



Investigation of Triterpenic Acid Diversity in jujube *Ziziphus jujuba* Mill. from Various Habitats in Iran

Zhaleh Khoshshima¹, Amir Abdollah Mehrdad Sharif,^{1*} , Ahmad Akrami¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, Email: a_sharif@mail.iau-tnb.ac.ir

Article type:

Research article

Abstract

Triterpenic acids, specifically Betulinic, Oleanolic, and Ursolic acids, are essential bioactive compounds found in jujube *Ziziphus jujuba mill.* fruit, possessing therapeutic properties for various diseases, including cancer. However, the amount of these triterpenic acids can vary depending on geographical and cultivation conditions. For this purpose, jujubes grown in orchards of 29 different habitats in different provinces located in the east, northeast, south, center, and west of Iran were sampled at the end of the summer season. The triterpenic acids present in the dried jujube powder were extracted using 96% ethanol as a solvent, with a liquid-to-solid ratio of 15 mL/g, under ultrasonic waves at a temperature of 40 °C for 35 minutes. The extracted acids were quantified using high-performance liquid chromatography coupled with a UV detector. The obtained data were subjected to subsequent nested analysis and the Tukey test. The results revealed that only the average amount of betulinic acid significantly varied among the ecotypes. Furthermore, a hierarchical cluster analysis based on the diversity of these three triterpenic acids, the studied ecotypes were divided into four clusters. Cluster 1, representing Iran's eastern and northeastern regions, exhibited the highest amounts of these triterpenic acids. However, the analysis of variance among the clusters showed no significant difference among them. The results showed that the climatic conditions, soil quality, seed, and agricultural methods can be effective in changing or not changing the amounts of triterpenic acids in jujube.

Article history

Received: 04-04-2023

Revised: 15-05-2023

Accepted: 27-06-2023

Keywords

Betulinic acid
Oleanolic acid
Ursolic acid
ultrasonic wave
hierarchical cluster analysis

Cite this article as: Khoshshima, Zh., Mehrdad Sharif, Amir Abdolah; Akrami, A. (2023). Investigation of Triterpenic Acid Diversity in jujube *Ziziphus jujuba* Mill. from Various Habitats in Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.*, 11(4): 106-116.



©The author(s)

Doi:

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

Dor:



بررسی تنوع اسیدهای تری ترپنیک موجود در عناب *Ziziphus jujuba* Mill. از رویشگاه‌های مختلف ایران

ژاله خوش سیما^۱، امیر عبدالله مهرداد شریف^{۱*} (ID)، احمد اکرمی^۱

^۱ گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، تهران، ایران، رایانامه: a_sharif@mail.iau-tnb.ac.ir

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

اسیدهای تری ترپنیک به خصوص اسید بتولینیک، اسید اولئونولیک و اسید اورسولیک به عنوان اجزای زیست فعال مهم در میوه عناب *Ziziphus jujuba* mill. دارای خواص درمانی در بسیاری از بیماریها از جمله سرطان می باشند. اما مقادیر این اسیدهای تری ترپنیک ممکن است در شرایط جغرافیایی و کشت متفاوت، یکسان نباشند. بدین منظور، از عناب کشت شده در باغات مربوط به ۲۹ رویشگاه متفاوت از شرق، شمال شرق، جنوب، مرکز، و غرب در استان‌های مختلف ایران در اواخر فصل تابستان نمونه برداری گردید. با استفاده از الکل ۹۶ درصد به عنوان حلال و با نسبت مایع به جامد ۱۵ میلی لیتر بر گرم تحت امواج فراصوت با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، زمان امواج دهی ۳۵ دقیقه اسید تری ترپنیک‌های موجود در پودر عناب خشک استخراج و سپس به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه با آشکار ساز ناحیه مرئی و ماورای بنفش اندازه‌گیری شده اند. پس از آن تجزیه تحلیل آشیانه ای و آزمون توکی بر روی داده‌های بدست آمده انجام شد، که نتایج نشان داد، فقط مقدار میانگین اسید بتولینیک بین اکوتیپ‌ها تفاوت معنی داری دارد. همچنین مطابق تجزیه و تحلیل خوشه‌ای سلسله مراتبی بر اساس میزان تنوع این سه اسید تری ترپنیک، اکوتیپ‌های مورد مطالعه به چهار خوشه تقسیم‌بندی گردید و نتایج نشان داد، خوشه ۱ که مربوط به مناطق شرق و شمال شرق ایران بوده حاوی بیشترین مقدار این سه اسید تری ترپنیک‌ها است، در مقابل تجزیه تحلیل واریانس بین خوشه‌ها نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین آنها وجود ندارد. نتایج حاصل از آمار نشان داد که شرایط اقلیمی، کیفیت خاک، بذر و نحوه کشاورزی می تواند در تغییر یا عدم تغییر مقدار اسید تری ترپنیک‌ها در عناب تاثیر گذار باشد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶

واژه‌های کلیدی:

اسید بتولینیک
اسید اولئونولیک
اسید اورسولیک
امواج فراصوت
تحلیل خوشه‌ای

استناد: ژاله خوش سیما، امیر عبدالله مهرداد شریف، احمد اکرمی (۱۴۰۲). بررسی تنوع اسیدهای تری ترپنیک موجود در عناب *Ziziphus jujuba* Mill. از رویشگاه‌های مختلف ایران. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۱ (۴)، ۱۱۶-۱۰۶.

Doi:
Dor:

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.



مقدمه

عناَب *Ziziphus jujube* Mill. یکی از معروف ترین گیاهان قرون گذشته بوده که به خواص منحصر به فرد آن در سال‌های اخیر بیشتر پی برده شده است. میوه عناَب حاوی مقادیر زیادی ویتامین و مواد معدنی، اسیدهای تری ترپنیک^۱، ساپونین‌ها^۲ و جوجوبوزید^۳ است که باعث شده ارزش غذایی بالایی داشته باشد. اسیدهای تری ترپنیک به خصوص اسید بتونیلیک (BA) ، اسید اولئونولیک (OA) و اسید اورسولیک (UA) در میوه عناَب از ترکیبات فعال زیستی اصلی است، که دارای اثرات دارویی کاربردی در درمان سرطان، یبوست، اضطراب و بی خوابی می باشند و در طب سنتی از عناَب برای درمان آلرژی، اضطراب، افسردگی، دیابت، اسهال، خشکی پوست، خستگی، فشار خون بالا ، بی خوابی، تعریق شبانه، درد، تنگی نفس و استرس استفاده می شود (Jahan et al., 2022, Bhopi et al., 2022, Ruan et al., 2023).

مقدار ترکیبات زیست فعال مانند اسیدهای تری ترپنیک در عناَب می‌تواند تحت تأثیر عواملی مانند زمین کشت، محیط جغرافیایی، شرایط فرآوری و شرایط نگهداری باشد. تفاوت بین ترکیبات شیمیایی عناَب در رویشگاه‌های مختلف می‌تواند تبدیل به چالشی در اصلاح و کاشت انواع عناَب و ارزیابی و استانداردسازی کیفیت محصول به دست آمده از آن شود (Song et al., 2020). از این رو بررسی مقدار اسیدهای تری ترپنیک در عناَب‌های مناطق مختلف برای صنعت داروسازی جهت مصارف دارویی بسیار مهم است. روش‌های مختلفی برای استخراج اسید تری ترپنیک‌ها مطرح شده است که بیشتر روش استخراج به کمک امواج فراصوت^۴ برای استخراج

اسید تری ترپنیک‌ها از عناَب و سایر گیاهان استفاده شده است (Wen et al., 2018, Hortas et al., 2018, Fu et al., 2014, Wei and Yang, 2014). همچنین جهت تعیین مقدار این اسیدها روش‌های متعددی معرفی شده که در این میان روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به دلیل آسانی، دقیق بودن در اغلب موارد استفاده شده است (Wua et al., 2015, Peng and Liu, 2010).

اما تا کنون مطالعه جامع بر طبق مقادیر OA, BA و UA برای عناَب ایرانی با در نظر گرفتن انواع رویشگاه‌ها انجام نشده است: با توجه به این موضوع اهداف این تحقیق عبارت است از: بررسی تنوع این اسیدهای تری ترپنیک اصلی در عناَب از رویشگاه‌های مختلف ایران با کمک تحلیل واریانس^۵ (ANOVA) و خوشه‌ای سلسله مراتبی^۶ (HCA) می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه: انواع عناَب‌های خشک مناطق مختلف ایران مربوط به اواخر فصل تابستان سال ۱۴۰۰ هجری شمسی از جمله شمال (جویبار)، شمال شرق (گرگان، چشمه آق سو، تپه صوفیان، کلاله، کردکوی)، جنوب (بافت، دوسیران، کازرون)، غرب (الیگودرز، ازنا، چال سرا، ایلام، درود)، شرق (بیرجند، سربیشه، قاین، درمیان، نهبندان، فردوس، سرایان)، مرکز (ساوه، خمین، دلیجان، تفرش، جعفرآباد، قم، خلیجستان ودهاقان) خریداری شد. نمونه‌ها آسیاب و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

مواد و معرف‌ها: استانداردهای OA, BA و UA از شرکت سیگما آلدریج و متانول کروماتوگرافی، سدیم پرکلرات و آنتراسن از شرکت مرک میلی پور خریداری شدند. اتانول ۹۶ درصد از شرکت الکل کیمیا زنجان خریداری شده و

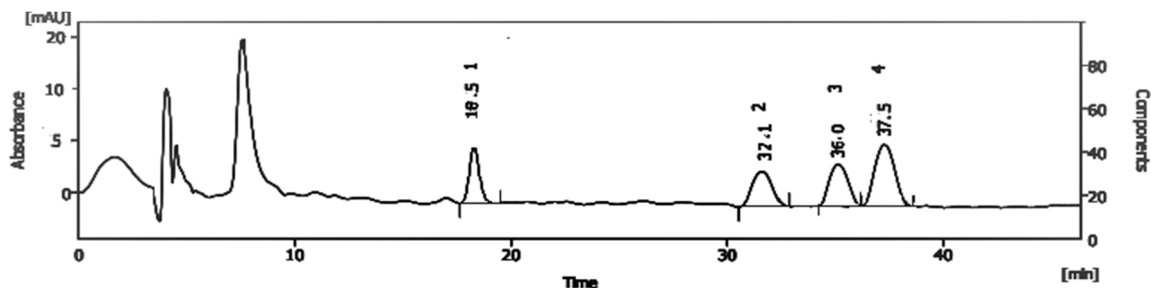
¹ Triterpenic acids² Saponins³ Jujuboside⁴ ultrasound-assisted extraction⁵ Analysis of variance⁶ Hierarchical Clustering

مایع با کارایی بالا (Kenuar Azura) مجهز به پمپ چهارتایی، گاز زد، با محفظه ستون و یک آشکارساز مرئی و فرابنفش (UV) تک طول موج تزریق گردید. ستون کروماتوگرافی مورد استفاده MN Nucleodur C18 gravity (250mm×4/6 mm, 5 μm) MN C18 guard column. (10mm×4/6 mm, 5 μm) بوده است. فاز متحرک متشکل از متانول و بافر پرکلرات سدیم ۲ دهم درصد وزنی حجمی با نسبت ۸۸ به ۱۲ بوده که قبل از استفاده از طریق فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر (نایلون) و سیستم خلأ صاف و گاز زدا شده، سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بوده و طول موج تشخیص روی ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد. دمای ستون در ۲۲ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شده و حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر بود.

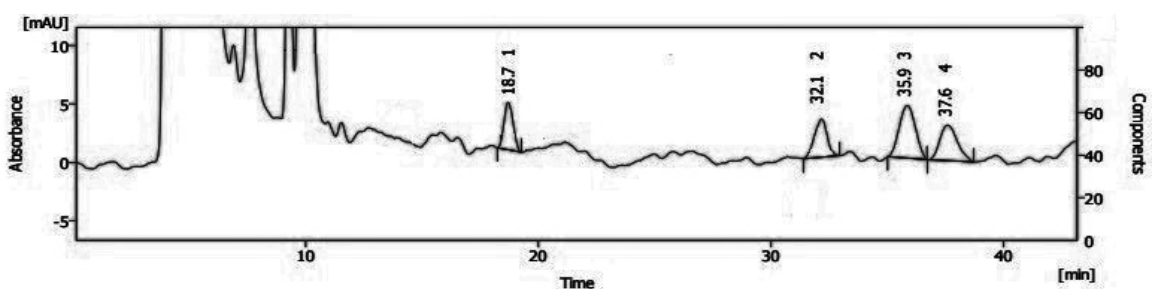
ضرایب همبستگی منحنی‌های کالیبراسیون بعد از تزریق در دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا بعد از محاسبات بیش از ۰/۹۹ بود. حد تشخیص (LOD) و حد کمیت سازی (LOQ) برای این سه اسید تری ترپنیک با کمک از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد و به ترتیب مطابق ذیل است. (۱/۰۸ میکروگرم بر میلی لیتر برای BA، ۰/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای OA و ۰/۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای UA) و (۳/۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر برای BA، ۲/۱۷ میکروگرم بر میلی لیتر برای OA و ۱/۲ میکروگرم بر میلی لیتر برای UA). با کمک مساحت پیک به دست آمده از استاندارد داخلی در محلول سه تایی استاندارد کلیه مساحت پیک‌های سایر محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها نرمالیزه شده و با درون‌یابی از منحنی کالیبراسیون مقدار هر کدام از اسیدها بر حسب میکروگرم بر گرم پودر خشک عنباب به دست آمده است. شکل ۱ کروماتوگرام محلول استاندارد و محلول عصاره عنباب را نشان می‌دهد.

آب خالص با استفاده از سیستم تصفیه آب اولترا Aquaplus در محل انجام آزمایش تهیه و در نهایت فیلتر نایلونی (۰,۴۵ میکرومتر) از میلی پور خریداری شده است. استانداردها و روش تهیه آنها: محلول‌های استاندارد BA، OA، UA و آنتراسن به‌عنوان استانداردهای داخلی با حل کردن مقدار مناسبی از آنها در الکل ۹۶ درصد تهیه شده تا غلظت نهایی ۰/۴۵ میلی گرم در میلی لیتر برای آنتراسن و ۰/۲ میلی گرمی بر میلی لیتر برای اسیدهای تری ترپنیک مذکور به دست آید. ۵ سری رقت با کمک محلول‌های ذخیره استاندارد به صورت مخلوط هر سه اسید تری ترپنیک‌ها در غلظت‌های بین ۱۶/۰ تا ۲۵/۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای BA، ۱۰/۰ تا ۱۵/۰ میکروگرم در میلی لیتر برای OA و ۱۰/۰ تا ۱۷/۰ میکروگرم در میلی لیتر برای UA همراه با ۲ میکروگرم در میلی لیتر آنتراسن به‌عنوان استاندارد داخلی تهیه شدند. استخراج به روش امواج فرا صوت: برای استخراج و تهیه عصاره حدود ۶۶۶ میلی گرم از نمونه‌ها (۲۹ نوع عنباب از رویشگاه‌های مختلف) به طور دقیق توزین و به یک لوله سانتریفیوژ منتقل شد و ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حجمی بر حجم به آن اضافه شد (نسبت مایع به جامد ۱۵ میلی لیتر بر گرم) و در دستگاه امواج فراصوت (D.S.A. China)، با فرکانس: ۴۰ کیلوهرتز در مدت زمان ۳۵ دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد استخراج شدند. سپس محلول‌های استخراج شده از طریق فیلترهای نایلونی ۰/۴۵ میکرومتر صاف شده و به یک بالون ژورن ۱۰ میلی لیتری منتقل شدند. در نهایت با استفاده از اتانول در حضور ۲ میکروگرم بر میلی لیتر آنتراسن به‌عنوان استاندارد داخلی به حجم رسانده شدند.

اندازه‌گیری به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: کلیه محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها به سیستم کروماتوگرافی



الف



ب

شکل ۱: کروماتوگرام محلول استاندارد (الف) و محلول عصاره عناب (ب) ترتیب خروج پیک‌ها: (۱) آنتراسن (۲) اسید بتولینیک (۳) اسید اولئولنیک (۴) اسید اورسولیک

مینی تب ۲۰۱۶ گروه‌بندی شده و سپس با کمک تحلیل واریانس یک طرفه تفاوت بین خوشه در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

مقادیر BA، OA و UA از عصاره عناب ۲۹ اکوتیپ با اندازه‌گیری به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به دست آمده و در جدول ۱ بر طبق استان‌ها و مناطق مختلف ایران به طور خلاصه نمایش داده شده است.

محاسبات آماری: تجزیه و تحلیل واریانس جهت بررسی و مقایسه میزان تنوع اسید تری ترپنیک‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی بین استان‌ها و داخل استان‌های مورد مطالعه ۲۹ اکوتیپ عناب مورد مطالعه به روش نستد و آزمون توکی با کمک نرم افزار گراف پد Prism نسخه ۹ انجام شد. در این مطالعه همچنین شباهت این ۲۹ اکوتیپ عناب مطابق با مقادیر BA، OA و UA به دست آمده و بر اساس موقعیت جغرافیایی طبق روش خوشه‌بندی تجمعی به عنوان یک رویکرد پایین به بالا با کمک نرم افزار

جدول ۱: مقادیر اسید تری ترپنیکها بر حسب میکروگرم بر گرم OA, BA و UA در ۲۹ اکوتیپ عناب

نام استان	منطقه	مقادیر اسید تری ترپنیکها بر حسب میکروگرم بر گرم		
		BA	OA	UA
خراسان جنوبی	بیرجند	۳۰۳/۸۳±۰/۸۶ ^a	۱۶۹/۵۲±۰/۹۲ ^a	۱۹۵/۸۴±۰/۵۶ ^a
	سربیشه	۲۸۵/۲۳±۰/۵۲ ^a	۱۷۵/۸۱±۰/۹۶ ^a	۱۸۰/۲۵±۰/۸۴ ^a
	قائن	۳۰۰/۰۲±۰/۴۵ ^a	۱۶۸/۹±۰/۹۴ ^a	۱۹۵/۶±۰/۹۲ ^a
	درمیان	۳۲۳/۴۵±۰/۶۸ ^a	۱۸۵/۲۳±۰/۸۶ ^a	۱۷۴/۲۳±۰/۹۴ ^a
	نهبندان	۳۰۲/۵۶±۰/۷۸ ^a	۱۹۰/۵۲±۰/۵۶ ^a	۱۸۵/۵۶±۰/۸۲ ^a
	فردوس	۲۷۴/۲۵±۰/۸۹ ^a	۱۶۲/۴۵±۰/۸۴ ^a	۱۹۶/۵۲±۰/۴۴ ^a
	سرایان	۲۹۳/۲۵±۰/۹۲ ^a	۲۰۰/۲۵±۰/۵۴ ^a	۱۷۴/۸۹±۰/۶۸ ^a
لرستان و ایلام	الیگودرز	۱۷۵/۲۸±۰/۹۵ ^{bcd}	۱۸۰/۲۵±۰/۶۳ ^{ab}	۱۷۴/۵۸±۰/۶۲ ^a
	ازنا	۱۸۰/۲۳±۰/۸۲ ^{bcd}	۲۳۰/۲۵±۰/۸۵ ^{ab}	۱۶۵/۲۳±۰/۹۴ ^a
	درود	۱۶۵/۴۵±۰/۸۵ ^{bcd}	۱۹۵/۹۶±۰/۹۵ ^{ab}	۱۷۰/۸۵±۰/۵۸ ^a
	چالسرا	۲۰۰/۵۶±۰/۶۵ ^{bcd}	۲۱۰/۲۳±۰/۹۲ ^{ab}	۱۹۸/۵۶±۰/۹۲ ^a
	ایلام	۱۶۸/۳۲±۰/۲۹ ^{bcd}	۱۸۵/۲۳±۰/۹۶ ^{ab}	۱۹۸/۲۵±۰/۸۶ ^a
مرکزی و قم و اصفهان	ساوه	۲۲۰/۳۲±۰/۵۹ ^{bef}	۱۹۵/۶۲±۰/۹۳ ^{ac}	۱۵۰/۸۵±۰/۵۹ ^a
	خمین	۲۰۰/۲۶±۰/۵۸ ^{bef}	۱۹۰/۵۶±۰/۸۴ ^{ac}	۱۶۵/۸۹±۰/۴۹ ^a
	دلجان	۲۵۰/۴۷±۰/۹۸ ^{bef}	۱۲۰/۵۶±۰/۹۴ ^{ac}	۱۵۵/۲۳±۰/۶۳ ^a
	نقرش	۱۹۵/۶۳±۰/۹۵ ^{bef}	۱۳۵/۲۶±۰/۸۷ ^{ac}	۱۴۵/۹۶±۰/۵۴ ^a
	جعفر آباد	۱۷۵/۲۶±۰/۹۶ ^{bef}	۹۰/۲۶±۰/۹۲ ^{ac}	۱۳۰/۲۶±۰/۸۹ ^a
	قم	۱۷۰/۲۶±۰/۶۳ ^{bef}	۱۴۲/۵۲±۰/۹۶ ^{ac}	۱۵۳/۶۲±۰/۲۶ ^a
	خلجستان	۱۵۵/۷۸±۰/۵۸ ^{bef}	۱۵۵/۷۴±۰/۹۵ ^{ac}	۱۲۳/۵۶±۰/۳۶ ^a
	دهاقان	۱۴۳/۵۸±۰/۸۴ ^{bef}	۱۸۵/۲۳±۰/۸۵ ^{ac}	۱۷۰/۲۸±۰/۵۹ ^a
کرمان و فارس	بافت	۱۷۰/۵۶±۰/۸۴ ^{ceh}	۱۷۵/۶۹±۰/۸۴ ^{abcd}	۱۸۰/۵۶±۰/۹۲ ^a
	دوسیران	۱۶۵/۳۲±۰/۵۸ ^{ceh}	۱۵۰/۲۳±۰/۹۲ ^{abcd}	۱۲۳/۵۶±۰/۹۶ ^a
	کازرون	۱۸۵/۴۵±۰/۷۴ ^{ceh}	۱۷۰/۴۵±۰/۵۶ ^{abcd}	۱۶۵/۲۳±۰/۹۸ ^a
گلستان و مازندران	کردکوی	۲۳۰/۵۲±۰/۷۲ ^{adfh}	۱۸۷/۹۴±۰/۴۵ ^{abd}	۱۷۹/۲۶±۰/۶۲ ^a
	گرگان	۲۸۹/۲۳±۰/۷۸ ^{adfh}	۱۹۵/۲۳±۰/۵۶ ^{abd}	۲۲۰/۳۶±۰/۶۵ ^a
	چشمه اقی سو	۲۹۰/۵۶±۰/۸۴ ^{adfh}	۲۰۰/۳۶±۰/۵۸ ^{abd}	۲۵۰/۹۶±۰/۹۸ ^a
	تپه صوفیان	۲۷۸/۴۵±۰/۸۶ ^{adfh}	۲۵۰/۶۳±۰/۵۹ ^{abd}	۲۳۰/۵۶±۰/۹۶ ^a
	جویبار	۲۲۶/۲۱±۰/۶۵ ^{adfh}	۱۶۵/۲±۰/۵۶ ^{abd}	۱۸۰/۶۵±۰/۸۷ ^a
	کلاله	۲۶۵/۴۲±۰/۵۸ ^{adfh}	۲۰۰/۳۰±۰/۹۲ ^{abd}	۱۹۵/۸۴±۰/۸۳ ^a

داده‌ها میانگین مقدار ± انحراف استاندارد (SD) را نشان می‌دهد (n = 3)

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، تفاوت آماری معنی داری مطابق با آزمون توکی در سطح آماری ۵ درصد ندارند.

جدول ۲. تجزیه واریانس نستد (آشپانه ای)

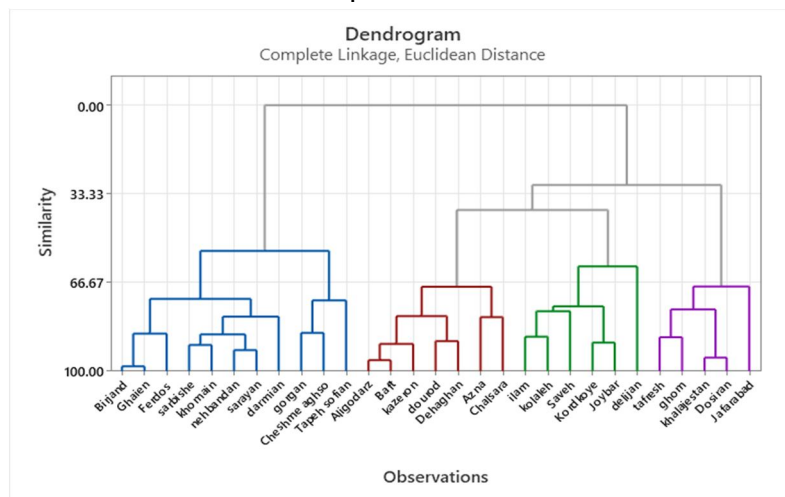
UA		OA		BA		منابع تغییرات
انحراف استاندارد	واریانس	انحراف استاندارد	واریانس	انحراف استاندارد	واریانس	
۱۱/۴۷	۱۳۱/۶ ^{NS}	۰/۰۰	۰/۰۰*	۲۰/۸۷	۳۶۹/۴*	بین استان‌ها
۱۸/۲۵	۳۳۳/۰ ^{NS}	۲۶/۳۷	۶۹۵/۲ ^{NS}	۱۹/۲۲	۴۳۵/۶*	بین اکوتیپ‌ها در داخل استان‌ها

NS و * به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد میباشد.

تمامی پارامترهای اندازه‌گیری شده در نظر گرفته شده باشد. در این راستا تجزیه و تحلیل خوشه سلسله‌مراتبی یک ابزار کاربردی برای کشف شباهت بین اجزای مختلف با در نظر گرفتن انواع پارامترها و شرایط است. باید در نظر گرفت که در تحلیل واریانس شباهت بین رویشگاه‌های مختلف نشان داده می‌شود در حالی که در تجزیه تحلیل خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی تفاوت بین گروه‌ها مشخص می‌شود که به‌عنوان یک ابزار کاربردی برای کشف شباهت بین اجزای مختلف در یک گروه می‌باشد. به همین دلیل در این مطالعه، گروه‌بندی مطابق با HCA بر اساس مقدار BA، OA و UA نیز انجام شد که نتیجه آن تقسیم بندی ۴ خوشه ای این ۲۹ اکوتیپ عنب می‌باشد که در شکل ۲ به طور کامل نمایش داده شده است. همچنین میانگین مقادیر BA، OA و UA بر حسب میکروگرم بر گرم همراه با تعداد اکوتیپ‌ها نیز در هر خوشه مشخص و در جدول ۳ فهرست شده است

مطابق مقادیر بدست آمده در جدول ۱ تحلیل واریانس آشیانه ای بین اکوتیپ‌ها در داخل استانها و بین استان‌ها انجام شده و نشان می‌دهد که مقدار BA در مناطق داخل استان‌ها و بین استان‌ها تفاوت معنی داری داشته و مقدار OA فقط بین استان‌ها تفاوت معنی داری دارد و همچنین مقدار UA در اکوتیپ‌های داخل استان‌ها و بین استان‌ها تفاوت معنی داری ندارد. به منظور درک بهتر از تشابه بین اکوتیپ‌های استان‌های مختلف آزمون توکی نیز انجام گردیده (جدول ۱) و مشاهده شد، مقدار BA در استان خراسان جنوبی فقط با استان گلستان و مازندران (شمال) و مقدار OA نیز در استان خراسان جنوبی با تمامی استان‌های مورد مطالعه و مقدار UA نیز در تمامی استان‌ها تفاوت معنی داری در سطح آماری ۵ درصد ندارند.

تحلیل واریانس نمی‌تواند دسته‌بندی مفیدی با اطلاعات کامل و طبقه‌بندی شده داشته باشد حتی اگر



شکل ۲: تجزیه و تحلیل خوشه‌ای سلسله‌مراتبی (HCA) ۲۹ نوع عنب از رویشگاه‌های مختلف ایران

جدول ۳: مقادیر میانگین بر حسب میکروگرم بر گرم BA، OA و UA در خوشه‌های مختلف.

متغیرها	تعداد اکوتیپ‌ها	BA	OA	UA
خوشه ۱	۱۱	۲۹۲/۸۲۶	۱۸۹/۹۵۱	۱۹۷/۳۳۳
خوشه ۲	۷	۱۷۴/۴۴۴	۱۹۲/۵۸۰	۱۷۵/۰۴۱
خوشه ۳	۶	۲۴۵/۵۴۳	۱۷۵/۸۰۸	۱۷۴/۰۸۳
خوشه ۴	۵	۱۷۲/۴۵۰	۱۳۴/۸۰۲	۱۳۵/۳۹۲

مقدار برابر با ۱۹۲/۵۸۰ میکروگرم بر گرم و خوشه ۴ کمترین مقدار میانگین برابر با ۱۳۴/۸۰۲ میکروگرم بر گرم را داراست. مقدار میانگین UA نیز در خوشه ۱ بیشترین مقدار برابر با ۱۹۷/۳۳۳ میکروگرم بر گرم را دارد. همچنین خوشه ۴ نیز کمترین مقدار UA برابر با ۱۳۵/۳۹۲ میکروگرم بر گرم را داراست.

بر اساس HCA، ۲۹ اکوتیپ عنب در ایران به چهار خوشه طبقه‌بندی شدند، مطابق با جدول ۳، مقدار میانگین BA در خوشه ۱ بیشترین مقدار و در خوشه ۴ کمترین مقدار به ترتیب برابر با ۲۹۲/۸۲۶ میکروگرم بر گرم و ۱۷۲/۴۵۰ میکروگرم بر گرم می‌باشد. مقدار میانگین OA در خوشه ۲ بیشترین

جدول ۴: نام اکوتیپ‌ها در هر خوشه

خوشه ۱	خوشه ۲	خوشه ۳	خوشه ۴
بیرجند	الیگودرز	ایلام	تفرش
قائن	بافت	کاله	قم
فردوس	کازرون	ساوه	خلیجستان
سربیشه	درود	کردکوی	دوسیران
نهبندان	دهاقان	جویبار	جعفرآباد
سرایان	ازنا	دلیجان	
درمیان	چالسرا		
خمین			
گرگان			
چشمه آق سو			
تپه صوفیان			

خوشه ۳ با ۶ اکوتیپ متعلق به غرب، مرکز و شمال و شمال شرق ایران و خوشه ۴ با ۵ اکوتیپ متعلق به مرکز ایران می‌باشد. همچنین برای تشخیص تفاوت معنی‌دار بین خوشه‌ها تحلیل واریانس یک طرفه انجام شد. جدول ۵ نتایج تحلیل را نشان می‌دهد.

با توجه به جدول ۴ که نام شهرهای هر خوشه در آن نشان داده شده است، می‌توان به این نتیجه رسید که خوشه ۱ با ۱۱ اکوتیپ بیشتر مربوط به مناطق شرق و شمال شرق ایران بوده، خوشه ۲ شامل ۷ اکوتیپ متعلق به مناطق غرب، جنوب و مرکز ایران،

جدول ۵: تحلیل واریانس یک طرفه خوشه‌ها

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	P (p-value) مقدار
داخل خوشه‌ها	۱۳۸۲	۸	۰/۱۴۴۷
بین خوشه‌ها	۳۲۹۷	۳	

مطابق جدول تفاوت معنی‌داری بین مقادیر این سه اسید تری ترپنیک در خوشه‌های مربوطه وجود ندارد.

دارد این بدان معناست که تغییر در مقدار آن تحت تاثیر شرایط اقلیمی و موقعیت جغرافیایی است. از طرفی با توجه به اینکه مقدار BA مطابق با نتایج واریانس آشیانه‌ای در داخل استان‌ها (جدول ۲) نیز متفاوت است می‌توان به این نتیجه رسید که شرایط

نتایج تحلیل واریانس آشیانه‌ای در جدول ۲ و آزمون توکی مطابق با جدول ۱ مشخص می‌کند مقدار میانگین BA در بین استان‌ها تفاوت معنی‌داری

بحث

مورد مطالعه می تواند تحت تاثیر اقلیم و موقعیت جغرافیایی نباشند.

تقسیم بندی ۴ خوشه ای مطابق با HCA بر اساس مقدار BA، OA و UA برای ۲۹ اکوتیپ عناب مورد مطالعه که در جدول ۳ مشخص شده است، نشان می دهد تقسیم بندی بر اساس موقعیت جغرافیایی تا حدودی موفقیت آمیز بوده است به گونه ای که بیشترین اعضا در خوشه ۱ با بیشترین مقدار در این سه اسیدتری ترپنیک تقریباً متعلق به مناطق نزدیک به هم و دریک امتداد از لحاظ جغرافیایی (شرق - شمال شرق) می باشند، همچنین در مورد خوشه ۴ که کمترین مقدار این سه اسید تری ترپنیک را داراست، کلیه اعضای آن متعلق به مرکز ایران می باشد. از طرفی این دو خوشه متعلق به مناطق جغرافیایی با شرایط آب و هوایی کمی متفاوت نیز هستند (جدول ۴). در مطالعه بر روی عناب چینی توسط Song و همکاران (۲۰۲۰) از رویشگاههای مختلف نیز، ۱۵ نوع اسید تری ترپنیک شناسایی و اندازه گیری شده که بر اساس مقدار این اسید تری ترپنیکها مطابق با HCA به ۵ خوشه تقسیم بندی گردیده و نشان داده شده است که خوشه ۳ بیشترین و خوشه ۴ کمترین مقدار اسید تری ترپنیکها را دارا بوده که اعضای آنها موقعیت جغرافیایی مشابهی داشتند.

در ادامه با بررسی تحلیل واریانس یک طرفه بین خوشهها مطابق جدول ۵ مشخص شد، عملاً بین میانگین مقادیر بدست آمده از این سه اسید در خوشهها تفاوت معنی داری وجود ندارد. به نظر می رسد شرایط آب هوایی معتدل و مرطوب یا گرم و خشک مناطق مورد مطالعه در تمامی خوشهها، تفاوت در میزان اسید تری ترپنیکها ایجاد نکرده است و از طرفی درشت مغذیها و نوع خاک در اقلیمهای ایران شرایط تقریباً یکسانی در تولید محتوای اسیدهای تری ترپنیک دارند. همچنین شرایط

خاک، بذر و نحوه کشاورزی در مناطق مختلف استان تاثیر گذار می باشد. Raudone و Vilkickyte (۲۰۲۱) در مطالعه ای در زمینه اثرات فنولوژیکی و جغرافیایی بر محتوای فنولی و تری ترپنوئیدی برگهای مورد صحرائی قرمز *Vaccinium vitis-idaea* L. با نتایج آماری نشان دادند که شرایط آب و هوایی بر محتوای اسید تری ترپنیکها و ترکیبات دیگر تاثیر گذار می باشد، بطوریکه شرایط سخت محیطی و سازگاری با سرما تأثیر مثبتی بر محتوای بیشتر ترکیبات دارد، بنابراین برگهای مذکور باید ترجیحاً در طول پاییز تا نیمه اول بهار جمع آوری شوند و همچنین تغییر شرایط درشت مغذیها و کیفیت خاک، نور، دما و رطوبت نیز باید برای بهبود مقادیر ترکیبات فنولی و تری ترپنوئیدی مورد استفاده قرار گیرند. Song و همکاران (۲۰۲۰) هم در بررسی و اندازه گیری تری ترپنوئید کل در عناب جمع آوری شده از مناطق مختلف چین به این نتیجه رسیدند که مقدار آن تابع موقعیت جغرافیایی و حتی شرایط خاک می باشد.

همچنین مقدار میانگین OA و UA بین اکوتیپهای مورد مطالعه مطابق با نتایج آماری بدست آمده (جدول ۱ و ۲) تفاوت معنی داری ندارد. این بدان معناست که اسید تری ترپنیکهای مذکور تحت تاثیر اقلیم و شرایط آب و هوایی نبوده است. Gao و همکارانش (۲۰۱۷) نیز در مطالعه بررسی تاثیر موقعیت جغرافیایی و تغییرات آب و هوا بر روی مقادیر اسید بتونیلیدیک، بتولین، لوپئول در پوست درخت توس آسیایی *Betula platyphylla* Suk. در ۴۸ مکان در شمال شرق چین به این نتیجه رسیدند که مقدار اسیدهای تری ترپنیک تحت تاثیر تغییر آب و هوا قرار نگرفته اما مقدار بتولین و لوپئول با افزایش دما و بارندگی افزایش یافته است. به نظر می رسد، مقادیر بعضی از اسید تری ترپنیکها در گونههای

حدودی در تغییر مقدار BA در ۲۹ اکتیپ عنباب تاثیر داشته است و مطابق با نتایج خوشه بندی مقدار BA به طور نسبی در مناطق سردتر (شمال شرق و شرق) و حاوی رطوبت بهتر در خاک افزایش داشته است. به نظر می رسد آب و هوای گرم و خشک یا گرم و مرطوب نمی تواند تاثیر بسزایی در تغییر مقدار اسید تری ترپنیکها داشته باشد. همچنین مقدار OA و UA تابع تغییرات اقلیمی نبوده که کیفیت خاک و مواد مغذی، یکسان بودن گونه عنباب کاشت شده و عدم اصلاح بذر می تواند در تغییر یا عدم تغییر محتوای انواع اسید تری ترپنیکها در گیاه تاثیر گذار باشد.

این نتایج می تواند اهداف مطالعه و برنامه ریزی در اصلاح نژاد و شناخت بیشتر ویژگی های فیتوشیمیایی گیاه در تولید گیاهان دارویی باکیفیت از نظر خواص دارویی مؤثرتر، تامین نماید. بر همین اساس توزیع جغرافیایی این گیاه دارویی به عنوان منبع متنوع ترپنوییدها اهمیت زیادی دارد. همچنین این نتایج می تواند داده های ارزشمندی را برای کشت، اصلاح و در نهایت ارزیابی کیفیت فراورده های دارویی حاصل از عصاره عنباب در جهت توسعه آن ارائه دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دکتر نبوی و دکتر طاهری برای حمایت از کارهای تحقیقاتی در شرکت دانش آزمای نوین باختر و شرکت داروسازی ایده دارو طب (تهران، ایران) نهایت تشکر را دارند.

کشاورزی، کشت و نگه داری از درختان عنباب در کلیه مناطق تقریباً به طور سنتی و یکسان بوده است. Song و همکاران (۲۰۲۰) در ادامه تحقیق خود بر روی عنباب چینی با روش PCA^۱ خوشه بندی بدست آمده از HCA مورد بررسی بیشتری قرار داده و مشخص نمودند که به غیر از خوشه ۳ و ۴ سایر خوشه ها به دلیل اینکه در شرایط جغرافیایی یکسان و موقعیت مکانی نزدیک به هم و شرایط کشت مشابه جمع آوری شده بودند، قابل تفکیک از هم نیستند و در نهایت این طبقه بندی نشان داده که موقعیت جغرافیایی، خاک، اصلاح کشت و بذر در تغییر مقادیر اسید تری ترپنیکها موثر است. همچنین Viskelis و همکارانش هم (۲۰۱۸) محتوای BA، OA و UA را در پوست سیب مورد مطالعه قرار داده و مشخص کردند که تنظیم رشد سیب در میزان این اسیدها بسیار تاثیر گذار است، از طرفی برش تنه باعث کاهش ۱۶ درصدی کل تری ترپنها در مقایسه با شاهد و ۲۶ درصد نسبت به هرس تابستانی گردید. همچنین روند تجمع بیشتر تری ترپنها در میوه ها همراه با کاهش فاصله کاشت درخت سیب مشاهده شد. آب و هوای سردتر و دوره پوشش گیاهی کوتاهتر باعث افزایش مقادیر قابل توجهی از تری ترپنها در میوه های منطقه آکاسیس در لیتوانی و استونی در مقایسه با میوه های کشت شده در لهستان شد.

نتیجه گیری نهایی

تحلیل واریانس آشیانه ای و آزمون توکی نشان داد که تغییرات آب و هوا و موقعیت جغرافیایی تا

¹Principal component analysis

Reference

- Jahan, M., Qadeer, A., Riaz, A., Noor, H. 2022. An overview of the causative factors required to get the best quality jujube. *International Journal of Unani and Integrative Medicine*. 6(3): 05-07.
- Bhopi Sweety, C., Jadhav Ravindra, S., Vikhe Dattaprasad, N. 2022. A review on *zizyphus jujuba*: a tiny plum having eminent potential of copious health benefits. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 14:(2) 107-112.
- Ruan, J., Li, H., Lu, M., Hao, M., Sun, F., Yu, H., Zhang, Y., Wang, T. 2023. Bioactive triterpenes of jujube in the prevention of colorectal cancer and their molecular mechanism research. *Phytomedicine*. 110:154639.
- Song, L., Zhang, L., Xu, L., Ma, Y., Lian, W., Liu, Y., Wang, Y. 2020. Optimized extraction of total triterpenoids from jujube *Zizyphus jujuba Mill.* and comprehensive analysis of triterpenic acids in different cultivars. *Plants*. 9(4):412.
- López-Hortas, L., Pérez-Larrán, P., González-Muñoz, M., Falqué, E., Domínguez, H. 2018. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid, A review. *Food Research International*. 103:130–149.
- Fu, Q., Zhang, L., Cheng, N., Jia, M., Zhang, Y. 2014. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate *Punica granatum L.* flowers. *Food Bioprod Process*. 92:321–32.
- Wei, M., Yang, Y. Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. 2014. *Separation and Purification Technology*. 130:182-192.
- Wua, H., Li, G., Liu, S., Liu, D., Chen, G., Hu, N., Suo, Y., You, J. 2015. Simultaneous determination of six triterpenic acids in some Chinese medicinal herbs using ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 107:98–107.
- Peng, Y., Liu, M. 2010. Analysis of triterpenoid acids in Chinese jujube. *Acta Horti*. 853:163-170.
- Guo S., Zhang, D., Wei, H., Zhao, Y., Cao, Y., Yu, T., Wang, Y., Yan, X. 2017. Climatic factors shape the spatial distribution of concentrations of triterpenoids in barks of White Birch *Betula Platyphylla Suk.* *Trees in Northeast China*. *Forests*. 8(9):334.
- Vilkickyte, G., Raudone, L. 2021. Phenological and geographical effects on phenolic and triterpenoid content in *Vaccinium vitis-idaea L.* leaves. *Plants*. 10:1986.
- Viskeli, J., Uselis, N., Liaudanskas, M., Janulis, V., Bielicki, P., Univer, T., Lepsis, J., Kvikly, D. 2018. Triterpenic acid content in the fruit peel of *malus × domestica* Borkh. depends on the growing technology. *Zemdirbyste-Agriculture*. 105(1): 71-78.