

»Mladi za napredek Maribora 2021«

38. srečanje

KOFEIN V ČAJU IN NJEGOV VPLIV NA SRČNI UTRIP ČLOVEKA IN VODNE BOLHE (*Daphnia magna* sp.)

Raziskovalno področje: INTERDISCIPLINARNO (KEMIJA IN BIOLOGIJA)

Raziskovalna naloga

Avtor: NIKA VAROŠČIČ
Mentor: ANITA MUSTAČ, TAMARA ŠIŠKO
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR
Število točk: 148/170

Maribor, 2021

KAZALO

KAZALO GRAFOV	3
KAZALO TABEL.....	4
KAZALO SLIK.....	5
POVZETEK	6
ZAHVALE	7
1 UVOD	8
1.1 Namen in cilji raziskovalne naloge	9
1.2 Raziskovalno vprašanje.....	9
1.3 Hipoteze	9
2 TEORETIČNO OZADJE.....	11
2.1 KOFEIN	11
2.1.1 Kemijske lastnosti kofeina	11
2.1.2 Delovanje kofeina	12
2.1.3 Vpliv kofeina na človeka.....	12
2.1.4 Kofein v čaju	13
2.1.4 Kofein v kavi.....	13
2.2 ČAJ.....	14
2.2.1 Kemijska sestava čaja.....	14
2.2.2 Zeleni čaj	14
2.2.3 Zeleni matcha čaj	15
2.2.4 Črni čaj	15
2.2.5 Beli čaj.....	16
2.2.6 Oolong ali rdeči čaj	16
2.3 VODNA BOLHA DAPHNIA MAGNA.....	17
2.3.1 Fizični opis	17
2.3.2 Življenjski cikel.....	18
2.3.3 Razmnoževanje	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 DELITEV NALOGE.....	20
3.2 VZORCI.....	20
3.2.1 Vzorci čajev.....	20
3.2.2 Vzorec kave.....	21
3.3 KEMIJSKE METODE IN MATERIALI.....	22

3.3.1 Priprava infuzij	22
3.3.2 Redčenje infuzij.....	22
3.3.3 Določanje koncentracij kofeina z UV-VIS spektrofotometrom.....	23
3.4 BIOLOŠKE METODE IN MATERIALI	25
3.4.1 Metoda štetja srčnega utripa vodne bolhe	25
3.4.2 Merjenje srčnega utripa na vzorcu človeške populacije.....	27
4 REZULTATI.....	29
4.1 Določanje vsebnosti kofeina	29
4.1.1 Umeritvena krivulja.....	29
4.1.2 Določanje kofeina v vzorcih čajev in kave	30
4.2 Merjenje frekvence srčnega utripa vodnih bolh	31
4.3 Povečanje frekvence srčnega utripa vodnih bolh v povezavi z vsebnostjo kofeina.....	34
4.4 Merjenje frekvence srčnega utripa človeka.....	34
4.5 Sprememba frekvence srčnega utripa človeka v povezavi z vsebnostjo kofeina.....	37
5 RAZPRAVA	38
6 ZAKLJUČEK.....	43
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	44
BIBLIOGRAFIJA	45
VIRI SLIK.....	51
PRILOGA.....	52

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena krivulja s kofeinom	29
Graf 2: Masa kofeina od največje do najmanjše na 100 ml čajne infuzije.....	31
Graf 3: Frekvenca srčnega utripa pri različnih raztopinah od najmanjše do največje	33
Graf 4: Frekvenca srčnega utripa vodnih bolh v odvisnosti od mase kofeina na 100 ml čajne infuzije.....	34
Graf 5: Srčni utrip testirancev moškega spola	35
Graf 6: Srčni utrip testirancev ženskega spola	35
Graf 7: Povprečna sprememba srčnega utripa po zaužitju čajev	36
Graf 8: Povprečna frekvenca srčnega utripa po uživanju čaja pri človeku od mase kofeina v čajih na 100 ml	37

KAZALO TABEL

Tabela 1: Opis vzorcev čajev	20
Tabela 2: Opis vzorca kave	21
Tabela 3: Mase in volumni uporabljeni za pripravo standardnih raztopin.....	24
Tabela 4: Podatki za umeritveno krivuljo za določitev koncentracije kofeina	29
Tabela 5: Absorbance in koncentracije razredčenih raztopin čajev in kave	30
Tabela 6: Masa kofeina v čajih in kavi na 100 ml infuzije	30
Tabela 7: Število utripov na minuto pri izpostavljenosti različnim raztopinam	31
Tabela 8: Srčni utrip testirancev pred in po zaužitju čaja	34
Tabela 9: Izmerjen srčni utrip vodnih bolh izpostavljenih različnim raztopinam.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura molekule kofeina.....	11
Slika 2: Vodna bolha <i>Daphnia magna</i> (lasten vir)	17
Slika 3: Spolno in nespolno razmnoževanje vodne bolhe.....	18
Slika 4: Čaji uporabljeni v raziskovalni nalogi (lasten vir).....	21
Slika 5: Čajne infuzije (lasten vir).....	22
Slika 6: Raztopine čajev (lasten vir)	22
Slika 7: UV-VIS Spektrofotometer: Perkin Elmer Lambda Bio+ (lasten vir)	23
Slika 8: Svetlobni mikroskop, pripomočki in vodne bolhe v kozarcu (lasten vir).....	25
Slika 9: Označeno srce vodne bolhe (lasten vir)	26
Slika 10: Primer beleženja srčnega utripa vodne bolhe za zeleni čaj (lasten vir)	27
Slika 11: Nadlaktni merilnik krvnega tlaka Omron M2 (lasten vir)	28
Slika 12: <i>Daphnia magna</i> z dvema jajčecema (lasten vir)	54
Slika 13: <i>Daphnia magna</i> (lasten vir).....	54

POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na vsebnost kofeina v različnih vrstah čajev in na njegov vpliv na srčni utrip vodnih bolh (*Daphnia magna*) in človeka. Čaj je namreč zraven kave glavni vir kofeina in med ljudmi zelo priljubljena pijača. Z metodo spektrofotometrije smo izmerili absorbance in določili koncentracijo kofeina v pripravljenih čajnih infuzijah. Opazovali smo vpliv pripravljenih čajev na srčni utrip vodnih bolh (*Daphnia magna*). Rezultati so pokazali, da izpostavljenost vodnih bolh čajem poveča hitrost bitja srca. Srčni utrip smo opazovali tudi na vzorcu človeške populacije, pri čemer ni bilo jasnih indikacij, da bi se srčni utrip v glavnem zvišal ali znižal po zaužitju čaja.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentoricama za vso pomoč in podporo pri izvedbi eksperimentalnega dela, za vodenje in usmerjanje ter za čas, ki sta ga namenili za sprotni in končni pregled raziskovalne naloge. Prav tako bi se rada zahvalila Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in hrano za dostop do vodnih bolh (*Daphnia magna*).

1 UVOD

Čaj je ena izmed najbolj priljubljenih pijač na svetu. Vsak dan ga uživa več sto milijonov ljudi. Že v 3. tisočletju pred našim štetjem so čaj uporabljali v kitajski medicini za zdravljenje raznovrstnih bolezenskih stanj. Njegovo mesto v medicini se je ohranilo vse do danes, ko čaj velja za priljubljeno pijačo s številnimi pozitivnimi učinki na človeško telo in dobro počutje. K temu pripomorejo koristne bioaktivne snovi, kot so polifenolne spojine, vlaknine, vitamini, minerali in še mnoge druge. Med njimi je tudi kofein, ki predstavlja do 4% suhe mase čajnih listov (Sinnathurai Sivasubramaniam, 2019). Čaj je zraven kave najpomembnejši vir kofeina, ki je zelo priljubljen pri ljudeh na vsakodnevni ravni. Tudi sama vsako jutro spijem skodelico čaja, da se počutim zbujeno in pripravljeno na nov dan. Sem velika ljubiteljica vseh vrst čajev in tako se mi je porodila ideja za raziskovalno nalogo. Zdelo se mi je zanimivo, da je pitje kave odsvetovano otrokom, medtem ko pitje čaja ni. Ali to pomeni, da čaji vsebujejo manj kofeina kot kava? Kako kofein v čaju vpliva na ljudi? Ta vprašanja so se mi porajala v mislih. Osredotočila sem se predvsem na vsebnost kofeina v čajih in njegov vpliv na srčni utrip organizmov, natančneje vodne bolhe (*Daphnia magna*) in človeka. Dosedanje raziskave so precej neusklajene glede vpliva kofeina na srčni utrip vodne bolhe. V študiji o vplivu različnih koncentracij kofeina na srčni utrip dafnije rezultati niso pokazali velikega vpliva kofeina na frekvenco srčnega utripa. Vzrok za to je lahko majhna koncentracija uporabljenega kofeina, vendar študija predvideva, da naj bi v večjih koncentracijah kofein znižal in ne povišal srčnega utripa vodne bolhe (Austin et al., 2019). Raziskava o vplivu kofeina v povezavi z dopaminom pa je pokazala povišanje srčnega utripa dafnije (Corotto et al., 2010). Ker pa se vodna bolha kot majhen vodni organizem ne more ravno primerjati s kompleksnim vretenčarjem kot je človek, smo preučili še vpliv zaužitih čajev na določenem vzorcu človeške populacije. Geethavani, Rameswarudu in Reddy (2014) navajajo, da kofein vpliva na povišanje srčnega utripa pri ljudeh, saj poveča raven kateholaminov, ki vplivajo na simpatično živčevje, le-to je odgovorno za tako imenovan boj in beg obrambni mehanizem organizma. Rezultati študije so pokazali, da kofein 60 minut po zaužitju zviša srčni utrip iz 72,9 utripov na minuto na 77,3 utripe na minuto. Nekatere druge raziskave pa so pokazale, da predvsem čaj kot tak zniža srčni utrip (Quinlan et al., 2000).

1.1 Namen in cilji raziskovalne naloge

Namen raziskovalne naloge je z metodo spektrofotometrije izmeriti absorbanco in določiti koncentracijo kofeina v različnih vrstah čaja ter primerjati rezultate z že znanimi raziskavami. Glavni cilj je opazovati vpliv čajnih infuzij na srčni utrip vodne bolhe rodu *Daphnia magna* in izbrane skupine človeške populacije in povleči morebitne vzporednice med vplivom kofeina v čaju na srčni utrip opazovanih testnih organizmov ter na podlagi raziskanih lastnosti kofeina in opravljenih eksperimentov sklepati, kako posamezna izbrana vrsta čaja vpliva na človeški organizem in kakšne so njene prednosti ali slabosti.

1.2 Raziskovalno vprašanje

1. Kakšne so vsebnosti kofeina v različnih vrstah čajev in kako vplivajo na srčni utrip vodne bolhe (*Daphnia magna*)?
2. Kakšna je sprememba pri srčnem utripu človeka po zaužitju čaja?
3. Ali so med izmerjenimi parametri možne korelacije, s katerimi lahko dokažemo pozitiven vpliv uživanja čaja na dobro počutje?

1.3 Hipoteze

HIPOTEZA 1: *Največjo koncentracijo kofeina bo vseboval zeleni matcha čaj, najmanjšo pa zeleni čaj.* Viri namreč trdijo, da ima matcha čaj zaradi postopka pridelave visoko vsebnost kofeina in katehinov (Kochman et al., 2020). Hilal in Engelhardt (2007) pa sta v raziskavi pokazala, da ima zeleni čaj nizko vsebnost kofeina, ki je manjša v primerjavi z belim in črnim čajem.

HIPOTEZA 2: *V primerjavi z vsemi vzorci čajev, bo vzorec kave vseboval največjo koncentracijo kofeina.* V literaturi je navedeno, da ima enaka količina kave v povprečju večjo koncentracijo kofeina kot čaj (Barone in Roberts, 1996).

HIPOTEZA 3: *Najhitrejši srčni utrip bo zaznan pri vodni bolhi, ki bo izpostavljena čajni infuziji z največjo vsebnostjo kofeina.* Kurien et al. (2018) navaja, da kofein poveča srčni utrip dafnije tako, da povzroči proizvodnjo in sprostitvev dopamina, ki poživljajoče vpliva na srce in krvi obtok. Posledično več kot je kofeina, več dopamina se sprostí.

HIPOTEZA 4: *Po zaužitju čaja se srčni utrip človeka poviša.* Čaj je namreč eden glavnih virov kofeina in študije ugotavljajo, da kofein poviša raven kateholaminov, ki posledično vplivajo na povišanje srčnega utripa (Geethavani et al., 2014).

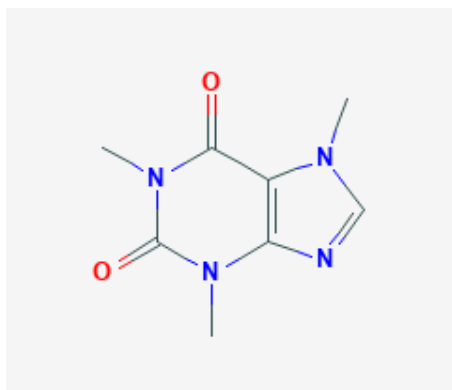
2 TEORETIČNO OZADJE

2.1 KOFEIN

Kofein je najpogostejše uporabljena psihoaktivna droga na svetu, saj je poceni, lahko dostopen, družbeno sprejemljiv in zakonit. Najdemo ga v več kot 60 različnih rastlinskih vrstah in že dolga stoletja se uporablja zaradi njegovih stimulativnih učinkov. Povprečna svetovna poraba kofeina je 70 mg na osebo na dan, v Združenih državah Amerike znaša 211 mg na osebo na dan, v Združenem kraljestvu pa kar 444 mg na osebo na dan, kar je največ na svetu. Kronična uporaba kofeina ne povzroča le tolerance, temveč tudi fizično odvisnost, kar se pokaže v pojavu različnih simptomov ob nenadni prekinitvi uživanja (Bylund, 2008).

2.1.1 Kemijske lastnosti kofeina

Molekulska formula kofeina je $C_8H_{10}N_4O_2$. IUPAC, nomenklatura navaja njegovo kemijsko ime 1, 3, 7- trimetilpurin- 2, 6- dion. Kofein je dušikova organska spojina iz skupine alkaloidov, alkalnih oziroma bazičnih spojin, ki so znane po svoji strupenosti. Nahaja se predvsem v kavi, od tod tudi poimenovanje čaju in čokoladi. Čisti kofein, imenovan tudi trimetilksantin, je v obliki belega prahu ali kristalnih delcev. Dobro je topen v vroči vodi, je brez vonja in ima grenak okus (Encyclopedia Britannica, 2018). Kofein se uporablja v živilski in farmacevtski industriji kot sestavina ali dodatek (Alessio, 2016). Toksikološki podatki varnostnega lista (2019) prikazujejo LD_{50} za kofein dermalno pri 2.000 mg/kg (Rat) in oralno pri 367 mg/kg (Rat). Iz podatkov lahko vidimo, da je praktično nemogoče, da bi se človek zastrupil s pitjem čaja ali kave, slednja vsebuje v povprečju 76 mg kofeina na 150ml, saj ni fizično mogoče zaužiti tolikšne količine kave, da bi prišlo do tega (Malek, 2021).



Slika 1: Struktura molekule kofeina

2.1.2 Delovanje kofeina

Adenozin je molekula, ki se v možganih veže na specifične receptorje in s tem upočasni delovanje živčnih celic, kar povzroči širjenje krvnih žil in občutek zaspanosti. Kofein tekmuje z adenozinom in zasede te receptorje, ker pa nima enakega učinka kot adenozin, skrči krvne žile, kar povzroči dodatno izločanje adrenalina v krvni obtok in posledično se poveča krvni tlak in srčni utrip. To povzroča občutek budnosti in ravno zaradi tega veliko ljudi zjutraj posega po kavi ali čaju. Ko je človek odvisen od kofeina, začne v telesu nastajati vedno več receptorjev za adenozin, da bi nadomestili tiste, ki jih zaseda kofein. Pri odvajanju od kofeina ostanejo nekateri receptorji nezasedeni, kar povzroči abstinenčno krizo, zato mora odvajanje potekati postopoma. Zaradi kemijske sestave kofein z lahkoto prehaja skozi biološke membrane in se hitro porazdeli po telesu. Čas delovanja kofeina se razlikuje glede na vir (čaj, kava, energijska pijača...), v glavnem pa traja od dveh ur in pol do sedem ur in pol. Največji učinek pa doseže od 15 do 45 minut po zaužitju (Hrastnik, 2016).

2.1.3 Vpliv kofeina na človeka

Kofein ima več učinkov na človeško telo, ki so odvisni predvsem od telesne mase, pogostosti uživanja, metabolizma, telesne aktivnosti in občutljivosti na kofein. Deluje kot stimulant centralnega živčnega sistema, zvišuje nivo energije, izboljša mišične dražljaje, poveča budnost in sposobnost koncentracije ter mentalne sposobnosti. Možni stranski učinki so pogosto uriniranje, saj kofein deluje kot blag diuretik, glavobol, nemirnost, hitrejši srčni utrip, tresenje in nespečnost, ki se pojavijo predvsem pri uživanju večje količine živil, bogatih s kofeinom. Učinki se lahko pojavijo v močnejši obliki ob sočasnem uživanju kofeina in nekaterih zdravil (Malek, 2021). Najnovejše raziskave so pokazale pomembne povezave med rednim uživanjem kofeina in zmanjšanjem tveganja za Alzheimerjevo bolezen, jetrne in kronične bolezni. Visoka raven kofeina v krvi naj bi celo v obdobju dveh do štirih let preprečila napredovanje demence. Deluje tudi antikancerogeno na tkiva in lajša bolečine migrenskega glavobola (Alessio, 2016). Kofein se v organizmu relativno hitro absorbira in posledično tudi dokaj hitro izloči (Malek, 2021).

2.1.4 Kofein v čaju

Pri povezavi kofeina s čajem velikokrat naletimo na besedo tein. Gre namreč za v osnovi enaka alkaloida, ki se razlikujeta v poimenovanju. Drugačna je tudi sposobnost povezovanja z drugimi sestavinami in posledično tudi drugače vplivata na telo. Izraz tein se uporablja v povezavi s čajem, medtem ko je kofein v širši rabi, ko govorimo o kavi, čokoladi, energijskih pijačah ipd. V čaju se tein veže s tanini, ki stabilizirajo efekt teina na telo in preprečujejo hitro sprostitvev. Posledično je počasneje absorbiran in učinek je dolgotrajnejši. Čaj torej v primerjavi s kavo učinkuje počasneje in dlje časa vzdržuje raven energije v telesu (Chai, 2021). Vsebnost teina je odvisna od starosti listov in z leti upada. V povprečju se giblje med 2.9% in 4.2% (NIJZ, 2012).

2.1.4 Kofein v kavi

Kava je glavni vir kofeina in ena izmed najbolj priljubljenih pijač na svetu. Vsebnost kofeina v kavi je odvisna od vrste kavnih zrn in metode priprave kave. V povprečju ima 120 ml skodelica kave 100 mg kofeina. Kava v primerjavi s čajem vsebuje manj kofeina, pripravljena skodelica kave pa več. Pripravljen čaj je po navadi veliko bolj razredčen z vodo kot kava, saj se za pripravo kave uporabi več kavnih zrn kot čajnih listov za pripravo čaja. (Wanyika et al., 2010). Razlika med kavo in čajem je tudi v delovanju kofeina oziroma teina. Pri čajih se kofein počasneje sprošča in ima dolgotrajnejši učinek, kot pri kavi, kjer neposredno vpliva na srce in krvni obtok. Kofein iz čaja se veže s tanini in neposredno vpliva na možgane in centralni živčni sistem (Hrastnik, 2016).

2.2 ČAJ

Čaj je druga najbolj priljubljena pijača na svetu. Pridobiva se iz listov čajevca, ki je zimzelen grm ali drevo iz družine *Theaceae*, vrste *Camelia*. Ima temno zelene, sijoče, ovalne in simetrične liste. Cvetovi so veliki in bele, roza ali rdeče barve, sadeži pa so majhni in rjavi. Glavni vrsti čajevca sta Kitajski (*Camellia sinensis*) in Indijski (*Camellia assamica*). Čajevec gojijo predvsem na Kitajskem, Japonskem, v Indiji in na Šrilanki. Liste čajevca se obira vso leto, vendar čas obiranja močno vpliva na kvaliteto listov. Izkazalo se je, da so najboljši čaji iz listov, ki se jih obira spomladi, saj so takrat listi občutljivi in najbolj aromatični. Kvaliteten okus in aromo dajo tudi še nerazviti, mladi listi (Gramza, Korczak in Amarowicz, 2005). Listni popki in listi čajevca se uporabljajo za pripravo štirih tradicionalnih čajev- zelenega, črnega, belega in »oolong« čaja (NIJZ, 2012). Obstaja še veliko drugih rastlin, ki se uporabljajo za ekstrakcijo, na primer rooibos in kamilica, vendar to niso čaji, razvrščeni so namreč v kategorijo zeliščnih infuzij ali tisana. Glavna razlika med različnimi čaji je stopnja oksidacije ali fermentacije listov med pridelavo in čas obiranja (Franks et al., 2019).

2.2.1 Kemijska sestava čaja

Kemična sestava čaja je kompleksa. V veliki količini so prisotne polifenolne spojine, ki lahko predstavljajo do 30% suhe mase čajnih listov in kamor spadajo katehini in tanini. Poleg tega so prisotne še beljakovine, ki predstavljajo od 15 % do 20 % suhe mase in katerih velik del so encimi (Chacko et al., 2010). Ena najbolj znanih sestavin čaja je kofein ali tein, ki spada v skupino alkaloidov, ki predstavljajo od 3 % do 4 % svežih listov. Vsebnost s starostjo listov upada (NIJZ, 2012). Aminokisline, kot so teanin, glutaminska kislina, glicin, serin, levcin in lizin, predstavljajo od 1 % do 4 %. Ogljikovi hidrati- celuloza, pektin, glukoza, fruktoza in saharoza predstavljajo od 5 % do 7 % suhe mase. 5 % suhe mase predstavljajo tudi minerali in elementi v sledovih, kot so kalcij, magnezij, krom, mangan, železo, baker, cink, selen, natrij, fosfor in aluminij. V čaju so v sledih prisotne še maščobe, steroli, vitamini, pigmenti in hlapne spojine, kot so alkoholi in estri (Chacko et al., 2010).

2.2.2 Zeleni čaj

Zeleni čaj se proizvaja s sušenjem, brez postopka fermentacije, listi so neoksidirani in na ta način se ohranijo polifenoli, ki predstavljajo do 30 % suhe mase listov. K polifenolnim

spojinam sodijo med drugim tudi katehini. Starejši listi vsebujejo več katehinov kot mlajši (NIJZ, 2012). Listi so zelene barve, pripravljen zeleni čaj pa je blede zeleni ali limonino rumen in rahlo grenki (Sivasubramaniam, 2019).

Zeleni čaj že od antičnih časov velja za zdravo pijačo v kitajski tradicionalni medicini. Nedavne študije so pokazale potencialne pozitivne učinke uživanja zelenega čaja. Prispeva k zmanjšanju tveganja za bolezni srca in ožilja ter nekaterih oblik raka, hkrati spodbuja zdravje ustne votline in drugih fizioloških funkcij, kot so nadzor telesne teže in antibakterijsko ter protivirusno delovanje. Pripomore k zaščiti pred ultravijoličnimi žarki in povečuje mineralno gostoto kosti (Cabrera, Artacho in Giménez, 2006).

2.2.3 Zeleni matcha čaj

Zeleni čaj je v osnovi na voljo v treh različnih variantah, v obliki listov, v čajnih vrečkah ali v obliki prahu. Matcha je japonski zeleni čaj v prahu vrste Tencha. Zaradi tradicionalnega načina gojenja, je še posebej bogat z antioksidanti. Čajni grmi so večino časa rasti v senci, pod naravnim bambusovim blagom. Ta metoda, ki zaščiti rastlino pred soncem, omogoča nastanek velikih količin bioaktivnih snovi, kot sta klorofil in l-teanin. Rezultat gojenja rastline v senci pred pobiranjem sta edinstven okus in barva čajnih listov in njihovih infuzij. Vrednost in vsebnost čaja sta odvisni tudi od sezone, v kateri se listi pobirajo. Visoka vsebnost teanina in kofeina ter nizka vsebnost katehina se pokaže v posebnem aromatičnem okusu, ki za razliko od čajnih vrst, ki rastejo na soncu, ni tako izrazito grenak. Tudi iz tega razloga njegova priljubljenost na tržišču hitro narašča (Jakubczyk et al., 2020).

Samo 0,6 % vsega pridelanega zelenega čaja se predela v matcha čaj. Razlika med pitjem zelenega in matcha čaja je v tem, da pri uživanju zelenega čaja na koncu čajne liste zavržemo, medtem ko jih pri pitju matcha čaja celotne popijemo, saj so zmleti v prah. To omogoča, da zaužijemo tudi komponente, ki niso topne v vodi. Zraven vseh bioaktivnih snovi, čajni listi vsebujejo veliko vlaknin, ki jih pri pitju matcha čaja vnesemo v telo. Zaradi te razlike naj bi imel matcha čaj večje pozitivne učinke na zdravje, kot navadni zeleni čaj (Štravs, 2018).

2.2.4 Črni čaj

Črni čaj je najpogostejša vrsta čaja. Pri postopku pridobivanja črnega čaja poteče fermentacija. Čajne liste najprej pustijo veneti, da izgubijo večino vlage. Potem liste svaljkajo, da spustijo

olja, ki vsebujejo encime in nato liste natrejo. Ti encimi sprožijo postopek fermentacije, kateremu sledi sušenje z vročim zrakom in ločevanje čajnih lističev po velikosti. Črni čaj ima nižjo vsebnost katehinov, hkrati pa vsebuje več kofeina oziroma teina kot zeleni čaj (Chai, 2017). Čajni listi so svetlo rdeče ali bakrene barve, pripravljen napitek pa je svetlo rdeč in rahlo trpkega okusa (Sivasubramaniam, 2019).

Zaradi različnega postopka priprave imata zeleni in črni čaj različne biološke učinke (Chacko et al., 2010). Študije so v zadnjih letih pokazale potencialne pozitivne učinke pri različnih boleznih, kot je rak, bolezni srca in ožilja, kronične vnetne bolezni in presnovni sindrom. Prav tako uravnava več celičnih stresorjev, kot so oksidativno, hipertonično, osmozno, toplotno in UV obsevanje (Yu et al., 2020).

2.2.5 Beli čaj

Beli čaj tako kot zeleni čaj ni fermentiran. Za beli čaj se namreč nabirajo mladi listi, ki še niso popolnoma odprti. Takrat so brsti še prekriti s finimi belimi dlačicami, po čemer je čaj tudi dobil ime. Čajne liste tako kot pri zelenem čaju po obiranju poparijo, da preprečijo oksidacijo polifenolov. Nato liste pretlačijo in valjajo, pri čemer dobijo značilno obliko in velikost. Po končnem sušenju pa jih še razvrstijo glede na velikost listov (Waugh et al., 2017). Beli čaj ima največ antioksidativnih učinkov, hkrati pa v povprečju vsebuje najmanj kofeina. Mlade čajne brstičke se obira ročno, zato je beli čaj zelo cenjen (Trebec, 2014).

Raziskave so pokazale, da ima beli čaj pozitivne učinke in pripomore k zaščiti pred boleznimi srca in ožilja, rakom, sladkorno boleznijo, boleznimi osrednjega živčevja in boleznimi, ki jih povzročajo mikroorganizmi (Sanlier, Atik and Atik, 2018).

2.2.6 Oolong ali rdeči čaj

Oolong čaj je delno fermentiran. Pri proizvodnji proces fermentacije poteka krajši čas in je glede na čas fermentacije nekje med zelenim in črnim čajem. Nekje vmes je tudi pri okusu in barvi, ter vsebnosti kofeina, polifenolov in ostalih komponent. Stopnja fermentacije je lahko različna, zato se bolj fermentiranemu oolong čaju, ki je bližje črnemu kot zelenemu, reče tudi rdeči čaj (Waugh et al., 2017). Oolong čaj naj bi zmanjšal tveganje za pojav različnih kroničnih bolezni, bolezni srca in diabetesa, saj prisotni polifenoli znižujejo krvni sladkor in odpornost celic na inzulin (WebMD, 2021).

2.3 VODNA BOLHA DAPHNIA MAGNA

Daphnia magna je majhen planktonski vodni rak. Spada v kraljestvo živali (*Animalia*), deblo členonožcev (*Arthropoda*), poddeblo rakov (*Crustacea*), razred ramenonožcev (*Branchiopoda*), red vodnih bolh (*Cladocera*), družino *Daphniidae* in rod dafnij (*Daphnia*). Gre za nevretenčarje, ki so bili poimenovani po značilnem vrtoglavem gibanju v vodi. Imajo pomembno vlogo v ekosistemi, saj so hrana tako vretenčarjem, kot tudi nevretenčarjem, hkrati pa se prehranjujejo s fitoplanktonom (Kosi, 2017).

Dafnijo najdemo v skalnatih bazenih Atlantika vzdolž severovzhodne obale Združenih držav. Tudi v zahodni Evropi, vključno z Anglijo, Belgijo, Nizozemsko, Finsko in na območjih Črnega morja ter na nekaterih Baltskih otokih. Živi v sladkovodnih in slanih habitatih, vključno z jezeri, rekami in začasnimi tolmoni. Najugodnejša življenjska temperatura je med 18 °C in 22 °C, vendar lahko prenašajo tudi veliko širši razpon (Elenbaas, 2013).

2.3.1 Fizični opis

Daphnia magna je zelo majhna, običajno velika med 2 mm in 5 mm in ima ovalno obliko, podobno ledvičastemu fižolu. Telo dafnije prekriva prozorna lupinasta struktura, imenovana dvoloputast karapaks, ki je večinoma narejena iz hitina. Sega do ščita glave, na koncu pa se podaljša v trn. Ker je dafnija prozorna, je po navadi takšne barve, kot je hrana, ki jo je zaužila. V notranjosti karapaksa ima lističaste okončine, ki sodelujejo pri ustvarjanju toka vode, ki prenaša hrano in kisik v usta in škrge. Dafnija ima tudi dva velika kremplja, ki se uporabljata predvsem za čiščenje karapaksa. Ima eno sestavljeno oko, ki je videti kot



Slika 2: Vodna bolha *Daphnia magna* (lasten vir)

sprednja temna lisa, in eno preprosto oko (Elenbaas, 2013). Ima dva seta dolgih, dvojno razvejenih anten, ki so dolge za pol njene dolžine ali celo več. Prvi par anten je skoraj zakrnel, drugi par pa se uporablja za plavanje. Moški organizmi so manjši od ženskih, vendar imajo daljše antene, drugačen trebuh in spremenjene, kot kavelj prve noge, ki služijo za pritrdjevanje samic med parjenjem (Kosi, 2017). Vodne bolhe imajo odprt krvni obtok. Srce se nahaja na hrbtni strani živali. Srčni utrip imajo relativno hiter, upočasni se pri nižjih temperaturah. Zaradi

prozornega telesa, je srce mogoče z lahkoto opazovati, zaradi česar se dafnija pogosto uporablja v raziskovalne namene (Ebert, 2005).

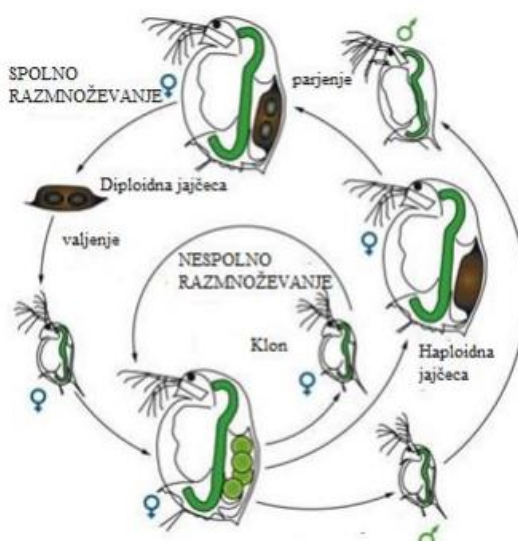
2.3.2 Življenjski cikel

Pri optimalnih pogojih lahko dafnija živi tudi 56 dni. Življenjski cikel je močno odvisen od številnih zunanjih dejavnikov, kot so količina raztopljenega kisika in temperatura vode ter razpoložljivost hrane (Kosi, 2017).

Za življenjski cikel dafnije v rastni sezoni je značilen nespolni način razmnoževanja. Samica proizvede sklop partenogenetskih jajčec vsakič, ko se levi. Razvoj jajčec je takojšen. Pri 20 °C se zarodki izležejo iz jajčec, vendar še ostanejo znotraj samice, kjer se naprej razvijajo. Po treh dneh se mlade dafnije sprostijo. So zelo podobne odraslim osebkom, samo da še nimajo razvitih spolnih organov. Mladi osebki se večkrat levijo in gredo skozi vmesne faze, preden izležejo svoja prva jajčeca. To po navadi traja od 6 do 10 dni. Odrasla samica lahko proizvede sklop jajčec vsake 3 do 4 dni do svoje smrti (Ebert, 2005). Če pogoji niso optimalni, ali če so jajčeca nastala s spolnim razmnoževanjem, se spustijo v valilne vrečke, kjer jajčeca vstopijo v diapavzo in se izvalijo, ko so razmere ugodnejše (Elenbaas, 2013).

2.3.3 Razmnoževanje

Daphnia magna se razmnožuje tako nespolno kot spolno in ima partenogenetski življenjski cikel, ki prikazuje heterogeno razmnoževanje. Najugodnejši pogoji in posledično največ jajčec nastane spomladi, ko lahko samica leže jajčeca vsake 4 dni in potem ostanejo v valilnih vrečkah še 2 do 3 dni, pa tudi poleti in jeseni (Kosi, 2017). Pri nespolnem razmnoževanju samice proizvajajo diploidna jajčeca, ki so kloni odraslega organizma. Pri tem nastanejo samo ženski osebki. V neugodnih razmerah, kadar je v okolju na voljo malo hrane, na območju prevelike gostote ali v ekstremnih temperaturnih razmerah, pa se razmnožujejo spolno. Spolno



Slika 3: Spolno in nespolno razmnoževanje vodne bolhe

razmnoževanje po navadi poteka v pozni jeseni (Elenbaas, 2013). Pri tem nastanejo moški organizmi kot odgovor na okolijski stres (Kosi, 2017). Med parjenjem samec zgrabi samico, ki proizvede oplojena haploidna jajčeca, ki se ovijejo v valilne vrečke (Elenbaas, 2013). Takšna jajčeca imenujemo zimska jajčeca, saj jih samica nosi na hrbtu, dokler niso razmere ugodnejše. V tem času so samice v večji nevarnosti plenjenja, saj so jajčeca pigmentirana in so hitreje vidne (Kosi, 2017).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 DELITEV NALOGE

Nalogo smo razdelili na kemijski in biološki eksperimentalni del. Pri kemijskem delu smo z metodo UV-VIS spektrofotometrije izmerili absorbanco različnih vzorcev pri določeni valovni dolžini in izračunali koncentracijo kofeina v vsakem vzorcu. Izbrali smo 5 različnih vrst čajev: zeleni, črni, rdeči, beli in matcha zeleni čaj. Za primerjavo smo vzeli še vzorec kave. Dobljene koncentracije smo primerjali z že znanimi raziskavami.

Pri biološkem delu smo z metodo štetja srčnega utripa opazovali vpliv raztopin različnih čajev na srčni utrip vodne bolhe. Dobljene rezultate smo primerjali z izračunanimi koncentracijami pri kemijskem delu in povlekli vzporednice med koncentracijo kofeina v čaju in vplivu le tega na srčni utrip vodne bolhe.

3.2 VZORCI

3.2.1 Vzorci čajev

Vsi vzorci čajev so bili kupljeni v trgovini Chai v Europarku v Mariboru. Vzorci označeni s številkami od 1 do 4 so bili v obliki posušenih listov shranjeni v papirnatih natron vrečkah z zapirali po 50 g. Vzorec označen s številko 5 je bil shranjen v obliki prahu v treh majhnih vrečkah po 10 g, ki so bile v posodi s pokrovom.

Vzorec številka 1 je japonskega porekla, vzorci 2, 4 in 5 so kitajskega porekla in vzorec številka 3 je indijskega porekla.

Tabela 1: Opis vzorcev čajev

Vzorec	Poreklo	Rok uporabe	Ime vzorca- oznaka	Oblika
1	Japonska	junij, 2023	zeleni čaj	posušeni čajni listi
2	Kitajska	maj, 2022	črni čaj	posušeni čajni listi
3	Indija	april, 2022	rdeči čaj	posušeni čajni listi
4	Kitajska	april, 2022	beli čaj	posušeni čajni listi
5	Kitajska	1. 9. 2022	matcha čaj	prah



Slika 4: Čaji uporabljeni v raziskovalni nalogi (lasten vir)

3.2.2 Vzorec kave

Za vzorec kave smo vzeli mleto kavo Barcaffé classic, ki je bila kupljena v trgovini Mercator. Vzorec kave, ki je označen s številko 6, je bil shranjen v plastični vrečki, v notranjosti obdani s folijo in je slovenskega porekla.

Tabela 2: Opis vzorca kave

Vzorec	Poreklo	Rok uporabe	Ime vzorca- oznaka	Oblika
6	slovensko	15. 3. 2022	kava	mleta- prah

3.3 KEMIJSKE METODE IN MATERIALI

3.3.1 Priprava infuzij

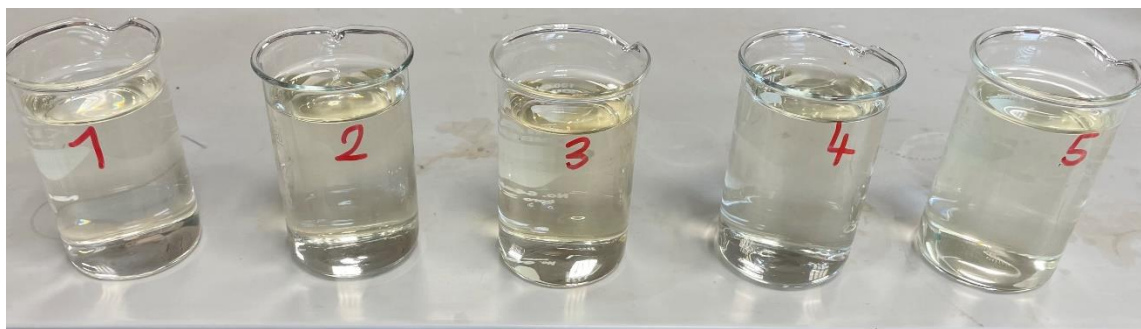
Infuzije od 1 do 6 smo pripravili po istem postopku. Natehtali smo 1g vsakega vzorca v čašo in dodali 100 ml vrele vode, temperature 100 °C, z merilnim valjem, pri čemer smo zadnjih nekaj kapljic dodali s kapalko, za večjo natančnost. Pripravljene infuzije smo pustili 5 minut. Nato smo pri vzorcih od 1 do 4 uporabili tehniko dekantiranja, da smo ločili čajne liste od tekočine. Vzorca 5 in 6 pa smo z lijem prefiltrirali. Tako pripravljene infuzije smo uporabili pri biološkem eksperimentalnem delu, za kemijski del pa smo jih še dodatno razredčili v razmerju 1:100, drugače ni bilo mogoče izmeriti absorbance pri valovni dolžini 273 nm z UV spektrofotometrom.



Slika 5: Čajne infuzije (lasten vir)

3.3.2 Redčenje infuzij

Pripravljene infuzije iz točke 3.3.1 smo redčili v razmerju 1:100. Tako pripravljene raztopine smo uporabili v naslednjem koraku določanja koncentracij kofeina.



Slika 6: Raztopine čajev (lasten vir)

3.3.3 Določanje koncentracij kofeina z UV-VIS spektrofotometrom

Princip:

Koncentracije kofeina v posameznih vzorcih smo določili z UV-VIS spektrofotometrom. Metoda spektrofotometrije temelji na interakcijah med neko snovjo in elektromagnetnim valovanjem. Pri tej metodi merimo absorbcije monokromatske svetlobe oziroma svetlobe ene valovne dolžine pri prehodu skozi vzorec in na podlagi tega določimo koncentracijo analita oziroma izbrane snovi (Miklavčič, 2015).

Aparature in pribor:

- UV-VIS Spektrofotometer: Perkin Elmer Lambda Bio+ (izmerjena absobanca: $\pm 0,0001$)
- tehtnica ($\pm 0,0001\text{g}$; $\pm 0,01\text{g}$)
- merilne pipete ($\pm 0,05\text{ml}$; $0,02\text{ml}$; $0,1\text{ml}$)
- merilni valji ($\pm 1\text{ml}$)
- merilna bučka ($\pm 0,100\text{ml}$)
- čaše
- plastične kapalke
- sterilne žličke
- steklene palčke
- lij
- filter papir



Slika 7: UV-VIS Spektrofotometer: Perkin Elmer Lambda Bio+ (lasten vir)

Izvedba:

Najprej smo naredili umeritveno krivuljo. Začetno raztopino čistega kofeina smo pripravili tako, da smo v merilno bučko natehtali $0,2020\text{ g}$ kofeina in dodali destilirano vodo do oznake. Pripravljeno začetno raztopino smo redčili tako, da smo v čašo odpipetirali določen volumen začetne raztopine (V_z) in dodali določen volumen destilirane vode (V_d), izmerjen z merilnim valjem, da smo skupaj dobili 100 ml raztopine (tabela 3). V literaturi smo našli podatek, da je valovna dolžina kofeina 273 nm (Jaber Al-Obaidi, 2015). Spektrofotometer smo kalibrirali z destilirano vodo. Nato smo izmerili absorbance petih standardnih raztopin pri valovni dolžini 273 nm . Vsaki raztopini smo izmerili absorbanco dvakrat in izračunali povprečje (tabela 3).

Tabela 3: Mase in volumni uporabljeni za pripravo standardnih raztopin

Raztopina	m_s (mg)	V_z (ml)	V_d (ml)
1	0,404	0,2	99,8
2	0,808	0,4	99,6
3	1,01	0,5	99,5
4	1,21	0,6	99,4
5	1,62	0,8	99,2

Izračunali smo koncentracije standardnih raztopin in v programu Excel narisali graf absorbance v odvisnosti od koncentracije, ki prikazuje umeritveno krivuljo.

Nato smo pripravljenim raztopinam iz točke 3.3.2 izmerili absorbanco dvakrat in nato izračunali povprečje. Iz dobljenih absorbanc smo v programu Excel na podlagi umeritvene krivulje izračunali koncentracije pripadajočim absorbancam. Iz dobljenih koncentracij smo izračunali maso kofeina v pripravljenih infuzijah iz točke 3.3.1.

3.4 BIOLOŠKE METODE IN MATERIALI

3.4.1 Metoda štetja srčnega utripa vodne bolhe

Pri prvem delu biološkega eksperimentalnega dela smo preučevali vpliv pripravljenih infuzij iz točke 3.3.1 na srčni utrip vodnih bolh. Vodne bolhe smo na dan eksperimenta prevzeli v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano na Teznu. Hranjene so bile v steklenem kozarcu v akvarijski vodi.

Princip:

Daphnia magna ima to edinstveno lastnost, da je njeno telo prozorno, kar omogoča opazovanje srca. Metoda štetja srčnega utripa temelji na dejstvu, da nekatere snovi vplivajo na frekvenco srčnega utripa, kar je mogoče z lahkoto opaziti, kot spremembo v hitrosti bitja srca, ko je vodna bolha izpostavljena določeni substanci. Ta metoda se pogosto uporablja v raziskovalne in poučevalne namene.

Aparature in pribor:

- svetlobni mikroskop Leica DM500 s kamero
- objektna stekelca z vdolbinami
- plastične kapalke
- papirnate brisače
- koščki filter papirja
- čaše
- štoparica na telefonu
- beli listi papirja
- barvna pisala

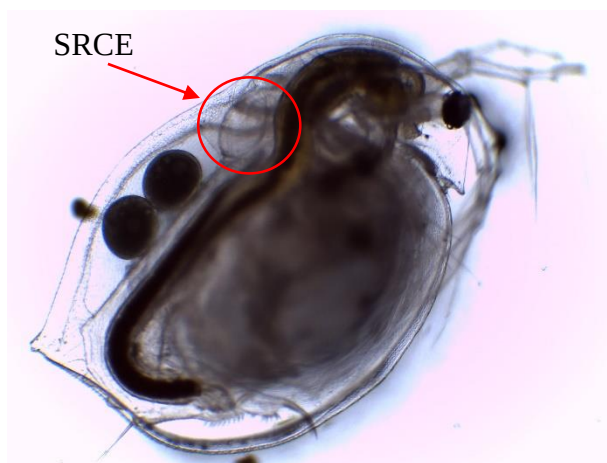


Slika 8: Svetlobni mikroskop, pripomočki in vodne bolhe v kozarcu (lasten vir)

Izvedba:

Pripravili smo si delovno okolje z vsemi potrebnimi materiali, pripomočki in aparaturami (slika 8). S plastično pipeto, ki smo jo na koncu poševno odrezali, da je bila odprtina dovolj velika, smo zajeli naključno vodno bolho in jo previdno prenesli na objektno stekelce z vdolbino. Vodno bolho smo pustili 3 minute, da se je privadila na novo okolje. Nato smo popivnali odvečno vodo s koščkom filter papirja, da se vodna bolha ni preveč premikala med

opazovanjem. Objektno stekelce smo dali pod mikroskop pod 400-kratno povečavo. Prilagodili smo položaj mizice tako, da smo jasno videli vodno bolho in da je bilo njeno srce na sredini vidnega polja (slika 9). Ob mikroskopu smo imeli pripravljen beli list papirja, črni flumaster in štoparico na telefonu. Gledali smo v mikroskop, pritisnili na štoparico in začeli risati pikice na beli list papirja v ritmu bitja srca. Vsaka pika na papirju predstavlja en utrip srca (slika 10). Merili smo 15 sekund in nato z rdečim pisalom prešteli pikice na papirju ter število pomnožili z 4, da smo dobili število utripov na minuto. Po končanem merjenju frekvence bitja srca, smo dali vodno bolho v posebno posodo z vodo za že uporabljene živali. Ta postopek smo ponovili še na eni vodni bolhi. Za čim večjo natančnost smo za kontrolo eksperimenta in za vsako raztopino opazovali dve vodni bolhi in vsaki izmerili srčni utrip trikrat. Potem smo izračunali povprečje utripov na minuto ene in druge vodne bolhe in še njuno skupno povprečje, ki smo ga obravnavali kot končen rezultat. V programu Excel smo zračunali tudi standardne odklone.



Slika 9: Označeno srce vodne bolhe (lasten vir)

ZELENI ČAJ (1)

Bohla 2

$$55 \cdot 4 = 220$$



$$53 \cdot 4 = 212$$



$$54 \cdot 4 = 216$$



Slika 10: Primer beleženja srčnega utripa vodne bolhe za zeleni čaj (lasten vir)

3.4.2 Merjenje srčnega utripa na vzorcu človeške populacije

Pri drugem delu biološkega eksperimentalnega dela smo preučevali vpliv pripravljenih infuzij iz točke 3.3.1 na srčni utrip človeka. Vzorec človeške populacije je predstavljalo 10 dijakov 1. letnika iz II. gimnazije Maribor, od tega je bilo 5 oseb ženskega spola in 5 oseb moškega. Stari so bili med 15 in 16 let.

Princip:

Merilnik krvnega tlaka je lahko ročni, avtomatski ali polavtomatski. Mi smo merili z avtomatskim. Ima manšeto in vgrajen merilnik, s katerim zazna krvni tlak in srčni utrip.

Aparature in pribor:

- nadlaktni merilnik krvnega tlaka Omron M2
- tehtnica ($\pm 0,01\text{g}$)
- sterilna žlička
- papirnati kozarci
- lij
- filter papir



Slika 11: Nadlaktni merilnik krvnega tlaka Omron M2 (lasten vir)

Izvedba:

Pripravili smo čaje po postopku opisanem pod točko 3.3.1 z razliko, da smo vse čajne infuzije prefiltrirali z uporabo lij in filtrirnega papirja. Za vsako vrsto čaja smo pripravili po dve čajni infuziji. Testirancem smo izmerili srčni utrip z nadlaktnim merilnikom krvnega tlaka pred in 10 min po zaužitju čaja. Za vsako vrsto čaja je bil eden izmed testirancev ženskega in drugi moškega spola.

4 REZULTATI

4.1 Določanje vsebnosti kofeina

4.1.1 Umeritvena krivulja

Tabela 4: Podatki za umeritveno krivuljo za določitev koncentracije kofeina

Koncentracija (mg/L)	Absorbanca pri 273nm (±0,001)
4,04	0,1105
8,08	0,3035
10,1	0,3945
12,12	0,4905
16,16	0,6940

Graf 1: Umeritvena krivulja s kofeinom



Enačba premice je $y = 0,0478x - 0,0848$, kjer x predstavlja koncentracijo in y absorbanco.

$$\text{koncentracija} = \frac{A + 0,0858}{0,048} \times \text{redčitveni faktor}$$

Korelacijski faktor R^2 je **0,9996**.

4.1.2 Določanje kofeina v vzorcih čajev in kave

Tabela 5: Absorbance in koncentracije razredčenih raztopin čajev in kave

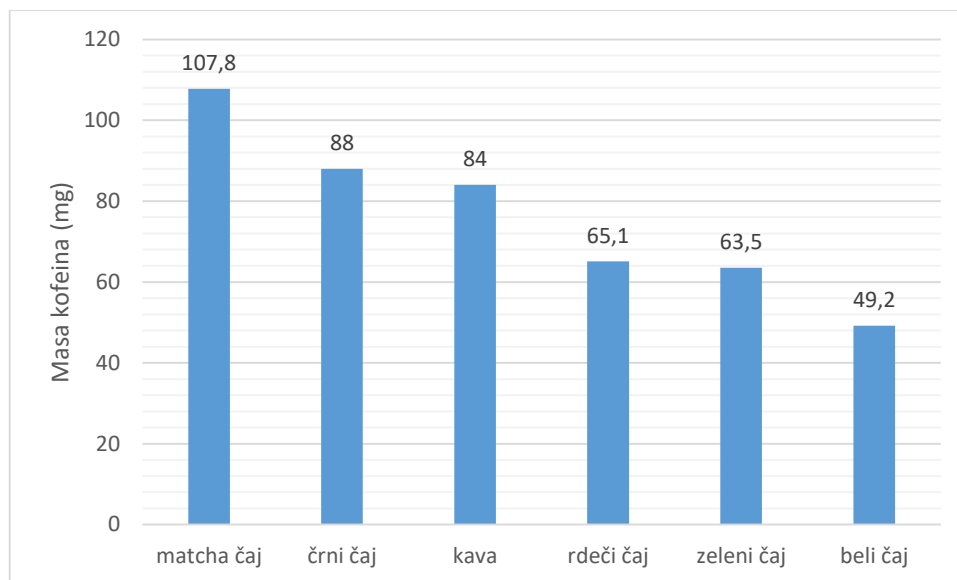
Raztopina	Ime raztopine	Absorbanca	Koncentracija v razredčeni raztopini (mg/L)
1	zeleni čaj	0,2190	6,35
2	rdeči čaj	0,2265	6,51
3	črni čaj	0,3365	8,8
4	Beli čaj	0,1505	4,92
5	matcha čaj	0,4315	10,78
6	kava	0,3175	8,4

Tabela 6: Masa kofeina v čajih in kavi na 100 ml infuzije

Infuzija	Ime infuzije	Volumen infuzije (l)	masa kofeina (mg)
1	zeleni čaj	0,1	63,5
2	rdeči čaj	0,1	65,1
3	črni čaj	0,1	88
4	beli čaj	0,1	49,2
5	matcha čaj	0,1	107,8
6	kava	0,1	84

Masa kofeina v prvotno pripravljene kavni in čajnih infuzijah se giblje med 108 mg in 49 mg na 100 ml pripravljene infuzije. Največjo vsebnost kofeina ima matcha čaj in sicer 107,8 mg, najmanjšo pa beli čaj, 49,2 mg. Kava je po vsebnosti kofeina tretja z 84 mg.

Graf 2: Masa kofeina od največje do najmanjše na 100 ml čajne infuzije



4.2 Merjenje frekvence srčnega utripa vodnih bolh

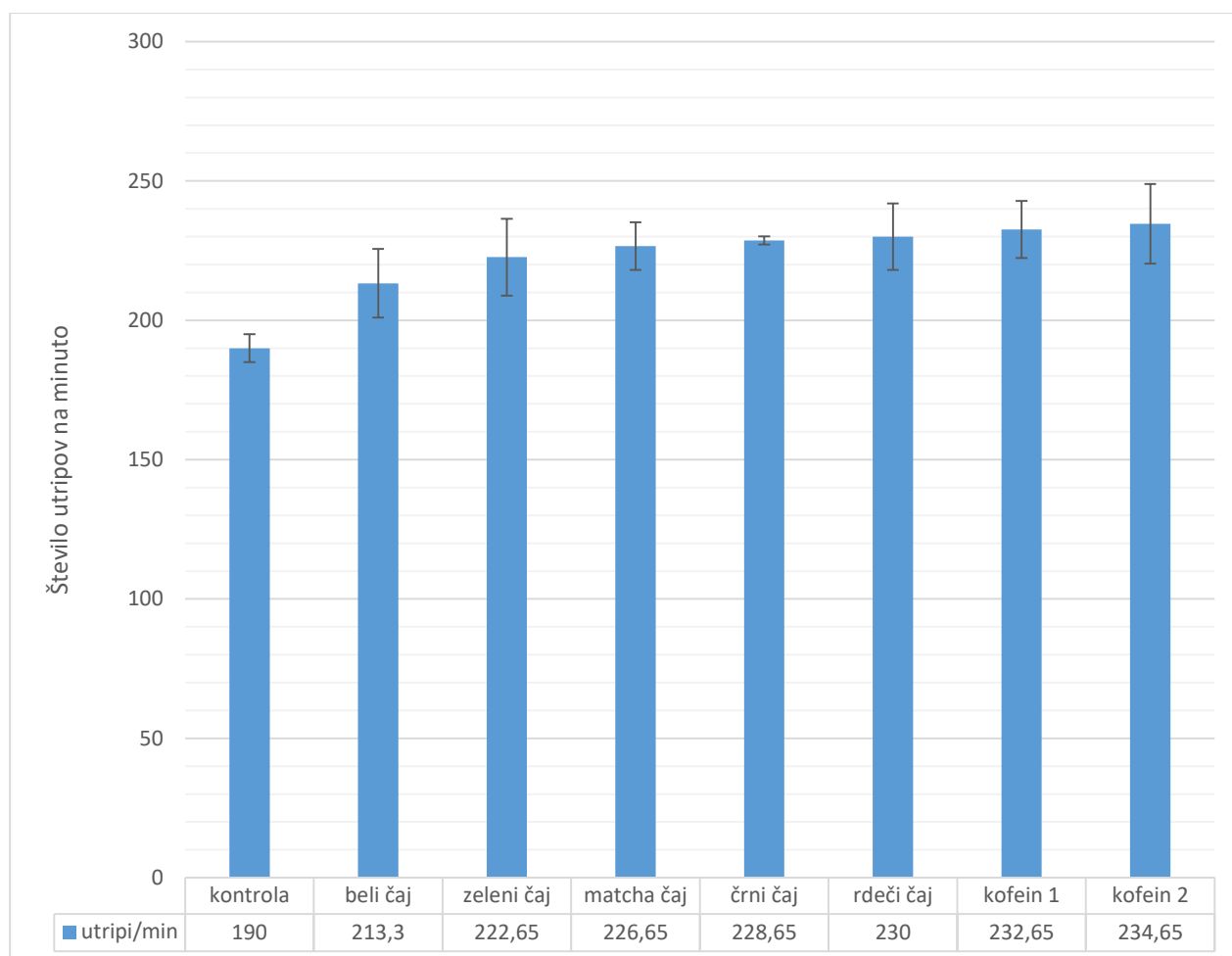
Tabela 7: Število utripov na minuto pri izpostavljenosti različnim raztopinam

Pripravljena raztopina	Vodna bolha	Povprečje (število utripov/min)	Skupno povprečje (število utripov/min)
kontrola	1	192	190
	2	188	
zeleni čaj	1	229,3	222,65
	2	216	
rdeči čaj	1	236	230
	2	224	

črni čaj	1	228	228,65
	2	229,3	
beli čaj	1	217,3	213,3
	2	209,3	
matcha čaj	1	232	226,65
	2	221,3	
kofein (destilirana voda)	1	241,3	234,65
	2	228	
kofein (akvarijska voda)	1	224	232,65
	2	241,3	

Iz tabele 7 lahko razberemo, da se je vsem vodnim bolham, ki so bile izpostavljene raztopinam, povečal srčni utrip glede na kontrolo. Najmanjše odstopanje od kontrole opazimo pri infuziji belega čaja, ki znaša 23,3 utripov/min, največje pa pri raztopini kofeina z destilirano vodo, 44,65 utripov/min. Izmed čajev pa je največje odstopanje pri rdečem čaju in sicer 40 utripov/min.

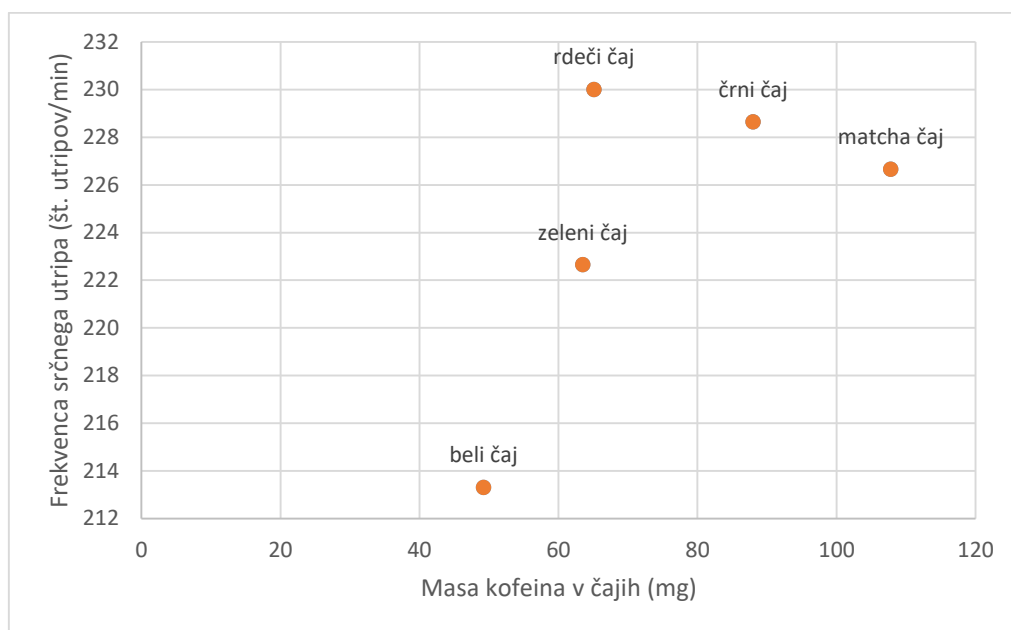
Graf 3: Frekvenca srčnega utripa pri različnih raztopinah od najmanjše do največje



Graf 3 prikazuje izmerjene frekvence srčnega utripa od najmanjše do največje v različnih raztopinah. Vidimo lahko, da raztopini čistega kofeina najbolj pospešita srčni utrip (323,65 utripov/min in 234,65 utripov/min). Med čaji pa ima največji vpliv rdeči čaj (230 utripov/min).

4.3 Povečanje frekvence srčnega utripa vodnih bolh v povezavi z vsebnostjo kofeina

Graf 4: Frekvenca srčnega utripa vodnih bolh v odvisnosti od mase kofeina na 100 ml čajne infuzije



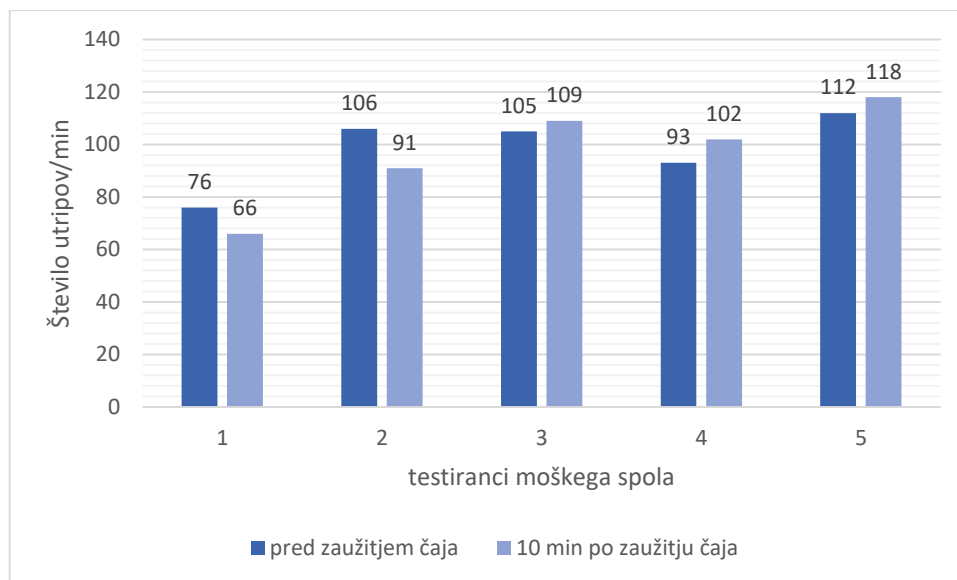
Iz grafa 4 vidimo, da frekvenca srčnega utripa vodnih bolh ne narašča linearno glede na vsebnost kofeina v določenem čaju.

4.4 Merjenje frekvence srčnega utripa človeka

Tabela 8: Srčni utrip testirancev pred in po zaužitju čaja

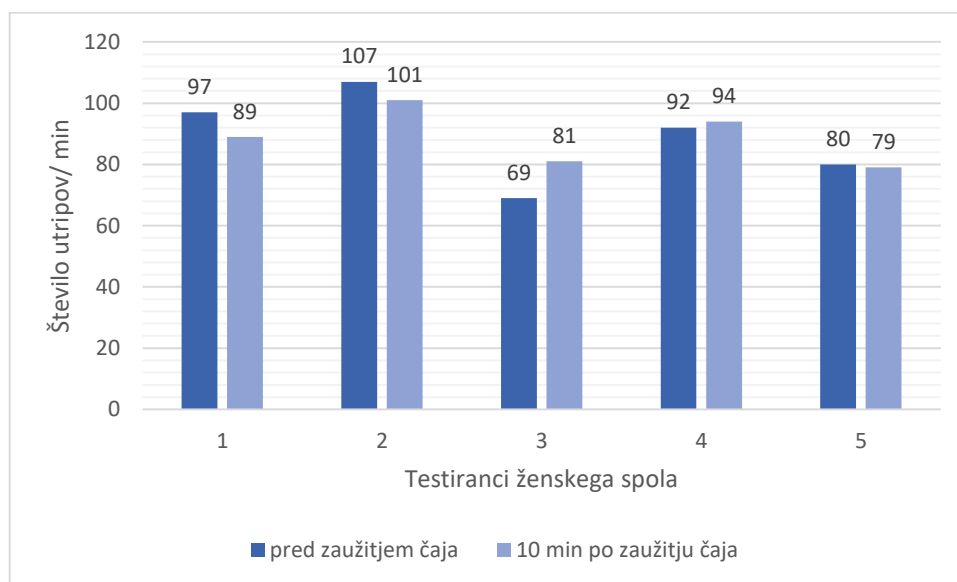
Čajna infuzija	fantje		punce	
	Pred pitjem čaja (št. utripov/min)	10min po pitju čaja (št. utripov/min)	Pred pitjem čaja (št. utripov/min)	10 min po pitju čaja (št. utripov/min)
matcha čaj	76	66	97	89
črni čaj	106	91	107	101
rdeči čaj	105	109	69	81
zeleni čaj	93	102	92	94
beli čaj	112	118	80	79

Graf 5: Srčni utrip testirancev moškega spola



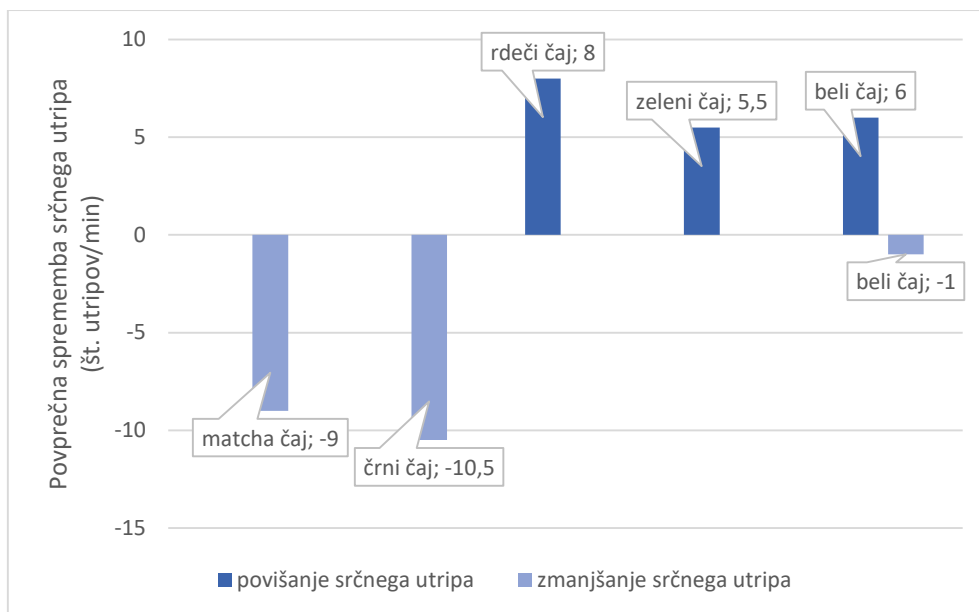
Iz grafa 5 vidimo, da se je prvima dvema testirancema srčni utrip zmanjšal 10 minut po zaužitju čaja in sicer prvemu za 10 utripov/min in drugemu za 15 utripov/min. Ostalim trem testirancem pa se je srčni utrip povečal. Osebi 3 se je povečal za 4 utripe/min, osebi 4 za 9 utripov/min in osebi 5 za 6 utripov/min.

Graf 6: Srčni utrip testirancev ženskega spola



Iz grafa 6 lahko opazimo, da se je trem osebam srčni utrip zmanjšal 10 minut po zaužitju čaja. Osebi 1 se je utrip zmanjšal za 8 utripov/min, osebi 2 za 6 utripov/min in pri osebi 5 se skoraj ni spremenil, samo za 1 utrip/min. Osebi 3 in 4 pa se je utrip povečal, za 12 utripov/min in 2 utripa/min.

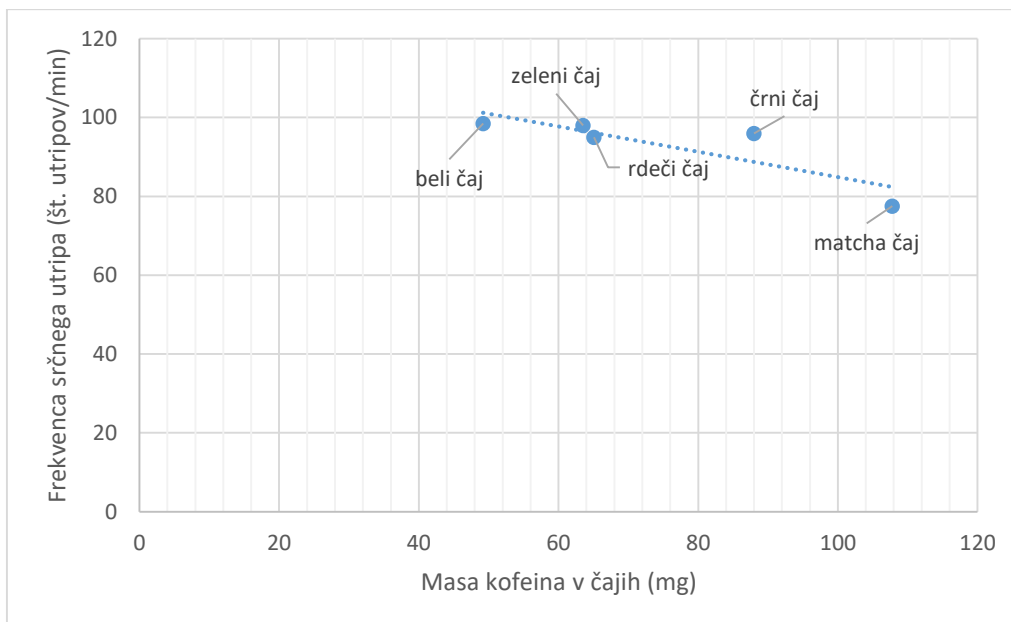
Graf 7: Povprečna sprememba srčnega utripa po zaužitju čajev



Iz grafa 7 lahko razberemo, da se je testirancem, ki so popili matcha in črni čaj, srčni utrip zmanjšal in sicer v povprečju za 9 utripov/min in 10,5 utripov/min. Tistim, ki so popili rdeči in zeleni čaj, se je srčni utrip povečal v povprečju za 8 utripov/min pri rdečem čaju in za 5,5 utripov/min pri zelenem čaju. Beli čaj je imel neenoten in majhen vpliv na hitrost bitja srca. Enemu izmed testirancev, ki je popil beli čaj, se je srčni utrip povečal za 6 utripov/min, drugemu, pa se je minimalno zmanjšal za 1 utrip/min.

4.5 Sprememba frekvence srčnega utripa človeka v povezavi z vsebnostjo kofeina

Graf 8: Povprečna frekvenca srčnega utripa po uživanju čaja pri človeku od mase kofeina v čajih na 100 ml



Največjo povprečno frekvenco srčnega utripa po 10 minutah po zaužitju čaja, sta imeli osebi, ki sta spili beli čaj (98,5 utripov/min), ki vsebuje najmanjšo maso kofeina (49,2 mg). Srčni utrip oseb, ki sta spili zeleni čaj, je tik za rezultatom za beli čaj (98 utripov/min). Zeleni čaj ima drugo najmanjšo vsebnost kofeina in sicer 63,5 mg. Pri testirancema, ki sta spila črni čaj, z 88 mg kofeina, je bil zabeležen povprečen srčni utrip 96 utripov/min. Osebi, ki sta spili rdeči čaj, z 65,1 mg kofeina, pa sta imeli frekvenco srčnega utripa 95 utripov/min. Opazimo, da se vrstni red črnega in rdečega čaja zamenja. Pri matcha čaju, ki pa ima najvišjo vsebnost kofeina (107,8 mg), pa je bil izmerjen povprečen srčni utrip 77,5 utripov/min.

5 RAZPRAVA

Čaj je ena izmed najbolj priljubljenih, lahko dostopnih in razširjenih pijač na svetu. Pitje čaja že od antičnih časov spada med navade za krepitev zdravja. Moderne raziskave na področju medicine to prepričanje samo še potrjujejo in ponujajo znanstveno podprte dokaze. Čajevec (*Camellia sinensis*) ljudje gojijo že tisočletja in njegove liste uporabljajo za zdravljenje različnih obolenj. Novejše študije predstavljajo nove pozitivne učinke čajnih listov in uživanja čajev na zdravje. Zeleni in črni čaj imata potencialne antikancerogene lastnosti. Številne raziskave dokazujejo, da uživanje čajev pripomore k vzdrževanju dobrega zdravja srca in ožilja ter presnove. Čaji pripomorejo k ohranjanju mladega videza in k preprečevanju sladkorne bolezni ter debelosti (Khan in Mukhtar, 2013).

HIPOTEZA 1: čaj vsebuje ogromno različnih substanc in spojin, ena najbolj znanih pa je kofein, za katerega se v primeru čaja pogosto uporablja poimenovanje tein. Kofein predstavlja do 4 % suhe mase čajnih listov (Sivasubramaniam, 2019). Povprečne vsebnosti kofeina v različnih čajih zelo variirajo. Črni čaj v povprečju vsebuje od 20 do 40 mg kofeina na 100 ml, zeleni čaj od 8 do 20 mg na 100 ml, beli čaj od 3 do 25 mg na 100 ml in Matcha čaj v povprečju vsebuje okoli 35 mg kofeina na 100 ml (Wartenberg, 2019). Rdeči ali oolong čaj pa v povprečju vsebuje od 30 do 55 mg kofeina (Metropulos, 2017). Vrednosti kofeina se znotraj vrste čaja zelo razlikujejo. Rezultati so pokazali največjo koncentracijo kofeina v matcha čaju, 107,8 mg na 100 ml, najmanjšo pa pri belem čaju, 49,2 mg na 100 ml. Zeleni čaj je po vsebnosti kofeina na predzadnjem mestu, za belim čajem, s 63,5 mg kofeina na 100 ml. Literatura navaja, da naj bi zeleni čaj v povprečju vseboval manj kofeina kot beli, vendar ima beli čaj veliko večji razpon povprečnih vrednosti kot zeleni čaj. Posledično je lahko razlog v tem, da beli čaj, ki smo ga preučevali v raziskovalni nalogi, spada med tiste vrste, ki vsebujejo več kofeina (Hilal in Engelhardt, 2007). S temi ugotovitvami lahko delno potrdimo 1. hipotezo. Dobljeni rezultati so nekoliko višji od znanih povprečnih vrednosti. Razlog za to bi lahko bil v tem, da v nobeni raziskavi ni bila uporabljena popolnoma enaka vrsta ali masa čajnih listov za pripravo čajev, kot smo jo uporabili mi (1g na 100ml vode). Drugi razlog bi lahko bil v tem, da smo za pripravo čajev uporabili vrelo vodo in ne deset ali dvajset stopinj pod vreliščem, kot je to v navadi. Karaköse S. (2011) namreč navaja, da se pri višji temperaturi iz čajnih listov izloči več kofeina kot pri nižji.

Zanimiva je tudi barva čajev, ki nekako sovпада z naraščanjem vsebnosti kofeina (slika 5). Beli čaj (4), ki vsebuje najmanj kofeina, je najbolj svetlo rumene barve, sledi zeleni (1), ki je svetlo zelene barve, rdeči (2), ki je svetlo oranžne, črni (3), rdeče barve in še matcha (5), ki je temno zelene barve. Na barvo čajev naj bi vpliv postopek pridelave in določene substance v čajnih listih. Črni čaj, ki je popolnoma fermentiran bo imel temnejše liste in posledično bo tudi barva napitka temnejša, v primerjavi z belim ali zelenim čajem, ki nista fermentirana (Liang et al., 2003).

HIPOTEZA 2: za primerjavo s čaji smo vzeli tudi vzorec kave, saj je le ta glavni vir kofeina. Kava kot napitek vsebuje več kofeina kot čaj. Študija Gilbert et al. (1976) navaja povprečno vrednost čaja 27 mg na 237 ml in kave 74 mg na 237 ml, kar je skoraj 3-krat več. Naši rezultati pa prikazujejo ravno nasprotno in sicer, da kava nima najvišje vsebnosti kofeina, temveč ima nižjo kot matcha in črni čaj, vendar višjo kot rdeči, zeleni in beli čaj. Razlog za to je v tem, da večina kavnih zrn že v osnovi vsebuje manj kofeina, kot čajni listi (Wanyika et al., 2010). Čajni listi vsebujejo 3,5 % kofeina, medtem ko kavna zrna samo od 1,1 do 2,2 %. Čaji imajo po navadi manjšo vsebnost kofeina, ker so bolj razredčeni kot kava, saj uporabimo več kavnih zrn kot pa čajnih listov za pripravo napitka. Prav tako po navadi pripravimo kavo z vrelo vodo, ki povzroči ekstrakcijo večje količine kofeina iz zrn, medtem ko čaj pripravimo z vodo, ki ima nekaj stopinj manj (Lisa Wartenberg, MFA, RD, LD, 2019). V našem primeru smo natehtali enako količino kave in čaja in jo raztopili v enaki količini vode, pri enaki temperaturi, pri čemer čaj ni bil bolj razredčen, zato je razumljivo, da imata matcha in črni čaj večjo vsebnost kofeina, s čimer moramo zavreči 2. hipotezo.

HIPOTEZA 3: vodna bolha *Daphnia magna* je testni osebek številnih raziskav in učnih vaj za učence v šolskem laboratoriju. Na njej se v večini izvajajo toksikološki testi. Je zares edinstvena, saj omogoča opazovanje vpliva določenih substanc na srce, ki ga lahko opazujemo v živem organizmu. Raziskave so pokazale, da kofein vpliva na frekvenco srčnega utripa dafnije in jo poveča (Kurien et al., 2018). Največji izmerjeni srčni utrip med vzorci čajev je bil zabeležen pri vodni bolhi, ki je bila izpostavljena infuziji rdečega čaja (230 utripov/min), sledi črni (228,65 utripov/min), matcha (226,65 utripov/min), zeleni (222, 65 utripov/min) in nazadnje še beli čaj (213,3 utripov/min). Raztopini čistega kofeina pa sta imeli še višje vrednosti (234,65 utripov/min in 232,65 utripov/min). Manjša razlika med prvo in drugo raztopino čistega

kofeina se pojavi zaradi uporabe različne vode pri pripravi raztopine. Pri prvi raztopini (kofein 1) smo uporabili destilirano vodo, ki ne vsebuje kisika in bi lahko bilo povečanje frekvence srčnega utripa posledica pomanjkanja kisika in ne samo delovanja kofeina. Zato smo drugo raztopino (kofein 2) pripravili z akvarijsko vodo, v kateri so bile shranjene vodne bolhe in ki je vsebovala kisik, da smo izključili morebitno odstopanje zaradi neprisotnosti kisika v prvi raztopini, ki je imela verjetno ravno iz tega razloga za 2 utripa/min hitrejši srčni utrip. Izračunane vrednosti standardnega odklona kažejo, da sta imeli vodni bolhi, izpostavljeni raztopini črnega čaja, najmanjši standardni odklon (1,49), torej so bile vrednosti teh meritev najmanj razpršene glede na aritmetično sredino. Največji standardni odklon (14,31) pa je pri raztopini kofeina z akvarijsko vodo.

Frekvenca srčnega utripa v odvisnosti od mase kofeina v čajih na začetku narašča, torej večja kot je vsebnost kofeina, večja bo frekvenca srčnega utripa, saj je povprečni srčni utrip pri belem čaju 213,3 utripov/min pri vsebnosti kofeina 49,2 mg na 100 ml in pri zelenem 222,65 utripov/min pri vsebnosti 63,5 mg na 100 ml. Nato pa se trend spremeni in sicer večja kot je vsebnost kofeina, manjša je frekvenca srčnega utripa. Vodni bolhi, izpostavljeni rdečemu čaju z vsebnostjo kofeina 65,1 mg na 100 ml sta imeli povprečni srčni utrip 230 utripov/min. Pri črnem čaju (88 mg na 100 ml) je frekvenca srčnega utripa 228,65 in pri matcha čaju (107,8 mg na 100 ml) je izmerjen srčni utrip 226,65. V razpravi raziskave Austin et al. (2019) je predvidevano, da naj bi kofein vplival na zmanjšanje srčnega utripa, kar delno sovпада z dobljenimi rezultati. Med izmerjenimi vrednostmi frekvenc srčnega utripa so med matcha, rdečim in črnim čajem zelo majhne razlike, okoli 2 utripa/min. Posledično bi lahko bilo tudi mogoče, da je prišlo pri merjenju srčnega utripa do napak, ki bi lahko celo spremenile vrstni red frekvenc srčnega utripa. Pri matcha in rdečem čaju je standardni odklon relativno velik (8,54 in 11,94), medtem, ko je pri črnem čaju samo 1,49. Prav tako ne smemo izključiti možnosti, da sta imeli naključno izbrani bolhi pri izpostavitvi določenemu čaju, že v osnovi višji ali nižji srčni utrip in je zaradi tega posledično prišlo do merske napake. Mogoče je tudi, da na srčni utrip vplivajo še nekatere druge substance prisotne v čaju, zraven kofeina. Glede na dobljene rezultate pa moramo 3. hipotezo ovreči, čeprav so vrednosti pri zelenem in belem čaju sledile predvidevanjem postavljene hipoteze, so še vedno tri vrednosti od petih, ki pa sledijo ravno obratnemu trendu.

HIPOTEZA 4: študije so dokazale, da kofein vpliva na srčni utrip človeka, saj lahko deluje na encime v srcu, ki spodbujajo intenzivnost krčenja srca, torej povišajo frekvenco srčnega utripa. Velike količine kofeina pa lahko povečajo količino kalcija v srčnih celicah, ki regulira stiskanje in sproščanje srčne mišice in posledično vpliva na proces črpanja krvi skozi srce. Vpliv kofeina na srce in ožilje naj ne bi bil odvisen od vira kofeina (čaj, kava...), temveč samo od količine le tega v posameznih napitkih (Gluckman, 2010). Geethavani et al. (2014) navajajo povišanje srčnega utripa za 4,4 utripe/min, kar je pri naših rezultatih najbližje vzorcu zelenega čaja, pri katerem se je testirancema povišal srčni utrip za 5,5 utripov/min. Primerjava med izmerjeno frekvenco srčnega utripa in vsebnostjo kofeina v čajih ne sovпада povsem z literaturo. Frekvenca srčnega utripa se namreč v glavnem z naraščanjem mase kofeina v čajih niža. Študije v večini res trdijo, da kofein vpliva na povečanje srčnega utripa in da večja količina kofeina hitreje poviša bitje srca, vendar nekatere raziskave kažejo, da čaj v celoti, kot pijača, pomirja vpliva na hitrost srčnega utripa človeka. Rezultati študije Quinlan et al. (2000) so pokazali, da čaj zviša krvni tlak, hkrati pa tudi zniža srčni utrip. Tako lahko torej sklepamo, da izoliran kofein poviša srčni utrip pri človeku, ko pa se v čaju veže z drugimi substancami in spojinami, kot so tanini, pa deluje pomirjevalno in celo zmanjša srčni utrip. Rezultati, ki smo jih dobili, se s tem delno skladajo. Matcha in črni čaj sta v obeh primerih testirancem znižala srčni utrip v primerjavi z začetnim, medtem ko sta ga rdeči in zeleni čaj povišala. Pri belem čaju pa je bilo zaznati minimalno povišanje srčnega utripa, pri čemer pri enem izmed testirancev skoraj ni bilo spremembe. S temi ugotovitvami lahko delno potrdimo našo 4. hipotezo. Razlog za nejasne rezultate bi lahko bil v premajhnem številu testirancev, saj ima vsak posameznik različen metabolizem. Prav tako obstaja možnost drugih vplivov na merjenje utripa testirancev, kot sta na primer vnos določene hrane pred merjenjem in psihogeni odziv na merjenje, kar lahko poviša ali zniža srčni utrip. Te dejavnike bi lahko minimizirali tako, da bi bili testiranci tešči in da bi vzeli večji vzorec populacije, ki bi nam omogočil večjo zanesljivost izmerjenih podatkov.

Z našo raziskovalno nalogo smo želeli raziskati in preučiti kofein, kot svetovno priljubljeno substanco, ki jo ljudje uživamo na vsakodnevni ravni ter zmeriti vsebnost kofeina v različnih vrstah čajev in preučiti njegov vpliv na srčni utrip organizmov.

Z nadaljnjo raziskavo in podrobnejšo analizo čajev bi lahko pridobili še natančnejše rezultate. Lahko bi izmerili skupne fenolne spojine in antioksidativno učinkovitost ter to merili na vodni bolhi in človeku. Vključili bi lahko še kombuča čaj in kombuča napitek, ki je prav tako fermentirana pijača, ki se pridobiva s pomočjo posebne oblike simbiotskih očetno kislin

bakterij in več vrst kvasovk v celulozni membrani. Zanimivo bi bilo vzpostaviti morebitne korelacije med učinki čajev in kombuče na vodno bolho in človeka ter raziskati še dodatne pozitivne učinke na zdravje in dobro počutje.

6 ZAKLJUČEK

V raziskovalno nalogo smo vključili 5 različnih vrst čajev in eno vrsto kave.

Z eksperimentalnim delom smo vzorcem čajev in kave izmerili vsebnost kofeina z metodo spektrofotometrije. Z vzorci čajev smo vplivali na srčni utrip vodne bolhe (*Daphnia magna*) in človeka. Namen je bil ugotoviti povezavo med vsebnostjo kofeina v čajih in njihovim vplivom na frekvenco srčnega utripa organizmov.

Ugotovili smo, da kofein v čajih vpliva na srčni utrip vodnih bolh in da ima največji učinek rdeči čaj. Frekvenca srčnega utripa je pri zelenem in belem čaju z vsebnostjo kofeina naraščala, pri rdečem, črnem in matcha čaju pa je glede na vsebnost kofeina padala.

Rezultati kažejo na to, da čaji in kofein v njih prav tako vplivajo na srčni utrip človeka, ni pa povsem jasno, ali ga povečajo oziroma zmanjšajo.

Zanimive korelacije so se pokazale tudi med vsebnostjo kofeina in barvo čajev. Temnejše barve kot je bil čaj, več kofeina je vseboval.

Čaji imajo vrsto pozitivnih učinkov na človeško telo in se že vrsto let uporabljajo na področju medicine. Imajo potencialne pomirjevalne učinke na srčni utrip, kar vodi v umirjenost in sproščenost. S podrobnejšimi raziskavami bi bilo mogoče na podlagi naše raziskovalne naloge izdelati produkte, ki bi imeli pomirjajoč učinek na telo in bi se lahko uporabljali pri različnih bolezenskih stanjih kot so napadi panike, kronični stres in anksioznost. Predvsem pa so tovrstne raziskave pomembne za namene promocije zdravega načina življenja in povezovanja naravnih, dostopnih bioaktivnih učinkovin z domačo preventivno uporabo in uporabo v medicinske namene. Hkrati pa nas z izvedenimi testi naravno pridobljenih učinkovin na občutljive vodne organizme ozaveščajo in opozarjajo o vplivu in morebitni toksičnosti za vse organizme, ki bi jih lahko bili izpostavljeni.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Veliko ljudi vsako jutro išče vir kofeina, ki bi jim dal občutek prebujenosti. Velika večina poseže po kavi, čeprav ima čaj več pozitivnih učinkov in ravno tako vsebuje kofein, ki se počasneje absorbira in deluje dlje časa. Z eksperimenti in raziskavami smo dokazali potencialno pomirjajoče delovanje kofeina v čaju na srčni utrip. Čaji zraven tega vsebujejo še druge bioaktivne snovi, ki so zelo koristne za naše telo.

V laboratoriju smo varno izpeljali eksperimentalno delo. Pri pripravi čajev za vzorec človeške populacije smo nosili rokavice in poskrbeli za higieno. Vzorce smo primerno zavrgli in v vseh primerih ravnali v skladu s predpisi.

Z našo raziskovalno nalogo želimo spodbuditi pogostejše uživanje čaja pri ljudeh, saj deluje antibakterijsko, protivirusno, antikancerogeno, ima pozitiven vpliv na bolezni srca in ožilja, bolezni osrednjega živčevja, na sladkorno bolezen in dobro počutje nasploh.

BIBLIOGRAFIJA

- Alessio, I. (2016). *Uživanje kave in vpliv na zdravje*. Izola: Univ. na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju.
- Austin, C., Onishi, S., Woolley, B., & Silva, R. (2019). *Caffeine concentration shows no significant effect on Daphnia magna heart rate*. Uni. of Oklahoma, odd. za biologijo.
- Barone, J. J., & Roberts, H. R. (1996). *Caffeine consumption*. Food and Chemical Toxicology, 34(1), 119–129. Pridobljeno iz Science Direct:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0278691595000933?via%3Dihub> (20. 3. 2021)
- Cabrera, Carmen & Artacho, Reyes & Giménez, Rafael. (2006). *Beneficial Effects of Green Tea—A Review*. Journal of the American College of Nutrition. 25. 79-99. Pridobljeno iz Taylor & Francis Online:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2006.10719518> (20. 3. 2021)
- Caffeine: chemical compound* (2018). Pridobljeno iz: Encyclopædia Britannica:
<https://www.britannica.com/science/caffeine> (12. 3. 2021)
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). *Beneficial effects of green tea: A literature review*. Chinese Medicine, 5(1), 13. Pridobljeno iz BMC Part of Springer Nature: <https://cmjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-8546-5-13> (19. 3. 2021)
- Corotto, F., Ceballos, D., Lee, A., & Vinson, L. (2010). *Making the Most of the Daphnia Heart Rate Lab: Optimizing the Use of Ethanol, Nicotine & Caffeine*. The American Biology Teacher, 72(3), 176–179. Pridobljeno iz University of California press Journals + Digital publishing:
<http://mr.crossref.org/iPage?doi=10.1525%2Fabt.2010.72.3.9> (22. 3. 2021)

- Črni čaj za začetnike. (4. 9. 2017). Pridobljeno iz Chai: <https://www.chai.si/blog/crni-caj-za-zacetnike/>
- David B. Bylund. (2008). *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Pridobljeno iz Sciencedirect: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780080552323/xpharm-the-comprehensive-pharmacology-reference> (15. 3. 2021)
- Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Nih.gov; National Center for Biotechnology Information (US). Pridobljeno iz National Center for Biotechnology Information Search database: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/> (16. 3. 2021)
- Elenbaas, M. (2013). *Daphnia magna*. University of Michigan, Museum of zoology. Pridobljeno iz Animal Diversity Web: https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/ (10. 3. 2021)
- Franks, M., Lawrence, P., Abbaspourrad, A., & Dando, R. (2019). *The Influence of Water Composition on Flavor and Nutrient Extraction in Green and Black Tea*. *Nutrients*, 11(1). Pridobljeno iz MDPI: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/1/80> (15. 3. 2021)
- Geethavani, G., Rameswarudu, M., & Reddy, R. (2014). *Effect of Caffeine on Heart Rate and Blood Pressure*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(2).
- Gilbert, R. M., Marshman, J. A., Schwieder, M., & Berg, R. (1976). *Caffeine content of beverages as consumed*. *Canadian Medical Association Journal*, 114(3), 205–208. Pridobljeno iz National Center for Biotechnology Information Search database: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1956955/> (19. 3. 2021)
- Gluckman, T., M.D. (2010). *Ask an Expert: How does caffeine affect the heart?* Pridobljeno iz Providence: <https://oregon.providence.org/forms-and-information/a/ask-an-expert->

[how-does-caffeine-affect-the-heart/](#) (13. 3. 2021)

Health Benefits of Oolong Tea. (16. 3. 2021). Pridobljeno iz WebMD:

<https://www.webmd.com/diet/health-benefits-oolong-tea#>

Hilal, Y., & Engelhardt, U. (2007). *Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea*. Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit, 2(4), 414–421.

Pridobljeno iz Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00003-007-0250-3> (21. 3. 2021)

Hrastnik, A. (2016). *NAVADE UŽIVANJA KOFEINA MED DIJAKI*. Univerza v Mariboru, Fakulteta za zdravstvene vede. Pridobljeno iz DKUM:

<https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=64542> (9. 3. 2021)

Jaber Al-Obaidi, Z. M. (2015). *The Qualification and Quantification of Caffeine in Two Different Caffeinated Pharmaceutical Formulas Employing RP-HPLC Technique*.

Pridobljeno iz Researchgate:

https://www.researchgate.net/publication/312053492_The_qualification_and_quantification_of_Caffeine_in_two_different_caffeinated_pharmaceutical_formulas_employing_RP-HPLC_technique (13. 3. 2021)

Jakubczyk, K., Kochman, J., Kwiatkowska, A., Kałduńska, J., Dec, K., Kawczuga, D., & Janda, K. (2020). *Antioxidant Properties and Nutritional Composition of Matcha*

Green Tea. Foods, 9(4). Pridobljeno iz MDPI <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/4/483> (8. 2. 2021)

Karaköse, S. (2011). *Characterization of caffeine and determination of caffeine in tea leaves using uv-visible spectrometer*. Academia, Vol. 5(1), 1–8. Pridobljeno iz academia:

https://www.academia.edu/25462263/Characterization_of_caffeine_and_determination_of_caffeine_in_tea_leaves_using_uv_visible_spectrometer (23. 3. 2021)

- Khan, N., & Mukhtar, H. (2013). *Tea and health: studies in humans*. Current Pharmaceutical Design, 19(34), 6141–6147. Pridobljeno iz Bentham Science: <https://www.eurekaselect.com/115113/article> (20. 3. 2021)
- Kochman, J., Jakubczyk, K., Antoniewicz, J., Mruk, H., & Janda, K. (2020). *Health Benefits and Chemical Composition of Matcha Green Tea: A Review*. Molecules, 26(1), 85. Pridobljeno iz MDPI: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/1/85> (15. 1. 2021)
- Kosi, T. (2017). *Strupenost in učinki vodne raztopine natrijevega klorata (I) na vodne bolhe (Daphnia Magna)*. Pridobljeno iz PeFprints: http://pefprints.pef.uni-lj.si/4735/1/Diploma_kosi_tisk.pdf (13. 3. 2021)
- Kurien, B., Perkins, C., Tullos, C., Mittermeier, Q., & Hjalmarsen, E. (2018). *The Effect of Caffeine and Ethanol on the BPM of Daphnia magna*. Journal of Undergraduate Biology Laboratory Investigations, 1(2). Pridobljeno iz Undergrad science journals: <https://undergradsciencejournals.okstate.edu/index.php/JUBLI/article/view/8785/1910> (20. 3. 2021)
- Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S., & Wu, Y. (2003). *Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions*. Food Chemistry, 80(2), 283–290. Pridobljeno iz Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814602004156?via%3Dihub> (20. 3. 2021)
- LISTI ČAJEVCA (CAMELLIA SINENSIS) (2012). Nacionalni inštitut za javno zdravje. Pridobljeno iz NIJZ: https://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/listi_cajevca.pdf (5. 3. 2021)
- mag. Malek, N., univ. dipl. inž. *Kofein* - Portal prehrana - Inštitut za nutricionistiko. Pridobljeno iz Inštitut za nutricionistiko: <https://www.nutris.org/prehrana/abc->

- [prehrane/druga-snovi/187-kofein.html](https://prehrane.druga-snovi/187-kofein.html) (5. 3. 2021)
- Metropulos, M., MS, RDN. (6. 9. 2017). *Oolong tea: Health benefits and risks*. Pridobljeno iz Medical News Today: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319276#what-is-oolong-tea> (23. 3. 2021)
- National Center for Biotechnology Information (2021). *PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine*. Pridobljeno iz National Library of Medicine: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine> (13. 3. 2021)
- Quinlan, P. T., Lane, J., Moore, K. L., Aspen, J., Rycroft, J. A., & O'Brien, D. C. (2000). *The Acute Physiological and Mood Effects of Tea and Coffee*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 66(1), 19–28. Pridobljeno iz Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0091305700001921?via%3Dihub> (16. 3. 2021)
- Sanlier, N., Atik, İ., & Atik, A. (2018). A minireview of effects of white tea consumption on diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 82–88. Pridobljeno iz Science Direct: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418306617?via%3Dihub> (16. 3. 2021)
- Sivasubramaniam, S. (2019). *tea | Definition, Types, & History*. Pridobljeno iz: Encyclopædia Britannica: <https://www.britannica.com/topic/tea-beverage> (16. 3. 2021)
- Štravs, A. (2018). *PRIMERJAVA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI IN SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V ZELENEM IN MATCHA ČAJU*. Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Odd, za živilstvo.
- Trebec, I. (27. 2. 2014). *Vse, kar še niste vedeli o čajih*. ABC Zdravja. Pridobljeno iz ABC zdravja: <https://www.abczdravja.si/hrana/vse-kar-se-niste-vedeli-o-cajih/> (10. 3.

2021)

Varnostni list. (11. 6. 2019). Po 1907/2006/ES, člen 31, 1-7. Pridobljeno iz Fagron:

https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/58-08-2_%28SL%29.pdf

(15. 3. 2021)

Vsebnost teina. (5. 3. 2021). Chai. Pridobljeno iz Chai: <https://www.chai.si/vsebnost-teina>

Wanyika, H., Gatebe, E., Gitu, L., & Ngumba, E. (2010). *Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market*. Pridobljeno iz Research gate:

https://www.researchgate.net/publication/261012967_Determination_of_caffeine_content_of_tea_and_instant_coffee_brands_found_in_the_Kenyan_market (18. 3. 2021)

Wartenberg, L., MFA, RD, LD. (7. 10. 2019). *Caffeine in Tea vs. Coffee: How Do They*

Compare? Pridobljeno iz Healthline: <https://www.healthline.com/nutrition/caffeine-in-tea-vs-coffee#caffeine-content> (14. 3. 2021)

Waugh, D. T., Godfrey, M., Limeback, H., & Potter, W. (2017). *Black Tea Source,*

Production, and Consumption: Assessment of Health Risks of Fluoride Intake in New Zealand. Journal of Environmental and Public Health, 2017, 1–27. Pridobljeno iz Hindawi: <https://www.hindawi.com/journals/jeph/2017/5120504/> (4. 3. 2021)

Yu, P., Huang, H., Zhao, X., Zhong, N., Zheng, H., & Gong, Y. (2020). *Distinct variation in taste quality of Congou black tea during a single spring season*. Food Science & Nutrition, 8(4), 1848–1856. Pridobljeno iz Wiley Online Library:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.1467> (15. 3. 2021)

VIRI SLIK

Slika 1: Struktura molekule kofeina (Pub Chem, dostopno na

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine#section=2D-Structure&fullscreen=true>, 12. 3. 2021)

Slika 2: Vodna bolha *Daphnia magna* (osebni arhiv avtorice)

Slika 3: Spolno in nespolno razmnoževanje vodne bolhe (Tadeja Kosi, dostopno na

http://pefprints.pef.uni-lj.si/4735/1/Diploma_kosi_tisk.pdf, 19. 3. 2021)

Slika 4: Čaji uporabljeni v raziskovalni nalogi (osebni arhiv avtorice)

Slika 5: Čajne infuzije (osebni arhiv avtorice)

Slika 6: Raztopine čajev (osebni arhiv avtorice)

Slika 7: UV-VIS Spektrofotometer: Perkin Elmer Lambda Bio+ (osebni arhiv avtorice)

Slika 8: Svetlobni mikroskop, pripomočki in vodne bolhe v kozarcu (osebni arhiv avtorice)

Slika 9: Označeno srce vodne bolhe (osebni arhiv avtorice)

Slika 10: Primer beleženja srčnega utripa vodne bolhe za zeleni čaj (osebni arhiv avtorice)

Slika 11: Nadlakti merilnik krvnega tlaka Omron M2 (osebni arhiv avtorice)

Slika 12: *Daphnia magna* z dvema jajčecema (osebni arhiv avtorice)

Slika 13: *Daphnia magna* (osebni arhiv avtorice)

PRILOGA

Tabela 9: Izmerjen srčni utrip vodnih bolh izpostavljenih različnim raztopinam

Pripravljena raztopina	Vodna bolha	Število utripov v 15s	Povprečje (število utripov/min)	Skupno povprečje (število utripov/min)
kontrola	1	47	192	190
		49		
		48		
	2	45	188	
		48		
		48		
zeleni čaj	1	56	229,3	222,65
		63		
		53		
	2	55	216	
		53		
		54		
rdeči čaj	1	54	236	230
		61		
		62		
	2	55	224	
		56		
		57		
črni čaj	1	58	228	228,65
		57		
		57		
	2	57	229,3	
		57		
		57		
beli čaj	1	52	217,3	213,3
		60		

		51		
	2	52	209,3	
		61		
		54		
matcha čaj	1	59	232	226,65
		55		
		60		
	2	54	221,3	
		56		
		56		
kofein (destilirana voda)	1	62	241,3	234,65
		60		
		59		
	2	54	228	
		60		
		57		
kofein (akvarijska voda)	1	54	224	232,65
		57		
		57		
	2	63	241,3	
		63		
		55		



Slika 12: *Daphnia magna* z dvema jajčecema (lasten vir)



Slika 13: *Daphnia magna* (lasten vir)