmeriti pri več proizvajalcih.

2. ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, doc. dr. , in njeni asistentki za pomoč pri vodenju raziskovanja, dajanju nasvetov in vložen čas ter trud za pomoč pri pisanju te naloge.

3. UVOD

Čaj je vse bolj priljubljena pijača. Vrste čaja razlikujemo na podlagi stopnje oksidacije listov. V svoji raziskovalni nalogi sem se osredotočil na bel, zelen in črn čaj. Prav vsi vsebujejo določeno količino fenolov. (Cortese, D. 2004). Polifenoli so antioksidativni reducenti, ki onemogočajo verižne radikalske reakcije, ki poškodujejo celice. Polifenoli prav tako topijo maščobne celice, uravnavajo prebavo, z raziskavami pa je potrjeno tudi, da uživanje predvsem zelenega čaja podaljša življenjsko dobo. Za določanje vsebnosti fenolov sem uporabil metodo, prilagojeno po Ainsworth in Gillespie (2007). S samim eksperimentom sem želel ovreči stereotipno razmišljanje posameznikov, da največjo vsebnost fenolov vsebuje zeleni čaj. (Wikipedija, 2013)



Slika 1: Vloge antioksidantov (vir: Cortese)

3.1 Raziskovalno vprašanje

Kolikšna je vsebnost fenolov v zelenem, belem in črnem čaju? Ali ima vodni ekstrakt zelenega čaja najvišjo vsebnost fenolov in ali vsebnosti fenolov ene vrste čaja variirajo med različnimi proizvajalci ?

3.2 Hipoteze

H1: Zeleni čaj vsebuje najvišjo vrednost fenolov.

H2: Vsebnosti fenolov iste vrste čaja variirajo med različnimi proizvajalci.

H3: Vsebnosti vseh vrst čajev in proizvajalcev si bodo zelo različne.

4. TEORETIČNO OZADJE

4.1 Črni čaj

Pridelava čaja zajema zbiranje, sušenje, venenje, zvijanje, fermentacijo in pakiranje. Fermentacijo povzroči svaljkanje. Pri tem procesu na aromo vpliva delež sproščenih celičnih sokov. Po fermentaciji čaj pražijo ter dimijo. Lističi so večinoma zelo črne barve in močno aromatični. Marsikateremu tipu tega laja dodajajo arome, zato poznamo vanilijev črni čaj, cimetov ipd. Za najkakovostnejši čaj je potrebno obrati le popke in mlade lističe. Velikost čajnih lističev pa ne igra pomembne vloge pri kakovosti samega čaja. (Štampfl, J., 1990, str. 44, 53, 58) Listi črnega čaja vsebujejo tudi veliko natrija, kalija, kalcija, beljakovin, karotena in vitaminov. (Fajmut, Š., 1996)

4.2 Zeleni čaj

Tega večinoma pridelujejo na Kitajskem, Tajvanu, Japonskem. Zeleni čaj je nefermentiran. Ta čaj pražijo približno 25 sekund pri 100 stopinj Celzija. Tako uničijo encime in fermentacija je preprečena. Po potrebi nekatere tipe tega čaja tudi zmeljejo v prah. Čaji pa prav tako vsebujejo fluor, ki pospešuje nastajanje rdečih krvnih teles oz. skrbi za pospešeno oskrbo telesa s kisikom. (Štampfl, J., 1990, str.43, 55) V zelenem čaju je večina katehinov tipa flavan-3-ol, ki, kot leta 2008 s strani UCLA dokazano, preprečujejo nastanek pljučnega raka.

4.3 Beli čaj

Kakor črni in zeleni čaj, je tudi beli pridobljen iz *Camellie sinensis*, vrste čajnega grma. Nekateri katehini (C₁₅H₁₄O₆-vzdruže zdravje rastline in ga najdemo v listih) v belem čaju po raziskavah dokazano zmanjšujejo krvni tlak in holesterol, ter zmanjšujejo verjetnost kardiovaskularnih bolezni. Čaj vsebuje majhno vrednost teina, posledično tudi kofeina. Vir Wikipedija navaja, da ta vrsta čaja vsebuje največjo vrednost antioksidantov. (Wikipedia, 2014)

4.4 Antioksidanti

Polifenoli so antioksidativni reducenti, ki onemogočajo verižne radikalske reakcije, ki poškodujejo celice. Polifenoli prav tako topijo maščobo v maščobnih celicah, uravnavajo prebavo, z raziskavami pa je potrjeno tudi, da uživanje predvsem zelenega čaja podaljša življenjsko dobo (Wikipedija, 2013). Polifenoli, ki nastopajo v čajih so katehini, flavonoidi, tanini in teaflanini. Katehini se pojavljajo v belem, zelenem in črnem čaju. Njihova vsebnost je odvisna predvsem od časa obiranja, skladiščenja in vrste čaja. (Cortese, D., 2004).

5. METODA IN PRIPOMOČKI

5.1 Uporabljeni instrumenti

Za določanje vsebnosti fenolov v čajih smo morali sprva pripraviti vodne ekstrakte čajev. Vodo smo zagreli na 80 C, nato pa jo po 2dL s pomočjo menzure prelili v elenmajerice in čaše. 2g vrečke čajev smo pustili v le-teh natanko 2 minuti. Kasneje smo odpipetirali 50mg pripravljenih vodnih ekstraktov in temu volumni dodali še enako količino aqua desta. Snovi smo dodali Na₂CO₃ in galno kislino. Po dvournem inkubiranju smo s pomočjo naprave za spektrofotometrično določanje, pri valovni dolžini 765 nm izmerili vsebnosti fenolov. Podatke smo statistično obdelali v programih SPSS, Excel in Origin.

5.2 Ekstrakcija čajnih vzorcev

- Čajne vrečke (2 g) smo ekstrahirali v 2 dL vode, 2 minuti pri 80 °C
- Ekstrakt smo nato ohladili na ledu
- v epice smo odpipetirali 100 µl ekstrakta;
- k vzorcu smo dodali 200 µl 10 % F-C reagenta,
- dodali smo 800 µl Na₂CO₃

5.3 Slepi vzorec

- pripravili smo tudi 2 slepa vzorca: v epico smo odpipetirali 100 µl aqua dest, 200 µl F-C reagenta in 800 µl Na₂CO₃

5.4 Standardi

- 100 / S4=0,246 mg/mL-1,7989
- 80+20 / S3=0,1968 mg/mL-1,5173
- 60+40 / S2= 0,1476 mg/mL-1,1621
- 40+60 / S1=0,0984 mg/mL-0,8875

Tabela 1: Standardi, koncentracije in izmerjene vrednosti fenolov

Standard	Koncentracija (mg/mL)	Izmerjene vsebnosti fenolov (mg/mL)
Std 1	0.8875	0.8545
Std 2	1.1621	1.1936
Std 3	1.5173	1.5228
Std 4	1.7989	1.8315

- standardom smo dodali 200 µl F-C reagenta ter 800 µl Na₂CO₃; prav tako smo jih redčili z aqua dest v razmerju 1:1

5.5 Inkubacija vzorcev, slepih raztopin in standardov

- vse vzorce, standarde in slepe vzorce smo stresali na vortexu
- sledilo je inkubiranje vzorcev, standardov in slepih vzorcev na stresalniku, in sicer 2 uri
- na koncu smo spektrofotometrično določili koncentracije fenolov pri valovni dolžini 765 nm.

5.6 Priprava kemikalij

- F-C reagent: pripravili smo 1 ml F-C reagenta in 9 ml destilirane vode ter ga postavili v hladilnik;
- Na₂CO₃: 700 mM Na₂CO₃ v destilirani vodi

V uporabi metode sem znotraj istega vzorca čaja naredil 5 do 12 ponovitev.



Slika 2: Vzorci različnih vrst čajev



Slika 3: Inkubiranje vodnih ekstraktov različnih vrst čajev

5.7 Statistična obdelava podatkov (SPSS, ORIGIN, EXCEL)

V uporabi metode sem znotraj istega vzorca čaja naredil 5 do 12 ponovitev. Spektrofotometrično določene koncentracije fenolov sem obdelal v programu SPSS in ORIGIN. V slednjem sem izdelal grafe posameznih vzorcev. Z Excelom sem si pomagal pri oblikovanju tabel, ki vključujejo koncentracije oz. vsebnosti fenolov, standarde in maso suhih listov čajev.

6. REZULTATI

LEGENDA:

- ČČ-Črni čaj
- ZČ-Zeleni čaj
- BČ-Beli čaj
- 1P-SinAss-Tee
- 2P-Europe
- 3P-Chai

Tabela 1: Izmerjene vsebnosti fenolov v vodnih ekstraktih črnega, zelenega in belega čaja.

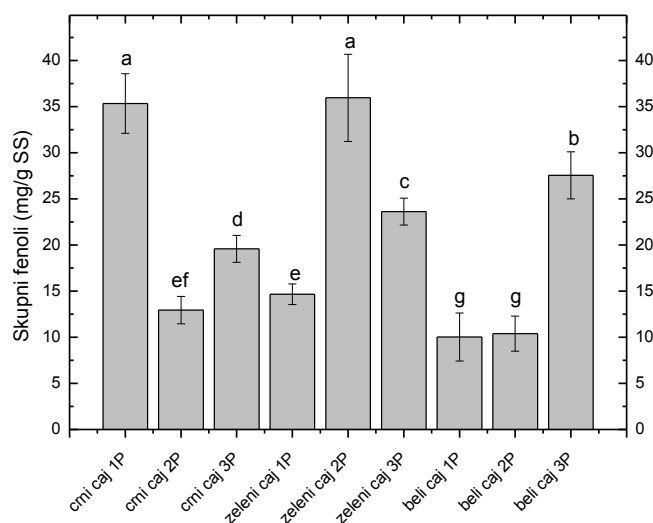
ČČ1P	31,39268 mg/mL	ZČ1P	17,55361 mg/mL	BC1P	7,479921 mg/mL
ČČ1P	30,73119 mg/mL	ZČ1P	18,12252 mg/mL	BC1P	9,122633 mg/mL
ČČ1P	33,99904 mg/mL	ZČ1P	16,70772 mg/mL	BC1P	9,229713 mg/mL
ČČ1P	35,34839 mg/mL	ZČ1P	15,5104 mg/mL	BC1P	9,907951 mg/mL
ČČ1P	39,02725 mg/mL	ZČ1P	14,5239 mg/mL	BC1P	14,42176 mg/mL
ČČ1P	37,58892 mg/mL	ZČ1P	12,8344 mg/mL	BC1P	15,50307 mg/mL
ČČ2P	12,55024 mg/mL	ZC2P	35,4703 mg/mL	BC2P	6,82597 mg/mL
ČČ2P	12,28524 mg/mL	ZC2P	33,14527 mg/mL	BC2P	7,886472 mg/mL
ČČ2P	15,73784 mg/mL	ZC2P	40,35545 mg/mL	BC2P	9,114837 mg/mL
ČČ2P	15,67816 mg/mL	ZC2P	40,94636 mg/mL	BC2P	10,83336 mg/mL
ČČ2P	12,57559 mg/mL	ZC2P	28,79854 mg/mL	BC2P	11,387 mg/mL
ČČ2P	12,88206 mg/mL	ZC2P	29,8809 mg/mL	BC2P	12,72383 mg/mL
ČČ3P	16567,17 mg/mL	ZC3P	21,81309 mg/mL	BC3P	27,95842 mg/mL
ČČ3P	17733,87 mg/mL	ZC3P	22,62415 mg/mL	BC3P	30,72938 mg/mL
ČČ3P	18015,42 mg/mL	ZC3P	23,18269 mg/mL	BC3P	25,70428 mg/mL
ČČ3P	17894,01 mg/mL	ZC3P	25,05615 mg/mL	BC3P	29,03779 mg/mL
ČČ3P	19070,84 mg/mL	ZC3P	23,4321 mg/mL	BC3P	22,95053 mg/mL
ČČ3P	19983,71 mg/mL	ZC3P	25,61784 mg/mL	BC3P	24,37589 mg/mL

6.1 Statistična analiza

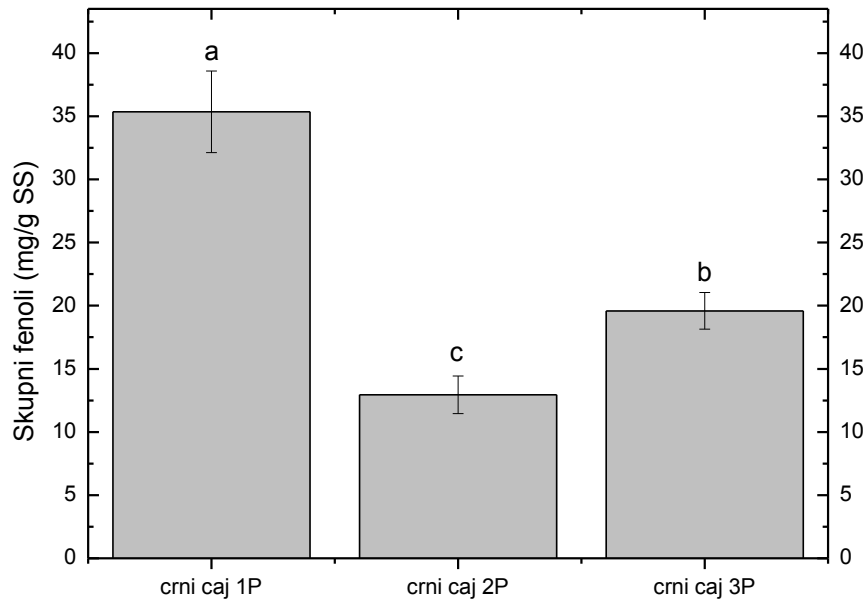
LEGENDA:

- **P**-proizvajalec (npr. 1P; SinAss-Tee)
- **SS**-suha snov
- **a** (najvišja vsebnost fenolov) – **g** (najnižja vsebnost fenolov)

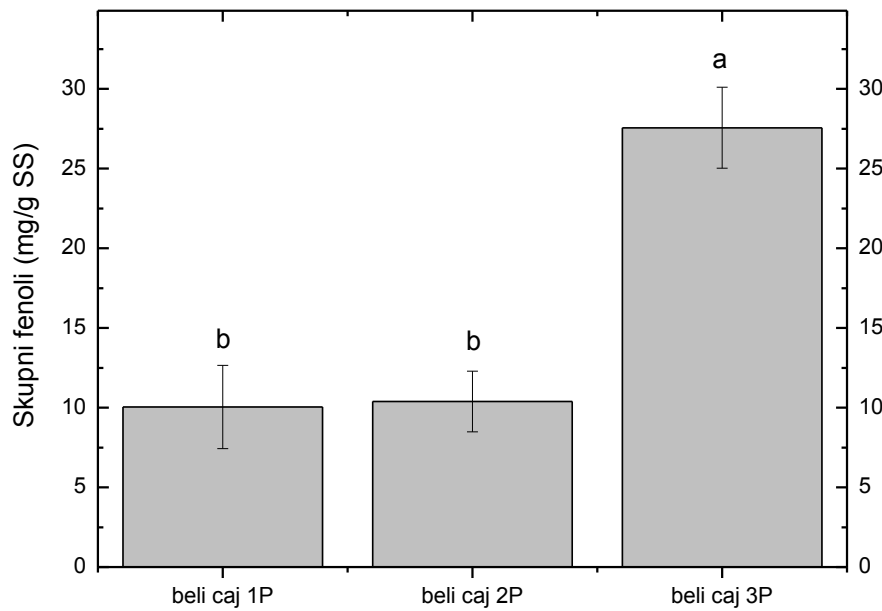
Graf 1: Vsebnost fenolov v izbranih čajih



Graf 2: Vsebnost fenolov v črnem čaju treh proizvajalcev



Graf 3: Vsebnost fenolov v belem čaju treh proizvajalcev



Graf 4: Vsebnost fenolov v zelenem čaju treh proizvajalcev

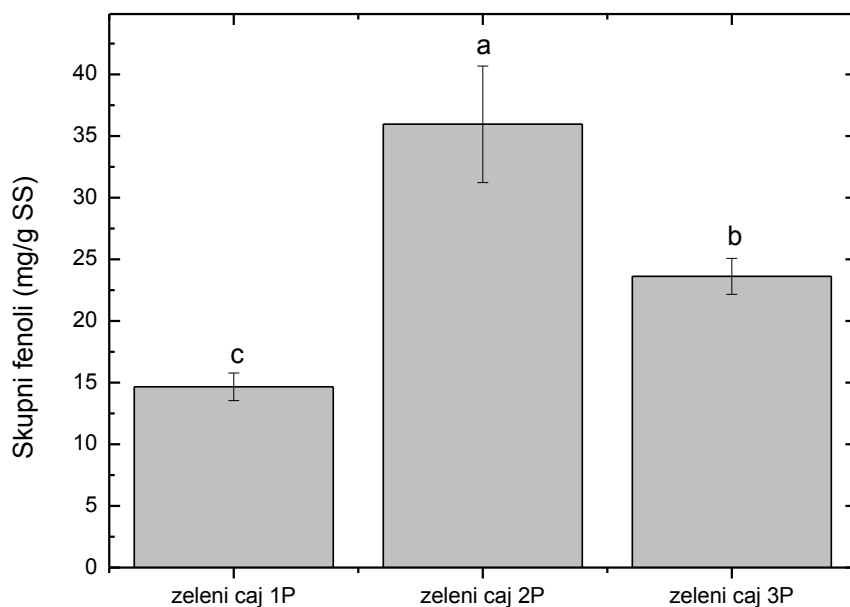


Tabela 2: Vzorci, št. ponovitev(N) in skupni fenoli, ter odkloni

Vzorci	Število ponovitev	Skupni fenoli (mg/mL)	SD
Črni čaj 1P	5	35.34	± 3.23
Črni čaj 2P	12	12.94	± 1.48
Črni čaj 3P	11	19.59	± 1.46
Zeleni čaj 1P	8	14.66	± 1.12
Zeleni čaj 2P	5	35.96	± 4.72
Zeleni čaj 3P	6	23.62	± 1.45
Beli čaj 1P	5	10.03	± 2.61
Beli čaj 2P	5	10.39	± 1.91
Beli čaj 3P	5	27.56	± 2.55

7. INTERPRETACIJA PRIDOBLJENIH REZULTATOV

Največjo vrednost fenolov smo določili v črnem čaju prvega proizvajalca (SinAss) in zelenem čaju drugega proizvajalca (Europe). Ta vzorca se med seboj signifikantno ne razlikujeta. Najnižjo vrednost smo določili v belem čaju prvega proizvajalca in belem čaju drugega proizvajalca. Statistična predstavitev prikazuje sedem različnih homogenih skupin. V isto homogeno skupino smo uvrstili beli čaj prvega proizvajalca in beli čaj drugega proizvajalca, z najnižjo vrednostjo fenolov.

V črnem čaju smo skupne fenole določili v skupnem območju med 12,94 in 35,34 mg/g suhe snovi. Statistično najvišjo vrednost smo določili pri prvem proizvajalcu, najnižjo pri drugem. Določiti nismo mogli statistične razlike med črnim čajem prvega in drugega proizvajalca. Vsem trem čajem skupaj prav tako nismo mogli določiti statistično značilnega vpliva.

Pri zelenih čajih smo te fenole določili v območju med 14,66 in 35,96 mg/g suhe snovi. Vsi trije čaji iste vrste so se po vsebnosti fenolov razlikovali. Statistično najvišjo koncentracijo skupnih fenolov smo določili v zelenem čaju drugega proizvajalca, najnižjo pa smo izmerili pri zelenem čaju prvega proizvajalca. Nismo pa ugotovili statistično značilne zveze.

Skupno območje fenolov v belih čajih se nahaja med 10,03 in 27,66 mg/g suhe snovi. Najvišja vsebnost je nastopila v belem čaju drugega proizvajalca, medtem ko se bela čaja prvega in drugega proizvajalca nista statistično razlikovala.

8. DISKUSIJA

Če analizirano povprečje skupnih fenolov v črnem čaju vseh proizvajalcev dobimo vrednost 19,90 mg/mL. Povprečje fenolov vseh zelenih čajev je 23,09 mg/mL in belih 15,99 mg/mL. Vendar povprečja ni smiselno kalkilirati, kajti na podlagi analize vidimo, da se vsebnost fenolov znotraj ene skupine zelo razlikujejo. Domnevamo pa lahko, da na skupno vsebnost le-teh močno vplivajo način pridelave čaja, čas pobiranja, sušenje, skladiščenje in čas

skladiščenja. Zeleni čaj ima največjo vsebnost fenolov, a bi bilo torej za potrditev zastavljene hipoteze neizogibno analizirati čaje različnih proizvajalcev.

Za pridobitev natančnejših koncentracij bi morali vse vzorce enakomerneje stresati na stresalniku. To v laboratoriju nismo pretirano upoštevali, saj smo si prizadevali skuhati čaje tako, kot v naravnem okolju posamezniku to veleva kultura pitja.

9. ZAKLJUČEK

Po opravljenem spektrofotometričnem določanju vsebnosti fenolov v belem, zelenem in črnem čaju lahko potrdim prvo hipotezo. Najvišjo vsebnost fenolov vsebuje zeleni čaj drugega proizvajalca in sicer 36 mg/mL. Vsebnosti fenolov iste vrste čaja variirajo med različnimi proizvajalci, čeprav se beli čaj prvega in drugega proizvajalca nista statistično razlikovala. Razlika v vsebnosti fenolov med njima je le 0,1 mg/mL. Na podlagi le treh proizvajalcev težko rečem, kateri čaj ima najvišjo vsebnost fenolov. V bodoče bi bilo potrebno izmeriti oz. analizirati vsebnost fenolov v čajih večih proizvajalcev. Mnogi proizvajalci pa morda ne pridobivajo vseh vrst čajev. Tako lahko gre pri določanju čaja z največjo vsebnostjo fenolov le za predvidevanje. S pomočjo HPCL aparata bi prav tako lahko določili vrste fenolov, ki nastopajo v vzorcih. Določeni fenoli, reducenti, lahko imajo v večjih količinah celo negativne učinke na telo.

10. Priloga

10.1 Določeni standardi in spektrofotometrično določanje koncentracij fenolov

Concentration Analysis Report

Report time 1/22/2014 11:16:37 AM
Method
Batch name C:\Documents and
Settings\Varian\Desktop\22012014
tea phenolics.BCN
Application Concentration 3.00(339)
Operator

Instrument Settings

Instrument Cary 50
Instrument version no. 3.00
Wavelength (nm) 765.0
Ordinate Mode Abs
Ave Time (sec) 0.1000
Replicates 1
Standard/Sample averaging OFF
Weight and volume corrections OFF
Fit type Linear
Min R² 0.95000
Concentration units mg/mL

Comments:

Calibration

Collection time 1/22/2014 11:16:58 AM

Standard mg/mL	Concentration	F	Readings
-------------------	---------------	---	----------

Std 1	0.8875		0.8545
Std 2	1.1621		1.1936
Std 3	1.5173		1.5228
Std 4	1.7989		1.8315

Calibration eqn Abs = 1.05274*Conc -0.06159
Correlation Coefficient 0.99717
Calibration time 1/22/2014 11:17:48 AM

Analysis

Collection time 1/22/2014 11:17:48 AM

Sample	Concentration	F	Readings
--------	---------------	---	----------

mg/mL

Sample 1	1.3555	1.3654
Sample 2	1.2705	1.2759
Sample 3	1.5635	1.5844
Sample 4	1.5855	1.6076
Sample 5	1.1201	1.1175
Sample 6	1.1599	1.1595
Sample 7	0.8837	0.8687
Sample 8	0.9144	0.9010
Sample 9	0.8343	0.8167
Sample 10	0.8970	0.8827
Sample 11	0.9363	0.9241
Sample 12	1.0182	1.0103
Sample 13	0.3258	0.2814
Sample 14	0.3845	0.3432
Sample 15	0.3985	0.3579
Sample 16	0.4234	0.3842
Sample 17	0.5881	0.5575
Sample 18	0.6278	0.5993
Sample 19	0.2994	0.2536
Sample 20	0.3368	0.2930
Sample 21	0.3835	0.3421
Sample 22	0.4447	0.4066
Sample 23	0.4646	0.4276
Sample 24	0.5124	0.4778
Sample 25	1.1368	1.1351
Sample 26	1.2436	1.2476
Sample 27	1.0136	1.0055
Sample 28	1.1375	1.1359
Sample 29	0.9012	0.8872
Sample 30	0.9536	0.9423

Results Flags Legend

U = Uncalibrated

N = Not used in calibration

O = Overage

R = Repeat reading

11. VIRI IN LITERATURA

CORTESE, D. (2004). Čaj, čas za zdaj. Ljubljana: Kmečki glas.

FAJMUT, Š. (1996). Kultura pitja čaja. Ljubljana: Kmečki glas.

MOHRING, W. (2003). Zdravilna moč čajev. Ljubljana: Prešernova družba. (Zbirka Za dober dan).

Rolih, M., 2013. Antioksidanti – vir zdravja..., dostopno na URL naslovu:

<http://www.hujsanje.info/antioksidanti-vir-zdravja-in-vitalnosti.html>

ŠTAMPFL, J. (1990). Čas za čaj... Ljubljana: samozaložba.

Wikipedija, 2013. Čaj, dostopno na URL naslovu: <http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Caj>

Wikipedija, 2013. Antioksidant, dostopno na URL naslovu:

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Antioksidant>

Wikipedia, 2014. Phenolic content in..., dostopno na URL naslovu:

http://en.wikipedia.org/wiki/Natural_phenols_and_polyphenols_in_tea

Wikipedia, 2014. Flavan-3-ol, dostopno na URL naslovu:

http://en.wikipedia.org/wiki/Flavan-3-ol#Potential_health_effects_of_catechins

Wikipedia, 2014. Health effect of..., dostopno na URL naslovu:

http://en.wikipedia.org/wiki/Health_effects_of_tea

Wikipedia, 2014. White tea, dostopno na URL naslovu:

http://en.wikipedia.org/wiki/White_tea