

بررسی برخی ترکیبات فنلی بافتهای میوه لیمو (*Citrus aurantifolia*) در مراحل مختلف رشد

شیوا قاسمی^{۱*}، خدایار همتی^۲، زین العابدین بشیری صدر^۳، عظیم قاسم نژاد^۴،
مصطفی قاسمی^۵

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. عضو هیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳. استادیار سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

۴. دانشجوی دکتری علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس تهران

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۱)

چکیده

میوه های مرکبات غنی از ترکیبات فلاونوئیدی هستند. فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنلی هستند که اثرات سودمندی شامل اثرات ضد سرطانی دارند. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین میزان هسپریدین، نارنجین و روتین در بافتهای مختلف میوه لایم در طی مراحل مختلف رشد بود. آزمایش در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. استخراج فلاونوئیدها با حلال متانول و دی متیل سولفوکسید و اندازه گیری آن ها با دستگاه HPLC صورت گرفت. نتایج نشان داد که هسپریدین، فلاونوئید غالب در میوه لایم بود. بیشترین میزان هسپریدین و نارنجین ۳۰ روز بعد از مرحله تشکیل میوه، به ترتیب ۳/۲۳ و ۱/۶۳ درصد ماده خشک بود و بعد از آن تا زمان بلوغ کاهش یافت. بیشترین میزان هسپریدین و نارنجین در پوست میوه یافت شد و روتین تنها در گوشت میوه در مرحله ۵۰ روز پس از تشکیل میوه یافت شد. هیچ یک از فلاونوئیدها در بذر یافت نشدند.

۱- مقدمه

اکسیدانی قوی دارند و رادیکالهای آزاد را مهار کرده و خطر برخی بیماریهای مزمن را کاهش می دهند و همچنین از برخی اختلالات قلبی عروقی جلوگیری می کنند [۴]. خواص ضد ویروسی، ضد میکروبی و ضد حساسیت آن ها نیز به اثبات رسیده است [۵]. میوه های نارس گونه های مختلف مرکبات به عنوان ذخایر مهم فلاونوئیدها شناخته شده اند [۶].

گلیکوزیدهای فلاوانون، هسپریدین و نارنجین به مقدار زیاد و تعدادی از فلاونوئیدهای دیگر به مقدار کمتر در میوه مرکبات وجود دارند [۷]. از آنجا که هیچگونه بررسی بر روی میزان فلاونوئیدهای میوه لایم در شهرستان میناب واقع

درخت لایم با نام علمی *Citrus aurantifolia* متعلق به خانواده مرکبات یا Rutaceae می باشد [۱]. این درخت دارای میوه های کشیده و گاهی گرد با پوست نازک با رنگ زرد مایل به سبز می باشد. رنگ داخل میوه نیز کمی متمایل به سبز و طعم آن ترش است. میوه لایم منبع خوبی از ویتامین است و خواص آنتی اکسیدانی زیادی دارد [۲].

فلاونوئیدها یکی از بزرگترین گروه های ترکیبات طبیعی هستند که جزء ترکیبات فنولی می باشند [۳] که به خاطر فیزیولوژی خاص، خواص دارویی و نقششان در سلامتی بسیار اهمیت دارند [۴]. این ترکیبات خواص آنتی

* مسئول مکاتبات: shivaghaseemi24@gmail.com

در استان هرمزگان صورت نگرفته است، لذا این تحقیق به منظور بررسی میزان سه فلاونوئید مهم موجود در میوه لایم (نارنجین، هسپریدین و روتین) در بافت های مختلف (پوست، گوشت و بذر) انجام گردید تا بهترین زمان برداشت میوه لایم به منظور دستیابی به حداکثر میزان فلاونوئیدها مشخص گردد.

۲- مواد و روشها

این تحقیق در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی به منظور بررسی تاثیر نوع بافت و مراحل مختلف برداشت بر میزان سه فلاونوئید مهم موجود در میوه لایم (هسپریدین، نارنجین و روتین) در چهار تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل نوع بافت (پوست، گوشت و بذر) و مراحل مختلف برداشت (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه) بود. میوه های درخت لایم رقم مکزیکی از کلکسیون ایستگاه تحقیقات کشاورزی شهرستان میناب (طول جغرافیایی ۵۷/۶ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۲۷/۷ درجه شمالی، ارتفاع از سطح دریا ۲۷ متر) واقع در استان هرمزگان در مراحل مختلف پس از تشکیل میوه (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ روز) جمع آوری گردید. در انتخاب درختانی که نمونه برداری از آن ها انجام شد، ارتفاع و اندازه تاج به منظور یکنواختی سن رعایت شد. سن درختان ۶ سال بود و همه اندازه گیری ها شامل ۴ تکرار بودند. میوه ها از جهات مختلف تاج درخت و به طور تصادفی انتخاب شدند. در مرحله اول برداشت به دلیل ریز بودن نمونه ها و عدم امکان جداسازی بافت، جداسازی بافت صورت نگرفت. در مرحله دوم برداشت نمونه ها شامل دو بافت پوست و گوشت، در مرحله سوم و چهارم شامل سه بافت مختلف پوست، گوشت و بذر بودند. بافتهای جداسازی شده ابتدا به مدت ۴۸ ساعت در دمای معمولی و در سایه قرار گرفتند و سپس به آون با دمای ۵۰ درجه منتقل شدند و ۲۴ ساعت در این دما باقی ماندند. پس از اینکه نمونه ها خوب خشک شدند و رطوبت آن ها به ۱۲ درصد رسید (اندازه گیری بارطوبت سنج)، بوسیله یک آسیاب برقی به صورت پودر در آمدند. به منظور یکنواخت کردن پودر نمونه ها از الک ۰/۵ میلیمتری عبور داده شدند. برای استخراج و اندازه گیری فلاونوئیدهای هسپریدین، نارنجین و روتین، نمونه ها به آزمایشگاه پژوهشکده صنایع شیمیایی سازمان

پژوهش های علمی و صنعتی ایران منتقل شدند. برای تهیه عصاره کل ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم از نمونه های پودر شده را طی دو مرحله در ۷۵ میلی لیتر هگزان قرار داده تا به کمک همزن مغناطیسی مواد زائد از رسوب جدا گردند. بعد محلول را از طریق قیف بوخنر همراه با کاغذ صافی واتمن عبور داده تا اسانس ها و روغن ها کاملاً از محلول جدا گردند. به منظور حذف کامل هگزان از محلول از دستگاه تبخیر گردان (Rotary evaporator) استفاده گردید. برای استخراج عصاره نهایی، محلول متانول و دی متیل سولفوکساید (دی ام اس) به نسبت ۳:۱ تهیه نموده سپس ۵ گرم از ماده فاقد اسانس و روغن را وزن کرده و حجم آن توسط محلول فوق به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. در مرحله بعد بالن محتوای محلول به مدت ۳۰ دقیقه روی هیتز با همزن مغناطیسی قرار داده شد تا فلاونوئیدها حل گردند. عصاره بدست آمده را از قیف بوخنر با کاغذ صافی واتمن عبور داده تا ناخالصی ها از محلول حاوی فلاونوئید جدا گردند. به منظور تعیین میزان فلاونوئیدهای هسپریدین، نارنجین و روتین، میزان ۱۰ میکرولیتر از عصاره بدست آمده، به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با مشخصات زیر تزریق گردید.

مشخصات ستون: طول ۳۰۰ میلی متر و قطر ۳/۹ میلی متر
آشکارساز: ۲۸۵ نانومتر برای هسپریدین و نارنجین، ۲۸۰ نانومتر برای روتین
سرعت جریان: ۲ میلی لیتر در دقیقه
فاز متحرک: شامل آب و استونیتریل به نسبت ۷۸/۵ به ۲۱/۵
استانداردهای هسپریدین، نارنجین و روتین از شرکت سیگما خریداری گردیدند. تجزیه داده ها توسط نرم افزار Excel و SPSS صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

میانگین، حد اقل، حداکثر و انحراف از استاندارد میزان فلاونوئیدهای میوه لایم در طی مراحل مختلف برداشت و در بافت های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود، میانگین میزان هسپریدین در پوست میوه ۳۰ روز پس از تشکیل میوه ۳/۲۳ درصد در ماده خشک و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۳/۰۹ و ۳/۳۹ درصد بود.

جدول ۱ مقایسه میانگین میزان فلاونوئیدها در بافتهای مختلف میوه لایم

انحراف از استاندارد	میانگین	برداشت (تعداد روز پس از تشکیل میوه)	زمان	
			نوع بافت	نوع فلاونوئید
۰/۱۴۹	۳/۲۳	۳۰	پوست	هسپریدین
۰/۰۹۷	۱/۶۳	۵۰	پوست	هسپریدین
۰/۱۰۴	۱/۳۹	۷۰	پوست	هسپریدین
۰/۰۹	۰/۲۷	۹۰	پوست	هسپریدین
۰/۱۹۷	۱/۶۳	۳۰	پوست	نارنجین
۰/۰۳۵	۱/۰۲	۵۰	پوست	نارنجین
۰/۰۶۹	۰/۴۱	۷۰	پوست	نارنجین
۰/۰۶	۰/۱۷	۹۰	پوست	نارنجین
۰	۰	۳۰	گوشت	روتین
۰/۱۰۶	۰/۲۱	۵۰	گوشت	روتین
۰/۰۲۴	۰/۰۵	۷۰	گوشت	روتین
۰	۰	۹۰	گوشت	روتین
۰/۳۵	۱/۵۹	۵۰	گوشت	هسپریدین
۰/۱۱۷	۰/۲۳	۷۰	گوشت	هسپریدین
۰/۰۶۱۸	۰/۰۵	۹۰	گوشت	هسپریدین
۰	۰/۴۲	۵۰	گوشت	نارنجین
۰/۰۶۶	۰/۱۹	۷۰	گوشت	نارنجین
۰/۰۰۵	۰/۰۲۶	۹۰	گوشت	نارنجین

در پوست میوه در هیچ یک از مراحل برداشت روتین یافت نشد.

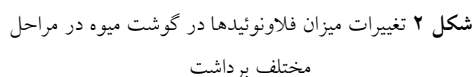
میانگین میزان هسپریدین در گوشت میوه ۵۰ روز پس از تشکیل میوه ۱/۵۹ درصد در ماده خشک و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۱/۲۵ و ۲/۰۸ بود. در زمان ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین هسپریدین به ۰/۲۳ درصد رسید و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۱۲ و ۰/۳۹ درصد بود و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین و حداقل و حداکثر هسپریدین به ترتیب ۰/۰۵۲، ۰ و ۰/۱۲ درصد در ماده خشک بود.

میانگین میزان نارنجین در گوشت میوه، ۵۰ روز پس از تشکیل میوه، ۰/۴۲ درصد در ماده خشک و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۴۸ درصد بود. ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین، حداقل و حداکثر به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۱۱ و ۰/۲۷ درصد بود و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین، حداقل و حداکثر به ترتیب ۰/۰۲۶، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ درصد در ماده خشک بود.

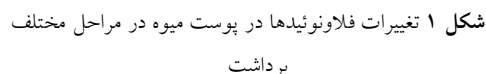
۵۰ روز پس از تشکیل میوه نیز میانگین مقدار هسپریدین در پوست میوه ۱/۶۳ و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۱/۵۴ و ۱/۷۶ درصد بود. ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین میزان هسپریدین در پوست ۱/۳۹ و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۱/۲۶ و ۱/۵۱ و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین درصد هسپریدین ۰/۲۷ و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۱۷ و ۰/۳۹ درصد بود.

میانگین درصد نارنجین در پوست میوه، ۳۰ روز پس از تشکیل میوه، ۱/۶۳ درصد در ماده خشک و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۱/۳۹ و ۱/۸۷ بود. ۵۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین میزان نارنجین ۱/۰۲۲ درصد در ماده خشک و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۹۸ و ۱/۰۶ درصد بود. ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین میزان نارنجین ۰/۴۱ درصد و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۵۱ درصد بود و در زمان ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین میزان نارنجین و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۱۷، ۰/۱۲ و ۰/۲۶ درصد بود.

میانگین میزان روتین در گوشت در زمان ۵۰ روز پس از تشکیل میوه، ۰/۲۱ درصد در ماده خشک و حداقل و حداکثر آن به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۳۶ درصد بود. در زمان ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، میانگین، حداقل و حداکثر به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۰۲ و ۰/۰۷ درصد در ماده خشک بود. در گوشت میوه در زمان ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، روتین یافت نشد.



نتایج نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید هسپریدین در پوست میوه لایم (۳/۲۳ درصد وزن خشک) در ۳۰ روز بعد از تشکیل میوه و کمترین میزان آن (۰/۲۷ درصد وزن خشک) مربوط به ۹۰ روز پس از تشکیل میوه بود. بیشترین میزان فلاونوئید نارنجین (۱/۶۳ درصد وزن خشک) نیز همانند هسپریدین در ۳۰ روز پس از تشکیل میوه و کمترین آن (۰/۱۷ درصد وزن خشک) در مرحله آخر برداشت بدست آمد. در شکل ۱ این تغییرات نشان داده شده است.



از تشکیل میوه بدست آمد و به ترتیب ۰/۵۹، ۰/۴۲ و ۰/۲۱۵ بود. دل-ریو و همکاران (۲۰۰۴) نیز در بررسیهای خود که بر روی فلاونوئیدهای موجود در میوه دو رقم لیمون در مراحل

گریپ فروت تحقیق کردند و نتایج آن ها نشان داد که روتین در پوست میوه وجود ندارد اما در عصاره میوه به میزان ۰/۰۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر روتین وجود داشت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [۱۰].

بررسیهای انجام شده بیانگر زیاد بودن میزان فلاونوئید هسپریدین در پوست و همچنین گوشت میوه نسبت به فلاونوئید نارنجین و روتین بود که نشان دهنده این مطلب است که هسپریدین در میوه لایم نسبت به دو فلاونوئید دیگر غالبیت دارد و بهترین زمان استحصال این فلاونوئیدها در مراحل ابتدایی رشد میوه می باشد.

۴- منابع

- [1] Peterson, J.J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B. and Holden . J.M. 2006. Flavanones in grapefruit, lemons and limes: A composition and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:74-80
- [2] Camara, L., Stefano. V.D., Del Bosco, S.F. and Schillaci, D. 2007. Antiproliferative activity of citruc juices and HPLC evaluation of their flavonoid composition. *Fitoterapia*, 78: 426-429
- [3] Thrugnanavel, A., Amutha. R., Baby Rani, W., Indira, K., Mareeswari, P., Muthulaksmi, S and Parthiban, S . 2007. Studies regulation of flowering in acid lime (*Citrus aurantifoila* swingle.). *Reacearch Journal of Agriculture and Biological science*, 3(4): 239-241
- [4] Gattuso, G., Barreca, David., Gargiulli , C., Leuzzi, U. and Caristi, C. 2007. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*, 12: 1641-1673
- [5] Cushine, T.P.T and Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. Journal of Antimicrob. Agent*, 26: 343-356
- [6] Hemmati, Kh., Omidbiagi, R., Bashirisadre Z., and Ebrahemi, Y. 2003. Effect of climate and harvesting time in quantities and qualities flavonoids certain in Citrus cultivars. Ph.D. Thesis. Modarres University Publisher.
- [7] Gorinstein, S., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., Soliva-Fortuny, R ., Martin Belloso, O., Martinez Ayala, A.L. and Trakhtenberg, S. 2006.

مختلف رشد انجام دادند، گزارش کردند که بیشترین میزان فلاونوئید هسپریدین (۳۹/۶ درصد وزن خشک) ، در مرحله ۳۰ روز پس از تشکیل میوه و کمترین میزان هسپریدین (۸۱/۰ درصد وزن خشک) در ۱۵۰ روز پس از تشکیل میوه یافت شد [۸].

همچنین در بررسی که همتی (۱۳۸۲) بر روی فلاونوئیدهای هسپریدین و نارنجین موجود در مرکبات جمع آوری شده از شمال و جنوب کشور انجام داد، مشخص شد که بیشترین میزان نارنجین در گریپ فروت مارش و قرمز در مرحله اول و دوم برداشت (به ترتیب ۶۱/۳۶ و ۲۸/۹ درصد وزن خشک) در تنکابن بدست آمد و بیشترین میزان هسپریدین در نارنگی محلی در مرحله اول و دوم برداشت (به ترتیب ۱۸/۳۶ و ۱۴/۲۸ درصد وزن خشک) در جیرفت تولید شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۶].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان فلاونوئیدهای نارنجین و هسپریدین در پوست میوه در تمام مراحل برداشت بیشتر از گوشت میوه بود. به طوری که میزان هسپریدین در پوست و گوشت در ۵۰ روز پس از تشکیل میوه به ترتیب ۱/۶۳ و ۱/۵۹ درصد، ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، ۱/۳۹ و ۰/۲۳ درصد و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، ۰/۲۷ و ۰/۰۵۲ درصد وزن خشک بود. میزان نارنجین نیز در پوست و گوشت در ۵۰ روز پس از تشکیل میوه به ترتیب ۱/۰۲۲ و ۰/۴۲ درصد، ۷۰ روز پس از تشکیل میوه، ۰/۴۱ و ۰/۱۹ درصد وزن خشک و ۹۰ روز پس از تشکیل میوه، ۰/۱۷ و ۰/۰۲۷ درصد وزن خشک بود. دل- ریو و همکاران (۲۰۰۴) فلاونوئیدها را در پوست و گوشت میوه لمون مقایسه کردند و نتایج نشان داد که میزان هسپریدین پوست ، بیشتر از گوشت میوه بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد [۸]. هورویتز و همکاران (۱۹۸۷) نیز گزارش کردند که بیشترین میزان فلاونوئید مرکبات در پوست میوه ساخته می شود [۹].

وانگ و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی که بر روی مرکبات کاشته شده در تایوان انجام دادند، مشخص کردند که ترکیبات فعال غالب در مرکبات، هسپریدین، نارنجین، کامفرول و دیوسمین می باشند [۱۰]. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر غالبیت هسپریدین و کمتر بودن میزان روتین نسبت به سایر فلاونوئیدها در میوه های لایم مطابقت دارد. یو و همکاران (۲۰۰۷) بر روی فلاونوئیدهای موجود در پوست و عصاره

- [10] Wang, Y.C., Chuang, Y.C. and Ku, Y.H. 2007. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food chemistry*, 102: 1163-1171
- [11] Yu, J., Deepak, V., Dandekar, a., Romeo, T., Toledo, B., Rakesh, K., Singh, B., Bhimanagouda, K. and Patil, S. 2007. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. *Food chemistry*, 105:1026-1031.
- Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, 17: 108-124
- [8] Del Rio, J.A., Fuster, M.D., Gomez, P., Porras, I., Garcia-Lidon, A. and Ortuno, A. 2004. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food chemistry*, 457-461
- [9] Horowitz, R.M. and Gentili, B. 1986. Taste effects of flavonoids. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationship*, 163-175

Quantitation of phenolic compounds in tissues of lime (*Citrus aurantifolia*) fruit during growth and maturation

Ghasemi, SH.^{1*}, Hemati, K.², Bashiri Sadr., Z.³, Ghasem Nezhad, A.⁴, Ghasemi, M.⁵

1. The previous Ms. Student of Horticulture Department ,Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources and Assistant teaching of Department of Horticulture, Hormozgan University.
2. Asis. Prof. of Horticulture Department, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources
3. Asis. Prof. of Iranian Science Organization of Science and Technology
4. Asis. Prof. of Horticulture Department, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources
5. The Ph. D. Student of Horticulture Department, Tarbiat Modares Univ. Tehran, Iran

(Received: 87/10/8 Accepted:88/9/1)

The citrus fruits are rich in flavonoid compounds. Flavonoids are polyphenolic compounds that exhibit valuable effects such as anti-cancer properties. Thus, this study was aimed to determine the levels of hesperidin, naringin and rutin presented in various lime (*Citrus aurantifolia*) fruit tissues during fruit growth and maturation. This experiment was laid out as a completely randomized blocks design with four replications. Extraction was carried out using methanol and dimethyl sulfoxide and quantification was done with the help of HPLC technique. The results showed that hesperidin was the predominant flavonoid in lime fruits. The highest amount of hesperidin and naringin was observed 30 days after fruit set (3.23 and 1.63 % in dry matter, respectively) and was decreased afterward until fruit maturation time. The hesperidin and naringin were found in maximum quantity in peel. The rutin flavonoid was produced in fruit pulp at 50 days after fruit set. None of the flavonoids was present in lime seeds.

Keywords: lime, phenolic compounds, fruit, hesperidin, naringin, rutin

* Corresponding Author E-Mail address: shivaghasemi24@gmail.com