Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، صفحه ۶۳۳- ۶۲۰ (۱۳۹۵)

شناسایی و کمّیت‌سنجی برخی ترکیب‌های فلاونوئیدی در تعدادی از بیوتیپ‌های مرکبات

مائده آهنکوب‌رو[۱*]، جواد فتاحی مقدم[۲] و رضا فتوحی قزوینی[۳]

۱*- نویسنده مسئول، فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: maedehahankob@yahoo.com

۲- استادیار، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران

۳- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

چکیده

بیوتیپ‌های طبیعی واقع در کلکسیون ژرم‌پلاسم پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور از ذخایر ژنتیکی باارزش در کشور است که شاید مناسب تازه‌خوری نباشند ولی قابلیت استفاده در صنایع فرآوری را دارند. به این منظور از میوه‌های ۱۶ بیوتیپ با کدهای ۶، ۸، ۱۵، ۲۱، ۲۴، ۲۵،۲۶، ۲۹، ۳۰، ۴۱، ۴۳، ۴۵، ۴۸، ۵۱، ۵۲ و ۵۳ از این کلکسیون در دو مرحله، ۶۰ روز پس از ۵۰٪ شکوفایی گل‌ها (بعد از ریزش خردادماه) و ۱۲۰ روز بعد از شکوفایی گل‌ها (آغاز بلوغ فیزیولوژی) نمونه‌برداری شد. علاوه‌بر اندازه‌گیری میزان فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، مقداری ترکیب‌های فلاونوئیدی شامل هسپریدین، نارینجین، کوئرستین و کاتچین نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار کاتچین و کوئرستین ۶۰ روز پس از ۵۰٪ شکوفایی گل‌ها و در بیوتیپ ۲۹ مشاهده شد. میزان هسپریدین و نارینجین در بین بیوتیپ‌ها روند متفاوتی داشت و بالاترین مقدار به‌ترتیب در بیوتیپ‌های ۴۳ و ۴۱ در ۱۲۰ روز بعد از گلدهی مشاهده شد. به‌طور کلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی طی رشد روند کاهشی داشت ولی بیوتیپ‌های ۶، ۲۹، ۴۳ و ۵۱ بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را ۶۰ روز پس از گلدهی داشتند. بالاترین میزان فنل کل در مرحله بلوغ میوه‌ها مشاهده شد. بیوتیپ با شماره ۴۸ بالاترین میزان فنل کل را نسبت به سایر بیوتیپ‌ها نشان داد. به‌طور کلی بیوتیپ‌های ۲۹، ۴۱ و ۴۳ دارای قابلیت بالایی از ترکیب‌های فلاونوئیدی هستند که می‌توانند در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی رقم و پایه، صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، بیوتیپ، فلاونوئیدها، فنل.

مقدمه

میوه‌های مرکبات به‌دلیل ویژگی‌های دارویی، تغذیه‌ای و آرایشی و همچنین به‌عنوان منابع غنی از اسیدسیتریک، فلاونوئیدها، فنل‌ها، پکتین‌ها، لیمونوئیدها، ویتامین C و غیره شناخته شده هستند (Kumar *et al.*, 2010). نارینجین، هسپریدین و نئوهسپریدین فلاوون‌های گلیکوزیدی هستند که تجمع آنها در گونه‌های مختلف مرکبات شناسایی شده است (Moulehi *et al.*, 2012). پژوهش‌های اپیدمیولوژی نشان می‌دهد که فلاونوئیدهای خوراکی مرکبات قادر به کاهش خطر بیماری‌های قلبی و عواملی که ساختمان و

www.SID.ir

Archive of SID

عملکرد بافت را دچار زوال می‌کنند (همانند آلزایمر، پارکینسون، دیابت و سرطان) هستند. به‌علاوه خواص ضدالتهاب بودن این ترکیب‌ها را به قابلیت ضدپراکسیداسیون چربی آنها ارتباط می‌دهند (Asjad *et al*., 2013؛ Rudge *et al*., 2012). همچنین ترکیب‌های سودمند مرکبات به‌دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی سبب خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن کاهش ابتلا به بیماری‌ها می‌شوند (Ramful *et al*., 2011). با گسترش آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همانند بوتیل هیدروکسی انیذول (BHA: Butylated hydroxyanisole) و ترتیری بوتیل هیدروکوئینون (TBHQ: tertiary butylhydroquinone) شناسایی و گسترش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در کنترل و کاهش رادیکال‌های آزاد حائز اهمیت است (Abd Ghafar *et al*., 2010).

پلی‌فنل‌ها ترکیب‌های مؤثر بسیاری از گیاهان دارویی را تشکیل می‌دهند و فعالیت آنزیم‌ها و گیرنده‌های سلولی وسیعی را تنظیم می‌کنند (Manach *et al*., 2004). علاوه‌براین، دارای ویژگی ضدجهشی، ضدمیکروبی، ضدویروسی، ضدحساسیت و ضدسرطان هستند (Lee *et al*., 2003؛ Hamauzu *et al*., 2008). نقش سودمند پلی‌فنل‌ها در سلامتی به‌دلیل اثر متقابل آنها با واکنش‌های سیگنالی بین سلولی و مکانیزم‌های مرتبط با عملکرد سلول است که در هر دو شرایط نرمال و یا تحت شرایط تنش مؤثر است (Vauzour *et al*., 2010).

مشخص کردن ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی و فنلی و ارتباط آن با حفظ کیفیت میوه در گسترش سلامت جامعه و توسعه صنایع تبدیلی مرکبات می‌تواند مهم باشد (Yi *et al*., 2008). فعالیت‌های شناخته شده فنل‌ها در انسان و گیاه و همچنین توجه به فعالیت بیولوژی آنها کافی است تا روشن شود که چرا باید استفاده از این ترکیب‌ها را در صنایع دارویی و غذایی مدیریت کرد (Valko *et al*., 2006).

ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی (فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و ویتامین C) در مرکبات تحت تأثیر واریته، اقلیم، عملیات کاشت و تغذیه است (Dhuique-Mayer *et al*., 2005؛ Lee & Kader, 2000). در پژوهشی که توسط Cano و همکاران (۲۰۰۸) بر روی رقم‌های مرکبات انجام شد، مشخص شد که مجموع دو ترکیب فلاونوئیدی هسپریدین و نارینجین در واریته‌های پرتقال در دامنه ۱۰۴/۸–۴۸/۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت میوه بود که در مقایسه با میزان این ترکیب در واریته‌های نارنگی (۶۰/۶–۱۳/۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) بالاتر بود. Hemmati (۲۰۰۳) با مقایسه شرایط محیطی شمال و جنوب کشور بر میزان فلاونوئیدهای مرکبات، دریافت که ترکیب‌های هسپریدین و نارینجین پوست مرکبات به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مکان کشت قرار داشت، در حالی‌که میزان هسپریدین مرکبات شمال کشور بیشتر از مرکبات جنوب بود. Salas و همکاران (۲۰۱۱) اثر چند فلاونوئید ازجمله هسپریدین، نارینجین و نئوهسپریدین استخراج شده از میوه‌های ریزش کرده و نارس گریپ‌فروت، پرتقال و نارنج را روی تعدادی از قارچ‌های مربوط به مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که ترکیب‌های فلاونوئیدی خاصیت ضد قارچی دارند. شدت فعالیت این ترکیب‌ها به نوع فلاونوئید و نوع قارچ بستگی داشت.

در ایران علاوه‌بر ارقام تجاری مرکبات که میوه آنها بیشتر به صورت تازه‌خوری مصرف می‌شود، بیوتیپ‌های زیادی از مرکبات نیز در شمال و جنوب کشور وجود دارد که تنوع ترکیبی آنها شناخته شده نیست. در طی دهه‌های اخیر با تلاش پژوهشگران پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور (رامسر)، تعدادی از این بیوتیپ‌ها جمع‌آوری شده و در کلکسیون‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. ارزیابی‌های انجام شده در این کلکسیون به‌طور عمده معطوف به مطالعات ژنتیکی و مورفولوژی بوده‌است و اطلاعات دقیقی از ترکیب‌های بیوشیمیایی آنها در دسترس نیست. به‌دلیل وجود منابع ژنتیکی بومی مرکبات در ایران، شناسایی این منابع و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنها می‌تواند برای استفاده در صنایع تبدیلی، دارویی، غذایی و استفاده در برنامه‌های اصلاحی رقم و پایه سودمند باشد. در این پژوهش برای اولین بار میزان فنل،

www.SID.ir

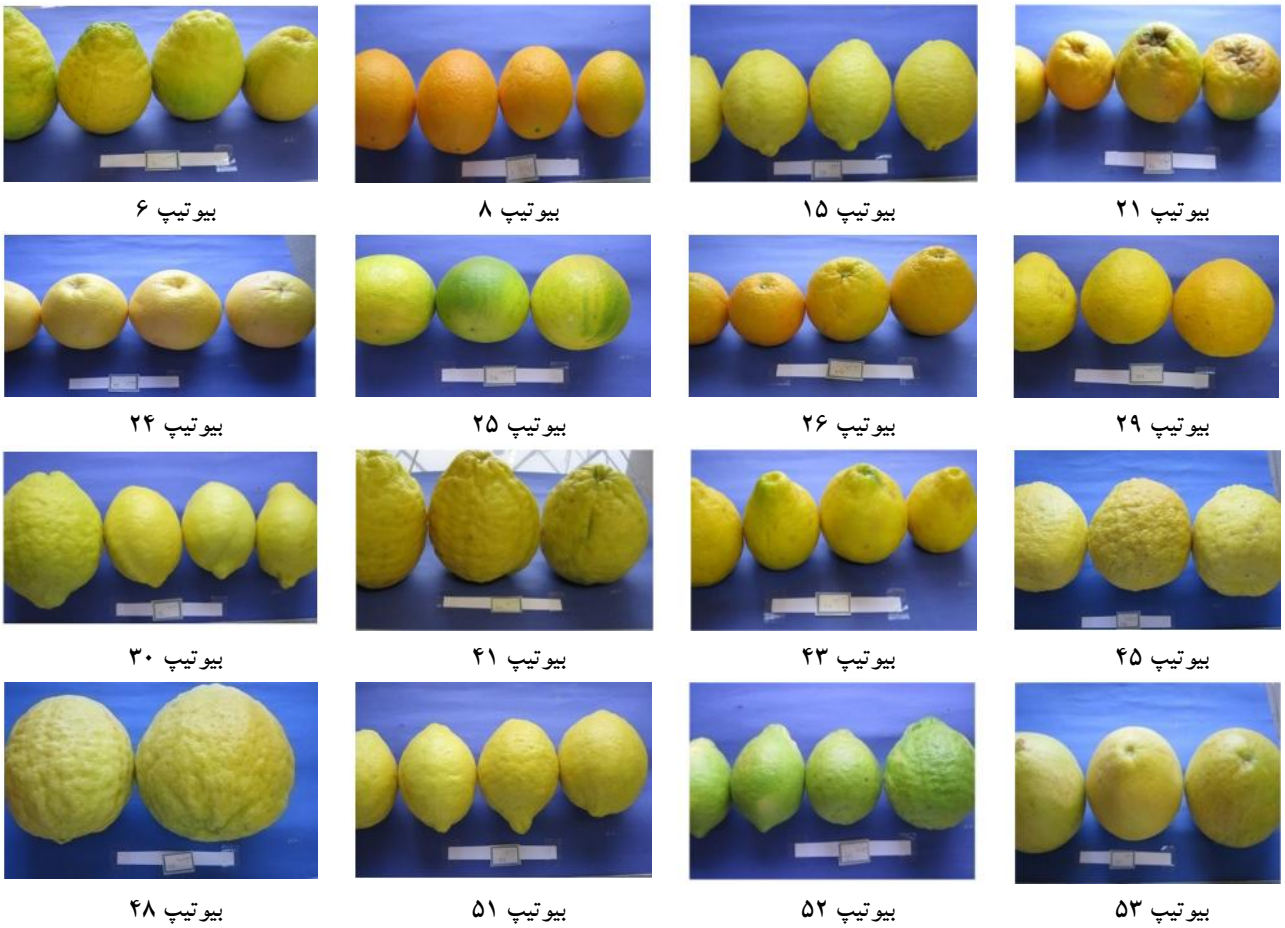
Archive of SID

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و برخی از ترکیب‌های فلاونوئیدی در میوه تعدادی از بیوتیپ‌های مرکبات در دو مرحله از رشد (۶۰ و ۱۲۰ روز پس از ۵۰٪ شکوفایی گل‌ها) با هدف شناخت توانمندی‌های دارویی و تغذیه‌ای آنها مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این آزمایش از میوه‌های ۱۶ بیوتیپ با کدهای ۶، ۸، ۱۵، ۲۱، ۲۴، ۲۵، ۲۹، ۳۰، ۲۶، ۴۱، ۴۳، ۴۵، ۴۸، ۵۱، ۵۲ و ۵۳ موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقاتی کترا وابسته به پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور (رامسر) استفاده شد (شکل ۱). برای هر بیوتیپ سه درخت بارور پیوندی روی پایه نارنج (به‌عنوان سه تکرار) که دارای شرایط رشدی و نگهداری یکسان بودند، در نظر گرفته شد. از هر تکرار ۱۵ عدد میوه از جهات مختلف درخت و به‌صورت یکنواخت در دو مرحله رشدی میوه تهیه شد. مرحله اول ۶۰ روز پس از ۵۰٪ شکوفایی گل‌ها (بعد از ریزش خردادماه) و مرحله دوم ۱۲۰ روز پس از ۵۰٪ شکوفایی (آغاز بلوغ فیزیولوژی) بود. پس از شستن میوه‌ها با آب از بافت قسمت استوای میوه نمونه گرفته و به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.



شکل ۱- میوه بیوتیپ‌های مورد استفاده در این آزمایش

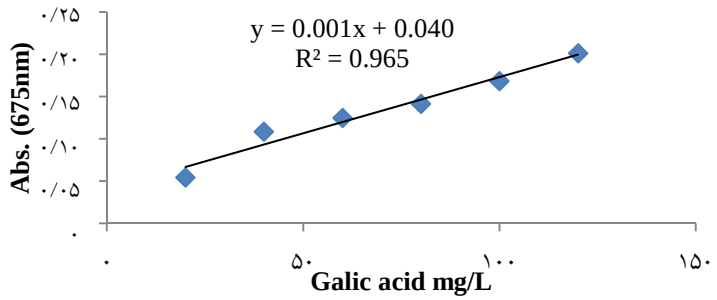
www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری فنل کل

به‌منظور استخراج ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی از حلال متانول خالص استفاده شد. نمونه‌ها با نسبت ۱:۳ به‌صورت تمام شب در داخل حلال قرار داده شد. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. قسمت شناور نمونه‌ها را به آرامی با سمپلر برداشته و در میکروتیوپ‌های درب‌دار و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

میزان فنل کل با روش Folin-Ciocalteu اندازه‌گیری شد (Meyers *et al.*, 2003). در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی بافت میوه با ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰٪ مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه ۲۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۷٪ به آن اضافه و محلول حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق (۲۰°C) نگهداری شد. بعد از این مدت میزان جذب محلول در طول موج ۶۷۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر نانو دراپ (Nano Drop (Model ND-1000; USA قرائت شد. میزان فنل کل از روی منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم نمونه تازه در سه تکرار ثبت شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی و رابطه خط جذب غلظت‌های مختلف محلول استاندارد گالیک اسید

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از طریق مهار رادیکال آزاد DPPH (۲و۲- دی‌فنیل- ۱- پیکریل هیدرازیل) توسط عصاره تعیین شد (Fattahi Moghadam *et al.*, 2012). عصاره میوه تا ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق و بعد ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۵ میلی‌مولار به ۲۵ میکرولیتر از عصاره اضافه شد. واکنش عصاره و DPPH بعد از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۰°C) و در غیاب نور کامل شد. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به‌صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Antioxidant activity (\%DPPHSce)} = [(A_C-A_S)/A_C] \times ۱۰۰$$

در این رابطه، A_C به‌عنوان جذب، DPPH به‌عنوان کنترل و A_S جذب نمونه به همراه DPPH بود. از متانول به‌عنوان بلانک استفاده شد.

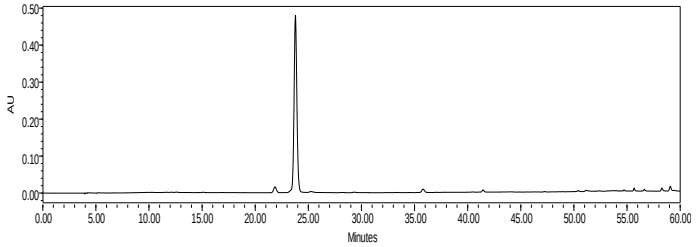
اندازه‌گیری نارینجین، هسپریدین، کوئرستین و کاتچین به روش تجزیه HPLC

برای اندازه‌گیری ترکیب‌های فلاونوئیدی (نارینجین، هسپریدین، کوئرستین و کاتچین) از روش HPLC استفاده شد. سیستم مورد استفاده مدل Waters 1525 با پمپ نوع Binary و دتکتور با مشخصات Waters 2487, Dual λ Absorbance بود. نرم‌افزار نصب شده روی سیستم به نام Breeze version 3:20 بود. ستون این سیستم به طول ۱۷۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر با منافذی به اندازه ۵ میکرومتر بود. حلال A شامل آب و حلال B شامل متانول بود. روش کار به‌صورت

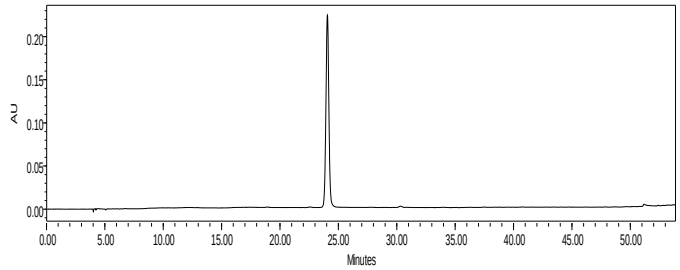
www.SID.ir

Archive of SID

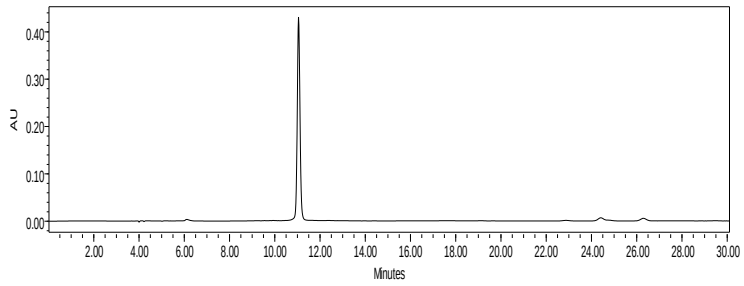
حلال با سرعت جریان ۱ میلی‌متر در دقیقه در دو طول موج ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر تعریف شد. حجم تزریقی برابر ۵۰ میکرولیتر بود (Fattahi Moghadam, 2011). برای تهیه محلول استاندارد به ۰/۵ میلی‌گرم از هر استاندارد ۱ میلی‌لیتر از حلال استخراج مورد استفاده اضافه شد (شکل‌های ۳، ۴، ۵ و ۶). در مورد استاندارد هسپریدین قبل از استفاده از متانول، با حلال DMSO حل شد. محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها با استفاده از فیلتر سرنگی فیلتر شدند.



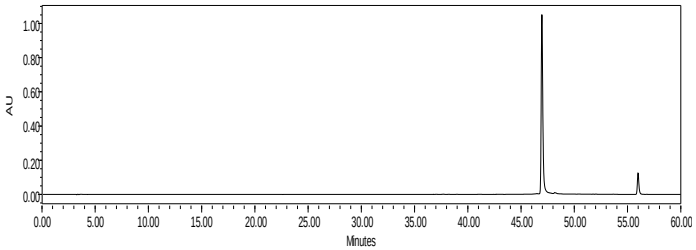
شکل ۳- کروماتوگرام استاندارد هسپریدین



شکل ۴ – کروماتوگرام استاندارد نارینجین



شکل ۵- کروماتوگرام استاندارد کاتچین



شکل ۶- کروماتوگرام استاندارد کوئرستین

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز آماری داده‌ها

پس از آزمون نرمالیزاسیون و اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، داده‌های مربوط به فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ با استفاده از آزمون اسپلیت پلات معمولی در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی (در سطح احتمال ۵٪) محاسبه شد. داده‌های مربوط به کمّیت‌سنجی ترکیب‌های فلاونوئیدی بر اساس درصد محاسبه و نتایج به‌صورت نمودار ترسیم شد.

نتایج

مقایسه میانگین میزان ترکیب‌های فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بیوتیپ‌های مرکبات

با مقایسه فنل کل در دو مرحله رشدی مشخص شد که بیوتیپ ۴۸ بالاترین (۰/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) میزان فنل کل را در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی نشان داد. بیوتیپ ۵۱ در مرحله بعد از ریزش خرداد با میانگین ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه، کمترین میزان فنل کل را در بین بیوتیپ‌ها داشت. بجز بیوتیپ ۸ در سایر بیوتیپ‌ها در هر دو مرحله نمونه‌گیری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۷).

به‌طور کلی تمام بیوتیپ‌ها بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در مرحله بعد از ریزش خرداد داشتند. بیوتیپ ۶ با میانگین ۹۲/۲۲٪ بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در مرحله بعد از ریزش خرداد نشان داد. هر چند با بیوتیپ‌های ۲۹، ۴۳ و ۵۱ اختلاف معنی‌داری نداشت. بیوتیپ ۴۵ در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی با میانگین ۲۳/۵۴٪ کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را داشت. بجز بیوتیپ ۸، ۲۶ و ۴۱ سایر بیوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری از نظر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دو مرحله از رشد داشتند (شکل ۸).

بررسی میزان فلاونوئیدهای نارنجین، هسپریدین، کوئرستین و کاتچین در بیوتیپ‌های مرکبات

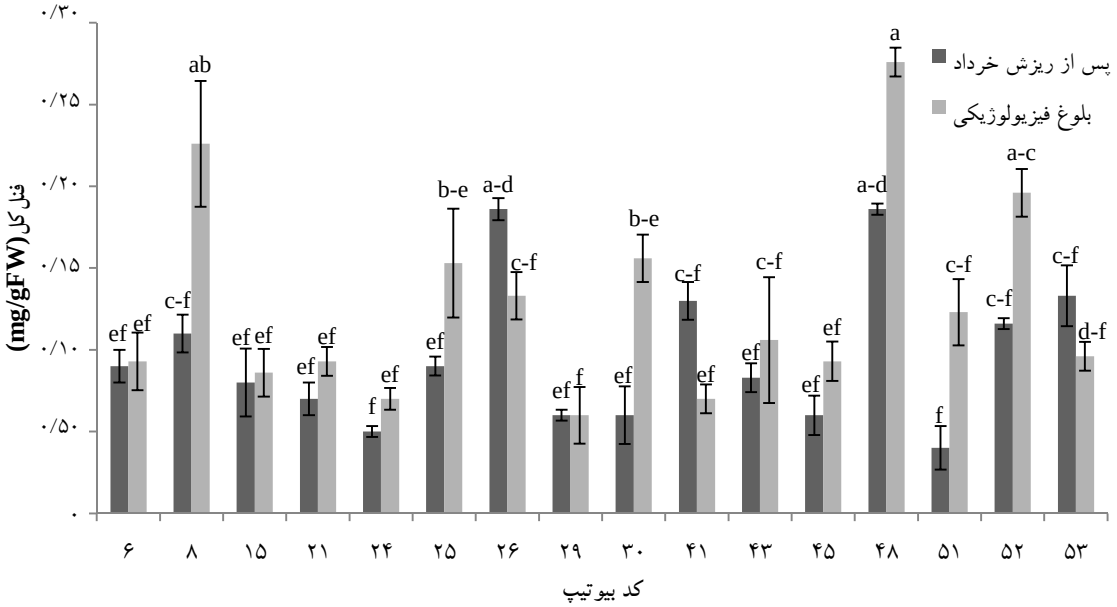
نتایج نشان داد که میزان هسپریدین در بین بیوتیپ‌ها در دو مرحله از رشد بسیار متفاوت بود (شکل ۹). میزان هسپریدین در بیشتر بیوتیپ‌ها در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی تا حدودی افزایش نشان داد که بیشترین آن مربوط به بیوتیپ ۴۳ و ۴۱ به‌ترتیب با مقدار ۳/۱۳٪ و ۰/۹۳٪ بود که نسبت به سایر بیوتیپ‌ها در زمان آغاز بلوغ فیزیولوژی در سطح بالایی قرار داشت (شکل ۱۰). ترکیب فلاونوئیدی نارینجین در تعدادی از بیوتیپ‌ها در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی افزایش یافت (شکل ۱۱). در این میان بیوتیپ ۴۱ با ۹/۴۷٪ و بیوتیپ ۲۶ با ۰/۹۹٪ بیشترین مقدار نارینجین را در آغاز بلوغ فیزیولوژی نشان دادند (شکل ۱۲).

مقدار کاتچین در بیشتر بیوتیپ‌ها در مرحله بعد از ریزش خرداد دارای بالاترین مقدار بود و مقدار آن در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی کاهش زیادی را نشان داد (شکل ۱۴). بیوتیپ ۲۹ با ۴/۲۴٪ بیشترین مقدار کاتچین را به خود اختصاص داد (شکل ۱۳).

ترکیب فلاونوئیدی کوئرستین در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی در بیشتر بیوتیپ‌ها تا حدودی کاهش یافت (شکل ۱۶) و بیشترین مقدار این ترکیب در مرحله پس از ریزش خرداد و در بیوتیپ ۲۹ با میزان ۰/۰۳۷٪ بود (شکل ۱۵).

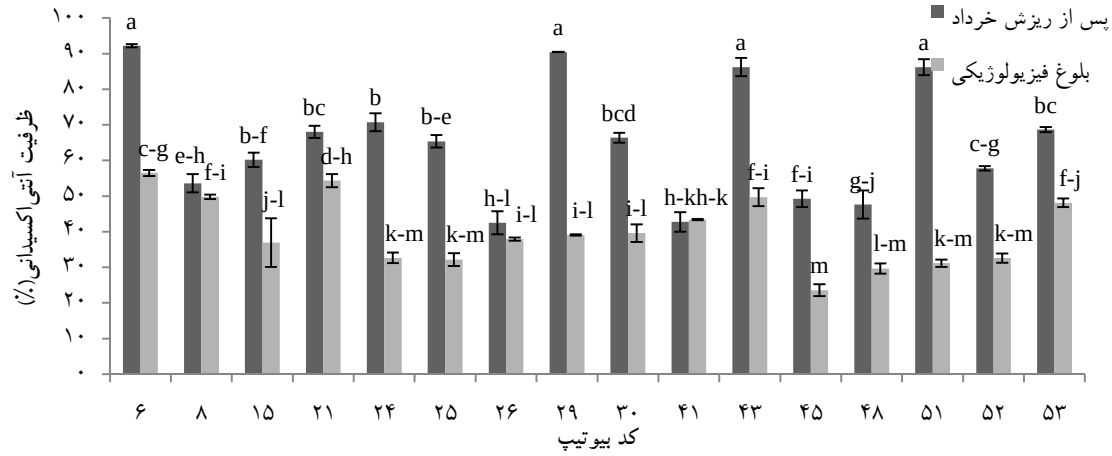
www.SID.ir

Archive of SID



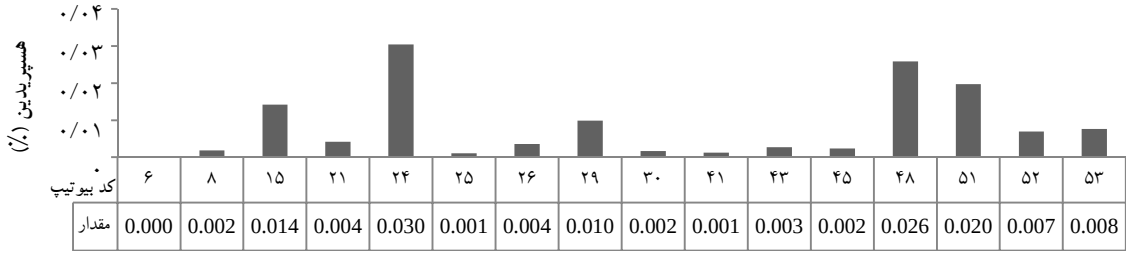
شکل ۷- میزان فنل کل در دو مرحله رشدی بعد از ریزش خرداد و بلوغ فیزیولوژی

حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر ندارند.



شکل ۸- میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دو مرحله رشدی بعد از ریزش خرداد و بلوغ فیزیولوژی

حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر ندارند.

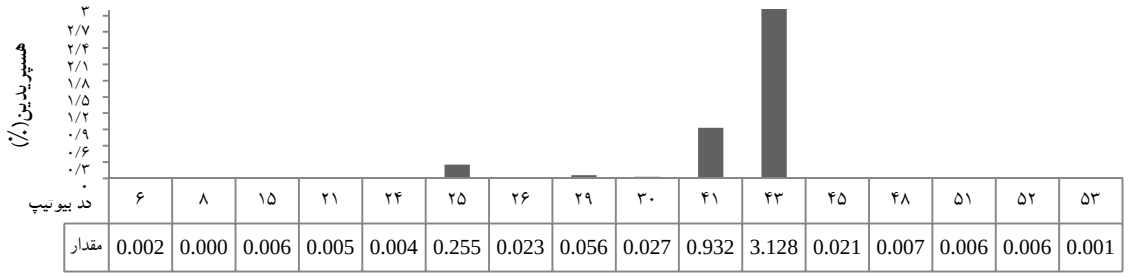


کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.000	0.002	0.014	0.004	0.030	0.001	0.004	0.010	0.002	0.001	0.003	0.002	0.026	0.020	0.007	0.008

شکل ۹- میزان هسپریدین در مرحله پس از ریزش خرداد

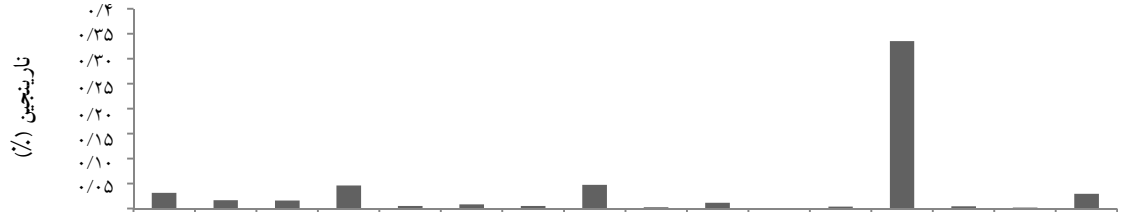
www.SID.ir

Archive of SID



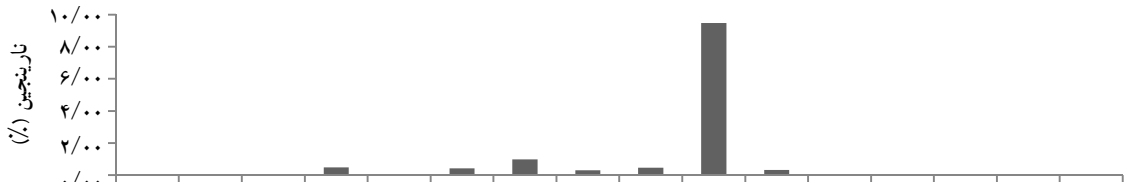
کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.002	0.000	0.006	0.005	0.004	0.255	0.023	0.056	0.027	0.932	3.128	0.021	0.007	0.006	0.006	0.001

شکل ۱۰- میزان هسپریدین در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی



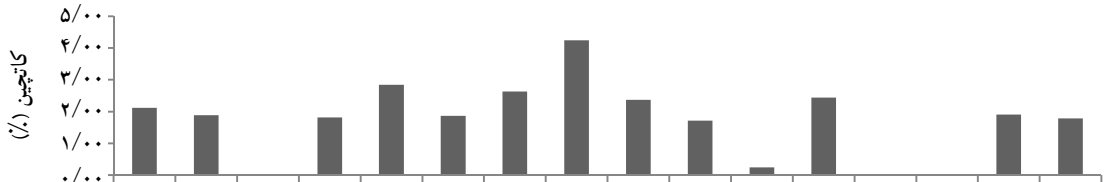
کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.031	0.016	0.016	0.046	0.005	0.008	0.005	0.047	0.002	0.011	0.000	0.004	0.335	0.004	0.002	0.029

شکل ۱۱- میزان نارینجین در مرحله پس از ریزش خرداد



کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.01	0.01	0.00	0.46	0.00	0.41	0.98	0.29	0.46	9.47	0.32	0.01	0.01	0.00	0.00	0.03

شکل ۱۲- میزان نارینجین در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی

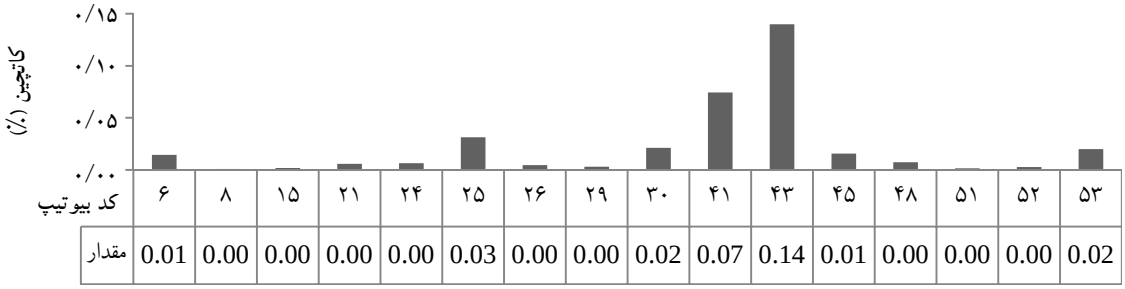


کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	2.11	1.88	0.01	1.81	2.84	1.86	2.63	4.24	2.36	1.71	0.24	2.43	0.01	0.00	1.90	1.78

شکل ۱۳- میزان کاتچین در مرحله پس از ریزش خرداد

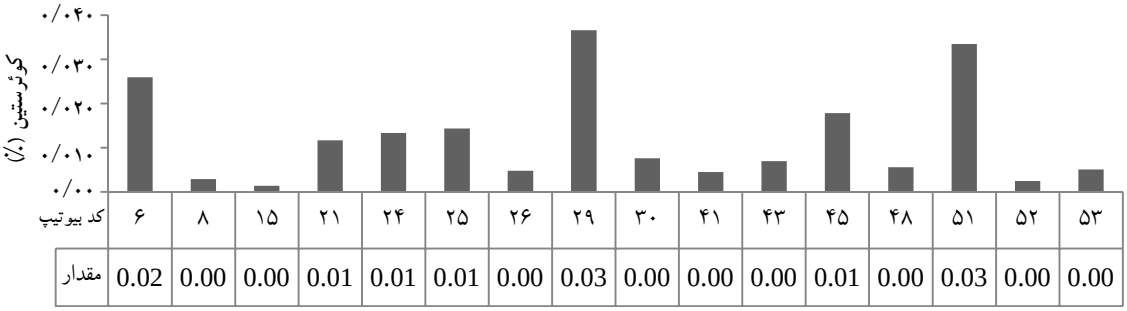
www.SID.ir

Archive of SID



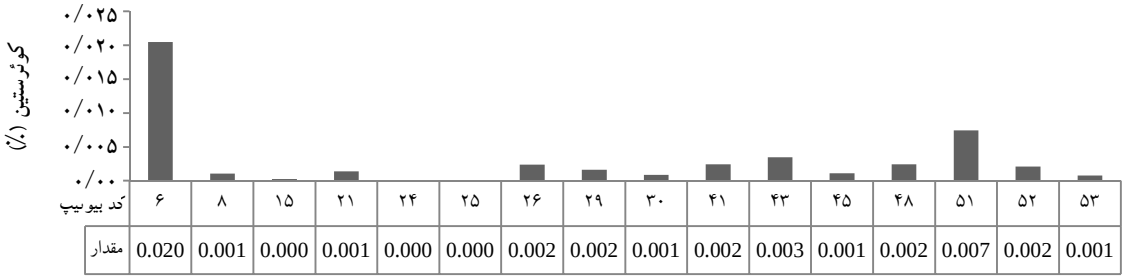
کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.02	0.07	0.14	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02

شکل ۱۴- میزان کاتچین در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی



کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00

شکل ۱۵- میزان کوئرستین در مرحله پس از ریزش خرداد



کد بیوتیپ	۶	۸	۱۵	۲۱	۲۴	۲۵	۲۶	۲۹	۳۰	۴۱	۴۳	۴۵	۴۸	۵۱	۵۲	۵۳
مقدار	0.020	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.002	0.002	0.001	0.002	0.003	0.001	0.002	0.007	0.002	0.001

شکل ۱۶- میزان کوئرستین در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی

بحث

تعیین میزان فنل کل میوه در مرکبات بیشتر در ارقام تجاری مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا Jang و همکاران (۲۰۱۰) میزان فنل کل را در پوملو ۰/۲۱۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در پوست گزارش کردند. همچنین Gorinstein و همکاران (۲۰۰۱) میزان فنل کل در پوست ارقام لمون، پرتقال و گریپ‌فروت را به‌ترتیب ۱/۹، ۱/۸ و ۱/۶ میلی‌گرم در گرم گزارش کردند.

تغییر فنل کل طی مراحل رشدی میوه مرکبات نیز مورد توجه برخی محققان بوده است. بر این اساس Menichini و همکاران (۲۰۱۱) مقدار فنل کل در مزوکارپ و اندوکارپ بالنگ را در حالت نارس (۱۸۱/۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه تازه) بیشتر از زمان رسیدن (۲۶۲/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه تازه) آن بیان کردند. مقدار گزارش شده در این پژوهش کمتر از نتایج بدست‌آمده توسط سایر محققان بود. Fattahi Moghadam و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تغییر میزان فنل کل شش رقم از مرکبات طی رسیدن گزارش کردند که میزان فنل کل با توجه به نوع رقم طی رسیدن میوه تغییر کرد. به‌طور کلی میزان فنل کل در میوه‌های بالغ و رسیده بالاتر بود. بنابراین به نظر می‌رسد برحسب ژنوتیپ،

www.SID.ir

Archive of SID

فنل کل بیوتیپ‌ها در مراحل مختلف نمو میوه روند متفاوتی را نشان می‌دهند.

در این پژوهش مشخص شد که میوه‌های نارس ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشتند. به‌طور مشابه Rekha و همکاران (۲۰۱۲) نیز دریافتند که عصاره چهار رقم مرکبات (لیمو، نارنج، پرتقال و نارنگی) در زمانی که نارس بودند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به زمان رسیده داشتند.

در پژوهشی با استفاده از چند روش تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اقدام به تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چند رقم نارنگی نارس شد. نتایج نشان داد که ترکیب‌های فنلی شامل فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی از عوامل مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه‌ها (مشترک در همه روش‌های تعیین آنتی‌اکسیدانی) بود (Ye *et al*., 2011).

وجود رابطه قوی ترکیب‌های فلاونوئیدی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پژوهش‌های مختلفی بیان شده است (Heim *et al*., 2002؛ Menichini *et al*., 2011؛ Mäkynen *et al*., 2013). بالا بودن برخی از ترکیب‌های فلاونوئیدی در مرحله بعد از ریزش خرداد می‌تواند دلیلی بر بالا بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیوتیپ‌ها در این زمان باشد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند تحت تأثیر عواملی مانند درجه رسیدن میوه، ژنوتیپ، روش‌های کشت، شرایط آب و هوایی در طی دوره نمو میوه و همچنین فرایندهای پس از برداشت باشد (Tavarini *et al*., 2008؛ Del Caro *et al*., 2004).

در پژوهشی که بر روی بالنگ انجام شد ترکیب‌های فلاونوئیدی در بخش‌های گل، برگ و میوه (مزوکارپ و اندوکارپ) این گیاه در دو مرحله از رسیدن اندازه‌گیری شد. فلاونوئیدهای مورد بررسی در این پژوهش شامل نارینجین، هسپریدین، هسپرتین، روتین، کوئرستین، دیوزمین و اپی‌ژنین بود. مقدار نارینجین، هسپریدین و کوئرستین در مرحله نارس این میوه در بخش مزوکارپ به‌ترتیب ۵۵۶، ۲۶ و ۱۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تازه (برابر ۰/۰۵۶، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱ درصد) بود. مقدار هسپریدین و کوئرستین در گل‌ها بسیار بیشتر (۲۲۴/۳ و ۵۸۰/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تازه) از میزان آن در میوه بود (برابر ۰/۰۲۲٪ و ۰/۰۵۸٪). همچنین نارینجین فقط در بخش مزوکارپ میوه نارس مشاهده شد (Menichini *et al*., 2011). در این پژوهش میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی بیوتیپ‌های مورد بررسی بسیار بالاتر از گزارش‌های مشابه بود، به‌طوری که اهمیت این بیوتیپ‌ها را به‌صورت بالقوه با هدف استخراج این ترکیب‌های ارزشمند نشان می‌دهد.

Ramful و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی پوست ۲۱ واریته از مرکبات در زمان رسیدن میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی همانند هسپریدین را بین ۲۳۴–۸۳ میلی‌گرم در گرم وزن تازه (برابر ۰/۰۲۳٪ و ۰/۰۰۸٪) بیان کردند. همچنین در این پژوهش نارینجین فقط در یک رقم نارنگی با میزان ۱۹/۴۹ میلی‌گرم در گرم وزن تازه (۰/۰۰۲٪) مشاهده شد. سایر ترکیب‌های فلاونوئیدی اندازه‌گیری شده شامل: پونسیرین، رویفولین، دیدایمین، روتین، دیوزمین و ایزورویفولین بود. در این پژوهش میزان هسپریدین بیوتیپ‌ها بسیار کمتر از مقدار گزارش شده بود، ولی در مقابل مقدار نارینجین بیوتیپ ۴۱ (۹/۴۷٪) بیشتر از مقدار گزارش شده بالا بود. به نظر می‌رسد عوامل ژنتیکی و محیطی می‌تواند تأثیر زیادی روی نوع و غلظت ترکیب‌های فلاونوئیدی داشته باشد (Federica & Sergio, 2005).

Ghorbani و Bakhshi (۲۰۱۳) با بررسی فلاونوئیدهای چند رقم سیب ایرانی و خارجی میزان کاتچین را در دامنه ۰/۰۲۴٪–۰/۰۰۲٪ بیان کردند. با اینکه میوه سیب یکی از میوه‌های شناخته شده در زمینه مقدار بالای کاتچین است ولی نتیجه قابل توجه این پژوهش، این بود که مقدار این ترکیب فلاونوئیدی در بین بیوتیپ‌های مورد بررسی بسیار بالاتر از میزان گزارش شده در سیب بود.

در پژوهشی روی سه رقم لیمو و در سه مرحله از رشد (مرحله میوه‌نشینی، ۳۰ روز بعد از باز شدن گل‌ها و ۱۵۰ روز بعد از باز شدن گل‌ها) مشخص شد که مقدار هسپریدین در مرحله اول کم، سپس در مرحله دوم افزایش زیادی داشت و در مرحله سوم کاهش یافت. به‌دلیل تنوعی که در بیوتیپ‌ها وجود داشت مقدار هسپریدین در تعدادی از

www.SID.ir

Archive of SID

بیوتیپ‌ها در مرحله اول کم و بعد در مرحله دوم افزایش یافت (بیوتیپ‌های ۲۵، ۴۱ و ۴۳)، البته در تعدادی از بیوتیپ‌ها میزان هسپریدین در مرحله دوم کاهش یافت. این روند افزایشی و کاهشی در مقدار این فلاونوئید می‌تواند به‌دلیل غیرفعال شدن آنزیم‌های دخیل در واکنش‌های شرکت کننده در تولید این ترکیب باشد (Del Rio *et al*., 2004). Omidbeigi و Hemmati (۲۰۰۵) در پژوهش خود افزایش سریع فلاونوئیدها را در مراحل اولیه رشد، به‌دلیل نقش عمده این ترکیب‌ها در بیان ژن و نسخه‌برداری DNA بیان کردند.

به‌طور کلی میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی همانند کاتچین و کوئرستین در همه بیوتیپ‌ها در مرحله پس از ریزش خرداد نسبت به آغاز بلوغ فیزیولوژی بالاتر بود. میزان هسپریدین و نارینجین طی دو مرحله از رشد روند متفاوتی داشت و بالاترین میزان این دو ترکیب در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی مشاهده شد. در این میان بیوتیپ ۲۹ در مرحله بعد از ریزش خرداد بالاترین مقدار کاتچین و کوئرستین را داشت. بیوتیپ‌های ۴۱ و ۴۳ به‌ترتیب بالاترین نارینجین و هسپریدین را در مرحله آغاز بلوغ فیزیولوژی داشتند. با این‌حال به‌نظر می‌رسد در مقایسه با ارقام تجاری سطح ترکیب‌های فلاونوئیدی در بیوتیپ‌های طبیعی مرکبات بالاست که می‌تواند ارزشمند باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری باید گفت که با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش مبنی بر بالا بودن ترکیب‌های فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا در بیوتیپ‌های ۶، ۲۹، ۴۱، ۴۳ و ۵۱، مشخص شد که این بیوتیپ‌ها می‌توانند یک منبع خوب و مناسب برای فراهم کردن ماده اولیه در صنایع غذایی و دارویی با هدف استخراج این ترکیب‌ها و یا استفاده در برنامه اصلاح ژنتیکی و ایجاد ارقام و پایه‌های جدید مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارشناسان آزمایشگاه و کلکسیون پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور (رامسر) آقایان مهندس کاظم نجفی و مهندس حشمت خانجانی قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abd Ghafar, M.F., Nagendra Prasad, K., Weng, K.K. and Ismail, A., 2010. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from citrus species. African Journal of Biotechnology, 9(3): 326-330.
- Asjad, H.M.M., Akhtar, M.S., Bashir, S., Din, B., Gulzar, F., Khalid, R. and Asad, M., 2013. Phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of six common Citrus plants in Pakistan. Journal of Pharmaceutical and Cosmetic Sciences, 1: 1-5.
- Cano, A., Medina, A. and Bermajo, A., 2008. Bioactivecompounds in differentcitrus varieties. discrimination among cultivars. Journal of Food Composition and Analysis, 21: 377-381.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V. and Agabbio, M., 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. Food Chemistry, 84: 99-105.
- Del Río, J.A., Fuster, M.D., Gómez, P., Porras, I., García-Lidón, A. and Ortuño, A., 2004. *Citrus limon*: a source of pharmaceutical interest. Food Chemistry, 84: 457-461.
- Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F. and Amito, M.J., 2005. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 2140-2145.
- Fattahi Moghadam, J., Hamidoghli, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Ghasemnejad, M. and Bakhshi, D., 2012. Determination of suitable harvesting time based on fruit bioactive compounds and antioxidant capacity in some citrus cultivars. Journal of Horticultural Science and Technology, 12(4): 355-368.
- Fattahi Moghadam, J., 2011 Optimize the antioxidant capacity of different varieties of citrus fruit quality. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture Guilan unervisity. Rasht, Iran.
- Federica, D.L. and Sergio, F.D.B., 2005. Citrus flavonoids as bioactive compounds: role, bioavailability, socio-economic impact and biotechnological approach for their modification. 90th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: Ten Years Later Ravello (Itally), 6-10 July.

www.SID.ir

Archive of SID

antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flower, leaves and fruits at two maturity stages. Food and Chemical Toxicology, 49: 1549-1555.
- Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P. and Liu, R.H., 2003.Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 6887-6892.
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I. and Saidani Tounsi, M., 2012. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate* Blanco.) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. Industrial Crops and Products, 39: 74-80.
- Omidbeigi, R. and Hemmati, K., 2005. A study of the variations of hesperidin flavonoid during fruit development of local mandarin (*Citrus reticulate* Blanco.). Scientific Journal of Agriculture, 28(1): 90-100.
- Ramful D., Tarnus, E., Aruoma, O.I., Bourdon, E. and Bahorun, T., 2011. Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. Food Research International, 44: 2088-2099.
- Ramful, D., Bourdon, T., Bourdon, E., Tarrnus, E. and Aruoma, O.I., 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian Citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. Toxicology, 278: 75-87.
- Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Pavithra Devi, J., Vijay Kumar, H.T. and Prashith Kekuda, T.R., 2012. Ascorbic asid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe Citrus fruits. Chemical Science Transactions, 1(2): 303-310.
- Rudge, H., Aparecida, T. and Ines, M., 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. Food Chemistry, 134: 1892-1898.
- Salas, M.P, Celiz, G., Geronazzo, H., Daz, M. and Resnik, S.L., 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. Food Chemistry, 124: 1411-1415.
- Tavarini, S., Innocenti, E.D., Remorini, D., Massai, R. and Guidi, L., 2008 Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. Food Chemistry, 107: 282-288.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and
- Ghorbani, E. and Bakhshi, D., 2013. Evaluation of content of chlorogenic asid flavonoids and antioxidant potential of 13 native and foreign apple cultivars. Plant Production Technology, 11(2): 53-62
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A. and Ciz, M., 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. Food Chemistry, 74: 309-315.
- Hamauzu, Y., Irie, M., Kondo, M. and Fujita, T., 2008. Antiulcerative properties of crude polyphenols and juice of apple and Chinese quince extracts. Journal of Food Chemistry, 108: 488-495.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572-584.
- Hemmati, K., 2003. The impact of weather and harvest time on quantitative and qualitative characteristics of varieties of citrus flavonoids. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- Jang, H.D., Chang, T.C. and Hsu, C.L., 2010. Antioxidant potentials of buntan pumelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its ethanolic and acetified fermentation products. Food Chemistry, 118: 554-558.
- Kumar, S., Narayan Jena, S. and Nair, N.K., 2010. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. Scientia Horticulturae, 123: 350-359.
- Lee, J., Koo, N. and Min, D.B., 2003. Reactive oxygene species, aging and antioxidative nutraceuticals. Comprehennsive Reviews in Food Science and Food Safety, 3: 21-33.
- Lee. S.K. and Kader, A.A., 2000. Preharvest and postharvest factor influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20: 207-220.
- Mäkynen, K., Jitsaardkul, S., Tachasamran, P., Sakai, N., Puranachoti, S., Nirrojsinlapachai, N., Chattapat, V., Caengprasath, N., Ngamukote, S. and Adisakwattana, S., 2013. Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. Food Chemistry, 139: 735-743.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal Clinical Nutrition, 79: 727-747.
- Menichini, F., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Conforti, F., Luca, D.D., Statti, G.A., Cindio, B.D., Menichini, F. and Tundis, R., 2011. Phytochemical profile,

www.SID.ir

Archive of SID

antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160: 1-40.

- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J. and Spencer, J.P.E., 2010. Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. Nutrients, 2: 1106-1131.
- Ye, X.Q., Chu, J.C., Liu, D.H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., Wu, D., Xu, J.G. and Kakuda, Y., 2011. Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. Food Chmistry, 124: 1561-1566.
- Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y. and Zeng, B., 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. Food Science and Technology, 41: 597-603.

www.SID.ir

Archive of SID

Identifying and assaying the quantity of flavonoid compounds in some citrus biotypes

M. Ahankoub Ro[1*], J. Fattahi Moghadam[2] and R. Foutohi Ghazvini[3]

1*- Corresponding author, M.Sc. Graduate student, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, Iran, E-mail: maedehahankob@yahoo.com
2- Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran.
3- Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, Iran

April: August 2015 Revised: December 2015 Accepted: January 2016

Abstract

The natural biotypes in the germplasm collection of the Citrus and Subtropical Fruits Research Center are a valuable genetic resource in the country that may not be suitable for fresh eating but they can be used in processing industry. Therefore, the fruits of 16 biotypes, coded as 6, 8, 15, 21, 24, 25, 26, 29, 30, 41, 43, 45, 48, 51, 52 and 53, were harvested at two stages, 60 days after 50% of flowering (after June drop) and 120 days after 50% of flowering (beginning of physiological maturity). Some variables were measured such as total phenol and antioxidant capacity, and flavonoid compounds including hesperidin, naringin, quercetin and catechin content. Results showed that the maximum amount of catechin and quersetin was observed at 60 days after 50% of flowering in the biotype 29. The amount of Hesperidin and Naringin was significantly different between biotypes. The highest amount of hesperidin and naringin was observed in biotypes 43 and 41 at 120 days after flowering, respectively. Generally, antioxidant capacity was reduced during of growth whereas biotypes 6, 29, 43, and 51 had the highest antioxidant capacity at 60 days after flowering. The highest total phenol content was observed at maturity stage of fruits. Biotype 48 showed higher amount of total phenol as compared with other biotypes. Totally, biotypes 29, 41, and 43 have high potential of flavonoid compounds to be used in the genetic improvement programs of cultivar and rootstock, food processing and pharmaceutical industry.

Keywords: Antioxidant capacity, biotype, flavonoids, phenol.

www.SID.ir