

## Pengaruh Waktu Sentrifugasi Terhadap Kadar $\gamma$ -Oryzanol Hasil Ekstraksi Rice Bran Dengan Metode Ultrasonic Bath

Tiara Armelia Ismoyo<sup>1</sup>, Zahra Hanifah<sup>1</sup>, Ratri Ariatmi Nugrahani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Jakarta, Jl. Cempaka Putih Tengah 27, 10510

\*Corresponding Author : ratri.ariatmi@ftumj.ac.id

### Abstrak

Rice bran mengandung banyak bioaktif salah satunya adalah  $\gamma$ -Oryzanol.  $\gamma$ -Oryzanol merupakan antioksidan alami yang sangat kuat dalam mencegah oksidasi dan lebih efektif mencegah radikal bebas dibandingkan dengan vitamin E. Tujuan penelitian ini mengetahui pengaruh waktu sentrifugasi pada ekstraksi  $\gamma$ -Oryzanol dari rice bran menggunakan metode ultrasonic bath. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi ialah n-Heksana : Isopropanol dengan perbandingan 1:3 (v/v). Hasil ekstraksi disentrifugasi untuk memperoleh supernatan ekstrak  $\gamma$ -Oryzanol dengan variasi waktu sentrifugasi 5, 10, 15, 20, dan 25 menit. Pada sampel ekstrak  $\gamma$ -Oryzanol dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Semakin lama waktu sentrifugasi maka semakin banyak rendemen yang diperoleh sampai waktu 25 menit. Hasil uji kualitatif menggunakan metode HPLC menunjukkan bahwa semua sampel mengandung  $\gamma$ -Oryzanol. Hasil uji kuantitatif sampel  $\gamma$ -Oryzanol dengan waktu sentrifugasi 25 menit memiliki kadar  $\gamma$ -Oryzanol tertinggi 2,84 mg/g. Hasil ini menunjukkan semakin lama waktu sentrifugasi maka semakin tinggi kadar  $\gamma$ -Oryzanol yang diperoleh.

**Kata Kunci:** Ekstraksi, Rice Bran, Sentrifugasi,  $\gamma$ -Oryzanol

### Abstract

Rice bran contains a number of bioactive compounds and one of them is  $\gamma$ -Oryzanol. This compound is a natural antioxidant that has high capacity to inhibit oxidation and is more effective in preventing free radicals than vitamin E. This study aimed to determine the effect of centrifugation period on the extraction of  $\gamma$ -Oryzanol from rice bran using ultrasonic bath. The solvent used in this process was n-Hexane : Isopropanol at 1:3 (v/v) ratio. The extraction samples were centrifuge to obtain the supernatant for different periods of 5, 10, 15, 20, and 25 minutes. The extraction samples underwent qualitative and quantitative tests using HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) to analyze the  $\gamma$ -Oryzanol content. Yields increased with longer centrifugation periods, with 25-minute centrifugation producing the highest. The qualitative analyses showed the presence of  $\gamma$ -Oryzanol in every sample. The quantitative analyses showed that centrifugation for 25 minutes yielded the highest amount of  $\gamma$ -Oryzanol at 2.84 mg/g. These results show that longer centrifugation period produces higher content yield of  $\gamma$ -Oryzanol.

**Keywords:** Ekstraksi, Rice Bran, Sentrifugasi,  $\gamma$ -Oryzanol

### PENDAHULUAN

Pemanfaatan rice bran dengan cara mengambil ekstrak dari rice bran akan meningkatkan nilai ekonomi. (Kusbiantoro dan Rakhmi, 2007).

Rice bran mengandung beberapa komponen bioaktif salah satunya adalah antioksidan  $\gamma$ -oryzanol (Xu dan Godber,

2000). Asam ferulat merupakan antioksidan asam fenolik yang mempunyai efektivitas sebagai antioksidan 4x lebih besar dibandingkan dengan vitamin E (Oryza Oil and Fat Chemical Co. Ltd., 2010).

Menurut penelitian Saenjum, *et.al.*, 2012 ekstraksi rice bran menggunakan pelarut N-heksana: Isopropanol (1:3) menghasilkan lebih banyak  $\gamma$ -Oryzanol. Metode ekstraksi  $\gamma$ -

*oryzanol* dengan *ultrasonic bath* lebih efektif dan efisien dalam waktu ekstraksi untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal.

Dalam proses ekstraksi, salah satu metode atau cara dalam pemisahan suatu bahan adalah dengan cara sentrifugasi. Metode sentrifugasi dimaksudkan agar segala bentuk proses pemisahan zat dapat dipercepat. Hal ini sebagai jawaban atas lamanya waktu yang diperlukan dalam proses pemisahan zat jika dengan cara konvensional. (Rahmadhani, dkk., 2012)

Ekstrak  $\gamma$ -*Oryzanol* dari *rice bran* dapat diaplikasikan menjadi produk makanan, farmasi ataupun kosmetik. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh sentrifugasi pada rendemen ekstrak  $\gamma$ -*Oryzanol* dedak padi (*rice bran*) dengan metode ekstraksi *ultrasonic bath*, memurnikan, dan mengkarakterisasi

## METODE

### A. Metode Penelitian

#### a) Alat & Bahan

Alat proses yang digunakan dalam penelitian ini timbangan digital, oven, *ultrasonic bath*, alat sentrifugasi, rangkaian alat destilasi, Erlenmeyer, gelas ukur, corong, beaker glass. Alat Analisa yang digunakan ialah HPLC. Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah *rice bran*, *n*-Heksana, isopropanol, air.

#### b) Proses Ekstraksi Metode *Ultrasonic Bath*

*Rice bran* sebanyak 30 gram ditempatkan dalam 3 erlenmeyer yang masing-masing 10 gram dan ditambahkan pelarut 100 ml pada setiap erlenmeyer. Dengan perbandingan *n*-Heksana : Isopropanol (1:3), 25 ml *n*-Heksana dan 75 ml Isopropanol.

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode *ultrasonic bath*. Sebanyak 3 erlenmeyer yang berisi pelarut dan *rice bran* dimasukkan ke dalam *ultrasonic bath* untuk proses ekstraksi selama 10 menit dengan suhu 35-40°C. Setelah 10 menit hasil ekstraksi dipisahkan dengan sentrifugasi untuk diambil supernatannya. Variasi waktu sentrifugasi yaitu 5, 10, 15, 20, dan 25 menit. Selanjutnya berat  $\gamma$ -*Oryzanol* dicatat sebelum pemurnian.

#### c) Prosedur Pemurnian $\gamma$ -*Oryzanol*

Hasil sentrifugasi disaring untuk

memastikan tidak ada endapan *rice bran* didalam hasil ekstraksi. Siapkan rangkaian distilasi. Masukkan hasil ekstraksi *rice bran* ke dalam labu didih. Distilasi dilakukan selama 1 jam dengan suhu 85-90°C. Pada hasil distilasi dilakukan proses penguapan kembali dengan menggunakan oven selama 30 menit pada suhu 70°C untuk memastikan tidak ada pelarut yang tersisa. Selanjutnya berat  $\gamma$ -*Oryzanol* dicatat setelah pemurnian.

### B. Metode Analisa

a) Menghitung Rendemen  $\gamma$ -*Oryzanol* menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

A = Berat  $\gamma$ -*Oryzanol* sesudah pemurnian

B = Berat  $\gamma$ -*Oryzanol* sebelum pemurnian

b) Menentukan Kadar  $\gamma$ -*Oryzanol* dengan Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Sistem HPLC yang digunakan untuk analisis senyawa  $\gamma$ -*Oryzanol* dengan fase gerak Acetonitril : Butanol : As.asetat : Aquadest (94:3:2:1), fase diam C<sub>18</sub>, detektor waters 2996 PDA (*Photodiode Array Detector*), kolom waters symmetry 5  $\mu$ m detektor UV panjang gelombang 320 nm. Masing-masing sample ditimbang dengan berat 1,62 g. Standar  $\gamma$ -*Oryzanol* dengan konsentrasi 500 ppm ditimbang sebanyak 2,5 mg.

Sampel 2 ml dilarutkan dengan pelarut dalam labu ukur 5 ml, saring dan masuk vial lalu dilakukan injek HPLC. Didapatkan hasil uji HPLC berupa luas area peak dari grafik kromatogram yang kemudian dari luas area tersebut dapat dihitung kadar  $\gamma$ -*Oryzanol* pada sampel. Berikut perhitungan konsentrasi dan kadar  $\gamma$ -*Oryzanol* mengacu pada literatur Laboratorium Kesehatan Daerah, Jakarta Pusat.

#### a. Perhitungan Konsentrasi $\gamma$ -*Oryzanol*

$$C_{sp} = \frac{A_{smpel}}{A_{standar}} \times C_{std} \quad (2)$$

C<sub>sp</sub> = Konsentrasi sampel (ppm)

C<sub>std</sub> = Konsentrasi standar (ppm)

A<sub>smpel</sub> = Luas area total  $\gamma$ -*Oryzanol* sampel

A<sub>standar</sub> = Luas area total  $\gamma$ -*Oryzanol* standar

## b. Perhitungan Kadar

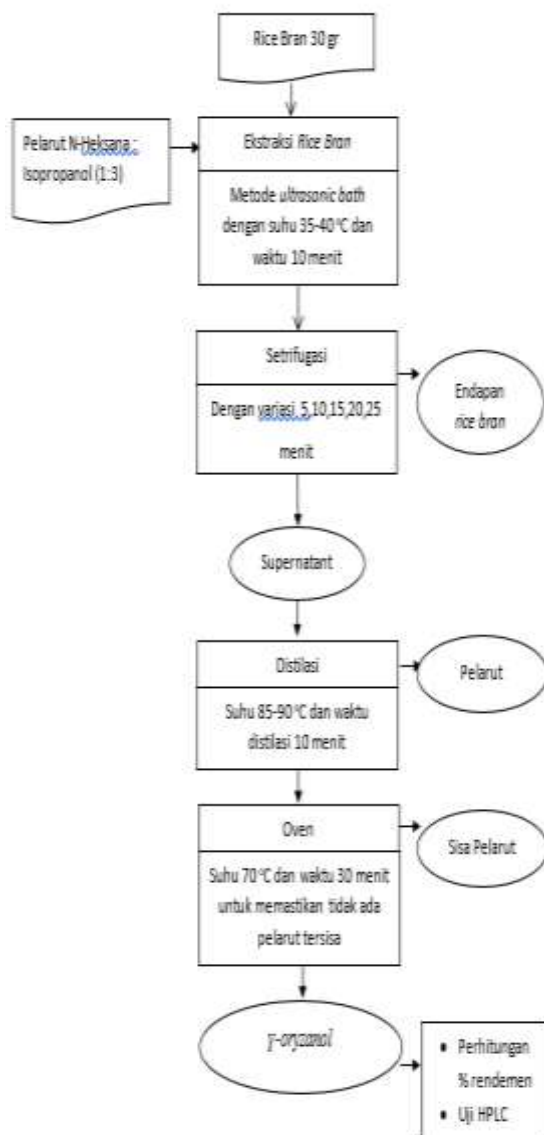
$$\text{Kadar sp} \left( \frac{\text{mg}}{\text{gr}} \right) = \frac{\mu \times 5 \text{ ml}}{\text{BT} \times 1000}$$

(3)

Kadar sp = Kadar sampel (gram)  
 $\mu$  = Konsentrasi sampel (mg/ml)  
 BT = Berat sampel (gram)

## C. Diagram Alir Penelitian

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambar 1. Diagram alir ekstraksi  $\gamma$ -Oryzanol

## Hasil Penelitian

A. Hasil Data Rendemen  $\gamma$ -Oryzanol

Dilakukan variasi waktu sentrifugasi pada  $\gamma$ -Oryzanol dan dihitung rendemen yang diperoleh dari tiap variasi. Variasi waktu sentrifugasi untuk mengetahui pengaruh waktu sentrifugasi terhadap rendemen. Tabel 1 menunjukkan hasil rendemen  $\gamma$ -Oryzanol. Tabel 1 Hasil rendemen  $\gamma$ -Oryzanol dengan variasi waktu sentrifugasi

Berat Awal (gr)	Berat Akhir (gr)	Ekstraksi ultrasonic bath (menit; suhu) °C	Sentrifugasi 600 ppm (menit)	Distilasi (menit; suhu) °C	% rendemen
318,5	41,80	10 ; 35-40 °C	5	60 ; 85-90 °C	13,12 %
319	44,13	10 ; 35-40 °C	10	60 ; 85-90 °C	13,83 %
318,7	66,83	10 ; 35-40 °C	15	60 ; 85-90 °C	20,96 %
319,1	68,47	10 ; 35-40 °C	20	60 ; 85-90 °C	21,45 %
319	75,88	10 ; 35-40 °C	25	60 ; 85-90 °C	23,78 %

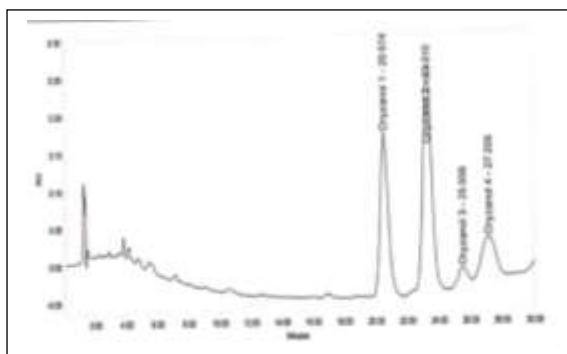
## B. Hasil Data Uji HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Berdasarkan hasil pengujian menggunakan metode HPLC maka diperoleh hasil analisis senyawa  $\gamma$ -Oryzanol pada sampel dan standar  $\gamma$ -Oryzanol dengan data luas area total pada peak grafik kromatogram sebagai berikut

Tabel 2 Hasil Uji HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Nama	Total Luas Area Oryzanol	Konsentrasi $\gamma$ -Oryzanol (ppm)	Kadar $\gamma$ -Oryzanol (mg/g)
Sentrifugasi 5 menit	8212304	318,477	0,98
Sentrifugasi 10 menit	8477667	328,768	1,01
Sentrifugasi 15 menit	8739564	338,924	1,04
Sentrifugasi 20 menit	17217147	667,689	2,07
Sentrifugasi 25 menit	24056114	982,908	2,84

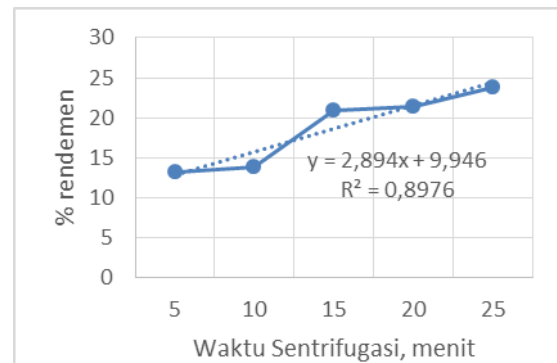
Berdasarkan dari hasil sampel  $\gamma$ -Oryzanol dengan waktu sentrifugasi 25 menit memiliki kadar  $\gamma$ -Oryzanol tertinggi sebesar 2,84 mg/g dengan grafik kromatogram seperti terdapat pada Gambar 1:

Gambar 1 Kromatogram Sampel  $\gamma$ -Oryzanol Sentrifugasi 25 menit

## PEMBAHASAN

### A. Analisa Hasil Rendemen $\gamma$ -Oryzanol

Grafik hubungan antara pengaruh waktu sentrifugasi terhadap rendemen  $\gamma$ -Oryzanol dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 Grafik Pengaruh Waktu Sentrifugasi Terhadap Rendemen  $\gamma$ -Oryzanol

Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa pengaruh waktu sentrifugasi pada pemurnian  $\gamma$ -Oryzanol sangat besar, semakin lama waktu sentrifugasi maka semakin besar persen rendemen  $\gamma$ -Oryzanol yang diperoleh. Setelah hasil ekstraksi  $\gamma$ -Oryzanol disentrifugasi maka terbentuk 2 lapisan yaitu : lapisan bawah dan lapisan atas. Lapisan bawah merupakan endapan *rice bran* yang terpisah dari hasil ekstraksi dan lapisan atas merupakan supernatant hasil ekstraksi  $\gamma$ -Oryzanol .

Proses pemisahan ini memerlukan waktu sentrifugasi yang cukup lama, terlihat bahwa semakin lama waktu sentrifugasi maka hasil ekstrak  $\gamma$ -Oryzanol yang diperoleh semakin besar sehingga berpengaruh terhadap % rendemen yang semakin tinggi. Hal ini disebabkan adanya gaya sentrifugal pada metode sentrifugasi. Endapan *rice bran* terpisah dari liquid atau hasil ekstrak  $\gamma$ -Oryzanol dengan adanya gaya sentrifugal pada campuran pelarut. Terjadi pemisahan dengan adanya gaya sentrifugal karena perbedaan berat jenis antara fase liquid dengan padatan. Ekstrak  $\gamma$ -Oryzanol dengan berat jenis yang lebih ringan dibandingkan dengan endapan *rice bran* maka ekstrak  $\gamma$ -Oryzanol akan terkumpul dibagian atas (supernatant). Persen rendemen terbesar diperoleh pada waktu sentrifugasi 25 menit dan kecepatan sentrifugasi 600 rpm sebesar 23,78%.

### B. Analisa Hasil Uji HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT atau biasa juga disebut dengan

HPLC (*Hight Performance Liquid Chromatography*) merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel. Fungsi dari HPLC yaitu untuk mengukur senyawa-senyawa kualitatif (waktu retensi) dan kuantitatif (luas area dan tinggi puncak). (Putra,2004).

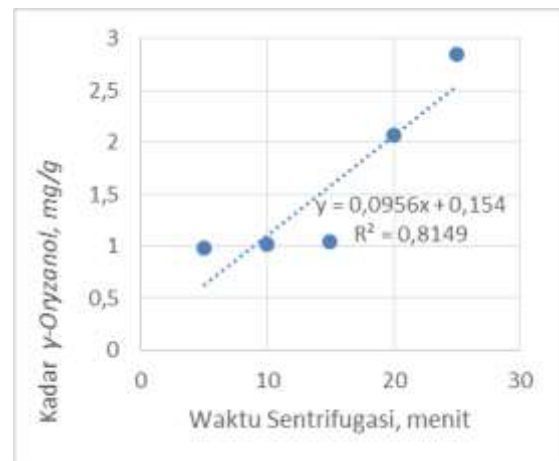
Pengujian ini bertujuan untuk menentukan kadar  $\gamma$ -Oryzanol dalam sample menggunakan instrument HPLC (*Hight Performance Liquid Chromatography*). Prinsip dasar HPLC yaitu berdasarkan perbedaan distribusi komponen-komponen dalam sampel di antara dua fase, fase gerak dan fase diam. Fase gerak yang digunakan berupa campuran senyawa acetronitril, butanol, asam asetat, aquadest dengan perbandingan 94:3:2:1 sedangkan fase diam yang digunakan adalah kolom C<sub>18</sub> yang bersifat non polar. Oleh karena itu uji ini menggunakan metode HPLC fase terbalik, karena fase gerak yang digunakan bersifat polar sedangkan fase diam bersifat non polar.

Detektor yang digunakan dalam pengujian metode HPLC ini adalah PDA (*photodiode array detection*) dikarenakan  $\gamma$ -Oryzanol hanya dapat terdeteksi dengan detector PDA sedangkan tokoferol dan tokotrienol dikuantifikasi dengan deteksi fluoresensi (Rogers *et al*, 1993). Analisis pada percobaan ini adalah analisis kualitatif dan kuantitatif.

Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi komponen dalam sampel dengan waktu retensi standar. Puncak yang akan muncul pada kromatogram adalah puncak komponen  $\gamma$ -Oryzanol terlebih dahulu. Hal tersebut dapat ditentukan berdasarkan struktur kimia dari masing-masing komponen. Komponen  $\gamma$ -Oryzanol dapat dilihat pada gambar 2.3  $\gamma$ -Oryzanol memiliki struktur yang relatif lebih non polar sehingga akan tertahan lebih lama di kolom yang sifatnya non polar.

Analisis kuantitatif, dilakukan perhitungan kadar  $\gamma$ -Oryzanol dalam sampel berdasarkan luas area puncak dengan menggunakan perbandingan konsentrasi dan luas area deret standar dengan sampel. Instrument HPLC harus

dikondisikan pada keadaan optimal agar hasil yang didapatkan baik. Kemudian baik sampel maupun deret standar, sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC perlu dilakukan *degassing* untuk menghilangkan gelembung udara karena gelembung udara dapat terkumpul dikepala pompa ataupun detektor sehingga akan mengganggu kondisi HPLC.



Gambar 3 Grafik Pengaruh Waktu Sentrifugasi Terhadap Kadar  $\gamma$ -Oryzanol

Berdasarkan Gambar 3 pengaruh waktu sentrifugasi terhadap kadar  $\gamma$ -Oryzanol menunjukkan persamaan regresi linear senilai  $y=0,0956x+0,154$   $R^2 = 0,8149$ . Berdasarkan dari hasil data pengamatan, menunjukkan bahwa analisa kualitatif pada semua sampel yang diujikan dengan metode HPLC mengandung  $\gamma$ -Oryzanol dikarenakan waktu retensi komponen dalam sampel hampir sama dengan waktu retensi standar dan jumlah komponen yang dihasilkan sesuai standar dan literatur. Sedangkan untuk analisa kuantitatif berdasarkan data yang diperoleh sampel  $\gamma$ -Oryzanol dengan waktu sentrifugasi 25 menit memiliki kadar  $\gamma$ -Oryzanol tertinggi sebesar 2,84 mg/g. Membuktikan bahwa semakin lama waktu sentrifugasi maka semakin tinggi pula  $\gamma$ -Oryzanol yang didapat.

## KESIMPULAN

1.  $\gamma$ -Oryzanol dari *rice bran* dapat diekstrak menggunakan pelarut *n*-Heksana dan isopropanol (1:3) metode ekstraksi *ultrasonic bath* dengan variasi waktu sentrifugasi

2. Hasil ekstraksi  $\gamma$ -Oryzanol menggunakan variasi waktu sentrifugasi 5, 10, 15, 20, dan 25 menit maka diperoleh % rendemen tertinggi pada waktu sentrifugasi 25 menit dan kecepatan sentrifugasi 600 rpm sebesar 23,78%.
3. Pada uji kualitatif semua sampel yang diujikan dengan metode HPLC mengandung  $\gamma$ -Oryzanol dikarenakan waktu retensi komponen dalam sampel hampir sama dengan waktu retensi standar dan jumlah komponen yang dihasilkan sesuai standar dan literatur.
4. Pada analisa kuantitatif berdasarkan data yang diperoleh dari pengujian metode HPLC, sampel  $\gamma$ -Oryzanol dengan waktu sentrifugasi 25 menit memiliki kadar  $\gamma$ -Oryzanol tertinggi sebesar 2,84 mg/gam. Membuktikan bahwa semakin lama waktu sentrifugasi maka semakin tinggi pula  $\gamma$ -Oryzanol yang didapat.

#### SARAN

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai variasi waktu sentrifugasi yang berbeda agar memperoleh waktu sentrifugasi optimal.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas Hibah Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi, sesuai dengan Kontrak Penelitian Tahun Anggaran 2019, Nomor: 20/AKM/PNT/2019.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Al Husna, Ulfa Abidah 2018. *Pengaruh Perbandingan Pelarut dengan Bekatul Serta Waktu Terhadap Hasil Ekstraksi Bekatul Padi (Oryza Sativa)*. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Bemvenuti ,Renata Heidtmann, Náthali Saião Nora dan Eliana Badiale-Furlong. 2012. *Extraction Of  $\gamma$ -Oryzanol From Rice Bran*. Ciênc. Agrotec., Lavras  
Chromatography A1034: 237-242.
- Handayani, Hana., Feronika Heppy Sriherfyna, Yunianta. 2016, *Ekstraksi*

*Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Ekstraksi)*, Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol.4 No.1: 262- 272, 2016.

- Hapsari, Nur. Welasih, Tjatoer. 2013. *Pembuatan Virgin Coconut Oil (Vco) Dengan Metode Sentrifugasi*. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri UPN “Veteran” Jatim
- Kumar, Raj R dkk. 2009. Preferential Extractability of Gamma Oryzanol from Dried Soapstock Using Different Solvents. *J Sci Food Agric*; 89: 195–200.
- Lachman L, Lieberman HA, Kanig J.L. 2001. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. Philadelphia: LEA & Febiger
- Kusbiantoro B, Rakhmi AT. 2007. Review : *Gamma Oryzanol Potensi Tersembunyi Dalam Produk Samping Padi*. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. 1(1): 165–70. Qureshi dkk, 2000.
- Mas’ud, Fajriyati. 2017. *Minyak Bekatul Padi: Kandungan Gamma Oryzanol, Vitamin E, Dan Potensinya Sebagai Pangan Fungsional*. Makassar: Universitas Hasanuddin
- Oryza, 2006, *Red Ginger Eztract: An All Natural Anti-arthritic & Antiinflammatory Agent for Food & Cosmetics Applications*, Oryza Oil & Fat Chemical Co., LTD, Tokyo.
- Patel, M., S N Naik. 2004. *Gamma-Oryzanol From Rice Bran Oil*. Center of Rural Development and Technology, Indian Institute of Technology, New Delhi.
- Purwanto, A., Fajriyati, A.S., Wahyuningtyas, D.. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Rendemen Dan Aktivitas Antioksidan Dalam Ekstrak Minyak Bekatul Padi (Rice Bran Oil). Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Vol. 13. No. 1. Halaman: 29 – 34
- Putra, E.D.L., 2004, *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*, Medan: Jurusan Farmasi, FMIPA Universitas Sumatra Utara
- Rahmadhani, S, 2012. *Sentrifugasi Dan Filtrasi*. Institut Pertanian Bogor.

- Rogers, E.J., Rice S.M., Nicolosi, R.J., Carpenter, D.R., McClelland, C.A., and Romanczyk, L.J. 1993. Identification and quantitation of  $\gamma$ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:301.
- Saenjum, C., Chaiyasut, C., Chansakaow, S., Suttajit, M., and Sirithunyalug, B. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of gamma-oryzanol rich extracts from Thai purple rice bran. *Journal Medical Plants Research* 6: 1070-1077.
- Xu, Z. and Godber, J.S., 1999. *Purification and identification of components of  $\gamma$ -Oryzanol in Rice*. *Journal Agric. Food Chem.* 47,2724-2728.