فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۵، شماره ۳، صفحه ۴۸۳-۴۶۹، بهار ۱۳۹۷

بهینه سازی شرایط استخراج عصاره استونی دانه زنیان (*Ajowan seed*) و تاثیر آن بر پایدار سازی روغن سویای خام

آرزو مشیری روشن[1]، عباسعلی ساری*[2]، نرجس آقاجانی[3]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
2. استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
3. استادیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

(تاریخ دریافت: 96/3/23، تاریخ آخرین بازنگری: 96/5/12، تاریخ پذیرش: 96/6/4)

چکیده

پایداری اکسیداتیو روغن‌ها و چربی‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند اکسیژن، نور، حرارت، یون‌های فلزی و آنزیم‌ها قرار می‌گیرد و در نهایت فساد اکسیداتیو رخ می‌دهد. کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی برای به تأخیر انداختن فساد اکسیداتیو، به‌دلیل احتمال سمیت و سرطان‌زایی، زیر سؤال قرار گرفته است. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره دانه زنیان و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی حاصل از آن می‌باشد. در این مطالعه عصاره استونی دانه زنیان تحت تاثیر غلظت‌های مختلف استون، مدت زمان و دماهای مختلف استخراج گردید. پس از انجام آزمایش‌های مختلف روی عصاره‌های حاصل بهترین شرایط استخراج برای عصاره‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ تعیین و عصاره‌گیری در شرایط بهینه انجام شد. سپس از عصاره‌های استخراجی در شرایط بهینه غلظت‌های 0/2، 0/4 و 0/6٪ تهیه و به روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان اضافه شد. هم‌چنین یک نمونه روغن بدون آنتی‌اکسیدان (نمونه شاهد) و یک نمونه روغن حاوی 200 ppm آنتی‌اکسیدان BHT نیز جهت مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آنتی‌اکسیدان سنتزی تهیه شد. تیمارهای مختلف در شرایط اکسیداسیون تسریع یافته (آون با دمای 90 درجه سانتی‌گراد) به مدت 5 روز نگه‌داری شد و سپس هر روز شاخص‌های عدد اسیدی، عدد پراکسید و عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها مورد بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که با افزودن آب به استون، استخراج ترکیبات فنولی افزایش یافته و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل افزایش می‌یابد که به علت افزایش قطبیت حلال می‌باشد. مطابق با شاخص‌های پایداری روغن مورد مطالعه در دمای 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 روز، بهترین نتایج مربوط به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و غلظت‌های بالاتر عصاره‌های استخراجی با حلال استون بود که پایداری روغن تحت تأثیر مواد فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره دانه زنیان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دانه زنیان، روغن سویا، عصاره استونی، آنتی‌اکسیدان، روش سطح پاسخ.

* نویسنده مسئول: sari@basu.ac.ir

1- مقدمه

امروزه روغن‌های گیاهی به دلیل آثار مفیدی چون کاهش کلسترول بیش‌تر مورد توجه قرار گرفته و به صورت‌های مختلفی نظیر روغن‌های سالادی، پخت و پز و سرخ‌کردنی به رژیم غذایی افراد راه پیدا کرده‌اند. روغن‌های خوراکی مختلف حائز درجه غیر اشباعیت و ساختار اسید چرب متفاوتی بوده، کیفیت و کمیت ترکیبات غیرتری گلیسریدی آن‌ها باهم متفاوت است. تفاوت‌های ساختاری به نوبه خود به تفاوت در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و پایداری اکسایشی آن‌ها منجر می‌گردد [1].

اکسیداسیون چربی‌ها یکی از اصلی‌ترین عوامل فساد مواد غذایی و تخریب رنگ، طعم، بافت، ارزش تغذیه‌ای و ضایعات اقتصادی است [2].

مطالعات نشان می‌دهد که دلیل محافظت آنتی‌اکسیدان‌ها از چربی‌ها احتمالاً به خاطر توانایی این ترکیبات در گیرندگی رادیکال‌های آزاد است. در حقیقت آنتی‌اکسیدان‌ها به‌وسیله واکنش با رادیکال‌های آزاد قبل از آن‌که با اسیدهای چرب واکنش دهند یا به‌وسیله واکنش دادن با فلزات از اکسیداسیون ممانعت می‌کنند [3]. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی علاوه‌بر داشتن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند در کاهش سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی و سایر مشکلات حادی که با پیری در ارتباط هستند تأثیر داشته باشند [4]. از این رو در این تحقیق منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی به نسبت فراوان، ارزان و قابل دسترس از جمله عصاره دانه زنیان جهت پایداری به روغن گیاهی بدون آنتی‌اکسیدان اضافه می‌شود و اثرات پایدارسازی آن در شرایط اکسیداسیون تسریع یافته نسبت به روغن گیاهی حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHT) مقایسه خواهد شد.

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum coptiocum L.* گیاهی یک ساله از راسته چتریان و میوه‌هایی به رنگ خاکستری متمایل به قهوه‌ای دارد. این گیاه در ایران، مصر و نواحی شرق هند می‌روید و در صنایع دارویی و غذایی کاربرد دارد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در این گیاه شامل تیمول، سیمن، آلفا پینن، دی پینن، گاماترپنین، بتاپینن، میرسن و کارواکرول می‌باشد[5]. این ترکیبات به‌دلیل ساختار فنولی می‌توانند جایگزین موثری برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی باشند.

روزبهان و همکاران ترکیبات فنولی تفاله انگور را با استفاده از حلال استون استخراج و مقدار آن را به روش فولین سیو کالتو اندازه‌گیری کردند. سپس به‌منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده مقادیر 50، 150، 250 و 350 قسمت در میلیون به روغن خام سویا اضافه شد و عدد پراکسیدو تیوباربیتوریک اسید (TBA) نمونه‌های روغن در طول مدت نگه‌داری تعیین گردید. نتایج نشان داد غلظت 150 قسمت در میلیون عصاره حاوی تانن تفاله انگور دارای فعالیت مناسبی در مهار اکسیداسیون روغن سویا بود [6].

اولیویرا و همکاران عصاره آبی برگ‌های سه رقم مختلف فندق را برای تعیین ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره برگ فندق از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی استاندارد نظیر BHA و آلفا توکوفرول بهتر عمل می‌کند[7].

چن و همکاران بیان کردند که وجود مقدار کمی آب در حلال استخراجی نفوذ حلال را به درون بافت‌های گیاهی آسان کرده و باعث حرارت دهی بهتر ماده گیاهی می‌شود. این امر به نوبه خود انتقال جرم اجزای فعال به درون حلال استخراجی را افزایش می‌دهد. در این مطالعه متانول 80 درصد مخلوط بهینه برای استخراج کلروژنیک اسید و اسید جنیپوزیدیک از *Eucommia ulmodie* در روش استخراج با مایکروویو بود[8].

هدف از این مطالعه انتخاب بهترین روش و شرایط استخراج عصاره دانه زنیان با حلال استون با توجه به میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل و بررسی قابلیت استفاده از عصاره‌های بهینه در پایداری اکسیداتیو روغن تحت شرایط اکسیداسیون تسریع یافته می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد و تجهیزات

در این تحقیق گیاه زنیان از یکی از فروشگاه‌های گیاهان دارویی سطح شهر همدان خریداری شد. روغن سویا از یکی از کارخانجات روغن کشی استان همدان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق شامل حلال استون، معرف فولین-سیو کالتو، کربنات سدیم، اسید گالیک، تری کلرو استیک اسید، کلرید آهن (III)، معرف DPPH، بافر فسفات، فری

سیانید پتاسیم، مولیبدات آمونیوم و اسید سولفوریک، فسفات سدیم بودند. همه مواد شیمیایی از شرکت مرک و حلال‌ها از شرکت‌های داخلی با بالاترین خلوص تهیه شدند. هم‌چنین دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده شامل مخلوط‌کن خانگی سانی، ساخت ایران، آون ممرت ساخت آلمان، ترازوی آزمایشگاهی با دقت 0/001 سارتوریوس، ساخت آلمان، اسپکتروفتومتر دو پرتویی ماوراء بنفش-مرئی ساخت پی جی اینسترومنت، انگلستان، سانتریفیوژ آزمایشگاهی سیگما، ساخت آلمان، تبخیر کننده چرخشی EKARV10، ساخت آلمان، pHمتر متروهم، ساخت ایران، بن‌ماری با مارک فن آزما گستر، ساخت ایران و شیکر لوله‌ای لابینکو پارس خزر، ساخت ایران بود.

2-2- روش کار

2-2-1- استخراج عصاره دانه زنیان با حلال به‌روش سنتی

استخراج بر اساس روش منصوری و همکاران انجام گرفت به این ترتیب که 40 گرم دانه زنیان آسیاب شده با 200 میلی‌لیتر حلال (از دو حلال، آب و استون در غلظت‌های 0، 50 و 100٪) مخلوط شد (نسبت 1 به 5) و برای مدت زمان مشخصی (مدت زمان استخراج 0 (کم‌تر از یک ربع ساعت)، 12 و 24 ساعت) در دمای استخراج 20، 40 و 60 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و هر دو ساعت یک بار نمونه‌ها با دست هم زده می‌شدند. بعد از اتمام مدت زمان استخراج، عصاره‌ها با استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره یک) فیلتر شد و مایع فیلتر شده حاصل از حلال استون توسط تبخیرکننده چرخشی در دمای 40 درجه سانتی‌گراد تا خروج کامل حلال استخراجی تغلیظ شدند [9]. پس از انجام آزمایش‌های مختلف روی عصاره‌های حاصل، بهترین شرایط استخراج برای عصاره‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ تعیین و عصاره گیری در شرایط بهینه انجام شد. سپس از عصاره‌های استخراجی حاصل از شرایط بهینه استخراج، غلظت‌های مختلف (0/2، 0/4 و 0/6%) تهیه و به روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان اضافه شد. روغن‌های حاوی عصاره‌ها سپس در شرایط اکسیداسیون تسریع یافته (آون با دمای 90 درجه سانتی‌گراد) به مدت 5 روز نگه‌داری شد و هر روز شاخص‌های عدد اسیدی، عدد پراکسید و عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین یک نمونه روغن بدون آنتی‌اکسیدان (نمونه شاهد) و یک نمونه روغن حاوی 200 ppm آنتی‌اکسیدان BHT نیز جهت مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با آنتی‌اکسیدان سنتزی تهیه و در شرایط مذکور نگه‌داری شد [6].

2-2-2- آزمون‌های انجام شده روی عصاره‌ها

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت [10]. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش قدرت احیاءکنندگی آهن سه ظرفیتی توسط روش ییلدریم و همکاران تعیین شد [11]. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش به دام اندازی رادیکال DPPH طبق روش بلویس تعیین شد [12]. اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با احیای مولیبدنوم (VI) به مولیبدنوم (V) توسط نمونه به روش عربشاهی دلوئی و عروج انجام شد[13].

2-2-3- اندازه‌گیری شاخص های اکسیداسیون روغن

بسته به میزان پراکسایش روغن، 0/1 تا 0/2 گرم نمونه بر اساس روش شانتا و دکر مورد ارزیابی قرار گرفت[14]. شاخص تیوباربیتوریک اسید و عدد اسیدی به ترتیب بر اساس روش وینک [15] و AOAC تعیین شد [16].

2-2-4- تجزیه و تحلیل آماری و بهینه سازی

به‌منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره‌های دانه زنیان تحت تأثیر غلظت حلال، دما و زمان استخراج از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی (CCD) با 3 سطح و 5 تکرار در نقطه مرکزی برای بررسی تأثیر شرایط استخراج بر خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل مورد استفاده قرار گرفت (1+، 0، 1-) (جدول 1). در این تحقیق محدوده متغیرهای مستقل غلظت حلال مورد استفاده (X_1)، دمای استخراج (X_2) و زمان استخراج (X_3) از آزمون‌های اولیه استنتاج گردید. تیمارهای آزمایشی به‌منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی‌نشده در پاسخ‌های مشاهده‌شده به صورت تصادفی درآمدند. برای رسم نمودارهای سه‌بعدی و بهینه‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار Design Expert 6.0.2

جدول (1) متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج

Table 1 Independent variables and levels used for optimizing the antioxidant properties of Ajowan seed acetonic extracts under the influence of different extraction conditions

متغیرهای مستقل Independent variables	سطوح و حدود متغیرها Levels and variables		
	-1.0	0.0	+1.0
زمان استخراج Extraction time (hour)	0.0	12	24
دمای استخراج Extraction temperature (°C)	20	40	60
غلظت حلال استون Acetone solvent concentration (W/W%)	0.0	50	100

استفاده شد. نتایج مربوط به پایداری اکسایشی روغن در شرایط انبارداری تسریع یافته براساس طرح پایه کاملا تصادفی با 3 تکرار انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات از نرم‌افزار SAS (2001) استفاده شد. مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح احتمال 5 درصد انجام گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی عصاره‌های استونی دانه زنیان

3-1-1- ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی

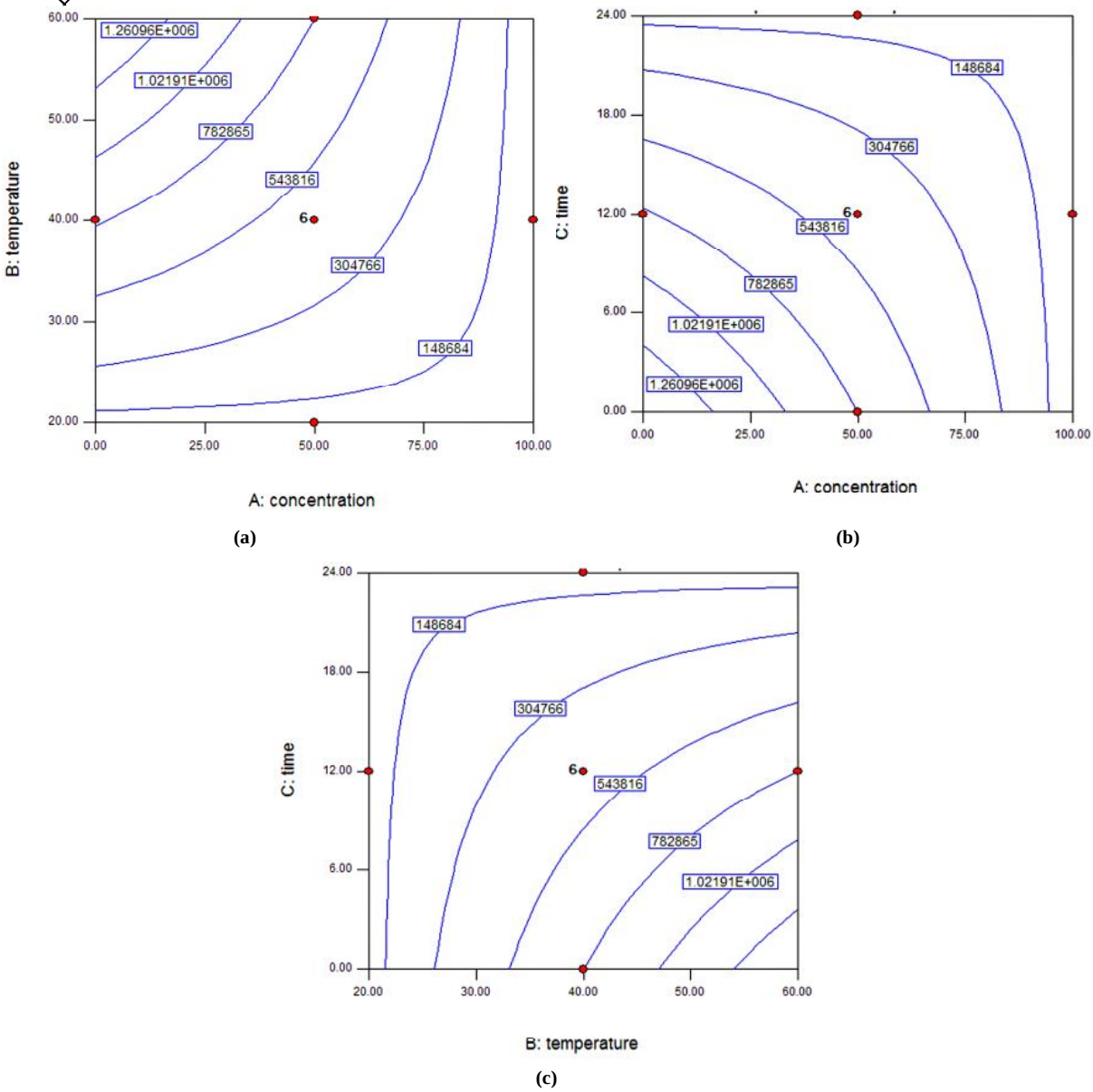
روند تغییرات ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان‌ها و دماهای مختلف استخراج و غلظت‌های مختلف حلال استون) در شکل (1) ارائه شده است. همان‌طور که در شکل (1-a) مشاهده می‌شود، در غلظت ثابت حلال استون با افزایش دمای استخراج میزان ترکیبات فنولی کل افزایش می‌یابد؛ درحالی‌که در دمای ثابت استخراج با افزایش غلظت حلال استون میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها روند نزولی را طی می‌کند که این حالت در دماهای بالاتر استخراج تشدید می‌شود.

شکل (1-b) روند تغییرات ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر زمان‌های مختلف استخراج و غلظت‌های مختلف حلال استون را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در غلظت ثابت حلال استون با افزایش زمان استخراج میزان ترکیبات فنولی کل روند نزولی را طی می‌کند. هم‌چنین در زمان‌های ثابت استخراج با افزایش غلظت حلال استون میزان ترکیبات فنولی استخراجی کاهش می‌یابد.

در شکل (1-c) مشاهده می‌شود که افزایش دمای استخراج باعث افزایش میزان ترکیبات فنولی کل استخراجی در عصاره‌های استونی می‌شود، درحالی‌که با افزایش زمان استخراج میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها کاهش می‌یابد.

با افزایش غلظت حلال استون از قطبیت حلال استخراجی (میزان آب حلال) کاسته می‌شود و بنابراین حلال نمی‌تواند ترکیبات قطبی و فنولی بیش‌تری را استخراج نماید. هم‌چنین با افزایش دمای استخراج میزان نفوذ حلال به داخل بافت ماده افزایش یافته و ترکیبات فنولی را به خوبی از داخل ماده خارج می‌سازد. افزایش دما منجر به افزایش انتقال جرم طی فرایند استخراج می‌شود؛ اما با افزایش زمان استخراج و اعمال دما ترکیبات فنولی استخراج شده با حلال استون ممکن است تخریب شده و در نتیجه میزان ترکیبات فنولی کل با افزایش زمان استخراج روند نزولی پیدا نماید.

همان‌طور که مشاهده شد زمان استخراج تأثیر مهمی بر میزان استخراج ترکیبات فنولی کل دارد، زیرا با گذشت زمان حلال فرصت پیدا می‌کند تا به بافت گیاهی نفوذ کند و ترکیبات فنولی فرصت کافی برای جدا شدن از سوبسترای خود و ورود به حلال اطراف را دارند که با نتایج به‌دست آمده



شکل (1) نمودار دو بعدی (کنتور) تغییرات میزان ترکیبات فنولی کل (میلی‌گرم اسید گالیک در 100 گرم دانه زنیان) عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج، a) غلظت حلال استون و دمای استخراج (زمان استخراج 12 ساعت)، b) غلظت حلال استون و زمان استخراج (دمای استخراج 40 درجه سانتی‌گراد) و c) دما و زمان استخراج (غلظت حلال استون 50%).

Fig. 1 The contour plot of the total phenolic compounds (mg of gallic acid per 100 grams) variations of Ajowan seed acetonic extracts under the influence of different extraction conditions; a) Aceton solvent concentration and extraction temperature (extraction time; 12 hours), b) Aceton solvent concentration and extraction time (extraction temperature; 40 °C), c) Time and temperature of extraction (solvent concentration; 50% v/v).

توسط اسپیگنو و همکاران [17] مطابقت داشت. هم‌چنین اعمال دمای بالا به راحتی می‌تواند اجزای گیاهی را تخریب کند و ترکیبات گیاهی به درون محیط وارد شوند. به‌همین دلیل با افزایش دما میزان ترکیبات فنولی استخراج شده روند صعودی دارد. در کل روش‌های حرارتی به‌ویژه آن‌هایی که در محیط مرطوب انجام می‌پذیرد، از طریق شکستن دیواره

سلولی باعث آزاد شدن هر چه بیش‌تر ترکیبات فنولی می‌شوند [18].

3-1-2- قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استخراجی

شکل (2) منحنی‌های سه بعدی روند تغییرات قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان و دماهای مختلف استخراج و غلظت‌های مختلف حلال استون) را نشان می‌دهد.

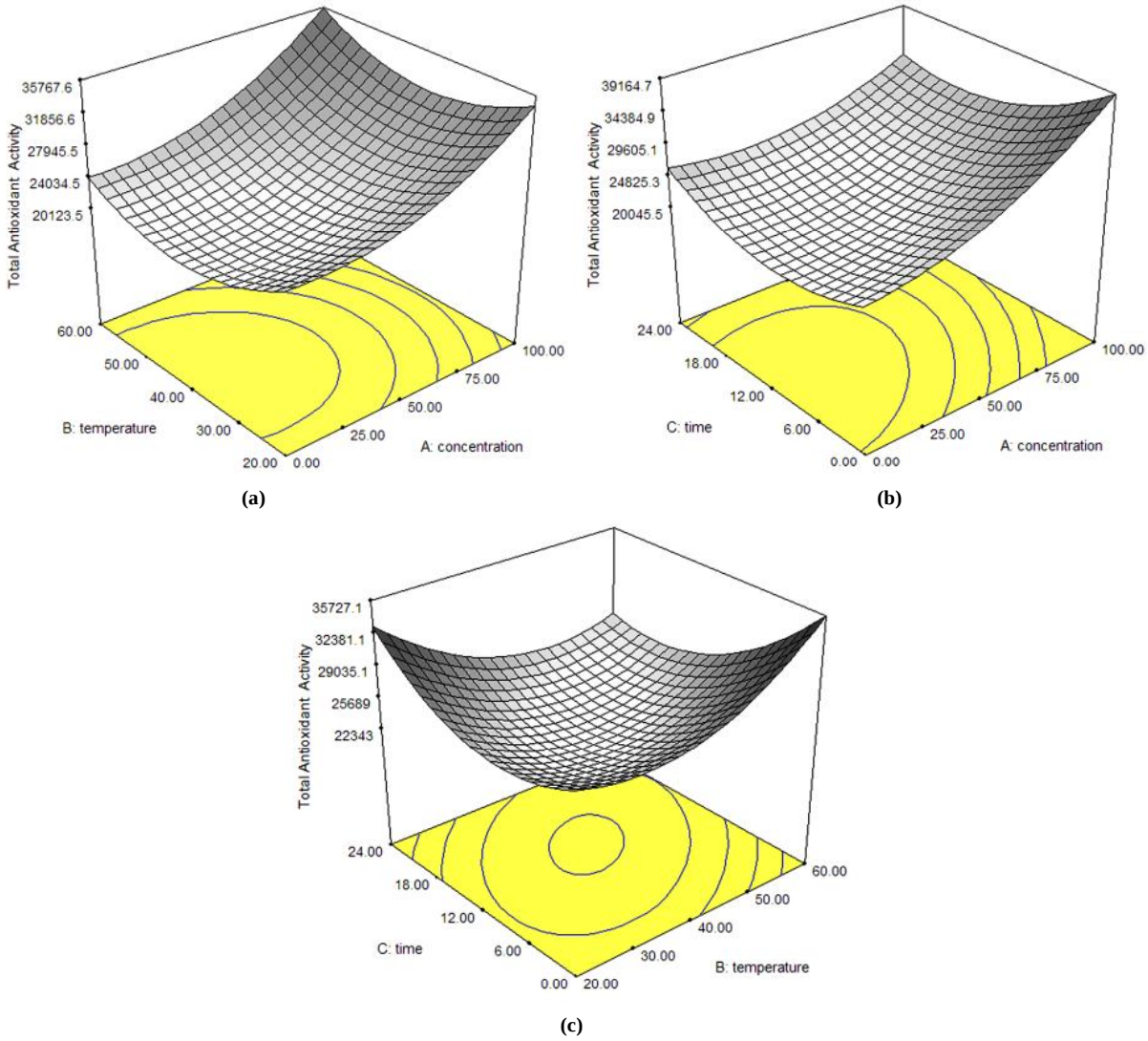
همان‌طور که در شکل (2-a) مشاهده می‌شود، در دماهای ثابت استخراج با افزایش غلظت استون میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استخراجی روند نزولی دارد درحالی‌که در غلظت ثابت استون با افزایش دمای استخراج میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها روند تقریباً ثابت و توأم با افزایش جزیی را طی می‌کند. در شکل (2-b) مشاهده می‌شود که با افزایش زمان استخراج میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها روند تقریباً ثابت و توأم با افزایشی را طی می‌کند درحالی‌که با افزایش غلظت استون میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استخراجی روند نزولی دارد.

در شکل (2-c) تأثیر همزمان دما و زمان استخراج بر میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استونی دانه زنیان نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در دمای ثابت با افزایش زمان استخراج میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استونی افزایش می‌یابد اما در زمان‌های ثابت استخراج با افزایش دمای استخراج میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استونی حاصل روند نزولی را طی می‌کند که پایین‌ترین میزان قدرت احیاءکنندگی (17/4397) مربوط به زمان استخراج کم‌تر از 6 ساعت و دمای استخراج 60 درجه سانتی‌گراد می‌باشد. با افزایش غلظت حلال استون مقدار قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها کاهش می‌یابد، زیرا میزان ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراجی با افزایش غلظت حلال استون روند نزولی داشت [13] و قدرت احیاکنندگی رابطه مستقیمی با میزان ترکیبات فنولی دارد[۱۹،۲۰]. افزایش میزان قدرت احیاءکنندگی با افزایش زمان و دمای استخراج نیز می‌تواند به علت افزایش میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها تحت شرایط استخراج طولانی مدت باشد. هم‌چنین کاهش قدرت احیاءکنندگی در استخراج طولانی مدت و دماهای بالا می‌تواند به‌علت تجزیه حرارتی ترکیبات فنولی موجود در عصاره باشد که با نتایج سایر محققین مطابقت داشت.

3-1-3- خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استخراجی

منحنی‌های سه بعدی روند تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان‌ها و دماهای مختلف استخراج و غلظت‌های مختلف حلال استون) در شکل (3) ارائه شده است. همان‌طور که در شکل (3-a) مشاهده می‌شود در زمان‌های ثابت استخراج با افزایش غلظت استون تا 50٪ میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استونی روند نزولی از خود نشان می‌دهند و از غلظت 50٪ به بالا میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استونی حاصل افزایش می‌یابد. بالاترین مقدار خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH (32/84) در محدوده زمان استخراج 18 ساعت و غلظت 100٪ استون مشاهده شد. هم‌چنین در غلظت‌های ثابت استون با افزایش زمان استخراج تا 18 ساعت خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها روند صعودی دارد درحالی‌که زمان‌های استخراج طولانی تر از 18 ساعت منجر به کاهش فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH می‌شود.

در شکل (3-b) روند تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استونی تحت تأثیر دمای استخراج و غلظت حلال استون را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش دمای استخراج فعالیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها روند صعودی دارد درحالی‌که با افزایش غلظت استون تا 50٪ میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها روند نزولی دارد، ولی از غلظت استون 50٪ به بالا فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها افزایش می‌یابد. بالاترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH (34/1841) در محدوده دمای استخراج 60 درجه سانتی‌گراد و غلظت استون 100٪ مشاهده شد.

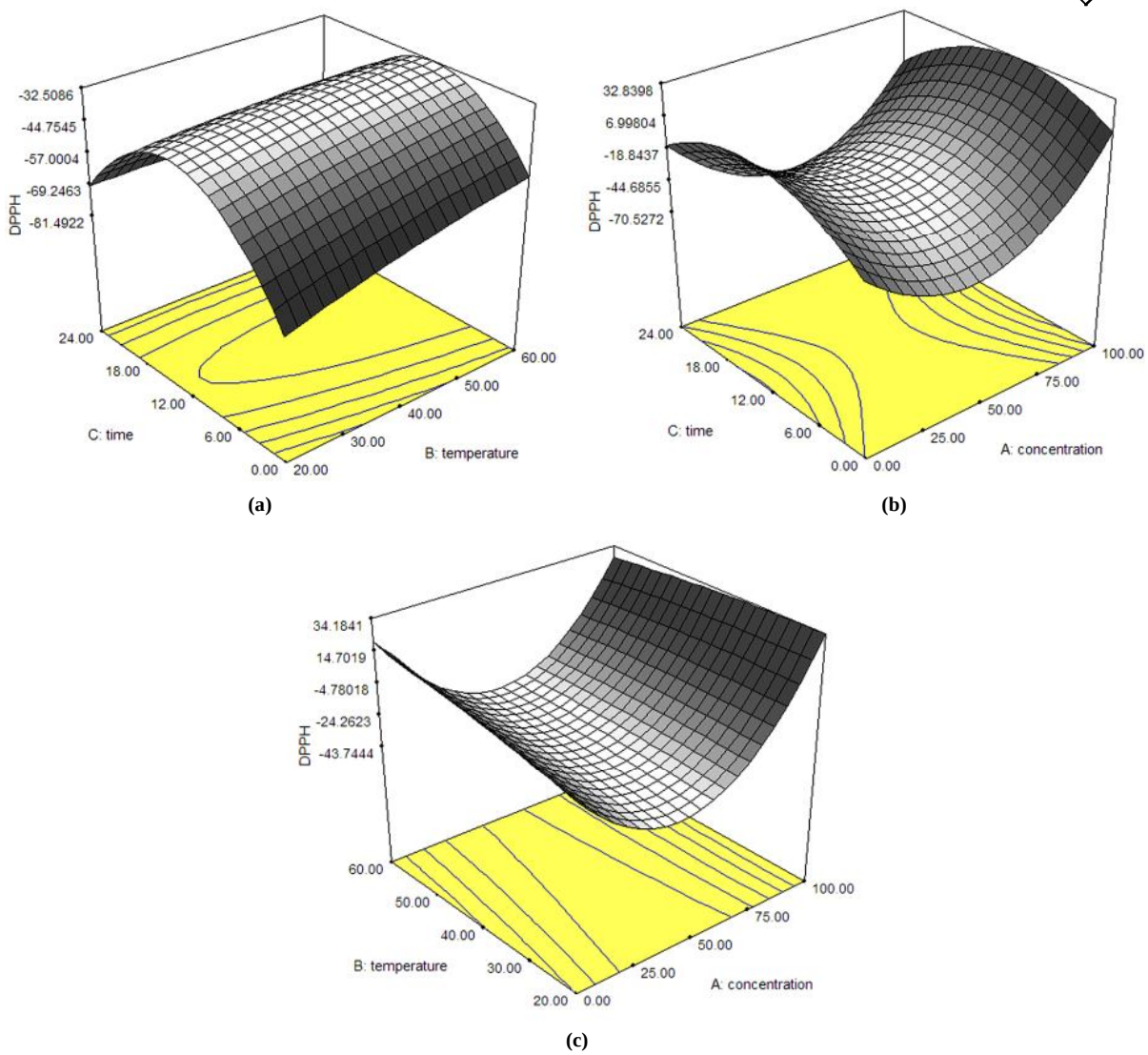


شکل (2) نمودار سه بعدی تغییرات میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج، a) غلظت حلال استون و دمای استخراج (زمان استخراج 12 ساعت)، b) غلظت حلال استون و زمان استخراج (دمای استخراج 40 درجه سانتی‌گراد) و c) دما و زمان استخراج (غلظت حلال استون 50%).

Fig. 2 The 3D surface of the variation in the reducing power amount of Ajowan seed acetonic extracts under the influence of different extraction conditions; a) Aceton solvent concentration and extraction temperature (extraction time; 12 hours), b) Aceton solvent concentration and extraction time (extraction temperature; 40 °C), c) Temperature and time of extraction (solvent concentration; 50% v/v).

در شکل (3-c) تأثیر همزمان دماها و زمان‌های مختلف استخراج بر میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی مهار رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استونی دانه زنیان نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بالاترین میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH در محدوده دمایی بالاتر از 45 درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج 12 ساعت و کم‌ترین مقدار قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH در محدوده دمایی 45-0 درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج کم‌تر از 2 ساعت مشاهده شد.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش زمان استخراج تا 16 ساعت میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH نمونه‌ها افزایش می‌یابد درحالی‌که با افزایش زمان استخراج



شکل (3) نمودار سه بعدی تغییرات میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج، a) غلظت حلال استون و دمای استخراج (زمان استخراج 12 ساعت)، b) غلظت حلال استون و زمان استخراج (دمای استخراج 40 درجه سانتی‌گراد) و c) دما و زمان استخراج (غلظت حلال استون 50%).

Fig. 3 The 3D surface of the variation in the DPPH radical scavenging activity of Ajowan seed acetonic extracts under the influence of different extraction conditions; a) Aceton solvent concentration and extraction temperature (extraction time; 12 hours), b) Aceton solvent concentration and extraction time (extraction temperature; 40 0C), c) Time and temperature of extraction (solvent concentration; 50% v/v).

بالاتر از 16 ساعت میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌های حاصل کاهش می‌یابد. در زمان ثابت استخراج با افزایش دمای استخراج میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها روند صعودی آهسته‌ای را طی می‌کند.

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد، غلظت حلال تأثیر معنی‌داری بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد داشت. هم چنین نتایج حاکی از آن بود که توانایی عصاره‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت حلال بوده و با افزایش غلظت حلال فعالیت جذب رادیکال‌های آزد آن‌ها افزایش می‌یابد.

از آن‌جا که رابطه مستقیمی بین فعالیت گیرندگی رادیکال با میزان ترکیبات فنولی در میوه‌ها وجود دارد [19، 20]، بنابراین با افزایش مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراج شده

انتظار می‌رود که درصد مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌ها افزایش یابد، ولی در تحقیق حاضر علی‌رغم افزایش مقدار ترکیبات فنولی تحت تاثیر افزایش دما و زمان استخراج در این تحقیق، با افزایش دما و زمان استخراج، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH عصاره‌های حاصل کاهش یافت که با نتایج سایر محققین متفاوت است.

4-1-3- خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استخراجی

منحنی‌های دو بعدی (کنتور) و سه بعدی روند تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج (زمان‌ها و دماهای مختلف استخراج و غلظت‌های مختلف حلال استون) در شکل (4) ارائه شده است. شکل (4-a) نشان‌دهنده تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل تحت تأثیر دمای استخراج و غلظت حلال استون می‌باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش دمای استخراج و غلظت حلال استون مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استونی افزایش می‌یابد به‌طوری‌که بیش‌ترین (33160/21) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ها مربوط به دماهای استخراج 60 و 20 درجه سانتی‌گراد و غلظت حلال استون 100% می‌باشد.

شکل (4-b) بیانگر تأثیر مقادیر مختلف زمان استخراج و غلظت حلال استون بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی است. همان‌طور که از این شکل مشاهده می‌شود بیش‌ترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در محدوده زمان استخراج (7-0 ساعت) و غلظت حلال استون 77 تا 100٪ مشاهده شد. شکل (4-c) تأثیر همزمان دماها و زمان‌های مختلف استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استونی دانه زنیان را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش دما و زمان استخراج میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استونی افزایش می‌یابد، اما در دماهای استخراج بالاتر با افزایش زمان استخراج میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استونی روند نزولی کمی دارد که می‌تواند به علت تأثیر مخرب دماهای بالای استخراج بر ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره در زمان‌های طولانی تر باشد. هرچند که این کاهش خیلی محسوس نبود. با افزایش دما و زمان استخراج میزان انتقال جرم در فرایند استخراج افزایش یافته و ترکیبات موثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتر از داخل سلول‌ها خارج می‌شوند، اما افزایش همزمان هر دو پارامتر می‌تواند منجر به تخریب ترکیبات موثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی شود که در محدوده دما و زمان انتخاب شده در این فرایند خیلی محسوس نبود.

به‌طور کلی با افزایش زمان و دمای استخراج میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها روند صعودی دارد و همین امر می‌تواند دلیل افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل باشد.

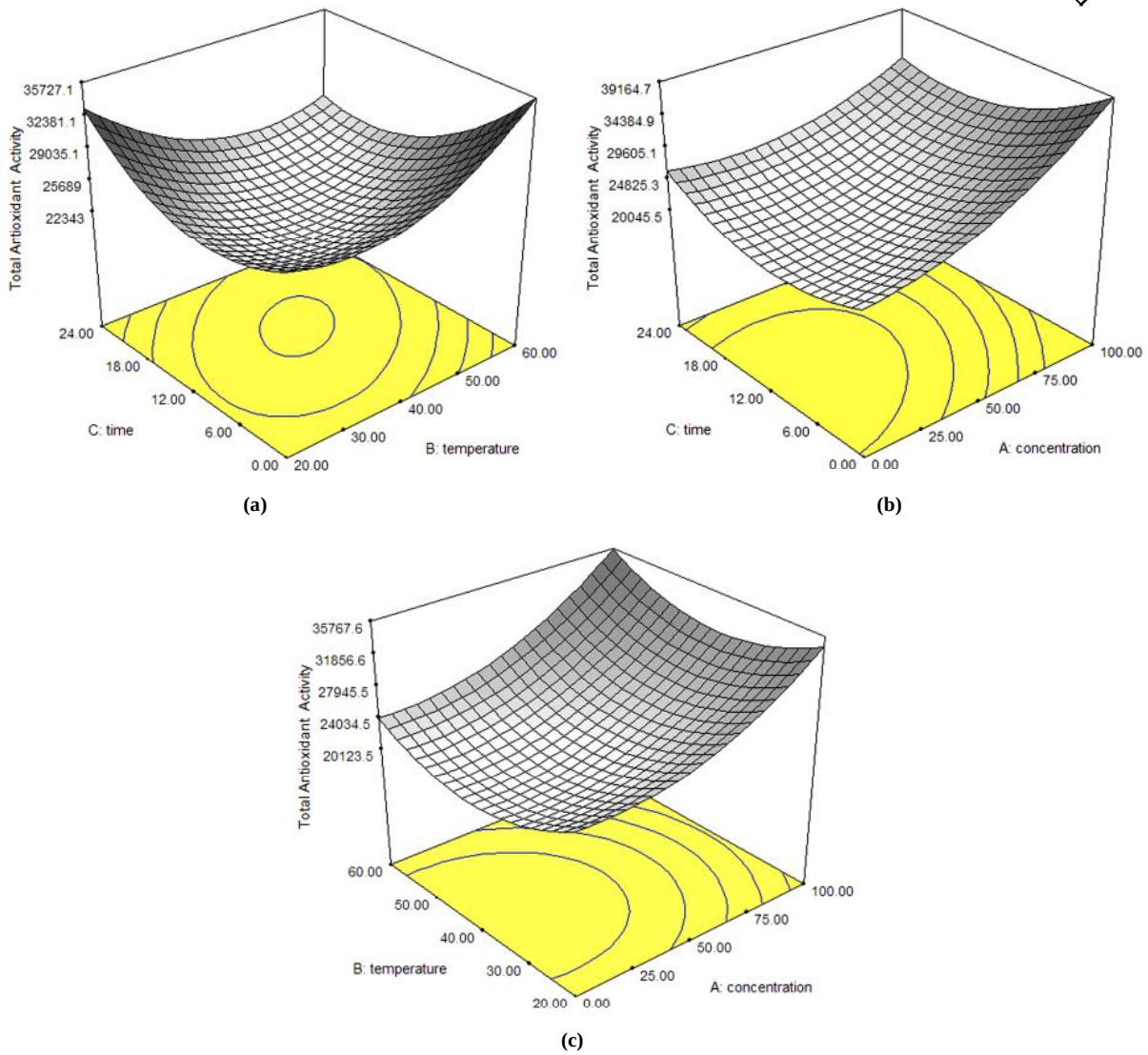
3-2- بهینه‌سازی فرایند استخراج عصاره از دانه زنیان تحت شرایط مختلف استخراج با حلال

جدول (2) شرایط تعیین‌شده برای متغیرهای مستقل جهت بهینه‌سازی استخراج عصاره از دانه زنیان و شرایط بهینه‌شده را نشان می‌دهد. از آنجا که در فرایندهای استخراج هدف دستیابی به بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و حفظ ترکیبات فعال و به حداقل رساندن خسارت حرارتی در زمان‌های

جدول (2) شرایط تعیین‌شده جهت بهینه‌سازی استخراج عصاره از دانه زنیان با استفاده از حلال استون

Table 2 Determined conditions for optimizing the extraction of Ajowan seed extract using acetone solvent

شرایط Conditions	هدف Target	حد پایین Low limit	حد بالا High limit	وزن بالا High weight	وزن پایین Low weight	اهمیت Importance
زمان استخراج Extraction time (hour)	حداکثر Maximum	0	24	1	1	3
دمای استخراج Extraction temperature (°C)	حداقل Minimum	20	60	1	1	3
غلظت حلال استون Acetone solvent concentration (W/W%)	در محدوده In the range	0	100	1	1	3



شکل (4) نمودار سه بعدی تغییرات میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های استونی دانه زنیان تحت تأثیر شرایط مختلف استخراج، a) غلظت حلال استون و دمای استخراج (زمان استخراج 12 ساعت)، b) غلظت حلال استون و زمان استخراج (دمای استخراج 40 درجه سانتی‌گراد) و c) دما و زمان استخراج (غلظت حلال استون 50%).

Fig. 4 The 3D surface of the variation in the total antioxidant capacity of Ajowan seed acetonic extracts under the influence of different extraction conditions, a) Aceton solvent concentration and extraction temperature (extraction time; 12 hours), b) Aceton solvent concentration and extraction time (extraction temperature; 40 0C), c) Time and temperature of extraction (solvent concentration; 50% v/v).

طولانی استخراج می‌باشد، بنابراین همان‌طور که در جدول (2) مشاهده می‌شود متغیرهای مستقل غلظت حلال در محدوده اعمال شده (100-0٪)، مدت زمان استخراج حداکثر و دمای استخراج جهت کاهش تأثیر نامطلوب حرارت بر ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی حداقل در نظر گرفته‌شده است. هم‌چنین متغیرهای وابسته‌ای نظیر مقدار ترکیبات فنولی کل، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال فعال DPPH و میزان قدرت احیاءکنندگی عصاره‌ها حداکثر در نظر گرفته‌شده است. در فرایند بهینه‌سازی به تمامی پارامترهای مستقل وزن و اهمیت یکسان داده شد. با توجه به شرایط مورد نظر راه حل دارای بالاترین مطلوبیت، مناسب‌ترین و بهترین شرایط خواهد بود که راه حل اول (با شرایط: زمان

استخراج 24 ساعت، دمای استخراج 20 درجه سانتی‌گراد و غلظت حلال استون 100٪) به‌عنوان بهترین شرایط جهت دست‌یابی به شرایط بهینه در نظر گرفته شد. در صورت اعمال شرایط راه حل اول خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی عصاره‌های حاصل از دانه زنیان به صورت بهینه حفظ می‌شود (شکل 5).

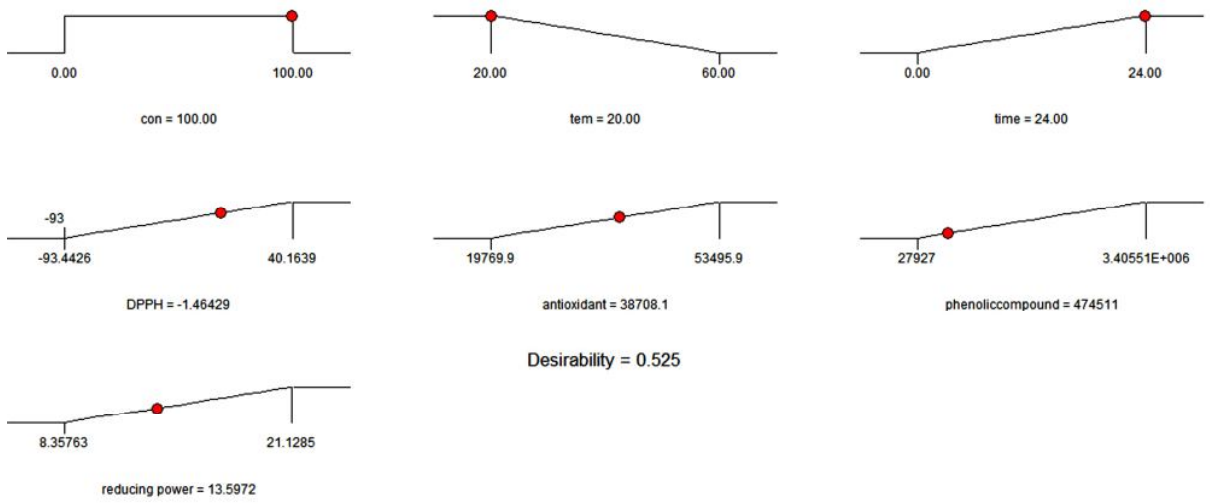
3-3- پایداری اکسایشی روغن بدون آنتی‌اکسیدان طی شرایط اکسیداسیون تسریع یافته تحت تأثیر عصاره‌های استخراجی

3-3-1- اثر افزودن عصاره‌های استخراجی بر شاخص عدد اسیدی نمونه‌های روغن بدون آنتی‌اکسیدان

همان‌طور که از شکل (6) مشاهده می‌شود بالاترین مقدار عدد اسیدی (درصد اولئیک اسید) در نمونه‌های شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان مشاهده شد درحالی‌که افزودن آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT منجر به کاهش معنی‌دار افزایش عدد اسیدی نمونه‌های روغن طی فرایند اکسیداسیون تسریع یافته شده بود ($p<0/05$). پایین‌ترین میزان عدد اسیدی در نمونه‌های حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مشاهده شد. هم‌چنین عصاره‌های استونی دانه زنیان در کلیه غلظت‌های اضافه‌شده به روغن باعث کاهش افزایش عدد اسیدی روغن در مقایسه با نمونه شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان شد و با افزایش غلظت عصاره میزان افزایش عدد اسیدی روغن‌ها طی فرایند اکسیداسیون تسریع یافته نیز کاهش یافت. غلظت‌های 0/4 و 0/6 درصد عصاره استونی در روزهای 4 و 5 انکوباتور گذاری در دمای 90 درجه سانتی‌گراد حتی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT باعث کاهش بیش‌تری در میزان افزایش عدد اسیدی نمونه‌های روغن شده بودند.

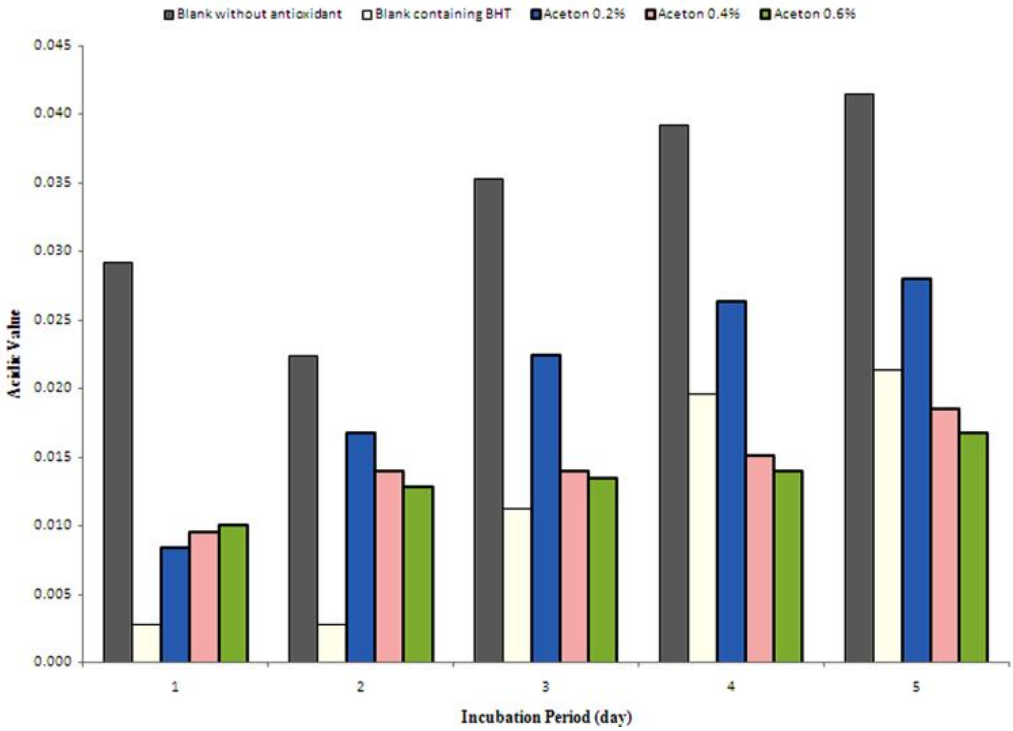
3-3-2- اثر افزودن عصاره‌های استخراجی بر شاخص عدد پراکسید نمونه‌های روغن بدون آنتی‌اکسیدان

در شکل (7) روند تغییرات عدد پراکسید نمونه‌های روغن حاوی غلظت‌های مختلف عصاره استونی دانه زنیان برحسب میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم روغن طی دوره اکسیداسیون تسریع یافته نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزودن عصاره‌های استونی به خصوص غلظت‌های 0/4 و 0/6 درصد و آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT میزان افزایش عدد پراکسید نمونه‌های روغن کاهش داشت که در اواخر دوره نگه‌داری در دمای 90 درجه سانتی‌گراد تأثیر افزودن عصاره‌های استونی و آنتی اکسیدان سنتزی BHT به وضوح مشخص بود. نمونه‌های شاهد بدون آنتی‌اکسیدان بالاترین مقدار عدد پراکسید را دارا بودند و نمونه‌های روغن حاوی اکسیدان سنتزی BHT و غلظت 0/6 درصد عصاره استونی به ترتیب کم‌ترین مقدار عدد پراکسید را دارا بودند. با افزایش زمان انکوباتورگذاری مقدار عدد پراکسید کلیه نمونه‌های روغن



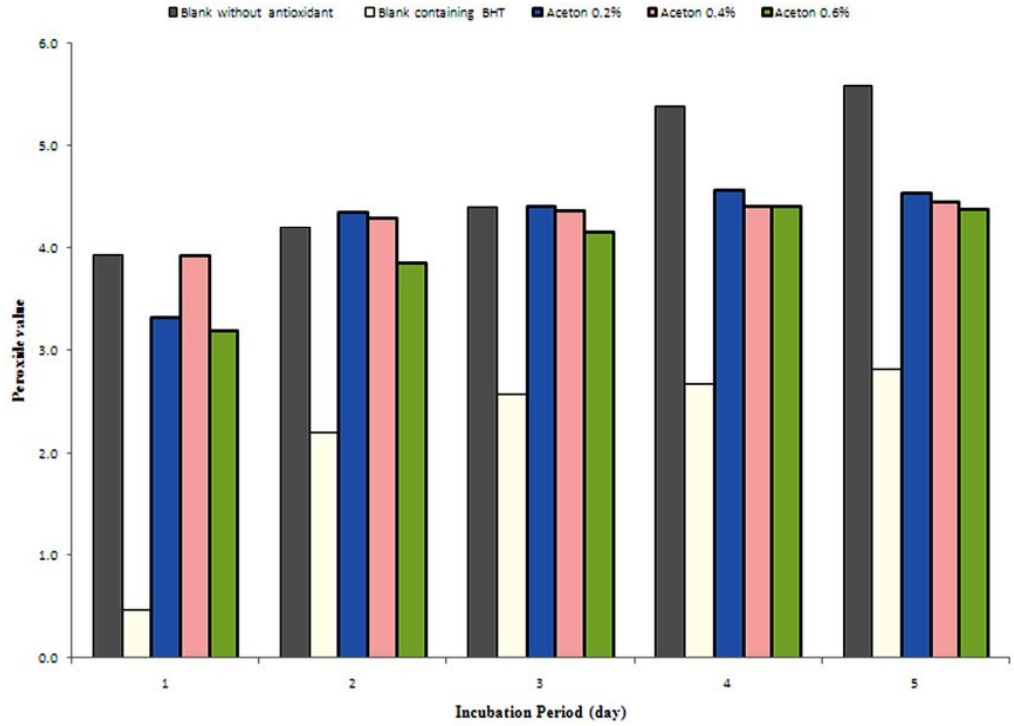
شکل (5) نتایج حاصل از بهینه‌سازی استخراج عصاره از دانه زنیان با استفاده از حلال استون.

Fig. 5 The optimization results of the acetone solvent extraction of Ajowan seed extract.



شکل (6) تأثیر افزودن عصاره‌های استونی بر تغییرات عدد اسیدی نمونه‌های روغن طی دوره اکسیداسیون تسریع یافته.

Fig. 6 Effect of acetonic extracts addition on the acid value variation of oil samples during accelerated oxidation period.



شکل (7) تأثیر افزودن عصاره‌های استونی بر تغییرات عدد پراکسید (میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم روغن) نمونه‌های روغن طی دوره اکسیداسیون تسریع یافته.

Fig. 7 Effect of acetonic extracts addition on the peroxide value (meq of O_2 / Kg of oil) of oil samples during accelerated oxidation period.

به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت که می‌تواند به‌علت تأثیر متقابل زمان و دمای انکوباتورگذاری بر تشدید اکسیداسیون روغن باشد ($p<0/05$).

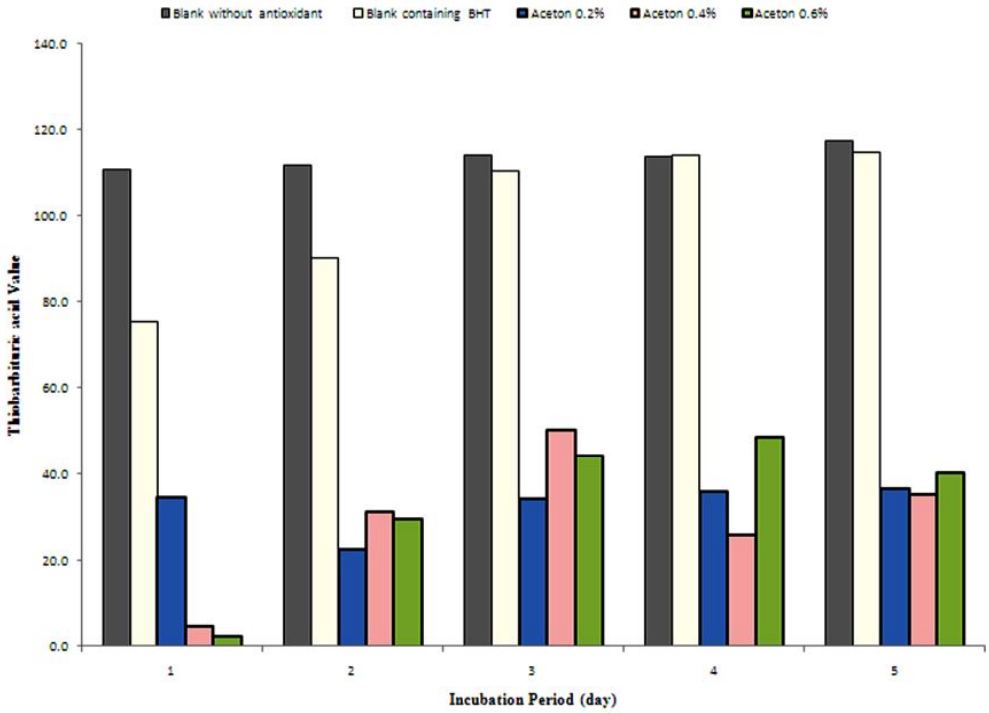
3-3-3- اثر افزودن عصاره‌های استخراجی بر شاخص عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن بدون آنتی‌اکسیدان

همان‌طور که از شکل (8) مشاهده می‌شود بالاترین مقدار عدد تیوباربیتوریک اسید (میلی گرم مالون آلدهید در کیلو گرم روغن) در نمونه‌های شاهد فاقد آنتی‌اکسیدان و نمونه‌های روغن حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT مشاهده شد درحالی‌که افزودن عصاره‌های استونی منجر به کاهش معنی‌دار روند افزایشی عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن طی فرایند اکسیداسیون تسریع یافته بود. با افزایش زمان انکوباتورگذاری در دمای 90 درجه سانتی‌گراد میزان عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن روند صعودی را نشان داد که به علت تأثیر دما و زمان بر تشکیل ترکیبات ثانویه حاصل از اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد. در شکل (8) روند تغییرات عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن حاوی غلظت‌های مختلف عصاره استونی دانه زنیان طی دوره اکسیداسیون تسریع یافته نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزودن عصاره‌های استونی میزان افزایش عدد تیوباربیتوریک اسید نمونه‌های روغن کاهش یافت. نمونه‌های شاهد بدون آنتی‌اکسیدان بالاترین و نمونه‌های روغن حاوی 0/6 درصد عصاره استونی کم‌ترین مقدار عدد تیوباربیتوریک اسید را دارا بودند ($p<0/05$).

همان‌طور که ملاحظه شد میزان عدد تیوباربیتوریک اسید در روزهای ابتدایی بسیار پایین است، زیرا این اندیس در اثر تجزیه هیدروپراکسیدهای تشکیل شده در روزهای اول و تبدیل آن‌ها به آلدئیدها و کتون‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه با پیشرفت روزهای آزمایش و در روزهای پایانی مقدار این اندیس بیش‌تر افزایش می‌یابد.

4- نتیجه‌گیری

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که با افزودن آب به حلال‌های مورد مطالعه کارایی آن‌ها در استخراج ترکیبات فنولی افزایش یافته و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های حاصل افزایش می‌یابد که به علت افزایش قطبیت حلال می‌باشد. در مجموع



شکل (8) تأثیر افزودن عصاره‌های استونی بر تغییرات عدد اسیدی نمونه‌های روغن طی دوره اکسیداسیون تسریع یافته.

Fig. 8 Effect of acetonic extracts addition on the acid value variation of oil samples during accelerated oxidation period.

می‌توان چنین بیان کرد که می‌توان از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در فرمولاسیون روغن‌های خوراکی استفاده نمود. همان‌طور که بیان شد مطابق با شاخص‌های پایداری روغن مورد مطالعه در دمای 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 روز بهترین نتایج مربوط به آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و غلظت‌های بالاتر عصاره‌های استخراجی با حلال استون بود که پایداری روغن تحت تأثیر مواد فنولی و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره دانه زنیان می‌باشد؛ بنابراین می‌توان با توجه به خصوصیات رنگی و طعمی روغن از آنتی‌اکسیدان طبیعی به جای آنتی‌اکسیدان سنتزی در پایدارسازی روغن استفاده نمود. البته بایستی در نظر گرفت که افزودن آنتی‌اکسیدان طبیعی به روغن بر اساس استانداردهای ملی و بین‌المللی صورت گیرد و در صورت عدم وجود استاندارد در این زمینه با توجه به ویژگی‌های کیفی محصول تولیدی اقدام به تهیه استاندارد مورد نیاز شود.

منابع

[1] Kamal-Eldin, A. (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*., 58, 1051-1061.

[2] Halli Well, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals In Biology And Medicine. (3rded) Oxford Univercity Press, Oxford.

[3] Cheung, L.M., Peter, C.K., Cheung, C.K., Ooi, E.C. (2003). Antioxident activity and total phenolic of edible mushroom extracts. *Food Chem*., 87(2), 240-255.

[4] Henry, G.E., Momin. R.A., Nair, M.G., Dewitt, D. L. (2002). Antioxidant and cyclooxigenase activites of fatty acids found in food. *J. Agric. Food Chem.*50, 2231-2234.

[5] Haghiroalsadat, F., Azhdari, M., Oroojalian, F., Omidi, M., Azimzadeh, M.(2015) The Chemical Assessment of Seed Essence of Three Native Medicinal Plants of Yazd Province (Bunium Premium, Cuminum Cyminum, Trachyspermum Copticum) and the Comparison of Their Antioxidant Properties. JSSU., 22(6), 1592-1603.

[6] Rouzbehan, Y., Alipour, D., Barzegar, M., Azizi, M.H. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds of grape pomace (Research note). *JFST.*, 5(3), 69-74.

[7] Olivera, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., Pereira, J.A., (2007). Hazel (Corylus avellana) leaves as source of antimicrobial and antioxidant compounds. *Food Chem*., 105, 1018-1025.

[8] Chan, H.L.B., Zhang, Z., Yao, S. (2004). Focused microwave assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in Eucommia ulmodies Oliv. *Talanta.*, 63, 659-665.

[9] Mansouri, G., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (Phoenix dactylifera). *Food Chem.*, 89, 411-420.

[10] McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., Robards, K. (2001). phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem*., 73, 73-84.

[11] Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4083-4089.

[12] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*., 26, 1199–1200.

[13] Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2006). Antioxi-

dant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. *Food Chem*., 102, 1233–1240.

[14] Shantha, NC, Decker, EA. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J. AOAC Int*.77(2), 421-424.

[15] Vyncke, W. (1970). Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloracetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*., 72, 1084-1087.

[16] AOAC. (2005). Official methods of analysis, 18th edition, Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.

[17] Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, M.D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng*., 81, 200-208.

[18] Zhou, K., Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on the wheat bran antioxidant activity estimation. LWT- Food Sci Technol., 37, 717-721.

[19] Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teasby the ferric reducing antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem*., 47, 633–636.

[20] Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjo, k.L., Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L*.) during maturation. *J. Agric. Food Chem*., 48, 1485-1490.