



مقاله علمی-پژوهشی

بهینه سازی استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از پوست انگور (*Vitis vinifera L.*) با کمک پیش تیمار اولتراسونیک

سعادت عزیزی<sup>۱</sup>، سید معین نظری<sup>۲\*</sup>، لیلا مرادی حق گو<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
<p><b>تاریخ های مقاله :</b></p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱</p>	<p>انگور یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که می تواند به صورت میوه تازه یا فرآیند شده مصرف گردد. انگور یکی از مهمترین محصولات باغی و تجاری ایران به شمار می آید. سالیانه مقادیر زیادی پسماند انگور در واحدهای تولید کننده ی شیره انگور تولید می شود و تولید کنندگان این محصول را با مشکلات زیادی برای دفع پسماند رو به رو می کنند. ضایعات و پسماندهای انگور منبع ارزشمندی از رنگدانه ها و ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی خصوصاً ترکیبات پلی فنولی هستند. استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از مواد اولیه ارزان قیمتی مانند ضایعات انگور روش مناسبی برای استفاده از آنها در صنایع غذایی و دارویی است. در این تحقیق برای یافتن شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی از پوست انگور شانی استان همدان از روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب مرکزی (CCD) با سه متغیر مستقل (زمان استخراج با استفاده از حمام اولتراسونیک، نسبت فاز مایع به جامد و غلظت حلال اتانول) استفاده شد. شرایط بهینه استخراج ترکیبات فراسودمند از پوست انگور شانی برحسب ماکزیمم مقدار ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی، ترکیبات آنتوسیانینی و همچنین ماکزیمم ظرفیت آنتی اکسیدانی (بر حسب DPPH) به دست آمد. شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی شامل غلظت اتانول ۵۹.۰۶٪، نسبت فاز مایع به جامد ۱۶.۰۸ml/g و زمان بهینه استخراج ۲۴.۱۲ min بود. نتایج تحقیق نشان داد عصاره پوست انگور شانی حاوی ۸ نوع ترکیب فنولی مختلف است که در میان آنها اپی گالوکاتچین و کاتچین بالاترین غلظت را دارند. بنابراین با یافتن شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولی و شناسایی اجزای دقیق آنها، میتوان این ترکیبات را در مقیاس کارگاهی تهیه کرد و در اختیار صنایع مختلف غذایی و دارویی قرار داد.</p>
<p><b>کلمات کلیدی:</b></p> <p>پوست انگور شانی، ترکیبات فنولی، آنتی اکسیدانهای طبیعی، امواج اولتراسونیک</p> <p><b>DOI: 10.22034/FSCT.21.146.118</b></p> <p>* مسئول مکاتبات: seyyedmoeinnzr525@gmail.com</p>	

## ۱- مقدمه

اکسیژن خاک، نفوذ به سطح، خاک و آبهای زیرزمینی است [۴]. ضایعات حاصل از انگور سرشار از ترکیبات فنولی هستند و برای غنی سازی غذای حیوانات یا تولید کود برای افزایش حاصلخیزی خاک یا تولید اتانول برای نوشیدنی های الکلی استفاده می شوند [۲]. ترکیبات فنولی یکی از گسترده ترین ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان هستند. اثرات مفید سلامتی بخش میوه ها و سبزی به دلیل حضور ترکیبات فنولی در آنهاست. ترکیبات فنولی طیف وسیعی از اثرات فیزیولوژیکی مانند (اثرات ضد حساسیت، ضد التهابی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و محافظت از قلب) دارند. به دلایل اقتصادی و زیست محیطی مقدار زیادی از محصولات جانبی تولید شده در حین تولید برای بازیابی ترکیبات ارزشمند مورد بررسی قرار گرفته اند [۴]. همچنین افزایش روز افزون جمعیت جهان و محدودیت منابع طبیعی توجهات را به سمت منابع تجدید پذیر و طراحی فرآیندهای استخراجی معطوف کرده است. بازیافت ضایعات از منابع کشاورزی برای تبدیل به محصولات با ارزش یک مثال خوب از این دسته است [۶]. در سراسر جهان حدود ۵-۹ میلیون تن ضایعات انگور تولید و دور ریخته می شود که این ضایعات مشکلات زیست محیطی و اقتصادی زیادی ایجاد می کنند. بنابراین استفاده از ضایعات تفاله انگور در صنعت غذا، مواد آرایشی و بهداشتی، صنایع داروسازی و آفت کش های زیستی اهمیت زیادی دارد [۲]. بنابراین از پتانسیل آنتی اکسیدانی ترکیبات فنولی می توان در تولید نگهدارنده های مواد غذایی یا تولید مکمل های غذایی استفاده کرد [۶].

عصاره ی پوماسه انگور به اشکال مایع، کنسانتره و پودری می تواند به عنوان مواد اولیه در صنایع غذایی، داروسازی و تولید ترکیبات آرایشی و بهداشتی استفاده شود. تحقیقات زیادی در مورد انگور و فرآورده های جانبی آن انجام شده است. از دلایل جذابیت این موضوع می توان به قوانین زیست محیطی و هزینه های دفع پسماند های انگور اشاره

انگور یکی از مهمترین محصولات کشاورزی جهان است که می تواند به صورت تازه مصرف شود یا در تولید محصولاتی مانند آب میوه، کشمش، ژله و مربا به کار رود. انگور سرشار از ترکیبات فنولی است و ۸۵٪ این ترکیبات در هسته و پوست انگور قرار دارند. افزایش تولید مواد غذایی صنعتی به میزان قابل توجهی، تولید زباله های غذایی را افزایش داده است. فرآوری میوه ها و سبزیجات موجب تولید مقادیر زیادی محصول جانبی مانند ساقه، برگ، پوست و هسته می شود که بسیاری از آنها به عنوان زباله دور ریخته می شود. درحین فرآوری انگور در صنایع غذایی، محصولات جانبی و ضایعات زیادی از انگور تولید می شود. این محصولات جانبی منبع ارزشمندی از رنگدانه ها و ترکیبات سلامتی بخش هستند [3; 2; 1]. عوامل مختلف مانند (نوع انگور، شرایط کاشت و برداشت) و نوع فرآوری می توانند ترکیبات شیمیایی فرآورده های جانبی انگور را تحت تأثیر قرار دهند [4].

در طی فرآیندهایی شیره سازی انگور تحت فشار قرار می گیرد اما ترکیب شیمیایی، ترکیبات زیست فعال تغییر معناداری پیدا نمی کند و مقدار قابل توجهی از ترکیبات زیست فعال در تفاله انگور باقی می ماند [5; 4]. در یک دوره کوتاه برداشت و فرآوری محصول، مقادیر زیادی از تفاله ی انگور در هر منطقه تولید و روی هم جمع می شود. با توجه به اینکه ترکیبات مختلفی مانند ترکیبات فنولی در تفاله انگور وجود دارد؛ سوزاندن یا حتی دفن کردن زباله می تواند موجب آسیب به محیط زیست گردد. این ترکیبات می توانند pH محیط را کاهش داده و مقاومت به تجزیه بیولوژیکی را افزایش دهند. یکی دیگر از مشکلات روی هم انباشته شدن این زباله ها، آلودگی آبهای سطحی و زیر زمینی است. توده های روی هم انباشته شده از تفاله ی انگور اگر به خوبی تیمار و فرآیند نشوند؛ می توانند موجب جذب مگس ها و آفات شده و بیماری ها رو گسترش دهند. تراوشات تولید شده از این تفاله ها مسئول کاهش

(Ghassempour et al., 2008) برای استخراج ترکیبات آنتوسیانینی پوست انگور قرمز از روش اولتراسونیک استفاده کردند؛ نتایج تحقیقات آنها نشان داد که روش اولتراسونیک نسبت به روش ماسراسیون روش استخراج موثرتری است و نیاز به زمان و حلال استخراج کننده ی کمتری دارد. (Mirbagheri et al., 2017) محتوای فنولی و خواص آنتی اکسیدانی عصاره ی هسته ی ۳ نوع مختلف انگور کشت داده شده در ایران را بررسی کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که بالاترین و کمترین میزان ترکیبات فنولی به ترتیب مربوط به عصاره هسته ی انگور قرمز و عصاره ی هسته ی انگور سبز بوده است. (Farhadi et al., 2016) نیز ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی انواع مختلف انگور منطقه اذربایجان غربی را بررسی کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که پوست انگور سیاه (Ghara Shani) بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها را دارد. (Caldas et al., 2018) تأثیر پارامترها (غلظت اتانول، زمان استخراج و نسبت فاز جامد به مایع) و روش های مختلف استخراج مانند روش های سنتی استخراج و استخراج به کمک امواج اولتراسونیک و ماکروویو را بر استخراج ترکیبات فنولی از پوست انگور بررسی کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که استخراج به کمک اولتراسوند بهترین عملکرد را در استخراج ترکیبات فنولی از پوست انگور داشته است و عصاره ی بیشتری در زمان کوتاه تری نسبت به روش های سنتی استخراج مانند هم زدن به دست آمده است. (Li et al (2019) شرایط استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی از پوست انگور قرمز را بهینه سازی کردند. پارامترهای استخراج شامل غلظت اتانول به عنوان حلال استخراج کننده، دما و زمان استخراج بود. بیشترین بازدهی ترکیبات فنولی، محتوای آنتوسیانینی و ترکیبات فنولی کل در دمای  $C^{\circ}$  ۵۰.۷۹، غلظت اتانول ۴۸.۸٪ و زمان ۱۴.۸۲ min بوده است. کارایی استخراج به شرایط فرآیند بستگی دارد. مطالعات نشان داده است که متغیرهایی مانند دما، زمان تماس، نسبت حلال به مواد جامد بر بازده استخراج ترکیبات فنولی از منابع طبیعی موثر است [۶]. در منابع گیاهی، انتخاب حلال

کرد. مواردی مانند قوانین زیست محیطی و هزینه های دفع پسماند حاصل از فرآوری انگور به جذابیت موضوع افزوده است [۴]. امکان یافتن فرآیندهای صنعتی استخراج نیاز به بررسی، تحقیق و مطالعه دارد. برخی از فاکتورهای موثر در انتخاب فرآیندهای صنعتی شامل بهینه سازی مقادیری که تأثیر مستقیم بر فرآیند دارند، انتخاب صحیح مواد خامی که عصاره گیری می شوند و قرار دادن این مواد خام در معرض پیش تیمارهای مناسب هستند [۶]. یکی از پیش تیمارهای موثر در فرآیند استخراج، استفاده از دستگاه اولتراسوند برای استخراج است. استخراج با اولتراسوند موجب کاهش زمان استخراج، کاهش مصرف حلال، افزایش بازده استخراج و بهبود کیفیت عصاره می شود. تکنیک استخراج با اولتراسوند به دلیل سادگی و کم هزینه بودن یک تکنیک جذابی به نظر می رسد. اساس کار استخراج با دستگاه اولتراسوند، استفاده از انرژی اولتراسوند (با فرکانس ۲۰ KHZ) برای تسهیل استخراج آنالیت ها از نمونه های جامد به وسیله ی حلال است و انتخاب حلال بستگی به ماهیت ترکیبی دارد که استخراج می شود. این تکنیک برای استخراج ترکیبات آلی از ماتریکس های مختلف به کار رفته است. با استفاده از این تکنیک زمان استخراج ۳ تا ۱۰ مرتبه کاهش پیدا می کند [۷]. امواج فراصوت با ایجاد پدید کاویتاسیون، موجب تخریب غشاهای سلولی و تسهیل نفوذ سیال به داخل سلول می شوند. همچنین با افزایش سطح تماس ذرات جامد با حلال، موجب کاهش زمان استخراج ترکیبات فنولی می گردند [۸]. (Novak et al., 2008) از اولتراسوند برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از پوست انگور استفاده کردند. زمان استخراج بسته به نوع ترکیب فلاونوئیدی استخراج شده ۱۵-۳۰ دقیقه بود. (Ghafoor et al., 2009) از امواج اولتراسوند برای استخراج ترکیبات فنولی و آنتوسیانین ها از هسته ی انگور استفاده کردند که مدت زمان استخراج در این روش ۵۰ دقیقه بود.

استخراج ترکیبات فنولی و شناسایی اجزای دقیق آنها، میتوان این ترکیبات را در مقیاس کارگاهی تهیه کرد و در اختیار صنایع مختلف غذایی و دارویی قرار داد.

## ۲- مواد و روش ها

تمامی مواد شیمیایی، استانداردها، معرف های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما و مرک با بالاترین کیفیت تهیه شدند.

### ۲-۱ آماده سازی مواد اولیه

ابتدا انگور شانی واریته *Vitis vinifera L.* از تاجکستان های منطقه تهیه شد. ابتدا ساقه ها و برگ ها از انگورها جدا شدند. حبه های انگور بعد از شستشو با آب، داخل صافی هایی قرار گرفتند تا آب شستشوی آنها گرفته شود؛ سپس داخل کیسه هایی قرار گرفتند و به کمک پرس و تحت فشار قرار دادن انگورها، آب انگور استخراج شد. تفاله ی باقی مانده در سایه و در معرض جریان هوا خشک شد. هسته های انگور از سایر اجزای پوماسه جدا شد و پوماسه حاصل که عمدتاً حاوی پوست انگور شانی بود؛ آسیاب گردید و از الک با مش ۱mm عبور داده شد و تا زمان استفاده نهایی در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری گردید.

### ۲-۲ طرح آزمایشات

شرایط بهینه استخراج تفاله انگور با استفاده از نرم افزار (DOE) Design Expert طرح ریزی شد. روش مورد بررسی سطح پاسخ (RSM) بود که با استفاده از طرح مرکب مرکزی (CCD) با سه متغیر مستقل (زمان استخراج با استفاده از حمام اولتراسونیک (1-30 min)، نسبت فاز مایع به جامد (۱۰-۴۰ ml/g) و غلظت حلال اتانول (96%-0)) در ۵ سطح و ۶ تکرار پیرامون نقطه ی مرکزی طرح انجام شد. تعداد کل تیمارها ۲۰ تیمار بود و متغیرهای وابسته شامل میزان کل ترکیبات فنولی، قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH، میزان ترکیبات فلاونوئیدی و مقدار ترکیبات آنتوسیانین مومومری بودند (جدول ۱).

### ۲-۳ استخراج

استخراج کننده اهمیت زیادی دارد چون حلال نوع و مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده را تعیین می کند. حلال های مایع مانند استون، اتانول و متانول به طور گسترده ای برای استخراج ترکیبات فنولی از منابع گیاهی به کار رفته اند. اتانول به دلیل سمیت کم، ایمنی بالا، دوستدار محیط زیست بودن و قابلیت بازیافت و استفاده ی مجدد از آن بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی مورد استفاده در صنایع غذایی است [۲].

انگور یکی از مهمترین محصولات باغی و تجاری ایران و منطقه ی همدان به شمار می آید. این محصول علاوه بر ارزش اقتصادی، از نظر داشتن ارزش تغذیه ای بالا و طیف گسترده ای از ترکیبات آنتی اکسیدانی بسیار مورد توجه است. ترکیبات آنتی اکسیدانی (فنولی) موجود در انگور، ترکیبات زیست فعالی هستند که اثرات مثبتی بر سلامتی انسان دارند. این ترکیبات فنولی کاربردهای بسیار گسترده ای در صنایع غذایی و دارویی نیز دارند. سالیانه مقادیر زیاد پسماند تفاله انگور در اثر تولید شیره انگور ایجاد می شود و تولید کنندگان سنتی و صنعتی را با مشکلات زیادی برای دفع پسماند رو به رو می کند. با توجه به اینکه انگور در فرآیند تهیه شیره انگور دچار تغییرات شیمیایی و تخمیر نمی شود بنابراین تفاله انگور حاصل از شیره سازی منبع ارزشمندی از ترکیبات فنولی است. استخراج ترکیبات ارزشمند آنتی اکسیدانی از مواد اولیه ارزان قیمتی مانند ضایعات و پسماند انگور روش مناسبی برای تولید این محصولات به نظر می رسد. تا کنون مطالعه جامعی بر روی ترکیبات آنتی اکسیدانی پوماسه انگور شانی تولیدی استان همدان، صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه یافتن شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات فنولی از پوماسه انگور شانی استان همدان است. در این تحقیق برای بهینه سازی شرایط استخراج از روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب مرکزی (CCD) با سه متغیر مستقل (زمان استخراج با استفاده از حمام اولتراسونیک، نسبت فاز مایع به جامد و غلظت حلال اتانول) در ۵ سطح و ۶ تکرار پیرامون نقطه ی مرکزی طرح انجام شد. با یافتن شرایط بهینه

قرائت شد. غلظت ترکیبات مونومری آنتوسیانینی بر اساس اختلاف جذب در pH ها و طول موج های مختلف و با استفاده از فرمول زیر بر حسب معادل گرم سیانیدین ۳- گلیکوزید بر لیتر (g eq cy-3-glu/L) عصاره محاسبه گردید:

فرمول ۱- فرمول محاسبه ترکیبات آنتوسیانینی مونومری

$$A = (A_{530nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{530nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$$

$$TMAC = \frac{A * MW * DF * 1000}{\epsilon * l}$$

در این فرمول  $A$  میزان جذب نوری،  $MW$  جرم مولکولی سیانیدین ۳- گلیکوزید ( $449.2 \text{ g mol}^{-1}$ )،  $DF$  فاکتور رقت،  $\epsilon$  جذب مولی سیانیدین ۳- گلیکوزید ( $\text{cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) و  $l$  طول عبور نور است.

برای تهیه بافر با  $\text{pH} = 1$  برای این آزمایش،  $1.86$  گرم کلرید پتاسیم ( $\text{KCl}$ ) را با آب مقطر به حجم  $1000$  رسانیده شد تا محلول ( $\text{KCl}$ ) با غلظت  $0.25$  مولار تهیه شود. سپس با افزودن قطره ای اسید کلرید ریک ( $\text{HCl}$ )  $\text{pH}$  بافر را به  $1$  می رسانیم.

برای تهیه بافر با  $\text{pH} = 4.5$  به این ترتیب تهیه شد که ابتدا  $54.43$  گرم سدیم استات ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) را با آب مقطر به حجم  $1000$  رسانیده شد تا محلول سدیم استات ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )  $0.4$  مولار آماده شود. سپس با افزودن قطره ای اسید کلرید ریک ( $\text{HCl}$ )  $\text{pH}$  بافر را به  $4.5$  رسید.

## ۲-۶ روش اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی مطابق روش [۱۶] اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت ترکیبات فلاونوئیدی، منحنی استاندارد کوئرستین رسم گردید.  $0.5 \text{ ml}$  عصاره با  $1.5 \text{ ml}$  اتانول  $96\%$  و  $0.1 \text{ ml}$  آلومینیوم کلرید  $10\%$  ( $\text{AlCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ) و  $0.1 \text{ ml}$  سدیم استات ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )  $1\text{M}$  و  $250 \text{ ml}$  آب مقطر ترکیب شد و به خوبی ورتکس گردید. سپس جذب نمونه ها در  $415 \text{ nm}$  توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت

شرایط استخراج بر اساس متغیرهای غلظت حلال، نسبت فاز مایع به جامد و زمان استخراج در حضور امواج اولتراسونیک (در فرکانس ثابت  $30$  کیلوهرتز) مطابق طرح آزمایشات مورد استفاده در این تحقیق (جدول ۲) انجام شد. سپس با کمک سانتریفوژ (با دور  $3000$ ) و در دمای  $4^\circ \text{C}$  ذرات جامد از عصاره های مایع جدا سازی گردید و مایع شفاف جداسازی شده از کاغذ صافی عبور داده شد و برای آزمایشات بعدی استفاده گردید.

## ۲-۴ روش اندازه گیری ترکیبات فنولی کل

مقدار ترکیبات فنولی تفاله انگور شانی به روش فولین سیوکالتو و مطابق روش اصلاح شده [۱۳] انجام شد. به این ترتیب که به  $40 \mu\text{l}$  عصاره،  $1 \text{ ml}$  معرف فولین ( $v/v$ )  $10\%$  اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید؛ سپس در دمای اتاق به مدت  $6 \text{ min}$  انکوبه گردید. در مرحله بعد  $0.5 \text{ ml}$  سدیم کربنات  $7.5\%$  به آن اضافه شد و به خوبی ورتکس گردید. سپس در دمای اتاق و در محل تاریک به مدت  $30 \text{ min}$  انکوبه شد و جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج  $760 \text{ nm}$  قرائت گردید. دستگاه اسپکتروفتومتر توسط آب کالیبره شد. میزان ترکیبات فنولی کل بر حسب منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. منحنی استاندارد بر حسب غلظت های مختلف اسید گالیک ( $0, 20, 40, 60, 80, 100 \mu\text{g/ml}$ ) رسم گردید. معادله استاندارد اسید گالیک  $y = 0.0069x + 0.0135$  و  $R^2 = 0.998$  بود.

## ۲-۵ روش اندازه گیری ترکیبات مونومری آنتوسیانینی

مطابق روش اصلاح شده [۱۵] انجام شد. این روش بر پایه تغییر ساختار ترکیبات آنتوسیانینی در  $\text{pH}$  های مختلف استوار است. در این روش  $0.2 \text{ ml}$  عصاره با  $4 \text{ ml}$  بافر  $1 = \text{pH}$  ترکیب گردید و بعد از ورتکس کامل به مدت  $60 \text{ min}$  در دمای اتاق و در محل تاریک نگهداری شد. مراحل ذکر شده، مجدداً برای بافر  $\text{pH} = 4.5$  تکرار شد. سپس جذب نمونه ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری که به کمک آب کالیبره شده بود در طول موج های  $530 \text{ nm}$  و  $700 \text{ nm}$

## 8-2 تعیین نوع و مقدار ترکیبات فنولی به کمک دستگاه HPLC

ترکیبات فنولی عصاره پوست انگور استخراج شده در شرایط اپتیمیم توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیزها با استفاده از دستگاه (HP 1100, Agilent, Waldbronn, HPLC Germany) انجام شد. آنالیز بر اساس روش اصلاح شده [۱۷] انجام شد. برای این منظور عصاره های استخراج شده توسط یک تبخیر کننده دوار در دمای کمتر از  $35^{\circ}\text{C}$  تبخیر شد و مجدداً در ۲۰ ml فاز متحرک حل شد و به حالت محلول تبدیل شد. ترکیبات آنالیز شده شامل مواردی مانند (کوآرستین، هسپریدین، گالیک اسید، کاتچین، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین گالات و اپی کاتچین گالات) بود. سرعت جریان (Flow rate) برابر  $1\text{ ml/min}$ ، ترکیب فاز متحرک به کار برده شده شامل (آب، استیک اسید و استونیتریل) بود. حلال A شامل (water/acetic acid, ۲.۵/۹۷.۵) و حلال B شامل (A, ۸۰/۲۰ acetonitrile/solvent) بود. شیب شستشو در زمان ۵۰-۰ min شامل حلال B (۰-۴۴٪)، در زمان ۵۰ تا ۵۵ min شامل حلال B (۴۴-۱۰۰٪) و B٪ ۱۰۰ به عنوان ایزوکراتیک به مدت ۵ دقیقه بود. ستون مورد استفاده از نوع  $\text{C}_{18}$ ، طول ستون ۲۵cm، اندازه ذرات پایه  $5\mu\text{m}$  بود و آزمایش در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  انجام شد. آشکارساز فرابنفش در طول موج  $280\text{nm}$  مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از نرم افزار Gate Chrom برای آنالیز استفاده شد.

## ۳- بحث و نتیجه گیری

### ۱-۳ ترکیبات فنولی

مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده از عصاره های حاصل از شرایط مختلف استخراج از  $217.200\text{ }\mu\text{g/ml}$  تا  $649.493\text{ }\mu\text{g/ml}$  است. نتایج آنالیز این تحقیق نشان داده است که مقدار ترکیبات فنولی با افزایش مقدار اتانول تا ۴۸٪ افزایش و بعد از آن کاهش می یابد (شکل ۱-a) که با نتیجه حاصل

ترکیبات فلاونوئیدی از منحنی استاندارد کوآرستین استفاده شد و مقدار ترکیبات فلاونوئیدی به صورت معادل mg کوآرستین در L عصاره بیان گردید. تمامی جذب ها در سه تکرار قرائت شد. معادله ی استاندارد کوآرستین  $y = 0.0341x + 0.0081$  و  $R^2 = 0.990$  بود.

### ۷-۲ روش محاسبه ظرفیت آنتی اکسیدانی (بر حسب قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH)

فعالیت آنتی اکسیدانی کل به روش مهار رادیکال های آزاد DPPH (رادیکال های او ۱ دی فنیل پیکریل هیدرازیل) مطابق روش [۴] اندازه گیری شد. به این ترتیب که به ۰.۲ عصاره استخراج شده، ۳.۸ ml محلول اتانولی DPPH با غلظت ۰.۱ mM به مدت ۱ min ورتکس شد. سپس در دمای اتاق و در محل تاریک به مدت ۳۰ min نگهداری شد و جذب نمونه در طول موج  $517\text{nm}$  قرائت گردید. درصد مهار کنندگی ترکیبات با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

فرمول ۲- فرمول محاسبه درصد مهار کنندگی ترکیبات آنتی اکسیدانی

$$\% \text{Inhibition} = \frac{\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}}{\text{Absorbance control}} * 100$$

مقدار جذب نمونه شاهد بر اساس حلال استخراج کننده است.

طرز تهیه محلول DPPH به این صورت است که  $4\text{mg}$  DPPH در ۱۰۰ ml اتانول ۹۹٪ حل می شود. از حمام اولتراسونیک برای اطمینان از انحلال کامل پودر DPPH استفاده می شود. سپس بالن مورد نظر را با فویل آلومینیومی پوشانیده شده و تا زمان استفاده در محل خنک و تاریک نگهداری می گردد. بهتر است محلول هر روز و به صورت تازه تهیه شود. محلول DPPH خالص به رنگ بنفش است؛ هرچه غلظت ترکیبات آنتی اکسیدانی افزایش یابد؛ محلول کم رنگ تر شده و زرد رنگ می شود.

با افزایش نسبت فاز مایع به فاز جامد از ۱۵.۵ min) تا ۱۶ ml/g مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده کاهش پیدا می کند. در تحقیق [۲۲] با افزایش نسبت فاز مایع به جامد غلظت ترکیبات فنولی استخراج شده از توت آسیاب شده افزایش پیدا کرده است.

در نسبت فاز مایع به جامد ثابت (۲۵ ml/g) با افزایش زمان استخراج از ۶.۸۷ min تا ۲۴.۱۲ min مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده تغییر چندانی پیدا نمی کند. نتیجه تحقیق [۲۲] نشان داده است که با افزایش زمان استخراج در حضور امواج اولتراسونیک میزان ترکیبات فنولی تغییر پیدا نمی کند. با افزایش غلظت اتانول تا ۴۸٪ مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش و پس از آن با افزایش غلظت اتانول، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده کاهش پیدا می کند (شکل ۱-۱). نتیجه حاصل با نتیجه تحقیق [۲۲] مطابقت دارد؛ در این تحقیق نیز با افزایش غلظت اتانول، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش یافته و سپس کاهش پیدا می کند.

همچنین در غلظت ثابت اتانول (۴۸٪) مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده با افزایش زمان استخراج افزایش پیدا می کند اما با افزایش نسبت فاز مایع به جامد مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده کاهش پیدا می کند (شکل ۱-۱ d).

مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای ترکیبات فنولی کل به صورت فرمول زیر است (جدول ۳):

فرمول ۳- مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای ترکیبات فنولی کل

*Total phenolic compound*

$$= 525 + 5.42A - 73.77B + 62.44C + 43.21AB + 62.29AC + 27.27BC - 109.17A^2 - 19.21C^2$$

A = غلظت حلال، B = نسبت فاز مایع به جامد، C = زمان استخراج

کند. با افزایش نسبت فاز مایع به جامد، ترکیبات مونومری آنتوسیانینی استخراج شده کاهش پیدا می کند (شکل ۲-۱ a) که احتمالاً به دلیل کاهش غلظت ترکیبات آنتوسیانینی استخراج شده در واحد حجم حلال یا اثرات تخریبی کاویتاسیون ایجاد شده در نسبت بالای فاز مایع به جامد است [۱۸]. با افزایش زمان استخراج میزان این ترکیبات تغییر زیادی پیدا نمی

از تحقیق [۲] تطابق دارد. در تحقیق (Li et al 2019) با افزایش غلظت اتانول از ۲۰٪ تا حدود ۵۰٪ مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش و بعد از آن دچار کاهش می شود. با افزایش نسبت فاز مایع به فاز جامد، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده کاهش می یابد که احتمالاً به دلیل کاهش غلظت ترکیبات فنولی استخراج شده در واحد حجم حلال است. از دلایل دیگر این کاهش می توان به اثرات تخریبی کاویتاسیون ایجاد شده (در نسبت های بالای فاز مایع به جامد) بر روی ترکیبات فنولی و تجزیه این ترکیبات اشاره کرد [۱۸]. با افزایش زمان استخراج مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش پیدا می کند. (Caldas et al., 2018) عنوان کرده اند که اتانول با غلظت ۵۰٪ مؤثرترین حلال برای استخراج ترکیبات فنولی از پوست انگور است.

در زمان ثابت استخراج (۱۵.۵ min) با افزایش غلظت اتانول تا ۴۸٪ مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده افزایش و پس از آن با افزایش غلظت اتانول، مقدار ترکیبات فنولی استخراج شده کاهش پیدا می کند (شکل ۱-۱ b)؛ که با نتیجه تحقیق [۱۹] هماهنگ است. احتمالاً با افزایش غلظت اتانول در حلال استخراج کننده، قطبیت حلال کاهش یافته و ترکیبات فنولی کمتری استخراج می شود [۲۰]. از طرفی احتمالاً در غلظت های بالای اتانول، سلول های گیاهی دهیدراته و تخریب شده و پروتئین های دیواره سلولی تخریب می شوند و همین امر موجب کاهش انتشار ترکیبات پلی فنولی از مواد گیاهی به حلال استخراج کننده می شود [۲۱]. در زمان ثابت استخراج

### ۳-۲ ترکیبات مونومری آنتوسیانینی

مقدار ترکیبات مونومری آنتوسیانینی استخراج شده از عصاره های حاصل از شرایط مختلف استخراج از ۴۲.۷۸ g/l تا ۷۶.۷۶ g/l است. با افزایش درصد اتانول ابتدا مقدار ترکیبات آنتوسیانینی استخراج شده افزایش و سپس کاهش پیدا می

در حلال استخراج کننده، قطبیت حلال کاهش یافته و ترکیبات فنولی کمتری استخراج می شود [۲۰]. از طرفی احتمالاً در غلظت های بالای اتانول، سلول های گیاهی دهیدراته و تخریب شده و پروتئین های دیواره سلولی تخریب می شوند و همین امر موجب کاهش انتشار ترکیبات پلی فنولی از مواد گیاهی به حلال استخراج کننده می شود [۲۱]. مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای ترکیبات مونومری آنتوسیانینی به صورت فرمول زیر است (جدول ۳):

فرمول ۴- مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای ترکیبات مونومری آنتوسیانینی

$$Total\ monomeric\ anthocyanin = 4.85 + 0.4082A - 0.3152B + 0.0499C - 0.4127A^2 + 0.0789B^2$$

A = غلظت حلال، B = نسبت فاز مایع به جامد، C = زمان استخراج

نسبت فاز مایع به جامد از ۱۶.۰۸ ml/g به ۳۳.۹۱ ml/g مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده کاهش می یابد (شکل ۳-ب) که احتمالاً به دلیل کاهش غلظت ترکیبات آنتوسیانینی استخراج شده در واحد حجم حلال یا اثرات تخریبی کاویتاسیون ایجاد شده در نسبت بالای فاز مایع به جامد است [۱۸]. در غلظت اتانول ثابت (۴۸٪) با افزایش زمان استخراج از ۶.۷۸ min به ۱۲.۲۴ min مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده افزایش پیدا می کند؛ اما با افزایش نسبت فاز مایع به فاز جامد از ۱۶.۰۸ ml/g به ۳۳.۹۱ ml/g مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده کاهش پیدا می کند (شکل ۳-ج).

مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای ترکیبات فلاونوئیدی به صورت فرمول زیر است (جدول ۳):

فرمول ۵- مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای ترکیبات فلاونوئیدی

$$Total\ Flavonoids = 28.12 + 4.30A - 8.83B + 4.38C - 3.67AB - 2.56BC + 6.27B^2$$

A = غلظت حلال، B = نسبت فاز مایع به جامد، C = زمان استخراج

افزایش غلظت اتانول تا ۴۸٪ میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH افزایش و بعد از آن کاهش پیدا می کند. با افزایش نسبت فاز مایع به فاز جامد، درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH کاهش پیدا می کند. احتمالاً به دلیل کاهش غلظت

کند (شکل ۲-ا). در زمان ثابت استخراج (۱۵.۵ min) با افزایش نسبت فاز مایع به فاز ثابت، مقدار ترکیبات مونومری آنتوسیانینی استخراج شده تغییر چندانی پیدا نمی کند. (He et al (2016) عنوان کردند که در زمان ثابت استخراج با افزایش نسبت فاز مایع به جامد، میزان ترکیبات آنتوسیانینی استخراج شده از پوماسه بلوبری کاهش پیدا می کند. همچنین در زمان ثابت استخراج (۱۵.۵ min) با افزایش درصد اتانول تا ۶۲.۲۷٪ ترکیبات آنتوسیانینی ابتدا افزایش پیدا کرده سپس کاهش می یابد (شکل ۲-ب). احتمالاً با افزایش غلظت اتانول

### ۳-۳ ترکیبات فلاونوئیدی

مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از عصاره های حاصل از شرایط مختلف استخراج از mg Quercetine/l تا ۲۲.۲۰ تا ۶۲.۵۸ mg Quercetine/l است. با افزایش نسبت فاز مایع به جامد مقدار ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده، کاهش پیدا می کند. با افزایش غلظت الکل و زمان استخراج مقدار ترکیبات فلاونوئیدی بیشتری استخراج می شود (شکل ۳-ا). در زمان استخراج ثابت (۱۵.۵ min) با افزایش غلظت اتانول از ۱۹.۴۵٪ تا ۷۶.۵۴٪ ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده افزایش پیدا می کند؛ اما با افزایش

### ۳-۴ ظرفیت آنتی اکسیدانی (بر حسب قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH)

درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH عصاره های حاصل از شرایط مختلف استخراج از ۹۶.۳٪ تا ۹۷.۵٪ است. با



استخراج، میزان مهار رادیکال های آزاد تغییر چندانی پیدا نمی کند؛ اما با افزایش غلظت اتانول تا ۴۸٪ درصد مهار رادیکال های آزاد افزایش یافته و پس از آن کاهش پیدا می کند (شکل ۴-ب) که با نتیجه تحقیق [۲ و ۲۱] منطبق است. مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH به صورت فرمول زیر است (جدول ۳):

فرمول ۶- مدل نهایی حاصل از فاکتورهای کد شده برای

#### قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH

$$\text{Radical scavenger activity (DPPH)} = 97.06 - 0.0532A - 0.2372B + 0.1029C + 0.1938AC - 0.2733A^2$$

A = غلظت حلال، B = نسبت فاز مایع به جامد، C = زمان استخراج

استخراج شده با غلظت اتانول ۴۸٪، نسبت فاز مایع به جامد ۱۰ ml/g و زمان استخراج ۱۵.۵ min مشاهده شد. ماکزیمم ترکیبات فلاونوئیدی (۲۱۳.۲۱ g eq cy-3-glu/L) در عصاره های استخراج شده با غلظت اتانول ۷۶.۵۴٪، نسبت فاز مایع به جامد ۱۶.۰۸ ml/g و زمان استخراج ۱۲.۲۴ دقیقه وجود داشت. شرایط بهینه استخراج ترکیبات فراسودمند از پوست انگور شانی برحسب ماکزیمم مقدار ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی و ترکیبات آنتوسیانینی و همچنین ماکزیمم ظرفیت آنتی اکسیدانی محاسبه شده بر حسب (DPPH) به دست آمد. بهترین غلظت اتانول برای استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی ۵۹.۰۶٪، نسبت فاز مایع به جامد ۱۶.۰۸ ml/g و زمان بهینه استخراج ۲۴.۱۲ min می باشد و مطلوبیت (Desirability) این شرایط استخراج ۰.۸۸ است. به منظور اعتبار سنتزی فرمول های مدل، آزمایش های بیشتری در شرایط بهینه مدل شامل غلظت اتانول ۵۹٪، نسبت فاز مایع به جامد ۱۶ ml/g و زمان استخراج ۲۴ min انجام شد. این شرایط بهینه به منظور قابلیت کاربرد در تولیدهای حقیقی به صورت رند شده در نظر گرفته شد. در این راستا، درصد خطای نسبی بین مقادیر به دست آمده و پیش بینی شده و همچنین درصد انحراف معیار نسبی مقادیر به دست آمده

ترکیبات فنولی استخراج شده در واحد حجم حلال است یا اینکه کاویتاسیون ایجاد شده (در نسبت های بالای فاز مایع به جامد) بر روی ترکیبات فنولی اثرات تخریبی داشته و موجب تجزیه این ترکیبات شده است [۱۸]. با افزایش زمان استخراج میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH افزایش پیدا می کند (شکل ۴-ا) که احتمالاً به دلیل انتشار بیشتر ترکیبات آنتی اکسیدانی به حلال استخراج کننده در زمان های تماس بالاتر است. نتیجه تحقیق [۲۳] نیز نشان داده است که با افزایش زمان استخراج مقدار مهار رادیکال های آزاد افزایش پیدا می کند. در نسبت فاز مایع به جامد ثابت (۲۵ ml/g) با افزایش زمان

#### ۳-۵ برآزش مدل

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده های حاصل از متغیرهای وابسته (ترکیبات فنولی کل، ترکیبات آنتوسیانینی مونومری، ترکیبات فلاونوئیدی و درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH) معادله ی چند جمله ای درجه دو (Quadratic) بهترین مدل پیشنهادی برای بررسی تأثیرمتغیرهای مستقل (درصد اتانول، نسبت فاز مایع به جامد و زمان استخراج) بر پاسخ های حاصل از این پژوهش است. شرط لازم برای برآزش مدل انتخاب شده این است که مدل معنادار (p value < 0.05) باشد و عدم تطبیق (Lack of fit) مدل معنادار نشود (P value > 0.05) باشد. شاخص های ضریب تبیین (R<sup>2</sup>) و ضریب تبیین تنظیم شده (Adjusted R<sup>2</sup>) به هم نزدیکتر بوده و اختلاف آنها کمتر از ۰.۲ باشد. برای اینکه یک مدل پیشبینی دقیقی از یک فرایند داشته باشد باید (Adeq Precision > 4) باشد (جدول ۴).

#### ۳-۶ یافتن شرایط اپتیمم استخراج

ماکزیمم ترکیبات فنولی (۶۴۹.۴۹ μg Galic acid/ml)، ماکزیمم ترکیبات فلاونوئیدی (۶۲.۵۸ mg Quercetine/l) و ماکزیمم ظرفیت آنتی اکسیدانی (۹۷.۵٪) در عصاره های

تفاله انگور در صنعت غذا، مواد آرایشی و بهداشتی، صنایع داروسازی و آفت کش های زیستی اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق از طرح CCD برای بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی از پوست انگور شانی استفاده شد و تأثیر پارامترهای زمان استخراج با استفاده از حمام اولتراسونیک، نسبت فاز مایع به جامد و غلظت حلال اتانول بر مقدار ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی و ترکیبات آنتوسیانینی و همچنین ماکزیمم ظرفیت آنتی اکسیدانی محاسبه شده بر حسب (DPPH) مورد مطالعه قرار گرفت. نتیجه آنالیز ANOVA نشان داد که تأثیر تمامی متغیرهای (زمان استخراج با استفاده از حمام اولتراسونیک، نسبت فاز مایع به جامد و غلظت حلال اتانول) بر پارامترهای مورد بررسی معنادار بود و مدل چند جمله ای درجه دو (Quadratic) بهترین مدل پیشنهادی برای پیشبینی پاسخ های حاصل از این پژوهش می باشد. اپتیمم شرایط استخراج ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانینی شامل غلظت اتانول % ۵۹.۰۶، نسبت فاز مایع به جامد ۰.۰۸ و ۱۶ و زمان استخراج ۲۴.۱۲min می باشد و مطلوبیت (Desirability) این شرایط استخراج ۰.۸۸ است. نتایج آنالیز با دستگاه HPLC نشان داد که عصاره پوست انگور شانی حاوی ترکیبات فنولی مختلفی است که ترکیباتی مانند اپی گالوکاتچین و کاتچین بیشترین غلظت را در میان ترکیبات فنولی دارند. سرانجام این تحقیق نشان داد که تفاله انگور شانی همدمان منبع مناسبی از ترکیبات آنتی اکسیدانی است که می توان این ترکیبات را در شرایط بهینه استخراج نمود و در صنایع مختلف غذایی و دارویی مورد استفاده قرار داد.

محاسبه گردید. نتایج نشان داد که مدل می تواند شرایط استخراج بهینه را به خوبی پیش بینی نماید (جدول ۵).

### ۳-۷ تعیین نوع و مقدار ترکیبات فنولی با استفاده از HPLC

برای شناسایی و تعیین کمیت ترکیبات فنولی موجود در عصاره پوست انگور از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. نتایج ارزیابی نشان داد عصاره پوست انگور شانی حاوی ۸ نوع ترکیب فنولی مختلف (کوئرستین، هسپریدین، گالیک اسید، کاتچین، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین گالات و اپی کاتچین گالات) است که بالاترین غلظت ترکیب فنولی به ترتیب مربوط به اپی گالوکاتچین با غلظت ۲۱.۸ mg/kg و کاتچین با غلظت ۱۳.۴ mg/kg است و ترکیب اپی کاتچین گالات با غلظت ۰.۳ کمترین مقدار را دارد (جدول ۶). نتیجه تحقیق [13] نشان داده است که ترکیبات فنولی کاتچین، اپی کاتچین و کوئرستین در پوست انگور سیاه منطقه آذربایجان غربی ایران وجود دارد که بالاترین میزان ترکیب فنولی مربوط به کاتچین و اپی کاتچین گزارش شده است. نتیجه تحقیق [14; 25] وجود ترکیباتی مانند کوئرستین، کاتچین و اپی کاتچین را در عصاره های استخراج شده از پوست انگور نشان داده است.

### نتیجه گیری

حجم بالایی از ضایعات انگور در سراسر جهان تولید و دور ریخته می شود که این ضایعات مشکلات زیست محیطی و اقتصادی زیادی ایجاد می کند. بنابراین استفاده از ضایعات

### ۴- منابع

- [1] Rathi, P., & Rajput, C. S. (2014). Antioxidant potential of grapes (*Vitis Vinifera*): A review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4(2), 102-104. <https://doi.org/10.22270/jddt.v4i2.776>
- [2] Li, J., Zhang, S., Zhang, M., & Sun, B. (2019). Novel approach for extraction of grape skin antioxidants by accelerated solvent extraction: Box-Behnken design optimization. *Journal of food science and technology*, 56, 4879-4890. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03958-5>
- [3] Carrillo, C., Nieto, G., Martinez-Zamora, L., Ros, G., Kamiloglu, S., Munekata, P. E., ... & Barba, F. J. (2022). Novel approaches for

- the recovery of natural pigments with potential health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 6864-6883.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07208>
- [4] Gülcü, M., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F., Özcan, M. M., Uslu, N., Babiker, E. E., ... & Azmi, I. U. (2020). Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties and harvest periods on bioactive compounds, antioxidant activity, phenolic composition, mineral contents, and fatty acid compositions of *Vitis* leave and oils. *Journal of food processing and preservation*, 44(11), e14890.  
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14890>
- [5] Aliakbarlu, J., Khalili, S., Mohammadi S., Naghili, H. (2014) *Int. Food Res. J.*, 21(1), 367
- [6] Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2111-2117.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0488110>
- [7] Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica chimica acta*, 732, 100-104.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- [8] Rojas, R., Castro-López, C., Sánchez-Alejo, E. J., Niño-Medina, G., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2016). Phenolic Compound Recovery from Grape Fruit and By-Products: An Overview of Extraction Methods. In *Tech*. doi: 10.5772/64821
- [9] Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A. M. (2008). Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica chimica acta*, 630(2), 107-115.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.002>
- [10] Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4988-4994.  
<https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- [11] Ghassempour, A., Heydari, R., Talebpour, Z., Fakhari, A. R., Rassouli, A., Davies, N., & Aboul-Enein, H. Y. (2008). Study of new extraction methods for separation of anthocyanins from red grape skins: analysis by HPLC and LC-MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(17), 2686-2703.  
<https://doi.org/10.1080/10826070802353247>
- [12] Mirbagheri, V. S., Alizadeh, E., Yousef Elahi, M., & Esmaeilzadeh Bahabadi, S. (2018). Phenolic content and antioxidant properties of seeds from different grape cultivars grown in Iran. *Natural product research*, 32(4), 425-429.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1306705>
- [13] Farhadi, K., Esmaeilzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food chemistry*, 199, 847-855.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083>
- [14] Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., & Brigida, A. IS, Conte-Junior, CA, Borguini, RG, Godoy, RLO, Cabral, L. MC, & Tonon, RV (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>
- [15] Maran, J. P., Priya, B., & Manikandan, S. (2014). Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1938-1946. [https://doi: 10.1007/s13197-013-1237-y](https://doi.org/10.1007/s13197-013-1237-y)
- [16] Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., & Pereira, Z. V. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants*, 3(4), 745-757. <https://doi.org/10.3390/antiox3040745>
- [17] Montealegre, R. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. C., Gascueña, J. M., & Romero, E. G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 687-693. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.003>
- [18] Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- [19] Ghafoor, K., & Choi, Y. H. (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, 295-300. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2009.052>
- [20] Che Sulaiman, I. S., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Chee, W. J., Ashari, S. E., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0285-1>
- [21] Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., & Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1114-1122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.024>
- [22] Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- [23] Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F., Adisa, A. R., Adiamo, O. Q., Babiker, E. E., Osman, M. A., ... & Elkareem, M. A. (2020). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from Argel

(*Solenostemma argel* Hayne) leaves using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Science and Technology*, 57, 3071-3080. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04340-6>

[24] He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and

anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food chemistry*, 204, 70-76.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>

[25] Nile, S. H., Kim, S. H., Ko, E. Y., & Park, S. W. (2013). Polyphenolic contents and antioxidant properties of different grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) cultivars. *BioMed research international*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/718065>

**Table 1: Real and coded parameters value in CCD extraction method**

F actor	Name	Units	Type	Subtype	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev.
A	Ethanol	%	Numeric	Continuous	0.00	96.00	-1 ↔ 19.46	+1 ↔ 76.54	48.00	24.20
B	Liquid phase/Solid phase	ml/g	Numeric	Continuous	10.00	40.00	-1 ↔ 16.08	+1 ↔ 33.92	25.00	7.56
C	time	min	Numeric	Continuous	0.00	30.00	-1 ↔ 6.88	+1 ↔ 24.12	15.45	7.42

**Table 2: Experiment design matrix in CCD method and experiment results**

Run	Ethanol (%)	Liquid phase/Solid phase (ml/g)	Time (min)	phenolic compound (µg/ml)	Total Monomeric Anthocyanin content(mg/l)	Flavonoids(mg/ml)	Radical scavenger activity(DPPH) %
1	48	40	15.5	444.42	86.6171	29.493	96.4
2	48	10	15.5	649.493	264.761	62.5802	97.5
3	96	25	15.5	200.217	75.0448	34.679	96.2
4	48	25	15.5	529.203	131.153	29.98	96.92
5	48	25	15.5	516.884	119.931	28.8765	97.11
6	76.541	16.0809	24.1218	560.362	213.211	56.5309	97.01
7	48	25	15.5	498.043	130.101	24.4321	97.05
8	48	25	15.5	536.449	104.852	28.3827	97.02
9	76.541	33.9191	24.1218	520.02	93.28	26.7778	96.9
10	48	25	15.5	534.275	143.076	29.123	97.4
11	19.459	16.0809	6.87825	532.101	83.1103	29	97.4
12	76.541	33.9191	6.87825	224.13	111.866	27.642	96.3
13	0	25	15.5	243.696	18.9365	22.2099	96.4
14	48	25	0	363.986	104.537	18.5062	96.77

15	76.541	16.0809	6.87825	342.246	182.352	45.0494	96.7
16	19.459	33.9191	6.87825	209.87	42.7825	24.1852	96.57
17	19.459	33.9191	24.1218	287.899	52.9522	26.037	96.64
18	48	25	15.5	505.29	140.271	24.0617	97.01
19	19.459	16.0809	24.1218	469.783	82.7597	39	96.69
20	48	25	30	571.957	140.271	41.0988	97.45

Table 3: ANOVA statistics analysis and statistics parameters results

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Total phenolic compound</b>						
<b>Model</b>	3.570E+05	8	44624.26	60.18	< 0.0001	significant
<b>A-Ethanol</b>	400.81	1	400.81	0.5405	0.4776	
<b>B-Liquid phase/Solid phase</b>	74320.34	1	74320.34	100.22	< 0.0001	
<b>C-time</b>	54596.66	1	54596.66	73.63	< 0.0001	
<b>AB</b>	14934.87	1	14934.87	20.14	0.0009	
<b>AC</b>	31037.34	1	31037.34	41.86	< 0.0001	
<b>BC</b>	5947.10	1	5947.10	8.02	0.0163	
<b>A<sup>2</sup></b>	1.730E+05	1	1.730E+05	233.35	< 0.0001	
<b>C<sup>2</sup></b>	6023.90	1	6023.90	8.12	0.0158	
<b>Residual</b>	8156.94	11	741.54			
<b>Lack of Fit</b>	6889.70	6	1148.28	4.53	0.0593	not significant
<b>Pure Error</b>	1267.24	5	253.45			
<b>Cor Total</b>	3.652E+05	19				
<b>Monomeric Anthocyanin content</b>						
<b>Model</b>	6.34	5	1.27	112.34	< 0.0001	significant
<b>A-Ethanol</b>	2.28	1	2.28	201.56	< 0.0001	
<b>B-Liquid phase/Solid phase</b>	1.36	1	1.36	120.18	< 0.0001	
<b>C-time</b>	0.0349	1	0.0349	3.09	0.1004	
<b>A<sup>2</sup></b>	2.48	1	2.48	219.53	< 0.0001	
<b>B<sup>2</sup></b>	0.0907	1	0.0907	8.03	0.0133	
<b>Residual</b>	0.1581	14	0.0113			
<b>Lack of Fit</b>	0.0925	9	0.0103	0.7835	0.6472	not significant
<b>Pure Error</b>	0.0656	5	0.0131			
<b>Cor Total</b>	6.50					
<b>Flavonoids</b>						
<b>Model</b>	2329.40	6	388.23	47.87	< 0.0001	significant
<b>A-Ethanol</b>	252.72	1	252.72	31.16	< 0.0001	

<b>B-Liquid phase/Solid phase</b>	1064.71	1	1064.71	131.27	< 0.0001	
<b>C-time</b>	269.69	1	269.69	33.25	< 0.0001	
<b>AB</b>	107.92	1	107.92	13.31	0.0030	
<b>BC</b>	52.50	1	52.50	6.47	0.0245	
<b>B<sup>2</sup></b>	577.49	1	577.49	71.20	< 0.0001	
<b>Residual Lack of Fit</b>	105.44	13	8.11			
	72.75	8	9.09	1.39	0.3727	not significant
<b>Pure Error</b>	32.69	5	6.54			
<b>Cor Total</b>	2434.84	19				
<b>Radical scavenger activity(DPPH)</b>						
<b>Model</b>	2.35	5	0.4696	12.35	0.0001	significant
<b>A-Ethanol</b>	0.0386	1	0.0386	1.02	0.3305	
<b>B-Liquid phase/Solid phase</b>	0.7687	1	0.7687	20.22	0.0005	
<b>C-time</b>	0.1489	1	0.1489	3.92	0.0678	
<b>AC</b>	0.3003	1	0.3003	7.90	0.0139	
<b>A<sup>2</sup></b>	1.10	1	1.10	28.83	< 0.0001	
<b>Residual Lack of Fit</b>	0.5321	14	0.0380			
	0.3940	9	0.0438	1.58	0.3185	not significant
<b>Pure Error</b>	0.1382	5	0.0276			
<b>Cor Total</b>	2.88	19				

**Table 4: Statistics table for selected models of evaluated parameters**

Source	Std. Dev.	Mean	C.V. %	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>	Adeq Precision
<b>Total phenolic compound</b>	27.23	437.02	6.23	0.97	0.96	0.88	24.19
<b>Monomeric Anthocyanin content</b>	0.1063	4.62	2.30	0.97	0.96	0.95	44.79
<b>Flavonoids</b>	2.85	32.38	8.79	0.95	0.94	0.89	24.02
<b>Radical scavenger activity(DPPH)</b>	0.195	96.87	0.20	0.82	0.74	0.60	11.81

**Table 5: Calculation of relative error percentage and relative standard deviation percentage for obtained and predicted values**

Source	Std. Dev.	Mean	C.V. %	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>	Adeq Precision
<b>Total phenolic compound</b>	27.23	437.02	6.23	0.97	0.96	0.88	24.19
<b>Monomeric Anthocyanin content</b>	0.1063	4.62	2.30	0.97	0.96	0.95	44.79
<b>Flavonoids</b>	2.85	32.38	8.79	0.95	0.94	0.89	24.02
<b>Radical scavenger activity(DPPH)</b>	0.195	96.87	0.20	0.82	0.74	0.60	11.81

Source	Predicted Value	Obtained Value	Relative error (%)	Relative Standard Deviation (%)
<b>phenolic compound</b>	608.31	592.43±13.48	2.61	2.28
<b>Anthocyanin</b>	219.72	229.03±6.65	4.24	2.17
<b>Flavonoids</b>	53.25	50.10±0.94	5.92	1.88
<b>(DPPH) %</b>	97.41	96.93±0.93	0.49	0.96



**Table 6: Type and concentration of phenol components in Shani grapes skin**

NO.	Type of phenolic compound	Content( $\mu\text{g/g}$ )
1	Quercetin	7.8
2	Hesperidin	2.3
3	Gallic acid	2.5
4	Catechin	13.4
5	Epigallocatechin	21.8
6	Epicatechin	5.6
7	Epigallocatechin gallate	4.8
8	Epicatechin gallate	0.3

**Fig 1**

- (a) Interaction plot for independent parameters (ethanol concentration, Liquid phase/Solid phase and Extraction time) on the content of extracted phenol components
- (b) Response surface plot of phenolic compound for various binary combination (Ethanol and Liquid phase/Solid phase)
- (c) Response surface plot of phenolic compound for various binary combination (time and Ethanol)
- (d) Response surface plot of phenolic compound for various binary combination (time and Liquid phase/Solid phase)

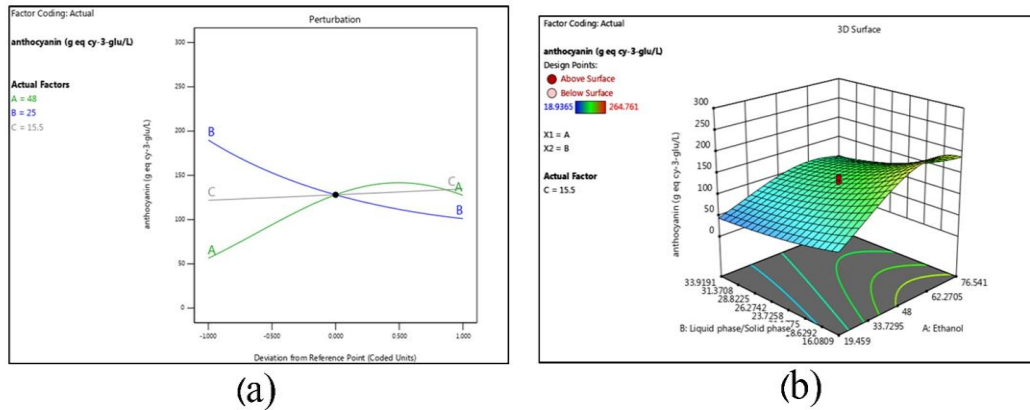


Fig 2

- (a) Interaction plot for independent parameters (ethanol concentration, Liquid phase/Solid phase and Extraction time) on the content of monomeric Anthocyanin compounds
- (b) Response surface plot of monomeric Anthocyanin compounds for various binary combination (Liquid phase/Solid phase and Ethanol)

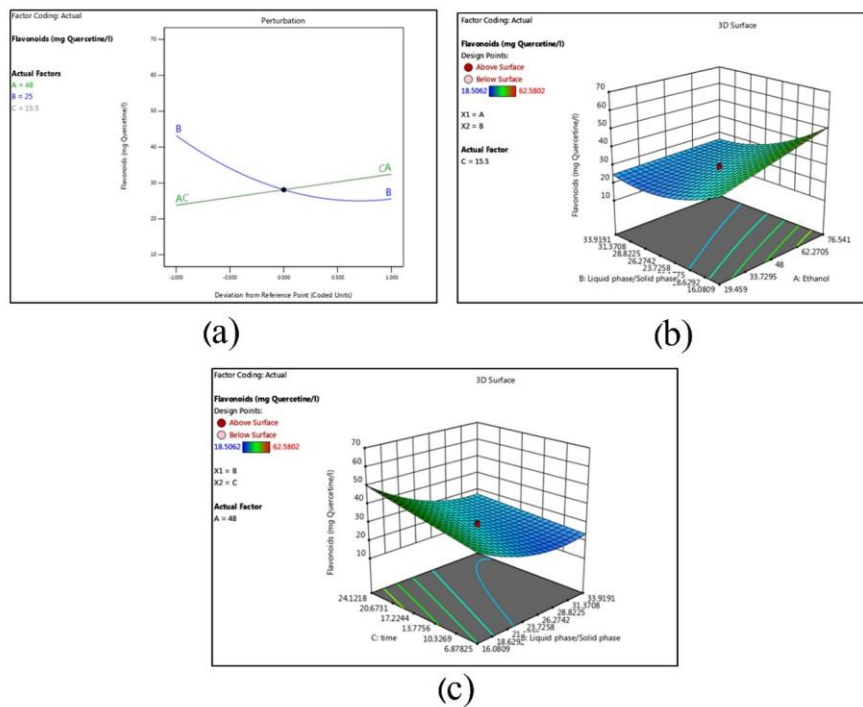


Fig 3

- (a) Interaction plot for independent parameters (Ethanol concentration, Liquid phase/Solid phase and Extraction time) on the content of extracted Flavonoid compounds
- (b) Response surface plot of Flavonoid compounds for various binary combination (Ethanol and Liquid phase/Solid phase)
- (c) Response surface plot of Flavonoid compounds for various binary combination (Time and Liquid phase/Solid phase)

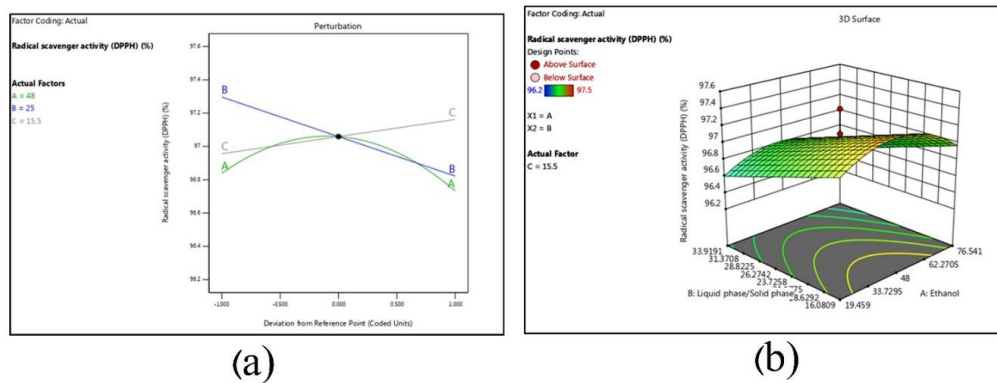


Fig 4

- (a) Interaction plot for independent parameters (Ethanol concentration, Liquid phase/Solid phase and extraction time) on the Radical scavenger activity (DPPH)
- (b) Response surface plot of Radical scavenger activity (DPPH) for various binary combination (Ethanol and Liquid phase/Solid phase)



## Scientific Research

## Optimizing the Extraction of Antioxidant Components from Grape (*Vitis vinifera L.*) Skin by Ultrasonic Pre-treatment

Saadat Azizi<sup>1</sup>, Seyyed Moein Nazari<sup>2\*</sup>, Leila MoradiHaghgou<sup>3</sup>

1,2- Department of food science and technology, Faculty of engineering, Hamedan Branch, Islamic Azad university, Hamedan, Iran.

3-Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Hamedan Branch, Islamic Azad university, Hamedan, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received: 2023/7/24  
Accepted: 2023/10/23

## Keywords:

*Shani grapes skin, phenolic compounds, natural antioxidant, ultrasonic waves*

DOI: 10.22034/FSCT.21.146.118

\*Corresponding Author E-Mail:  
seyyedmoeinnzr525@gmail.com

Grapes are one of the most important agricultural products which could be used either as a fresh fruit or a processed food. In Iran, grapes are very crucial agricultural and commercial products. Every year, a massive volume of grapes waste is made by the units of grape Doshab producers, so the producers are engaging with many problems of waste disposal. Grapes waste is a valuable source of natural pigment and antioxidant compounds specifically polyphenols compounds. Extracting antioxidant compounds from cheap primary materials like grapes waste is a suitable method for various food and pharmaceutical industries. In this research and aim to finding optimum state for extracting phenolic compounds from Shani grapes skin, response surface method (RSM) and central composite design (CCD) with 3 independent variables (extraction time using ultrasonic bath, liquid to solid phase ratio and ethanol solvent concentration) were applied. The optimum condition for extraction of this compound was 59.06% concentration of ethanol, 16.08 ml/g liquid to solid phase ratio and 24.12 min extraction time. The research results have shown that the extract of Shani grapes skin contains 8 different phenolic compounds, which among them epigallocatechin and catechin had highest concentration. Consequently, by finding optimum condition of phenolic compounds extraction, these compounds could be produced in pilot scale for utilizing in food and pharmaceutical industries.