



Gimnazija Kranj
Koroška cesta 13
4000 Kranj

Raziskovalna naloga na področju kmetijstva, biotehnologije in
prehrane

OPTIMALNI ČAS KUHANJA ŠPINAČE, PRI KATEREM SE IZLOČI MAKSIMALNA MASA OKSALNE KISLINE, HKRATI PA SE OHRANI MAKSIMALNA KOLIČINA ANTIOKSIDANTOV

Avtor:
Tara Gantar

Mentor:
Petra Flajnik, prof. kem.

POVZETEK

Špinača (*Spinacia oleracea* L.) je postala zelo priljubljeno živilo in je nepogrešljiva v uravnoteženi dieti. Poleg številnih ključnih hranil, kot so različni antioksidanti in klorofil, pa vsebuje tudi nekatere potencialno škodljive snovi, kot so oksalna kislina. Cilj te raziskovalne naloge je določiti optimalen čas kuhanja špinače v vodi pri 80°C, pri katerem je špinača najbolj koristna za človeško telo. To je čas, pri katerem se ohrani največ koristnih antioksidantov, hkrati pa izloči maksimalna količina škodljive oksalne kisline.

Masa izločene oksalne kisline je bila določena z metodo redoks titracije. Rezultati eksperimenta so pokazali, da se velik del oksalne kisline izloči že po 1 minuti kuhanja, izločanje pa se z daljšim časom kuhanja pomanjšuje. Količina v špinači ohranjenih antioksidantov pa je bila določena s spektrofotometrijo, natančneje z metodo CUPRAC. Izkazalo se je, da v prvih treh minutah kuhanja količina antioksidantov pada dokaj linearno, vendar veliko počasneje kot narašča masa izločene oksalne kisline.

Optimalen čas kuhanja špinače pri 80°C je bil tako določen med 1 in 2 minutama, saj se takrat izloči največ oksalne kisline, hkrati pa se ohrani največja količina antioksidantov.

ABSTRACT

Spinach (*Spinacia oleracea* L.) has become very popular and is an infallible component of a balanced diet. Besides numerous key nutrients like various types of antioxidants and chlorophyll, it also contains some potentially harmful substances like oxalic acid. The aim of this research is to determine the optimal cooking time at 80°C, at which spinach is most beneficial for the human body. This is the time, when the maximum value of beneficial antioxidants is preserved and the most harmful oxalic acid is excreted.

Mass of excreted oxalic acid was determined with the method of redox titration. The experimental results showed that a large proportion of oxalic acid is already excreted after the first minute of cooking, however, excretion with longer cooking time gradually decreases. The amount of in spinach preserved antioxidants was determined with spectrophotometry, precisely with the CUPRAC method. The amount of preserved antioxidants decreased rather linearly in the first three minutes of cooking; however, the value is falling much slower compared to the increase of excreted oxalic acid.

The optimal cooking time of spinach at 80°C was determined between 1 and 2 minutes, since this is the time when the most oxalic acid is excreted at the same time as the maximum amount of antioxidants is preserved.

TABLE OF CONTENTS

POVZETEK	2
ABSTRACT.....	2
UVOD	4
RAZISKOVALNO VPRAŠANJE.....	5
HIPOTEZI	5
TEORETIČNO OZADJE	5
ŠPINAČA	5
OKSALNA KISLINA.....	6
ANTIOKSIDANTI	7
METODOLOGIJA	8
KUHANJE ŠPINAČE.....	8
DOLOČITEV SPROŠČENE OKSALNE KISLINE.....	8
DOLOČITEV OHRANJENIH ANTIOKSIDANTOV	9
REZULTATI IN ANALIZA	10
MASA IZLOČENE OKSALNE KISLINE	10
OHRANJENI ANTIOKSIDANTI	11
INTERPRETACIJA REZULTATOV	12
ZAKLJUČEK.....	13
VIRI.....	14
VIRI SLIK.....	15
PRILOGA.....	16

UVOD

Namen te raziskovalne naloge je odgovoriti na naslednje raziskovalno vprašanje: »Kateri je optimalni čas kuhanja špinacije (*Spinacia oleracea* L.) pri 80°C, pri katerem se izloči maksimalna masa oksalne kisline, hkrati pa se ohrani maksimalna količina antioksidantov?«

Raziskovalno vprašanje je bilo izbrano glede na to, da je špinacija postala dokaj popularno živilo v vsakodnevni prehrani, in bi s tem razlogom morala biti pripravljena na način, ki je za naše telo najkoristnejši. Poleg tega ni dostopna nobena raziskovalna naloga, ki bi zadevala ravno učinek časa kuhanja na skupno vsebnost antioksidantov in oksalne kisline v špinaciji. Vseeno pa obstajajo članki, v katerih so raziskovali samo vpliv kuhanja na oksalno kislino ali antioksidante v špinaciji vključno z drugimi snovmi, ki v tej nalogi ne bodo upoštevane. Z odgovorom na zastavljeno raziskovalno vprašanje bo možno ovrednotiti strokovna članka Wang et al (2018) ter Hossain et al (2017). Članka Indrawati et al (2004) vendarle ne bo mogoče ovrednotiti, saj zadeva vsebnost antioksidantov v pomaranči in korenju, vendar bo vseeno uporabljena v nalogi, saj podpira zmanjšanje količine antioksidantov s toplotno obdelavo.

V Wang et al (2018) je uporabljena metoda kapilarne elektrolize, s katero je bila določena masa ohranjene oksalne kisline v špinaciji pri treh temperaturah kuhanja (60°C, 80°C and 100°C) in štirih časih (30s, 1min, 2min, 3min). Prišli so do ugotovitve, da se pri višji temperaturi in daljšemu času kuhanja razgradi špinatično tkivo in posledično pospeši sproščanje oksalne kisline, vendar se koncentracija oksalne kisline v špinaciji signifikantno poveča že po 30 sekundah kuhanja pri vseh izmerjenih temperaturah. Glede na članek Wang et al (2018) so najboljši pogoji za kuhanje špinacije, pri katerih se sprosti največ oksalne kisline, pri 100°C za 2 minuti.

V članku Hossain et al (2017) je raziskan vpliv različnih pogojev kuhanja (surova, kuhana, ocvrta špinacija) na koncentracijo treh vrst antioksidantov, prisotnih v špinaciji (fenoli, flavonoid in vitamin C) s spektrofotometrijo. Ugotovili so, da je koncentracija vitamina C v špinaciji edina, ki se s toplotno obdelavo zmanjša, medtem ko se koncentraciji fenolov in flavonoida povečata kot rezultat izboljšanja zmožnosti antioksidantov s povečanjem njihove biološke dostopnosti ob kuhanju ali cvrtju. Hossain et al (2017) prav tako navaja, da je cvrtje špinacije celo bolj primeren postopek toplotne obdelave kot kuhanje, vendar študija ne vsebuje podatkov o temperaturi ali času obdelave. Ravno nasprotno, Indrawati et al (2004) trdi, da se koncentracija antioksidantov v pomarančnem soku zmanjšuje, ko doseže temperaturo 100°C ali več, kar je pojasnjeno z visoko vsebnostjo askorbinske kisline v pomarančni, ki ob visokih temperaturah razpada.

Glede na obstoječe študije sta bili izbrani alternativni metodi za določanje količine antioksidantov in oksalne kisline, ki omogočata primerjavo rezultatov. Za merjenje mase izločene oksalne kisline je bila izbrana metoda redoks titracije po Brown in Ford (2014), medtem ko je bila za določanje količine ohranjenih antioksidantov določena CUPRAC metoda (the cupric reducing antioxidant power method) po Pisosch in Negulescu (2011) and Gouda in Amin (2010). Naprava, uporabljena za izvedbo CUPRAC metode je bila SpectroVis® Plus Spectrophotometer. Izbrana je bila temperatura 80°C, saj jo je lažje vzdrževati v primerjavi s temperaturo 100°C.

RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Kateri je optimalni čas kuhanja špinače (*Spinacia oleracea* L.) pri 80°C, pri katerem se izloči maksimalna masa oksalne kisline, hkrati pa se ohrani maksimalna količina antioksidantov?

HIPOTEZI

HIPOTEZA 1: Masa iz špinače izločene oksalne kisline bo z daljšim časom kuhanja naraščala, vendar se bo po izločanje po določenem času ustavilo.

HIPOTEZA 2: Količina antioksidantov v špinači z daljšim časom kuhanja pada.

TEORETIČNO OZADJE

ŠPINAČA

Špinača (*Spinacia oleracea* L.) je užitna rastlina iz družine ščirovk, ki ima zdravilne lastnosti (Kavitha in Saradha Ramadas, 2013). Bogata je s hranili, kot so vitamini A, C, E in K, minerali magnezijem, kalcijem, železom, fosforjem, bakrom, manganom, cinkom in kalijem, različnimi karotenoidi kot sta β -karoten in lutein, vendar vsebuje tudi potencialno škodljive snovi, kot sta folna in oksalna kislina ter nitrati (Kavitha in Saradha Ramadas, 2013). Špinača je prav tako vir antioksidantov, vendar so vrednosti o količini katerekoli snovi prisotne v špinači drugačne glede na različne strokovne študije in članke (Morelock in Correll, 2008).

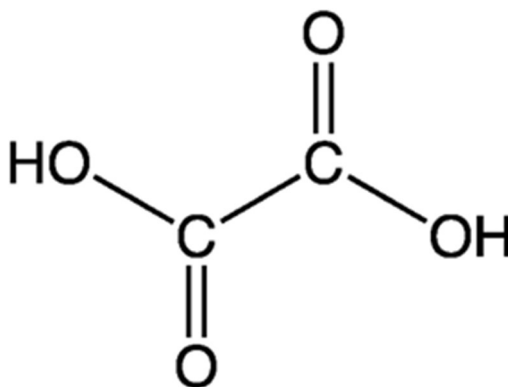


SLIKA 1: Sveža špinača (*Spinacia oleracea* L.).

OKSALNA KISLINA

Oksalna ali etanodiojska kislina je najpomembnejša in najenostavnejša spojina iz skupine dikarboksilnih kislin z manjšo molekulsko maso, ki imajo splošno formulo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$. So vodotopne alifatske kisline, ki so v naravi prisotne tako v obliki soli kot prostih kislin. Pri sobni temperaturi so dikarboksilne kisline prisotne v obliki kristalov brez barve in vonja. Glede na to, da je oksalna kislina prva iz serije dikarboksilnih kislin ($n=0$), ima najvišjo gostoto in konstanto disociacije. Njene kemijske lastnosti so močno povezane s prisotnostjo dveh karboksilnih skupin. (Rozaini, 2012)

Oksalna kislina obstaja v obliki dihidrata ali v nehidrirani obliki, vendar slednja ni prisotna v naravi. Topna je v polarnih topilih, kot so aceton in alkoholi, ni pa topna v kloroformu in benzenu. Ima edinstvene kemijske lastnosti, ki so odraz interakcij med sosednjima karboksilnima skupinama, in posledično poveča vrednost konstante disociacije kot rezultat tako imenovane karboksilacije, saj se oksalna kislina ob hitrem segrevanju do 100°C razgradi. Oksalna kislina je edina dikarboksilna kislina, ki ni odporna na oksidacijo, in se zato uporablja v raznih procesih. Enostavno je oksidirana v ogljikov dioksid in vodo, zlasti ob prisotnosti težkih kovin. (Rozaini, 2012)



SLIKA 2: Molekulska struktura oksalne kisline $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$.

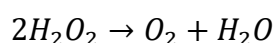
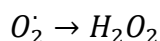
Oksalna kislina je naravno prisotna v špinaci v dokaj velikih količinah. Je organska kislina, ki jo je mogoče najti v rastlinah, algah, glivah, lišajih in živalih, vključno s človekom, kjer je tvorjena kot drugi metabolit vitamina C. Oksalna kislina je lahko prisotna v prosti obliki ali kot mineralni kristali, saj se enostavno veže z različnimi minerali in tako tvori v vodi topne oksalne soli z natrijem, kalijem in cinkom, in netopne oksalne soli s kalcijem, magnezijem in železom. V vodi netopne oksalne soli, ki se tvorijo v črevesju, lahko posledično inhibirajo absorpcijo mineralov in tako znižujejo biološko uporabnost kalcija in železa. Visoke ravni oksalnih soli v človeškem telesu lahko vodijo do nastanka ledvičnih kamnov in motenj prebave. Masa oksalne kisline se v različnih delih rastline razlikuje in je prav tako odvisna od sezone rasti in starosti rastline. (Mou, 2008) Najvišje ravni oksalne kisline so najpogosteje v listih, vmesne koncentracije v semenih in najnižje v stebelu rastline. Vsebnost oksalne kisline v špinaci pa se spreminja tudi med vrstami, saj nekatere vsebujejo 400-600 mg/100g sveže špinace, medtem ko nekatere celo 700-900 mg/100g sveže špinace. (Savage et al, 2000)

ANTIOKSIDANTI

Fitokemikalije telesu nudijo zaščito proti oksidativnemu stresu in pomagajo pri ohranjanju ravnovesja med oksidanti in antioksidanti (Sreeramulu et al, 2013). Oksidativni stres je škoda, ki jo povzročijo reaktivne kisikove vrste, vključno s prostimi radikali, kot so samostojni kisik, hidroksilni radikal, superoksidni anion in vodikov peroksid. Te vrste povzročajo škodo s tem, ko reagirajo s skoraj vsako molekulo, prisotno v živih organizmih, ki imajo pomembno vlogo pri vzpostavljanju mnogih patoloških stanj. Presežek reaktivnih kisikovih vrst povzroči presežek prostih radikalov in lipidne peroksidaze, ki potencialno povzroča bolezenska stanja, kot so rakotvornost, sladkorna bolezen, ateroskleroza, sive mreine in staranje. (Hossain et al, 2017)

Antioksidanti so raznolika skupina z različnimi lastnosti. Encimski antioksidanti so naravno proizvedeni v človeškem telesu, medtem ko so antioksidanti v obliki hranil prisotni v mnogih živilih. Obe skupini antioksidantov lahko deaktivirata ali odstranita reaktivne proste radikale in posledično popravita škodo, ki so jo radikali povzročili. (Hossain et al, 2017) Največji vir antioksidantov je rastlinska hrana, ki vsebuje flavonoide in sorodne fenolske spojine (Hossain et al, 2017). Zelenolistna zelenjava in žita so najbogatejši vir antioksidantov poleg ostalih mikronutrientov, visoke energijske vrednosti in beljakovin (Sreeramulu et al, 2013). Raziskave so pokazale, da redno uživanje sadja in zelenjave lahko obvaruje telo pred škodo, ki jo povzročijo prosti kisikovi radikali, tako da jih zavirajo ali izločijo (Hossain et al, 2017).

Glede na njihovo aktivnost se antioksidanti lahko ločijo na encimske in ne-encimatske. Encimski antioksidanti razgradijo in odstranijo proste radikale, saj jih pretvorijo v vodikov peroksid in nato v vodo ob prisotnosti različnih kofaktorjev, kot so železo, cink, mangan in baker. Poenostavljen mehanizem delovanja antioksidantov je naveden spodaj:



Ne-encimatski antioksidant delujejo kot motilci nastanka prostih radikalov, saj ovirajo verižno reakcijo, ob kateri nastajajo. Primeri najpogostejših antioksidantov so vitamini (A, C, E), bioflavonoidi in karotenoidi, vsaka skupina pa ima svoj mehanizem po katerem razgrajuje proste radikale. (Nimse in Pal, 2015)

Kuhanje ali kakršnakoli druga oblika toplotne obdelave lahko signifikantno zmanjša količino antioksidantov v hrani, navezujoč na temperaturno senzibilnost številnih antioksidantov (Indrawati et al, 2004). Nasprotno, Hossain et al (2017) trdi, da se je količina fenolov in flavonoidov s toplotno obdelavo povečala, saj je visoka temperatura zvišala biološko dostopnost teh antioksidantov in tako zvišala njihovo sposobnost. Znižanje količine s toplotno obdelavo je bilo zaznано le pri vitaminu C, ki ima znano nizko odpornost na visoke temperature (Hossain et al, 2017).

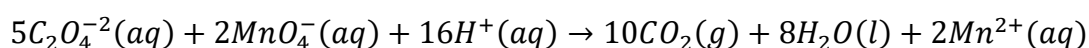
METODOLOGIJA

KUHANJE ŠPINAČE

1000g sveže špinače istega porekla je bilo kupljene v lokalni trgovini. 100g špinače je bilo skuhane v 400ml vode, ki je bila vnaprej segreta na 85°C, upoštevajoč dejstvo, da se je voda ob dodatku špinače ohladila na 80±2°C. Po določenem času kuhanja je bila špinača takoj vzeta iz vode in pripravljena za nadaljne meritve. Postopek je bil ponovljen za vsak vzorec.

DOLOČITEV SPROŠČENE OKSALNE KISLINE

Redoks titracija nam omogoči določiti koncentracijo določene snovi v raztopini na podlagi redoks reakcije, ki se v tem primeru zgodi med kalijevim permanganatom KMnO₄ in oksalno kislino H₂C₂O₄ po naslednji enačbi:



Med reakcijo je MnO₄⁻ (Mn⁺⁷) reduciran v Mn²⁺, kar povzroči spremembo barve iz močne vijolične v brezbarvno, zato dodajanje indikatorja ni potrebno, saj je reakcija kar sama svoj indikator, kjer sprememba barve odraža ekvivalentno točko. (Brown in Ford, 2014)

Po kuhanju špinače je bila odcejena voda ohlajena na sobno temperaturo, nato pa razdeljena na dele po 50ml in vsakemu delu dodanih 100ml H₂SO₄ z molarnostjo 1mol/dm³. Kisla raztopina je bila titrirana z 0,01mol/dm³ KMnO₄ toliko časa, dokler barva raztopine ni ostala svetlo rožnate barve (SLIKA 3) najmanj 15 sekund. Volumen porabljene KMnO₄ je bil odčitani ob vsaki titraciji. Postopek je bil prav tako ponovljen na vzorcu surove špinače, kjer je bila slednja pred titracijo temeljito pretlačena v 50ml vode pri sobni temperaturi.



SLIKA 3: Na levi sliki je 50ml vode, v kateri se je kuhala špinača, na srednji sliki ji je bilo že dodanih 100ml H₂SO₄, na desni sliki pa je bila kisla raztopina že titrirana s KMnO₄ in prikazuje odtенок rožnate, ob katerem je bila titracija končana.

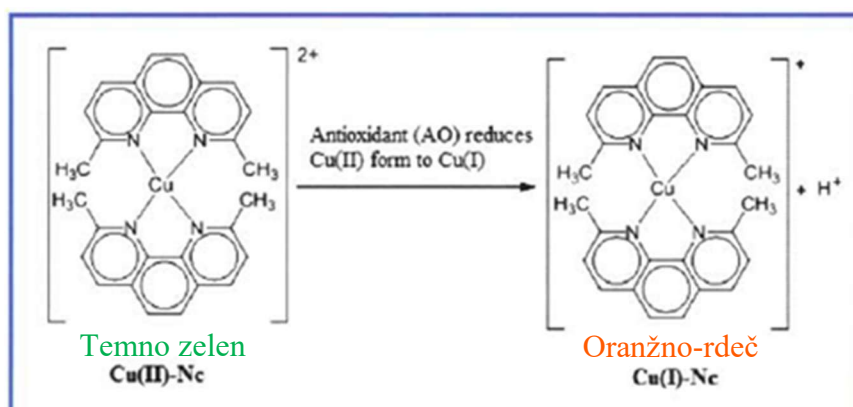
DOLOČITEV OHRANJENIH ANTIOKSIDANTOV

Za določitev količine ohranjenih antioksidantov je bila izbrana metoda CUPRAC (cupric reducing antioxidant power). Za izvedbo procesa je potrebno iz $C_{14}H_{12}N_2$ in $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ pripraviti Cu(II)-neokuproin kompleks. Metoda temelji na redukciji Cu(II)-neokuproin kompleksa v Cu(I)-neokuproin kompleks (SLIKA 4), pogojena pa je s prisotnostjo antioksidanta, ki donira vodik. Potek reakcije je viden zaradi spremembe barve, saj ta iz temno zelene (Cu(II)) preide v oranžno-rdečo (Cu(I)). Absorpcija končne raztopine se tako sklada s spremembo barve, saj se Cu(II)-neokuproin reducira v Cu(I)-neokuproin. (Gouda in Amin, 2010) Sprememba barve je lahko določena kot absorpcija pri 450,5nm glede na študijo Pisosch in Negulescu (2011) in pri 448nm glede na študijo Gouda in Amin (2010), ki prav tako označuje spremembo v količini prisotnih antioksidantov. Relativna sprememba v ohranjenih antioksidantih bo predstavljena s količnikom ohranitve QOP (quotient of preservation), definiranim kot:

$$QOP = 1 - \frac{A_0 - A(\text{končna})}{A_0}$$

QOP je razmerje med razliko začetne (A_0) in končne vrednosti absorpcije ($A(\text{končna})$) ter začetno absorpcijo. Začetna absorpcija je absorpcija končnega vzorca surove špinače, medtem ko je končna absorpcija tista, ki vsebuje končno raztopino vzorcev z različnimi časi kuhanja, in tako omogočata bolj očitno primerjavo. Da količnik izraža vrednost v špinači ohranjenih antioksidantov, je dobljena vrednost odšteta od 1, saj bi drugače predstavljala količino razpadlih antioksidantov. Iz formule za količnik je tako razvidno, da večja vrednost QOP predstavlja večjo količino ohranjenih antioksidantov in obratno. Ko je vrednost količnika enaka 1, je količina antioksidantov maksimalna.

Valovna dolžina (λ), pri kateri je bila izmerjena absorpcija, je bila 449nm, saj je bila to najbližja možna vrednost uporabljeni v študijah Pisosch in Negulescu (2011) in Gouda in Amin (2010), dostopna na razpoložljivem spektrofotometru.



SLIKA 4: Redukcija Cu(II)-neokuproin kompleksa v Cu(I)-neokuproin kompleks ob prisotnosti antioksidanta.

Pred izvedbo meritev je bil spektrofotometer kalibriran z metanolom CH₃OH. Absorpcija pri valovni dolžini $\lambda=449\text{nm}$ je bila s SpectroVis® Plus spektrofotometrom izmerjena na vzorcih špinadne raztopine, pridobljene z vakuumsko filtracijo temeljito zmlete zmesi iz 3,6g ohlajenega vzorca špinadce z dodatkom 10ml CH₃OH. Dodatnih 10ml CH₃OH je bilo prilitih 1ml filtrirane raztopine, od česar je bilo ločenih 1,5ml in zmešano s 0,5ml vnaprej pripravljenega Cu(II)-neokuproin kompleksa. Dobljena raztopina je bila postavljena v spektrofotometer po 150 sekundah, saj se je med tem časom reakcija zaključila (Gouda in Amin, 2010). Tik pred meritvijo je bila raztopina razredčena z 2ml destilirane vode.

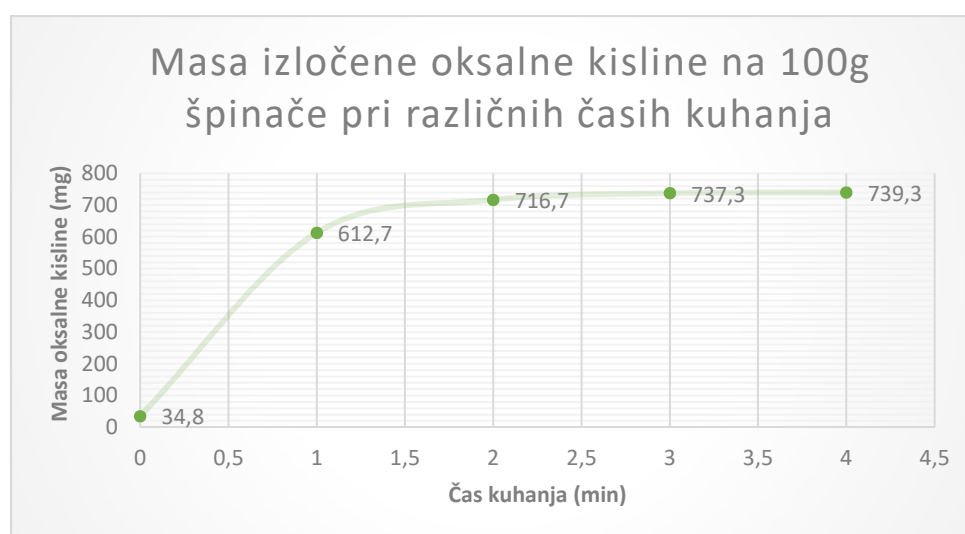
REZULTATI IN ANALIZA

MASA IZLOČENE OKSALNE KISLINE

Mase med kuhanjem izločene oksalne kisline so bile pridobljene iz podatka porabljenega volumna KMnO₄ pri titraciji, saj je molarost te raztopine vnaprej znana. Povprečne vrednosti so podane v *TABELI 4*. Treba je poudariti, da so bile dobljene mase oksalne kisline v enem vzorcu pomnožene z 8, saj je bila tako lahko določena masa oksalne kisline, ki se je izločila iz začetnih 100g špinadce.

ČAS (min)	POVPREČNA MASA OKSALNE KISLINE (mg)
0	34,8
1	612,7
2	716,7
3	737,3
4	739,3

TABELA 4: Izračunani povprečne vrednosti mase oksalne kisline, ki je bila izločena iz špinadnih vzorcev pri različnih časih kuhanja.



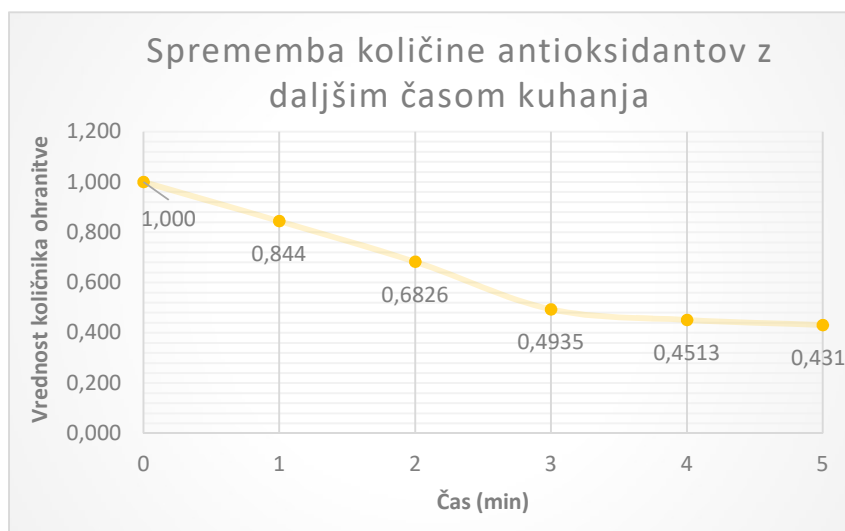
GRAF 1: Masa izločene oksalne kisline na 100g špinadce pri različnih časih kuhanja. Prva točka označena z 0 minutami predstavlja surov špinadni vzorec. Graf je bil narejen v Microsoft Excel.

OHRANJENI ANTIOKSIDANTI

Vrednosti količnika ohranitve antioksidantov (QOP) so bile izračunane za vse meritve absorpcije. Absorpcija surovega vzorca špinacije je bila upoštevana za začetno vrednost A_0 in povprečna absorpcija po n minutah kuhanja končna vrednost $A(\text{final})$. Izračunane vrednosti so podane v *TABELI 5*.

ČAS (min)	POVPREČNA ABSORPCIJA	QOP
0	1,232	1
1	1,040	0,8442
2	0,841	0,6826
3	0,608	0,4935
4	0,556	0,4513
5	0,531	0,4310

TABELA 5: Povprečna absorpcija pri 449nm in količnik ohranitve izračunana (QOP) za vsak čas kuhanja.



GRAF 2: Zmanjševanje vrednosti količnika ohranitve antioksidantov (QOP) kot posledica zmanjševanja količine ohranjenih antioksidantov z daljšanjem časa kuhanja. Graf je bil narejen v Microsoft Excel.

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Namen te raziskovalne naloge je bil najti optimalen čas kuhanja špinače, pri katerem se izloči največja masa oksalne kisline in hkrati ohrani največja količina antioksidantov. Rezultati so bili priskrbljeni z dvema ločenima metodama (po Brown in Ford (2014) ter Gouda in Amin (2010)) in so zato predstavljeni z dvema ločenima grafoma. Ponovno je treba poudariti, da vrednosti oksalne kisline predstavljajo maso izločene kisline (*GRAF 1*), medtem ko vrednosti absorpcije in količnika ohranitve antioksidantov (QOP) predstavljajo količino ohranjenih antioksidantov v vzorcu kuhane špinače (*GRAF 2*).

Vse meritve so bile izvedene za vzorce, ki so se kuhali pri $80\pm 2^{\circ}\text{C}$, in posledično trendi niso nujno veljavne za druge temperature kuhanja. Masa izločene oksalne kisline je odvisna tudi od volumna vode, v kateri se špinača kuha (Mou, 2008), v tej nalogi 400ml. Posledično je možno sklepati, da bi bili rezultati pri drugačni količini vode drugačni.

Masa izločene oksalne kisline močno naraste že po prvi minuti kuhanja, ob daljšem času kuhanja pa se upočasni, kar na grafu prikazuje plateau. Oblika grafa mase izločene oksalne kisline (*GRAF 1*) tako spominja na graf korenske funkcije, iz česar je možno sklepati, da z daljšanjem časa kuhanja masa izločene oksalne kisline konstantno narašča, vendar nikoli ne doseže maksimuma. Glede na rezultate eksperimenta ima graf asimptoto, zaradi katere je možno sklepati, da celotne vsebine oksalne kisline ni mogoče iz špinače izločiti s kuhanjem pri 80°C . Hipoteza 1 je posledično potrjena.

Količina ohranjenih antioksidantov je v intervalu prvih štirih meritev padala dokaj linearno (*GRAF 2*). Vseeno pa je graf padanja količine antioksidantov očitno položnejši v primerjavi z grafom izločanja oksalne kisline (*GRAF 1*). Padec ohranjene količine antioksidantov se vidno zmanjša pri peti meritvi, kjer je bila špinača kuhana 4 minute. Sprememba v sprva linearnem trendu je razlog, da je bila izvedena dodatna meritve vzorca, kuhanega 5 minut, s čimer bi preverili točnost pete meritve. Rezultati dodatne meritve so potrdili pravilnost predhodnje meritve, kar je razvidno na *GRAFU 2*. Graf količine ohranjenih antioksidantov prav tako doseže plateau, kar lahko zopet navežemo na predpostavko, da so nekateri antioksidanti, prisotni v špinači, odporni na visoke temperature in posledično ohranjeni ne glede na čas kuhanja. Hipoteza 2 je tako lahko le delno podprta, saj drži, da količina antioksidantov z daljšim časom kuhanja pada, vendar se po določenem času ustavi.

ZAKLJUČEK

»Kateri je optimalni čas kuhanja špinacije (*Spinacia oleracea* L.) pri 80°C, pri katerem se izloči maksimalna masa oksalne kisline, hkrati pa se ohrani maksimalna količina antioksidantov?« Pridobljeni eksperimentalni rezultati so pokazali, da je optimalen čas kuhanja špinacije pri 80°C, pri katerem se ohrani največ antioksidantov in hkrati izloči največ oksalne kisline, med 1 in 2 minutama. Presenetljivo pa se je tako izločanje oksalne kisline kot padec količine ohranjenih antioksidantov po 3 minutah kuhanja močno zmanjšal.

Rezultati izločene mase oksalne kisline ob kuhanju špinacije pri 80°C so tako skladni z rezultati, ki jih navaja študija Wang et al (2018). Večina oksalne kisline je izločena že po prvi minuti kuhanja, nato pa se močno zmanjša ob daljšem času kuhanja, česar razlog bi bilo lahko, da se večina vodotopne oksalne kisline izloči že v prvih minutah. Plateau na *GRAFU 1* pa vodi k predpostavki, da je popolna izločitev oksalne kisline iz špinacije s kuhanjem pri 80°C nemogoča, saj se delež kisline v špinaciji nahaja tudi v obliki, ki ni topna v vodi.

Pridobljeni rezultati, ki zadevajo antioksidante, pa niso skladni z rezultati iz študije Hossain et al (2017), saj je bila količina antioksidantov z daljšim časom kuhanja zmanjšana. Čeprav Hossain et al (2017) ne navaja začetne količine antioksidantov v špinaciji, ampak le specifične vrednosti antioksidantov pod vplivom različnih načinov priprave špinacije, bi bilo napačno narediti zaključek, da bo skupna količina antioksidantov narasla kot posledica povečanja količine fenolov in flavonoidov, kot navaja Hossain et al (2017). Tako lahko predpostavljamo, da večino antioksidantov v špinaciji zastopa vitamin C ali drug antioksidant, ki ima nizko odpornost na visoke temperature. Plateau na *GRAFU 2* pa namiguje na prisotnost antioksidantov, ki niso občutljivi na visoke temperature, saj se nižanje ohranjenih antioksidantov ustavi.

Pomembno je tudi ovrednotiti uporabljene študije in članke. Vsi so bili obravnavani kot zanesljiv vir informacij, saj so bili objavljeni v raznih znanstvenih revijah, spletnih straneh, dnevnikih in platformah. Podatki so bili prav tako dosledni in eksperimentalno podkrepljeni, ne glede na spremenljive vrednosti oksalne kisline v špinaciji, saj so vrednosti zelo različne glede na vrsto, del rastline in odvisne od drugih faktorjev.

Pojavila se je tudi težava zadevajoč eksperimentalno metodo, in sicer redoks titracijo. Proces je bil dokaj zamuden, zlasti titracija prvega kuhanega vzorca, saj ni bilo možno napovedati volumna KMnO_4 , potrebnega za nevtralizacijo. Tako je bila količina, večja od 30ml, titrirana v kislino raztopino kapljico za kapljico z namenom, da nebi zgrešili ekvivalentne točke. Prav tako je bilo težko titracijo ustaviti konstantno pri enakem odtenku rožnate, kljub temu da je bil uporabljen vzorec za primerjavo.

Raziskovalna naloga pa ni odgovorila na vprašanje katere vrste antioksidantov so prisotne in ohranjene v špinaciji po kuhanju ter kakšen je učinek kuhanja na druge koristne ali potencialno škodljive snovi, ki so prisotne v špinaciji, kot so klorofil ali nitrati.

VIRI

Brown, C. in Ford, M., 2014. Chemistry. 2nd ed. Harlow, Essex: Pearson Education Limited, str. 419 – 421

Gouda, A. in Amin, A., 2010. *Copper(II)–neocuproine reagent for spectrophotometric determination of captopril in pure form and pharmaceutical formulations*. [online] Dostop: <https://cyberleninka.org/article/n/187373/viewer> [Dostopano 22. februar 2021]

Hossain, A., Khatun, M. A., Islam, M. in Huque, R., 2017. *Enhancement of Antioxidant Quality of Green Leafy Vegetables upon Different Cooking Method*. [online] Dostop: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642804/> [Dostopano 21. februar 2021]

Indrawati, Van Loey, A. in Hendrickx, M., 2004. *Pressure and temperature stability of water-soluble antioxidants in orange and carrot juice: a kinetic study*. [online] Dostop: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-004-0929-y>> [Dostopano 1. marec 2021].

Kavitha, V. in Saradha Ramadas, V., 2013. *Nutritional composition of raw fresh and shade dried form of spinach leaf (Spinach oleracea)*. [online] Dostop: <https://jprsolutions.info/files/final-file-56a31f41186605.47532419.pdf> [Dostopano 22. februar 2021]

Morelock, T. in Correll, J., 2008. *Spinach*. [online] Dostop: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-30443-4_6 [Dostopano 1. marec 2021]

Mou, B., 2008. *Evaluation Of Oxalate Concentration In The U.S. Spinach Germplasm Collection*. [online] Dostop: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/43/6/article-p1690.xml> [Dostopano 25. januar 2021]

Nimse, S. in Pal, D., 2015. *Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms*. [online] Dostop: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c4ra13315c>> [Dostopano 1. marec 2021]

Pisosch, A. in Negulescu, G., 2011. *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review*. [online] Dostop: <https://www.longdom.org/open-access/methods-for-total-antioxidant-activity-determination-a-review-2161-1009.1000106.pdf> [Dostopano 22. februar 2021]

Rozaini, M., 2012. *The Chemistry of Dicarboxylic Acids in the Atmospheric Aerosols*. [online] Dostop: <<https://www.intechopen.com/books/atmospheric-aerosols-regional-characteristics-chemistry-and-physics/the-chemistry-of-dicarboxylic-acids-in-the-atmospheric-aerosols>> [Dostopano 1. marec 2021]

Savage, G. P., Vanhanen, L., Manson, S. M. in Ross, A., 2000. *Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods*. [online] Dostop: https://www.researchgate.net/publication/222030915_Effect_of_Cooking_on_the_Soluble_and_Insoluble_Oxalate_Content_of_Some_New_Zealand_Foods [Dostopano 25. februar 2021]

Sreeramulu, D., Reddy, C., Chauhan, A., Balakrishna, N. in Raghunath, M., 2013. *Natural Antioxidant Activity of Commonly Consumed Plant Foods in India: Effect of Domestic Processing*. [online] Dostop: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/369479/> [Dostopano 21. februar 2021]

Wang, Z., Ueda, H., Takeuchiand, A. in Ando, A., 2018. *Effects Of Cooking Conditions On The Relationships Among Oxalate, Nitrate, And Lutein In Spinach*. [online] Dostop: https://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/24/3/24_421/_pdf/-char/ja [Dostopano 25. januar 2021]

VIRI SLIK

SLIKA 1: <https://www.farmflavor.com/lifestyle/whats-season-spinach/> (1. marec 2021)

SLIKA 2: https://www.softschools.com/formulas/chemistry/oxalic_acid/330/ (1. marec 2021)

SLIKA 3: avtorska

SLIKA 4: https://www.researchgate.net/figure/The-CUPRAC-reaction-and-chromophore-Bisneocuproine-copper-I-chelate-cation-Protons_fig1_232913724 (1. marec 2021)

PRILOGA

Snovi, potrebne za pripravo Cu(II)-neokuproin kompleksa:

- 0,0001g $C_{14}H_{12}N_2$
- 120ml CH_3OH
- 0,29g $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$
- 40ml H_2O