

The Effect of Extraction Conditions on the Yield of Tannins and Phenolics from Acorn Shell and Cupule

Z. Zarezade¹, A. Forouhar², H. Saberian^{3*}

1- Department of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2- Department of Food Science and Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

3- Department of Agro-Industrial Waste Processing, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR) at IUT, Isfahan, Iran

(*- Corresponding Author Email: Saberian@acecr.ac.ir)

Received: 10.05.2025

Revised: 09.06.2025

Accepted: 17.06.2025

Available Online: 18.08.2025

How to cite this article:

Zarezade, Z., Forouhar, A., & Saberian, H. (2025). The effect of extraction conditions on the yield of tannins and phenolics from acorn shell and cupule. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(4), 463-476. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.93451.1432>

Introduction

Acorn, a traditional component of the human diet, is a rich source of bioactive compounds, especially polyphenols and tannins, which possess antioxidant, antibacterial, and antiviral properties. These compounds have extensive applications in the food, pharmaceutical, and chemical industries. However, their yield and purity depend highly on extraction conditions, including solvent type and polarity, temperature, extraction time, particle size, and solid-to-solvent ratio. Solvent extraction is the most widely used among various extraction techniques due to its simplicity and efficiency. Given the limited data on tannins from native acorns in Chaharmahal and Bakhtiari Province, this study aims to evaluate the effect of solvents with varying polarity and pH on tannin extraction. The purity of extracted tannins was also determined using HPLC. The findings of this research could serve as a basis for optimizing the extraction of valuable compounds from acorn and facilitating the industrial utilization of these native resources.

Materials and Methods

To extract tannins from acorn shell, cupule, and shell-cupule mix, the samples were ground and passed through a 40-mesh sieve. Extraction was carried out using three types of solvents: distilled water, 40% ethanol solution, and 0.22% sodium hydroxide solution. The process was performed at two temperatures (60°C and 90°C) with a solid-to-liquid ratio of 1:10, for one hour under continuous stirring. The resulting extracts were filtered and then dried at 50°C. To determine the actual extraction yield in alkaline-treated samples, the amount of sodium hydroxide was quantified by titration with HCl, and its mass was subtracted from the dry extract weight to obtain the real extraction yield. Total phenolic content was measured using the Folin–Ciocalteu method by determining absorbance at 760 nm. Tannin content was estimated by subtracting non-tannin phenolics from total phenolics using PVPP as an adsorbent. In this method, PVPP was added to the extract, and after centrifugation, non-tannin phenolics were separated, allowing tannin content to be calculated by difference. HPLC analysis was performed using a C18 column and a detector set at 280 nm to confirm the presence of tannins. Tannic acid was used as the standard, and separation was achieved using a gradient of formic acid and acetonitrile. Statistical analyses were conducted using SPSS, and graphs were plotted using Excel.

Results and Discussion

The effects of solvent type and extraction temperature were examined for tannin extraction. The results indicated that increasing the temperature from 60°C to 90°C enhanced extraction yields for both distilled water and 0.22%



©2025 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.93451.1432>

sodium hydroxide solution. However, the effect of temperature increase was significantly more pronounced under alkaline conditions. Higher temperatures improve solvent penetration, reduce viscosity, and accelerate the diffusion of bioactive compounds, which markedly boosts tannin extraction in combination with an alkaline solvent. Regarding solvent type, ethanol demonstrated superior performance in tannin extraction. Due to its dual nature (polar and non-polar), ethanol efficiently extracted a broad spectrum of phenolic compounds. The average tannin yield using ethanol was around 51.41%, which surpassed other treatments, including alkaline extraction at high temperature (48.06%). This highlights ethanol's strong capacity to extract condensed tannins, which are abundant in acorns. Moreover, ethanol tended to extract fewer impurities, such as carbohydrates, than polar solvents like sodium hydroxide, thereby increasing the purity of the tannin extracts. Further analysis of the total phenolic content revealed that the source material (cupule or shell) and solvent type significantly influenced the extraction yield. The highest total phenolic content (61.22%) was obtained from the cupule using sodium hydroxide, significantly exceeding other materials and treatments. This confirms the cupule's richness in phenolic compounds, though given its lower proportion in the acorn structure, using a blend of cupule and shell is more practical. Additionally, ethanol and sodium hydroxide achieved higher yields than water, underscoring the beneficial role of alkaline and semi-polar solvents in phenolic compound release. Further specific analysis of tannin extraction also showed that ethanol-based treatments yielded the highest results. The use of 40% ethanol nearly doubled the tannin yield compared to aqueous and alkaline treatments. This high efficiency is attributed to the better solubility of tannins in polar-organic solvents like ethanol. On the other hand, extraction with sodium hydroxide at lower temperatures (60°C) resulted in lower yields, emphasizing the combined effect of temperature and solvent on extraction efficiency. HPLC analysis for tannic acid quantification confirmed that the tannin content of the shell-cupule mix and cupule alone was 48.06% and 61.23%, respectively. These findings emphasize the practical value of using a shell-cupule mixture as an industrial tannin source, as it not only contains a substantial amount of tannin but also offers better availability and a higher weight proportion compared to the cupule alone.

Conclusion

This study highlights the significant influence of extraction conditions, particularly solvent type and temperature, on the extraction yield of tannins and phenolic compounds from acorn resources. Alkaline extraction at elevated temperatures was more effective for tannin extraction from the shell-cupule mix, while ethanol exhibited high efficiency due to its semi-polar nature. Although the acorn cupule is richer in total phenolics, the higher abundance of the cupule-shell blend in the fruit makes it a more practical target for industrial tannin production.

Keywords: Acorn, Polyphenolic compounds, Solvent extraction, Tannin

تأثیر شرایط استخراج بر بازده تانن و ترکیبات فنولی پوست و جفت بلوط

زهرا زارع زاده^۱ - علی فروهر^۲ - حامد صابریان^{۳*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۷

چکیده

این پژوهش با هدف بهینه‌سازی استخراج تانن و ترکیبات فنولی از بلوط (پوست و جفت) انجام شد. در مرحله نخست، بازده استخراج عصاره فنولی از مخلوط پوست و جفت با استفاده از حلال‌های مختلف (آبی، قلیایی و اتانول) و در دو دمای ۶۰ و ۹۰ درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، محتوای فنول کل و تانن عصاره‌های استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش دما، به‌ویژه در حضور حلال قلیایی (سود ۰/۲۲٪)، بازده استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت را به‌طور معنی‌داری از ۳۰/۸۰ به ۳۹/۶۴٪ افزایش داد. اتانول نیز در مقایسه با آب، بازده استخراج بالاتری را نشان داد. آنالیز ترکیبات فنولی کل نشان داد که جفت بلوط به‌طور قابل توجهی غنی‌تر از پوست است و استخراج با اتانول و استخراج قلیایی در دمای بالا، بالاترین بازده فنول کل را به همراه داشت. با این حال، برای استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت، اتانول با بازده ۵۱/۴۱٪ کارآمدترین حلال بود. ارزیابی تانن با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مقادیر بالاتری را نسبت به روش‌های شیمیایی نشان داد و میزان تانن در مخلوط پوست و جفت (۴۸/۰۶٪) و جفت (۶۱/۲۳٪) را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: استخراج با حلال، بلوط، تانن، ترکیبات پلی فنولی

مقدمه

بلوط به‌عنوان یکی از منابع غذایی مهم از دوران باستان در رژیم غذایی انسان نقش داشته است. این میوه در قاره‌های مختلف از جمله اروپا، آسیا، آفریقای شمالی و آمریکای شمالی و شرقی به‌صورت گسترده مصرف می‌شود و در برخی مناطق تا ۲۰ درصد از سبد غذایی جوامع را تشکیل می‌دهد (Iranmanesh & Goujani, 2015). در ایران، وارینه‌های *Q. macranthera*، *Q. libani*، *Q. infectoria*، *Q. brantii* و *Q. castaneifolia* به‌طور گسترده پراکنده شده‌اند (Pourhashemi & Sadeghi, 2020). جنگل‌های بلوط به‌طور گسترده در نواحی غرب، جنوب غرب، شمال و شمال غرب گسترش یافته و بیشترین تعداد این درختان در دامنه رشته کوه‌های زاگرس و در غرب دیده می‌شوند. ۴/۵ میلیون هکتار از ۵/۵ میلیون هکتار جنگل‌های زاگرس را درختان بلوط

پوشانده است (Salarkarimi, Varidi, & Varidi, 2019). مساحت جنگل‌های کهگیلویه و بویراحمد، بیش از ۸۷۰ هزار هکتار می‌باشد و ۸۰ درصد جنگل‌های آن را درختان بلوط تشکیل می‌دهد (حدود ۷۰ میلیون اصله درخت). سالانه حدود ۲۶۰ هزار تن بلوط در جنگل‌های استان کهگیلویه و بویراحمد تولید می‌شود که حدود ۷۰ هزار تن آن به صورت سنتی برداشت می‌شود. استان‌های ایلام، چهارمحال و بختیاری، فارس، کردستان و لرستان نیز درصد قابل توجهی از جنگل‌های بلوط کشور را در خود جای داده‌اند. هر درخت بلوط در سال‌های میوه‌دهی خود حداقل ۱۵ کیلوگرم میوه تولید می‌کند (Ghaderi Ghahfarokhi, Sadeghi Mahoonak, Alami, Azizi, & Ghorbani, 2012) و با توجه به عدم باردهی همه درختان، میزان تولید سالیانه میوه بلوط در کشور حداقل حدود یک میلیون تن می‌باشد. تنوع

۱- گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- گروه پژوهشی فرآوری پسماند و ضایعات کشاورزی، جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

(*) نویسنده مسئول : Email: Saberian@acecr.ac.ir

انتخابی بودن، حلالیت ترکیب هدف، هزینه و ایمنی انجام شود. به طور کلی، حلال‌هایی با قطبیت نزدیک به ترکیب هدف، بازده استخراج بالاتری دارند (Zhang, Lin, & Ye, 2018).

استخراج به عنوان گام اولیه در جداسازی ترکیبات ارزشمند از مواد خام است و برای استخراج ترکیبات، از روش‌های متنوعی همچون استخراج با حلال، تقطیر، پرس مکانیکی، و تصعید بهره گرفته می‌شود. در این میان، استخراج با حلال به دلیل سادگی و کارایی بالا، پرکاربردترین روش محسوب می‌شود. مکانیسم این فرآیند شامل سه مرحله اصلی است: نفوذ حلال به درون ماتریس جامد ماده خام، حل شدن ترکیبات هدف در حلال و انتشار ترکیبات حل شده به بیرون از ماتریس. در نهایت، ترکیبات استخراج شده جمع‌آوری و خالص‌سازی می‌شوند. کارایی این فرآیند به عواملی مانند دمای استخراج، زمان تماس و نوع حلال وابسته است (Du, Zhao, Song Zhang, & Wang, 2011; Zhu et al., 2024).

حیدری و زارعی (Heidari & Zarei, 2016) در پژوهشی میزان تانن موجود در درختان بلوط مناطق جنگلی در ناحیه زاگرس یاسوج را به کمک فراصوت و حلال آب بررسی نموده و نشان دادند که پوست درخت بلوط دارای ۵ تا ۷ درصد تانن می‌باشد (Heidari & Zarei, 2016). همچنین جهان‌شاهی و همکاران (Jahanshahi, Tabarsa, 2016) در پژوهشی میزان تانن موجود در پوست درختان بلوط منطقه جنگلی استان گلستان را با استفاده از حلال‌های آب، متانول، و مخلوط آب-متانول (۱:۱) و به کمک دستگاه سوکسله مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تانن استخراج شده (حدود ۱۴٪) مربوط به حلال آب-متانول (۱:۱) بود (Jahanshahi et al., 2011). در پژوهشی دیگر ترکمان و همکاران (Torkaman & Seyam, 2009) میزان تانن موجود در پوست پنج گونه درختی شامل گردوی سیاه، بلوط، توسکا، ممرز و راش را بررسی نمودند. نتایج نشان داد بیشترین میزان مواد استخراجی (۲۹/۸٪) و تانن (حدود ۵۰٪ از مواد استخراجی) مربوط به پوست گردوی سیاه بود، درحالی که کمترین میزان به راش (۱۶/۷٪ مواد استخراجی) تعلق داشت (Torkaman & Seyam, 2009). با توجه به کمبود داده‌های علمی در مورد استخراج تانن از بلوط‌های بومی منطقه چهارمحال و بختیاری (*Quercus brantii*) (Heidari & Zarei, 2016)، این پژوهش در راستای بررسی تأثیر انتخاب حلال (از منظر قطبیت و pH) و دمای استخراج مناسب در مرحله استخراج طراحی شد. همچنین، تأثیر حلال‌های مختلف با قطبیت و pH متفاوت بر بازده استخراج تانن ارزیابی شد. علاوه بر این، خلوص تانن‌های استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد سنجش قرار گرفت.

کاربردهای بلوط در صنایع غذایی قابل توجه است؛ از جمله تولید نان، کیک، نوشیدنی‌های مشابه قهوه (Claudia, 2013) و همچنین فرآورده‌های نوینی مانند نودل، توفو و سس بر پایه بلوط (Pasqualone et al., 2019). با وجود تولید سالانه حدود یک میلیون تن میوه بلوط در ایران، این محصول عمدتاً به عنوان خوراک دام استفاده می‌شود. البته پژوهش‌های جدید نشان‌دهنده پتانسیل بلوط برای استخراج ترکیبات ارزشمندی مانند پلی‌فنول‌هاست (Faruk, Ashaduzzaman, & Dungani, 2020).

پلی‌فنول‌ها به عنوان ترکیبات زیست‌فعال نقش کلیدی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی، از جمله بیماری عروق کرونر و سکتة قلبی ایفا می‌کنند. مکانیسم این اثرات عمدتاً به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود (Bertelli et al., 2021). این ترکیبات که متنوع‌ترین گروه آنتی‌اکسیدان‌های غذایی محسوب می‌شوند، با مقدار مصرف توصیه شده روزانه حدود ۱ گرم، از اسیدهای فنلی ساده تا تانن‌های پلیمریزه شده را شامل می‌شوند (Pietta, 2003). تانن‌ها به عنوان دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی، نقش دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا، حشرات و جانوران گیاهخوار دارند (Das et al., 2020). میزان این ترکیبات در گیاهان متأثر از عوامل جغرافیایی، گونه‌شناسی و سن درخت است و معمولاً در پوست درختان غلظت بالاتری دارد. ساختار شیمیایی تانن‌ها شامل گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل است که قابلیت تشکیل کمپلکس با ماکرومولکول‌ها را فراهم می‌کند (Dehghanian et al., 2022). از جمله منابع غنی تجاری تانن‌ها می‌توان به پوست درختان بلوط و شاه‌بلوط اشاره کرد که به دلیل محتوای بالای این ترکیبات از اهمیت اقتصادی برخوردارند.

در مقیاس صنعتی، استخراج با آب (به روش خیساندن) برای جداسازی ترکیبات از پوست درختان رایج است (Bitwell, Indra, 2023). تانن‌ها به دلیل خواص منحصر به فرد، کاربردهای فراوانی در صنایع گوناگون دارند. این کاربرد ها شامل استفاده از این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدان و عامل شفاف‌کننده در نوشیدنی‌ها، استفاده در تولید لاستیک (به عنوان منعقدکننده پلیمرها) و چسب، استفاده در برخی داروها با اثربخشی در مهار ویروس HIV، فعالیت ضدتوموری، ضدباکتریایی، و ضدویروسی (Khanbabaee & Van Ree, 2001). با وجود کاربردهای گسترده، ناهمگن بودن ساختار تانن‌ها و وجود ناخالصی‌ها در فرآیند استخراج، چالش‌های عمده‌ای برای تولید تجاری ایجاد می‌کند. عواملی مانند اندازه ذرات، دما، فشار، زمان استخراج، نوع حلال، و نسبت جامد به حلال بر کیفیت و خلوص محصول نهایی تأثیر مستقیم دارند (Das et al., 2020). انتخاب حلال مناسب نیز از جمله شاخص‌های کلیدی است که باید بر اساس قطبیت،

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد اولیه

استخراج تانن از پوست، جفت و مخلوط پوست و جفت بلوط منطقه چهارمحال و بختیاری (*Quercus brantii*) انجام شد. بنابراین در ابتدا،

پوست و جفت بلوط جدا شد و مطابق شکل ۱، سه نمونه بلوط بدون پوست، جفت بلوط و میوه بلوط حاصل شد.

برای کاهش اندازه ذرات و ایجاد یکنواختی سه نمونه پوست، جفت و مخلوط پوست و جفت، از آسیاب (مدل TS-2500 ساخت شرکت توس شکن خراسان، ایران) و الک شماره ۴۰ استفاده شد.



شکل ۱- قسمت‌های مختلف بلوط، الف) پوست بلوط، ب) جفت بلوط و ج) میوه بلوط
Fig. 1. Different parts of oak: (a) acorn shell, (b) acorn cupule, and (c) acorn fruit (acorn)

استخراج

فرآیند استخراج با استفاده از محلول سود ۰/۲۲ درصد، آب مقطر و محلول ۴۰ درصد اتانول در شرایط دمایی مطابق جدول ۱ استفاده شد. نسبت جامد به مایع ۱ گرم به ۱۰ میلی‌لیتر و زمان استخراج ۱ ساعت

به همراه هم زدن مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه محلول استخراج شده از کاغذ صافی عبور داده و عصاره استخراج شده در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در آون خشک شد (Rahnemoun, Sarabi Jamab, Javanmard Dakheli, Bostan, & Safari, 2018).

جدول ۱- حلال‌های مورد استفاده و دمای استخراج تانن

ردیف No.	نوع حلال	دما
	Distilled water	Temperature (°C)
1	آب خالص Distilled water	90
2	آب خالص Distilled water	60
3	محلول ۴۰ درصد اتانول 40% ethanol solution	60
4	محلول آبی ۰/۲۲ درصد هیدروکسید سدیم 0.22% aqueous sodium hydroxide solution	90
5	محلول آبی ۰/۲۲ درصد هیدروکسید سدیم 0.22% aqueous sodium hydroxide solution	60

تعیین بازده استخراج

پس از انجام استخراج و عصاره‌گیری، در مورد نمونه استخراج شده با سود، به‌منظور تعیین میزان هیدروکسید سدیم موجود در محلول

عصاره، ۲۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار تیتر شد و میزان هیدروکسید سدیم موجود از رابطه زیر محاسبه شد:

$$N_{NaOH} \times 25 = 0.1 \times V_{HCl}$$

اندازه‌گیری تانن به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی

بالا

همچنین برای تعیین ترکیبات تاننی در عصاره استخراجی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای این آزمایش، ۱ میلی گرم عصاره در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس این مخلوط با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد و به سیستم HPLC تزریق گردید. تانیک اسید به عنوان نشانگر شیمیایی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در حالت فاز معکوس روی ستون C18 با استفاده از روش شستشوی تدریجی دوگانه و آشکارساز ماوراء بنفش انجام شد. سیستم گرادیانی شامل دو حلال بود: حلال A شامل ۰/۱ درصد اسید فرمیک و حلال B نیز محلول ۰/۱ فرمیک به همراه استونیتریل با نرخ جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه پمپ شدند. فرآیند گرادیان از ۹۵٪ محلول A آغاز شد و در نهایت به ۵٪ محلول B رسید. دمای ستون در ۳۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. پیک‌های نمونه با محلول استاندارد تانیک اسید در ۲۸۰ نانومتر که از آزمایش به دست آمد، مقایسه شدند. غلظت تانیک اسید با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون مناسب محاسبه شد (Arina & Harisun, 2019).

روش آماری تحلیل داده‌ها

نتایج آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0.05$) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 انجام شد.

نتایج و بحث

آنالیز وزنی قسمت‌های مختلف بلوط

پس از جداسازی قسمت‌های مختلف بلوط، هر کدام وزن شده است. وزن هر قسمت از بلوط و در نتیجه درصد وزنی هر قسمت در جدول ۲ بیان شده است. طبق نتایج بیان شده در جدول ۲، حدود ۳۰٪ از مخلوط پوست و جفت را جفت تشکیل داده است که عدد قابل توجهی است.

در مرحله نخست، از مخلوط پوست و جفت برای استخراج استفاده شد. ارزیابی بازده استخراج تانن از نمونه‌ها با استفاده از حلال‌ها و شرایط مختلف استخراج، بینش ارزشمندی درباره تأثیر قطبیت حلال، اثرات دما و نقش pH در مورد بازده استخراج از منابع کشاورزی ارائه می‌کند (Zhang et al., 2018). نتایج حاصل از بررسی تأثیر دما و نوع حلال بر استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت (شکل ۲)، نشان داد که

سپس با ضرب مولاریته هیدروکسید سدیم در جرم مولکولی آن و حجم عصاره بدست آمده از استخراج، وزن هیدروکسید سدیم موجود در عصاره تعیین شد. با کم کردن وزن هیدروکسید سدیم محاسبه شده از وزن عصاره خشک، وزن عصاره خالص بدست آمده با حلال هیدروکسید سدیم، محاسبه شد. در سایر تیمارها (که از حلال‌هایی غیر از سود استفاده شده بود)، عصاره توزین شد تا در ادامه برای محاسبه بازده استخراج مورد استفاده قرار گیرد. بازده استخراج در تیمارهای مورد بررسی، با تقسیم وزن عصاره خالص در هر نمونه بر میزان ماده اولیه بر اساس فرمول زیر تعیین شد:

$$\text{بازده استخراج} = \frac{\text{وزن عصاره بدست آمده}}{\text{وزن ماده اولیه}} \times 100$$

اندازه‌گیری میزان فنول کل

۵۰ میکرولیتر از محلول عصاره استخراج شده با ۱۲۵۰ میکرولیتر از فولین سیوکالتو رقیق شده با آب (۵ برابر رقیق شده) مخلوط شد و به مدت ۱ دقیقه در محیط تاریک نگه داری شد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول ۱۰ درصد کربنات سدیم به آن اضافه شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت میزان فنول کل بر اساس میلی گرم تانیک اسید به ازای هر گرم نمونه گزارش شد. برای منحنی کالیبراسیون از محلول تانیک اسید با غلظت‌های ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر استفاده شد (Payab, Chaichi, Nazari, & Maleki, 2019).

اندازه‌گیری تانن‌ها با استفاده از پلی ونیل پلی پرولیدین

(PVPP)

۰/۰۵ گرم پودر PVPP به ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر محلول عصاره اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط مخلوط شد و ۳۰ دقیقه زمان ماند داده شد تا تانن‌ها با PVPP کمپلکس تشکیل دهند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. در این حالت PVPP همراه با تانن‌ها رسوب می‌کند و ترکیبات غیرتاننی فنولیک در محلول باقی می‌مانند. پس از سانتریفیوژ کردن، از روشی که در تعیین میزان فنول کل بکار گرفته شد، استفاده و ترکیبات فنول کل (این بار بدون ترکیبات تانن) اندازه‌گیری شد. از اختلاف فنول کل، با و بدون افزودن PVPP در وزن یکسان از نمونه، میزان تانن مشخص می‌شود (Valizadeh Yonjalli, Mirzaei Aghjehgheshlagh, Mahdavi, Navidshad, & Staji, 2020).

می‌کند. نقش قدرت یونی در فرآیند استخراج تانن قابل توجه است، زیرا بر حلالیت و برهم‌کنش‌های مولکولی تأثیر می‌گذارد (Hosseinzadeh, Khorsandi, & Hemmaty, 2013). قبلاً بلکول و همکاران (Blackwell, Herald, Bean, & Gadgil, 2012) نیز نشان داده بودند که شرایط قلیایی نسبت به استفاده از آب مقطر بازده بالاتری را در استخراج ترکیبات فنولی از سورگم نشان داده است که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. سود در محیط استخراج، احتمالاً از طریق افزایش انحلال ترکیبات فنولی، شکستن پیوندهای دیواره سلولی و آزادسازی بهتر تانن‌ها، اثر قابل توجهی در فرآیند استخراج دارد.

استفاده از اتانول به‌عنوان حلال نیز بازده بالاتری را نسبت به استفاده از آب نشان می‌دهد. این تأثیر را می‌توان به ماهیت شیمیایی این حلال‌ها از منظر میل به استخراج طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنولی براساس قطبیت آنها، ربط داد. ترکیبات فنولی، گستره وسیعی از ترکیبات با ساختارهای مختلف و اغلب قطبی هستند اگرچه به‌دلیل اتصال آنها با مولکول‌های غیر قطبی، ممکن است این دسته از ترکیبات فنولی با حلال‌هایی با قطبیت کمتر بهتر استخراج شوند. آزاده دل و همکاران (Azade del, Hanachi, & Saboora, 2016) نشان دادند که استخراج ترکیبات فنولی از پسته با افزایش قطبیت حلال کاهش پیدا می‌کند.

بنابراین باتوجه به بازده بالای استخراج سود، حلال سود ۰/۲۲ درصد در دمای ۹۰ درجه برای استخراج ترکیبات پوست و جفت به صورت منفرد، استفاده شد. مطابق شکل ۲-ب، مشخص است که میزان ترکیبات قابل استخراج فنولی در جفت بلوط به شکل معنی‌داری از پوست بلوط بیشتر است. این مشاهده و از سویی دیگر میزان کمتر جفت (۹/۶٪) در ساختار میوه بلوط، استفاده مخلوط پوست و جفت بلوط (۳۱/۹۵٪) را با هدف استخراج تانن توجیه می‌کند زیرا پس از پوست گیری بلوط با دستگاه، مخلوط پوست و جفت حاصل می‌شود که سهولت دسترسی دارد و می‌تواند برای استخراج استفاده شود.

ترکیبات فنولی کل

در طی فرآیند استخراج بسته به شرایط فرآیند، ناخالصی‌هایی نیز وارد محصول می‌گردد. میزان ناخالصی‌ها به عوامل فرآیند از قبیل اندازه ذرات، دما، فشار، زمان، نوع حلال و نسبت جامد به حلال بستگی دارد. قبلاً مشخص شده است که دما و نسبت جامد به حلال، محتوای کربوهیدرات را در تانن‌های استخراج شده کنترل می‌کند (Das et al., 2020). از این رو، استخراج تانن‌ها باید با کنترل دقیق عوامل عملیاتی انجام شود.

افزایش دما از ۶۰ به ۹۰ درجه سلسیوس منجر به افزایش بازده استخراج در هر دو نوع حلال شد، اما شدت این افزایش با استفاده از حلال قلیایی (سود ۰/۲۲ درصد) نسبت به آب مقطر بیشتر بود. دماهای بالاتر در فرآیند استخراج منجر به افزایش حلالیت ترکیبات زیست فعال شده و سرعت انتشار این ترکیبات از ماده اولیه به درون حلال را نیز بهبود می‌دهد (Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007).

جدول ۲- آنالیز وزنی قسمت‌های مختلف بلوط

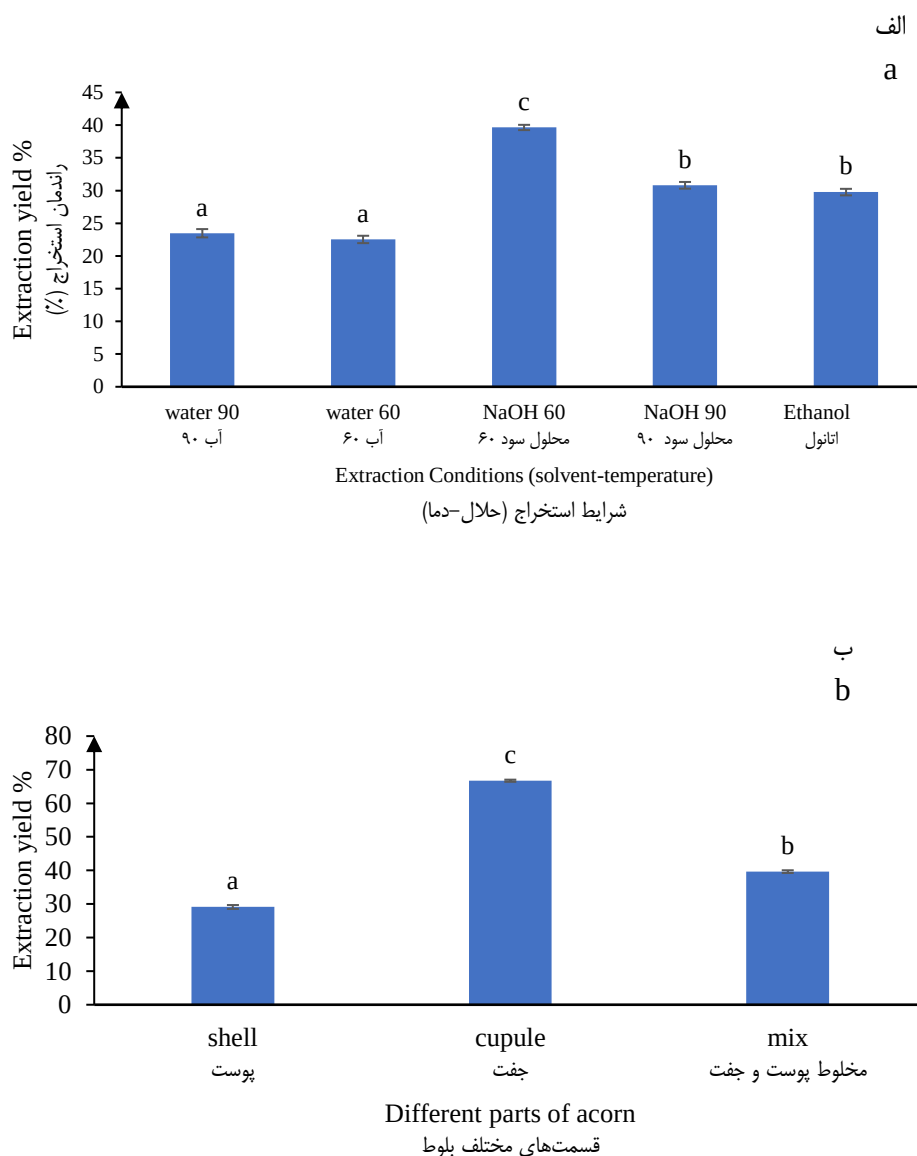
Table 2- Weight analysis of different acorn parts

نمونه Sample	درصد وزنی Weight percentage
پوست بلوط Acorn shell	22.37 ± 0.50
جفت بلوط Acorn cupule	9.60 ± 1.90
مخلوط پوست و جفت Mixed of shell and cupule	31.95 ± 1.63
مغز بلوط Acorn kernel	67.25 ± 1.62

هنگامی که حلال مورد استفاده آب مقطر بود، با افزایش دما، بازده استخراج از ۲۲/۵۲ به ۲۳/۴۷ واحد افزایش یافت. این تفاوت هرچند از نظر عددی قابل مشاهده است، اما از نظر آماری معنی‌دار نبود که می‌تواند ناشی از محدودیت در حلالیت تانن‌ها در آب خالص در این بازه دمایی یا پایداری ساختارهای گیاهی در برابر آب داغ باشد. در مقابل، در تیماری که از حلال سود ۰/۲۲ درصد استفاده کرد، بازده استخراج از ۳۰/۸۰ به ۳۹/۶۴ واحد افزایش یافت، که افزایشی کاملاً معنی‌دار محسوب می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که در حضور یک حلال قطبی دما می‌تواند نقشی مهم در برهم‌کنش حلال با بافت لیگنوسولوزی ماده اولیه در راستای آزاد سازی ترکیبات فنولی و احتمالاً غیر فنولی داشته باشد.

افزایش دما موجب افزایش نفوذپذیری حلال، کاهش ویسکوزیته و تسهیل انتقال جرم می‌شود که در ترکیب با محیط قلیایی، اثر هم‌افزایی قابل ملاحظه‌ای بر استخراج تانن‌ها دارد (Spigno et al., 2007). با این حال قبلاً گزارش شده است که دمای بالا در فرآیند استخراج، میزان حل شدن و انتشار ترکیبات هدف را افزایش می‌دهد. هرچند که دماهای بسیار بالا ممکن است با تخریب ترکیبات زیست فعال همراه شده و از سویی دیگر منجر به ورود ناخالصی‌های نامطلوب به عصاره‌ها گردد (Zhang et al., 2018).

مطابق شکل ۲-الف، هنگامی که از محلول سود به‌عنوان حلال استفاده می‌شود، نسبت به pH خنثی (حلال آبی) بازده بالاتری ایجاد



شکل ۲- مقایسه بازده استخراج عصاره فنولی از بلوط (الف: شرایط متفاوت استخراج از مخلوط پوست و جفت و ب: بازده استخراج از جفت، پوست و مخلوط پوست و جفت با محلول سود ۹۰ درجه سلسیوس)

نتایجی که با حروف کوچک متفاوت در ستون‌های شکل ۲ مشخص است، بر اساس آزمون توکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

Fig. 2. Phenolic extract yield from acorn: (a) Different extraction conditions from mix (b) Extraction yield from sell, cupule and mix. of them using 90°C NaOH solution. Small letters in the column indicate significant difference according to Tukey's test.

همانطور که در شکل ۳-الف نشان داده شده است، در میان روش‌های مختلف استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت، بیشترین بازده مربوط به استخراج با اتانول و سود ۰/۲۲ درصد در دمای ۹۰ درجه سلسیوس بود که به ترتیب بازدهی ۵۱/۴۱ و ۴۸/۰۶٪ را نشان داد و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. این موضوع اهمیت حلال‌های آلی نیمه‌قطبی مانند اتانول را در استخراج ترکیبات فنولی که دارای

نتایج استخراج فنول کل از مخلوط پوست و جفت با حلال‌های مختلف در شکل ۳-الف آورده شده است. نتایج استخراج فنول کل از پوست و جفت بلوط به صورت منفرد و با حلال سود در شکل ۳-ب نشان داده شده است. معادله منحنی استاندارد اسید تانیک نیز به صورت $Y=388.12 X - 47.65$ ($R^2= 0.998$) بدست آمد.

مولکول‌ها و ایجاد تعادل مناسب بین بخش‌های آب‌دوست و آب‌گریز، محیط بهینه‌ای برای استخراج این ترکیبات فراهم می‌کند (Makkar, 2003). همچنین این افزایش میزان استخراج تانن را می‌توان به ویژگی‌های شیمیایی اتانول نسبت داد. اتانول یک حلال نیمه‌قطبی است و توانایی استخراج ترکیبات فنولی و تانن‌های قابل حل در هر دو فاز آبی و آلی را دارد. بسیاری از تانن‌ها (به‌ویژه تانن‌های کندانس‌شده موجود در بلوط) در حلال‌های قطبی-آلی همچون اتانول محلول‌ترند. قبل از پژوهش‌هایی بازده بالاتر استحصال تانن با بکارگیری اتانول نسبت آب به‌عنوان حلال گزارش شد است (Azizah & Azizah, 2021).

در مقابل، تیمار قلیایی با وجود کارایی مشابه با اتانول در استخراج ترکیبات فنل کل، مقدار تانن آن به‌طور معنی‌داری کمتر بود. این اختلاف احتمالاً به‌دلیل تخریب ساختاری تانن‌ها در pH بالا و تشکیل کمپلکس‌های نامحلول بین تانن‌ها و یون‌های فلزی می‌باشد (Jian & Zhang, 2022; Zhang, Guan, Zhang, & Tang, 2023). همچنین حلال قطبی نه تنها تانن‌ها را استخراج می‌کند، بلکه سایر اجزای قطبی مانند کربوهیدرات‌ها و مواد معدنی را نیز حل می‌کند، به‌طوری‌که تانن استخراج‌شده حاوی انواع مختلفی از ناخالصی‌ها است (Kusuma, Wulandari, Nurfutriani, & Awaludin, 2022).

تیمار آبی کمترین بازده استخراج را در استخراج تانن نشان داد. این نتایج با مطالعات قبلی، همانند پژوهش مختارپور و همکاران (Mokhtarpour, Naserian, Valizadeh, Mesgaran, & Pourmollae, 2014) از ضایعات پسته، که محدودیت‌های حلالیت ترکیبات فنولی و تانن‌ها را در محیط کاملاً آبی گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. احتمالاً عدم توانایی در شکستن پیوندهای فنول-پروتئین و فنول-پلی‌ساکارید از مهم‌ترین دلایل این بازده پایین محسوب می‌شوند (Mokhtarpour et al., 2014).

امکان استفاده از تانن در کاربردهای مختلف تا حد زیادی به خلوص آنها بستگی دارد. نوع حلال، کنترل دما، نسبت جامد به حلال، اندازه ذرات، منابع و زمان استخراج به دستیابی به کیفیت بهتر تانن‌ها کمک می‌کند (Das et al., 2020). معمولاً کربوهیدرات‌ها در طول فرآیند استخراج، به همراه تانن‌ها استخراج شده که کاربردهای آنها را محدود می‌کند.

اندازه‌گیری تانن با روش HPLC

با توجه به میزان بالای ترکیبات فنولی در جفت بلوط و همچنین سهولت دسترسی و درصد بالای وزنی مخلوط پوست و جفت بلوط، این دو منبع برای سنجش تکمیلی میزان تانن با روش HPLC انتخاب شدند. نتایج حاصل از آنالیز HPLC (شکل ۵) که به‌منظور اندازه‌گیری

ساختارهای متنوع قطبی و غیرقطبی هستند، برجسته می‌سازد. اتانول با داشتن توانایی حلالیت دوگانه، قادر به استخراج مؤثرتر طیف وسیع‌تری از ترکیبات فنولی است (Lee et al., 2024). علاوه براین، این مشاهده اثر مثبت محیط قلیایی در دمای بالا در آزادسازی ترکیبات فنولی متصل به دیواره سلولی را نشان می‌دهد. شرایط قلیایی اغلب برای استخراج ترکیبات فنولی و تانن‌ها مناسب‌تر از شرایط خنثی یا اسیدی هستند. در مطالعه‌ای توسط بوراس و همکاران (Bouras et al., 2015) مشخص شد که استفاده از شرایط قلیایی نسبت به استفاده از آب مقطر به‌طور قابل توجهی کارایی استخراج ترکیبات فنولی از پوست درخت بلوط را بهبود می‌بخشد؛ که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. همچنین مشخص است که استفاده از آب خالص، حتی در دمای بالا، توان کمتری در استخراج مؤثر ترکیبات فنولی نسبت به حلال‌های قوی‌تر دارد، بنابراین نقش pH در استخراج با حلال نیز در این مطالعه برجسته شده است.

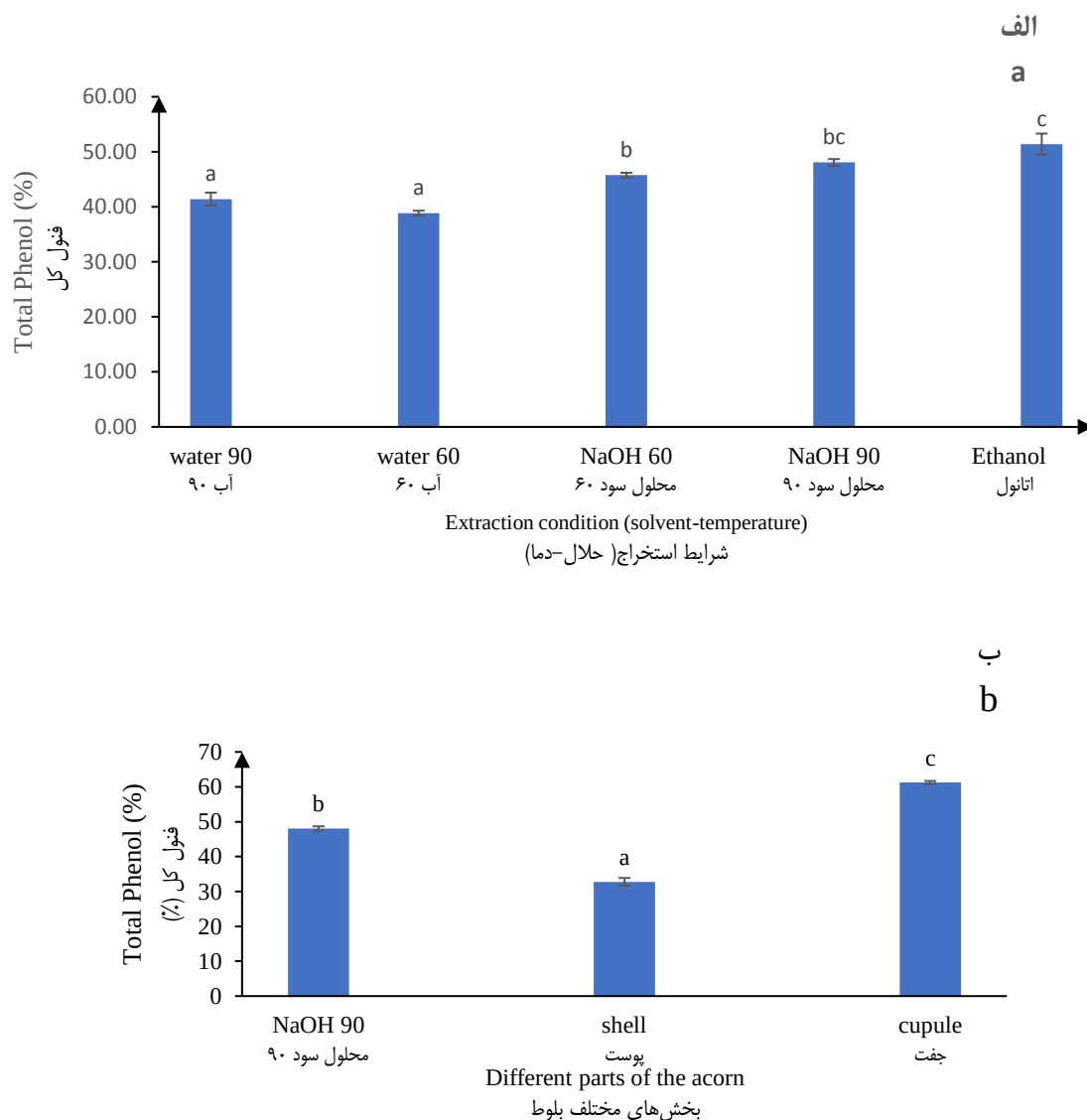
بنابراین باتوجه به بازده بالای استخراج اتانول و سود و قیمت ارزانتر سود، حلال سود ۲۲/۰ درصد در دمای ۹۰ درجه برای استخراج ترکیبات فنولی پوست و جفت به‌صورت منفرد، استفاده شد. در بین تیمارهای بررسی‌شده، جفت بلوط (cupule) با میانگین استخراج ۶۱/۲۲ درصد با بکارگیری حلال قلیایی، بالاترین میزان استخراج فنول کل را نشان داده است. این مقدار به‌طور معنی‌داری از سایر منابع بیشتر است و نشان‌دهنده‌ی غنای بالای جفت از منظر ترکیبات فنولی است. به‌عبارتی، استفاده از جفت به‌تنهایی نسبت به مخلوط پوست و جفت بلوط، کارایی به مراتب بیشتری در استخراج ترکیبات فنولی دارد. هرچند همان‌گونه که در جدول ۱ نیز نشان داده شده است، جفت درصد کمی از میوه بلوط را تشکیل می‌دهد. همچنین براساس نتایج مشخص شد که، کمترین میزان ترکیبات فنولی در بخش پوست قرار دارد.

اندازه‌گیری تانن با روش PVPP

محتوای تانن عصاره‌های استخراج شده از مخلوط پوست و جفت با استفاده حلال‌هایی از هر سه گروه حلال آبی، اتانولی و سود با بالاترین بازده، با استفاده از روش مرسوم PVPP مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس شکل ۴ مشخص است که با بکارگیری اتانول به عنوان حلال، بازده استخراج تانن افزایش می‌یابد. مقدار تانن استخراج‌شده با اتانول ۴۰ درصد (۳۲/۲۵٪) تقریباً بیش از سه برابر تیمارهای آبی (۸/۹۱٪) و قلیایی (۹/۷۷٪) می‌باشد. این نتیجه کارایی بالای اتانول (در مقایسه با آب و سود به‌عنوان حلال) در استخراج تانن را نشان می‌دهد. در بخش قبل نیز بازده استخراج ترکیبات فنول کل با استفاده از اتانول، میزان بالایی را نشان داد. تشابه در روند استخراج تانن و ترکیبات فنول کل، تأیید می‌کند که اتانول با حفظ یکپارچگی ساختاری

از استاندارد اسید تانیک برای تعیین زمان بازداري ترکیبات تانني استفاده گردید. بر اساس داده‌های به‌دست آمده، میزان تانن در مخلوط پوست و جفت ۴۸/۰۶٪ و در جفت به تنهایی ۶۱/۲۳٪ اندازه‌گیری شد.

اسید تانیک در نمونه‌های جفت و مخلوط پوست و جفت بلوط انجام شد، نشان داد که روش HPLC در مقایسه با روش‌های شیمیایی متداول، مقادیر بالاتری از تانن را اندازه‌گیری می‌کند. در این آزمایش

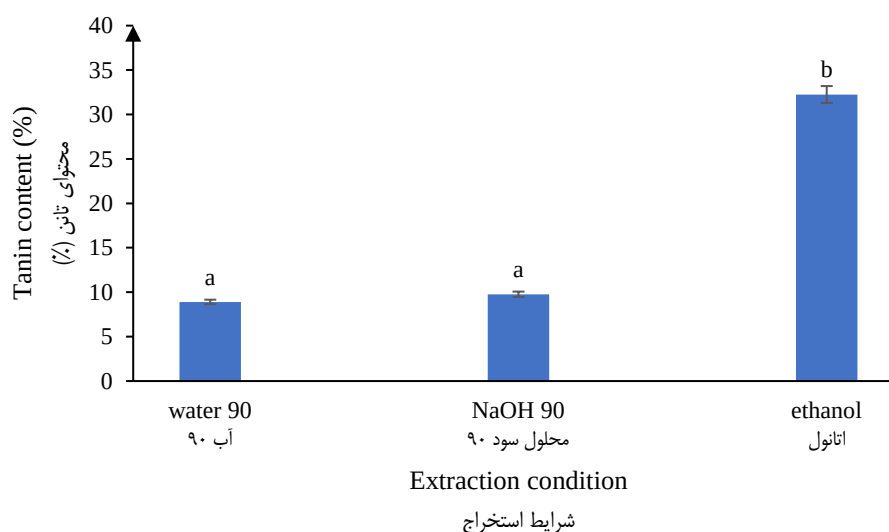


شکل ۳- نتایج استخراج فنول کل -بخش الف: از مخلوط پوست و جفت با حلال‌های مختلف. بخش ب: از پوست، جفت و مخلوط پوست و جفت با استفاده از محلول سود

نتایجی که با حروف کوچک متفاوت در ستون مشخص است، بر اساس آزمون توکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) در شکل می‌باشد.

Fig. 3. Total phenol extraction results: (a) From mix using different solvents (b) From shell, cupule and mix. Of them using NaOH solution

Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ($p < 0.05$) according to Tukey's test.



شکل ۴- تأثیر شرایط استخراج بر میزان تانن کل

نتایجی که با حروف کوچک متفاوت در ستون مشخص است، بر اساس آزمون توکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) می‌باشد.

Fig. 4. Effect of extraction conditions on total tannin content

Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ($p < 0.01$) according to Tukey's test.

در نظر گرفتن عواملی نظیر خلوص، سهولت دسترسی و فراوانی منابع و همچنین کاربرد در صنایع غذایی و دارویی یا شیمیایی صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی، خالص‌سازی تانن استخراجی جهت کاربردهای دارویی و صنعتی در دستور کار قرار گیرد.

منابع تأمین مالی

این مقاله با حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان ایران و جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان (ACECR)، در قالب طرح احمدی روشن با عنوان «کسب دانش فنی تولید انواع محصولات با ارزش افزوده از بلوط» با کد ۷۳۱۰۱۵ طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲ انجام شده است. بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از سازمان‌های مذکور ابراز می‌داریم.

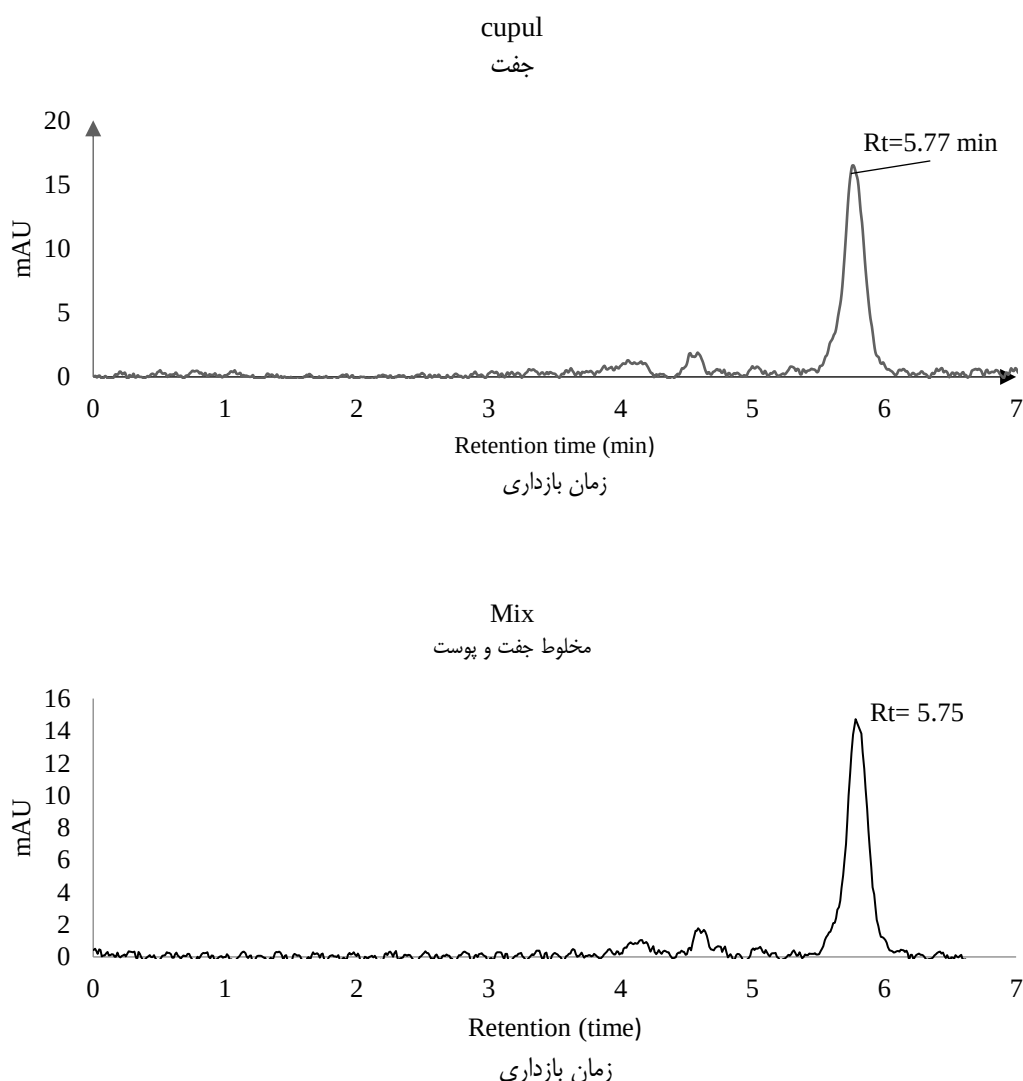
مشارکت نویسندگان

زهرا زارع‌زاده: مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، تحقیق و بررسی.
علی فروهر: مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، نوشتن- پیش‌نویس اصلی.
حامد صابریان: نوشتن- بررسی و ویرایش، مدیریت پروژه، روش‌شناسی.

اگرچه مقدار تانن در جفت بلوط به تنهایی بیشتر بود، اما از نظر کاربردهای صنعتی، استفاده از مخلوط پوست و جفت احتمالاً گزینه مطلوب‌تری محسوب می‌شود. چون درصد وزنی بالاتری دارد و از توجیه اقتصادی بهتری برخوردار است و موجب افزایش بازدهی کلی فرآیند می‌گردد. تفاوت مقادیر اندازه‌گیری شده بین روش HPLC و روش‌های شیمیایی را می‌توان به عواملی همچون قدرت تفکیک بالاتر HPLC در شناسایی انواع تانن‌ها، عدم تداخل ترکیبات مزاحم در روش کروماتوگرافی و حساسیت بیشتر دستگاه HPLC در اندازه‌گیری نسبت داد. این یافته‌ها به وضوح اهمیت انتخاب روش آنالیزی مناسب و همچنین مزایای استفاده از مخلوط پوست و جفت بلوط را در کاربردهای صنعتی نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بازده استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت بلوط به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر نوع حلال و دمای استخراج قرار دارد. به‌طور خاص، استخراج با اتانول ۴۰٪ منجر به بازده حدود ۳۲ درصدی شد، در حالی که بازده استخراج با سود ۲۲٪/۰ درصدی در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به حدود ۴۸ درصد افزایش یافت. اتانول به دلیل ماهیت نیمه‌قطبی خود، کارایی بالایی (۳۲٪) در استخراج تانن از مخلوط پوست و جفت بلوط نشان داد. جفت بلوط منبع غنی‌تری از ترکیبات فنولی کل است، اگرچه مخلوط پوست و جفت سهولت و فراوانی بیشتری دارد. در نهایت، انتخاب منبع و روش استخراج باید با



شکل ۵- میزان تانن جفت و مخلوط پوست و جفت و عصاره بر اساس تانیک اسید
Fig. 5. Tannin content of cupule and mix based on tannic acid equivalent

References

1. Arina, M.I., & Harisun, Y. (2019). Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101104. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101104>
2. Azade del, S., Hanachi, P., & Saboora, O. (2016). Investigation of soluble and insoluble tannins and anthocyanins assay in two Cultivar pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 14(63), 179-186. (In Persian with English abstract)
3. Azizah, Y.N., & Azizah, M. (2021). Proximate composition of dried powder of *Passiflora foetida* leaves and fruits and its phytochemical content of crude aqueous and ethanol extract. *Universiti Malaysia Terengganu Journal of Undergraduate Research*, 3(4), 99-108. <https://doi.org/10.46754/umtjur.2021.10.011>
4. Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Baini, G., Cappellucci, G., & Miraldi, E. (2021). Polyphenols: From theory to practice. *Foods*, 10(11), 2595. <https://doi.org/10.3390/foods10112595>
5. Bitwell, C., Indra, S.S., Luke, C., & Kakoma, M.K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>

6. Blackwell, D.L., Herald, T.J., Bean, S.R., & Gadgil, P. (2012). Alkaline extraction of phenolic compounds from intact sorghum kernels. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12), 2671-2675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03138.x>
7. Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590-601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
8. Claudia, P. (2013). Acorn bread: A traditional food of the past in Sardinia (Italy). *Journal of Cultural Heritage*, 14(3), S71-S74. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2012.11.012>
9. Das, A.K., Islam, M.N., Faruk, M.O., Ashaduzzaman, M., & Dungani, R. (2020). Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>
10. Dehghanian, Z., Habibi, K., Dehghanian, M., Aliyar, S., Lajayer, B.A., Astatkie, T., & Keswani, C. (2022). Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. *Heliyon*, 8(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09094>
11. Du, G., Zhao, H., Song, Y., Zhang, Q., & Wang, Y. (2011). Rapid simultaneous determination of isoflavones in *Radix puerariae* using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column. *Journal of Separation Science*, 34(19), 2576-2585. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100295>
12. Ghaderi Ghahfarokhi, Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Azizi, M.H., & Ghorbani, M. (2012). Study on antioxidant activities of phenolic extracts from fruit of a variety of Iranian acorn (*Q. castaneifolia* var *castaneifolia*). *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 9(35), 45-56. (In Persian with English abstract)
13. Heidari, F., & Zarei, R. (2016). *Study of Tannin Levels in Oak Trees in the Zagros Region, Yasuj Forest Areas* International Conference on Research in Science and Technology. (In persian)
14. Hosseinzadeh, R., Khorsandi, K., & Hemmaty, S. (2013). Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts. *PloS One*, 8(3), e57353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057353>
15. Iranmanesh, Y., & Goujani, H.J. (2015). Investigation of extractable oil from Brant's oak (*Quercus brantii* Lindl.) acorn in Chaharmahal and Bakhtiari forests. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 23(3), 527-535.
16. Jahanshahi, S., Tabarsa, T., Asghari, Z., & Resalati, H. (2011). Investigation of the amount of tannic acid in bark oak (*Quercus castanifolia*). *Iranian Journal of Wood and Paper Industries*, 1(1), 27-35. (In Persian)
17. Jian, X., & Zhang, J. (2022). Component and structure of *Aspergillus flavipes* sp. Biodegraded bayberry tannins: a potential routine for condensed tannin cleaner degradation and disposal. *ACS Omega*, 7(7), 5809-5816. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05768>
18. Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports*, 18(6), 641-649.
19. Kusuma, S., Wulandari, S., Nurfitriani, R., & Awaludin, A. (2022). The potential solvent for tannin extraction as a feed additive made of coffee husk (*Coffea canephora*) using Soxhlet Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 980(1), 012024. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/980/1/012024>
20. Lee, J.-E., Jayakody, J.T.M., Kim, J.-I., Jeong, J.-W., Choi, K.-M., Kim, T.-S., & Ryu, B. (2024). The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: A comparative review. *Foods*, 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>
21. Makkar, H.P. (2003). Treatment of plant material, extraction of tannins, and an overview of tannin assays presented in the manual. In *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage – A Laboratory Manual* (1st Edition ed., pp. 43-48). Springer Science. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7_2
22. Mokhtarpour, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R., Mesgaran, M.D., & Pourmollae, F. (2014). Extraction of phenolic compounds and tannins from pistachio by-products. *Annual Research & Review in Biology*, 4(8), 1330. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/7793>
23. Pasqualone, A., Makhlouf, F.Z., Barkat, M., Difonzo, G., Summo, C., Squeo, G., & Caponio, F. (2019). Effect of acorn flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits. *Heliyon*, 5(8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02242>
24. Payab, M., Chaichi, M.J., Nazari, O.L., & Maleki, F.Y. (2019). Tannin extraction from oak gall and evaluation of anti-oxidant activity and tannin iron chelation compared with deferoxamine drug. *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*, 5(2), 18-25. <https://doi.org/10.11648/j.jddmc.20190502.11>
25. Pietta, P., Minoggio, M., & Bramati, L. (2003). Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 28, 257-312. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80143-6](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80143-6)
26. Pourhashemi, M., & Sadeghi, S.M.M. (2020). A review on ecological causes of oak decline phenomenon in forests of Iran. *Ecology of Iranian Forests*, 8(16), 148-164. <https://doi.org/10.52547/ifej.8.16.148>

27. Rahnemoun, P., Sarabi Jamab, M., Javanmard Dakheli, M., Bostan, A., & Safari, O. (2018). Comparison of two methods of solvent extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(5), 939-952. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101331>
28. Salarkarimi, V., Varidi, M.J., & Varidi, M. (2019). The effect of chestnut (*Quercus brantii*) flour substitution on the physicochemical and sensory properties of burgers. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8(1), 15-30.
29. Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021>
30. Torkaman, J., & Seyam, S. (2009). Measurement of tannin in treebarks of Oak, Beech, Alder, Horn beam and Black Walnut [Research]. *Journal of Medicinal Plants*, 8(29), 58-63.
31. Valizadeh Yonjalli, R., Mirzaei Aghjehgheshlagh, F., Mahdavi, A., Navidshad, B., & Staji, H. (2020). The effects of tannin extract and linseed oil on yield, physicochemical characteristics and fatty acid profile of ewe milk. *International Journal of Dairy Technology*, 73(4), 656-666. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12716>
32. Zhang, L., Guan, Q., Zhang, H., & Tang, L. (2023). Effect of metal ions on the interaction of condensed tannins with protein. *Foods*, 12(4), 829. <https://doi.org/10.3390/foods12040829>
33. Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20.
34. Zhu, Y., Ouyang, H., Lv, Z., Yao, G., Ge, M., Cao, X., & He, J. (2024). Simultaneous determination of multiple components in rat plasma by UPLC-MS/MS for pharmacokinetic studies after oral administration of Pogostemon cablin extract. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1293464. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1293464>