

## بررسی ساپونین‌های استروئیدی در ریزوم گیاه *Ruscus aculeatus* L. در شمال ایران (شهرستان سوادکوه)

ژیلا اصغری<sup>۱\*</sup>، محمد محمودی عالمی<sup>۱</sup>، محسن مظاهری تهرانی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۴

### چکیده

جنس *Ruscus* L. متعلق به تیره مارچوبه دارای شش گونه است که در سراسر دنیا پراکنده‌اند و دارای مشتقات استروئیدی، ساپونینی و گلیکوزیدی می‌باشد. گونه *Ruscus aculeatus* L. تنها گونه این جنس می‌باشد که در ایران رشد می‌کند و به وفور در جنگل‌های شمالی و دره‌های مرطوب یافت می‌شود. در طب سنتی از عصاره این گیاه به‌عنوان مقوی عروق سیاهرگی و درمان بواسیر استفاده می‌شود. لذا در این تحقیق ریزوم گیاه کوله‌خاص در اوایل تیرماه ۱۳۹۰ از شهرستان سوادکوه در استان مازندران جمع‌آوری و پس از خشک کردن، آسیاب و با استفاده از حلال هگزان چربی‌زدایی شد. عصاره‌گیری با روش سوکسله و با حلال متانول انجام شد. عصاره پس از تغلیظ توسط روتاری با حلال بوتانول نرمال و آب دوفازی شد. رسوب ناشی از اضافه کردن دی اتیل‌تر به فاز آلی با روش‌های کروماتوگرافی مایع تحت خلاء (VLC) و کروماتوگرافی ستونی شستشو گردید، تا ترکیب موجود در عصاره خالص‌سازی گردد. در ادامه با استفاده از روش‌های طیف بینی رزونانس مغناطیسی هسته (<sup>1</sup>H-NMR)، فرسرخ (IR) و طیف‌سنجی جرمی ساختمان شیمیایی ترکیب استخراج شده یعنی ترکیب Stigmast-5,22-dien-3-O- $\alpha$ -D-glucoopyranoside شناسایی گردید.

**واژه‌های کلیدی:** استیگمات-۵، ۲۲-دی-ان-۳- $\alpha$ -O-D- گلیکوپیرانوزید، کروماتوگرافی مایع تحت خلاء، کوله خاص  
(*R. aculeatus* L.)

\*نویسنده مسئول: asghari\_jila@yahoo.com

## مقدمه

تری‌ترین‌ها و استروئیدها (که از پیش ماده‌های حاوی ۳۰ کربن ایجاد شده‌اند) می‌توانند به‌عنوان ترکیبات آزاد تشکیل شوند، اما اغلب به‌صورت ساپونین‌ها ایجاد می‌گردند که معمولاً یک یا چند مولکول قند نیز به آنها متصل است. تری‌ترین‌های آزاد و استروئیدها ترکیباتی چربی دوست هستند (ویک، ۱۳۸۹). تری‌ترینوئیدها با ۶ واحد ایزوپرن یا ۳۰ واحد اتم کربن در رزین‌های گیاهی در کوتین و چوب پنبه‌ها وجود دارد، اغلب جامد بی‌رنگ با نقطه ذوب بالایی هستند. از مهم‌ترین این ترکیب‌ها، می‌توان تری‌ترینوئیدهای آزاد، استرول‌های گیاهی، استروئیدها، لیمونوئیدها، آلفا آمیرین، ساپونین‌های تری‌ترینوئیدی، کوکوریبتاسین و کوآسینوئیدها را نام برد. این ترکیبات اغلب در تیره‌های گیاهی نظیر پروانه آسها، آلاله، کدوئیان، خرزهره و استبرق به وفور یافت می‌شود (قاسمی، ۱۳۸۸). از دو گروه تری‌ترینوئیدی: استرول‌ها یا استروئیدهای گیاهی (فیتواسترول) و ساپونین‌های تری‌ترینوئیدی، دارای تنوع بسیاری بوده و تاکنون در حدود ۴۰۰۰ نوع از این ترکیب‌ها شناسایی شده است. نتایج تحقیقات نشان داده است که اغلب استرول‌های گیاهی دارای خاصیت مهمی نظیر بازدارندگی بر رشد تومورها (Beveridge, 2002)، کاهش کلسترول و سکت‌های قلبی (Hicks, 2001; Uddin, 2015) در انسان هستند. ساپونین‌ها گروه بزرگی از تری‌ترین‌های موجود در برخی گیاهان هستند که کاربرد وسیعی در تولید داروهای گیاهی دارند. اغلب ساپونین‌ها خاصیت صابونی داشته و به‌طور هم‌زمان قابل حل در چربی و آب هستند. به همین دلیل این ترکیبات دارای خواص شویندگی بوده و به‌هنگام لرزش در آب تولید کف می‌کنند (قاسمی، ۱۳۸۸). روش‌های زیادی برای استخراج ترکیبات طبیعی از جمله فیتواسترول‌ها وجود دارد که متداول‌ترین آن استفاده از حلال‌هایی نظیر

کلروفرم، هگزان، تولوئن، پترولیوم اتر، استن و غیره است (Uddin, 2009). یکی دیگر از روش‌های استخراج فیتواسترول‌ها که اخیراً گزارش شده است، روش فضای فوق بحرانی با استفاده از دی‌اکسید کربن است (Uddin, 2015) که دارای مزایای زیادی نسبت به روش‌های متداول می‌باشد (Ge, 2002; Lopez, 2004).

کوله‌خاس (*Ruscus aculeatus* L.) گیاهی پایا، چوبی و کوچک است که بوته‌های درهم فشرده و منشعب به ارتفاع ۵۰-۳۰ دارد (قهرمان، ۱۳۸۶). موسم گلدهی آن مهر-آبان می‌باشد. انتشار جغرافیایی آن جنگل‌های شمالی و دره‌های مرطوب کناره خزر، مازندران، زیارت‌گرگان، بندرگز، گیلان، لاهیجان و جنگل‌های رستم‌آباد در نزدیک رشت، جنگل‌های اطراف رامسر، رودبار، آستارا و طوالش می‌باشد (قهرمان، ۱۳۸۶). تمام اندام‌های گیاه گیاه، از جمله سرشاخه‌های جوان، ریشه‌ها و ریزوم دارای استفاده دارویی و سرشاخه‌های میوه‌دار دارای کاربردهای صنعتی می‌باشند. عصاره این گیاه برای درمان علائم نارسایی سیاهرگی مزمن (واریکوزیس) شامل تورم، خارش، درد و احساس سنگینی در عضو مبتلا استفاده می‌شود. کوله‌خاس برای درمان و التیام بواسیر همراه با سوزش و خارش نیز موثر است و به دو صورت خوراکی و موضعی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. این گیاه به‌عنوان مدر و ملین خفیف نیز مورد استفاده داشته است. اثر درمانی این گیاه به وجود ساپونین‌های استروئیدی که تا ۶ درصد از وزن خشک گیاه را شامل می‌شوند، مربوط می‌گردد. ساپونین‌های عمده موجود در این گیاه عبارتند از راسسین (تیپ اسپروستان مونودسموزیدیک)، راسکوزید (تیپ فروستان بیوسموزیدیک) همراه با آگلیکون‌های راسکوژنین (۱ بتا- هیدروکسید دیوسژنین) و نئوروسکوژنین می‌باشد. مطالعات آزمایشگاهی نشان

مشتق فوروستانول و سه مشتق گلیکوزید های سولفات‌ها از این گونه‌ها جداسازی و شناسایی گردید ( De Mimaki, 2008; Kite, 2007; Marino, 2012).

لذا با توجه به سطح فراوان پراکنش گیاه کوله خاص در اغلب جنگلهای شمال ایران و استفاده های فراوان دارویی از آن نزد مردم بومی منطقه این تحقیق برای نخستین بار، با هدف جداسازی و خالص سازی ترکیبات شیمیایی به ویژه مشتقات استروئیدی در گیاه و سپس شناسایی ترکیبات استخراج شده با روش های طیف‌سنجی  $^1\text{H-NMR}$ ، IR و طیف‌سنجی جرمی در منطقه سواد کوه در استان مازندران می پردازد.

### مواد و روش‌ها

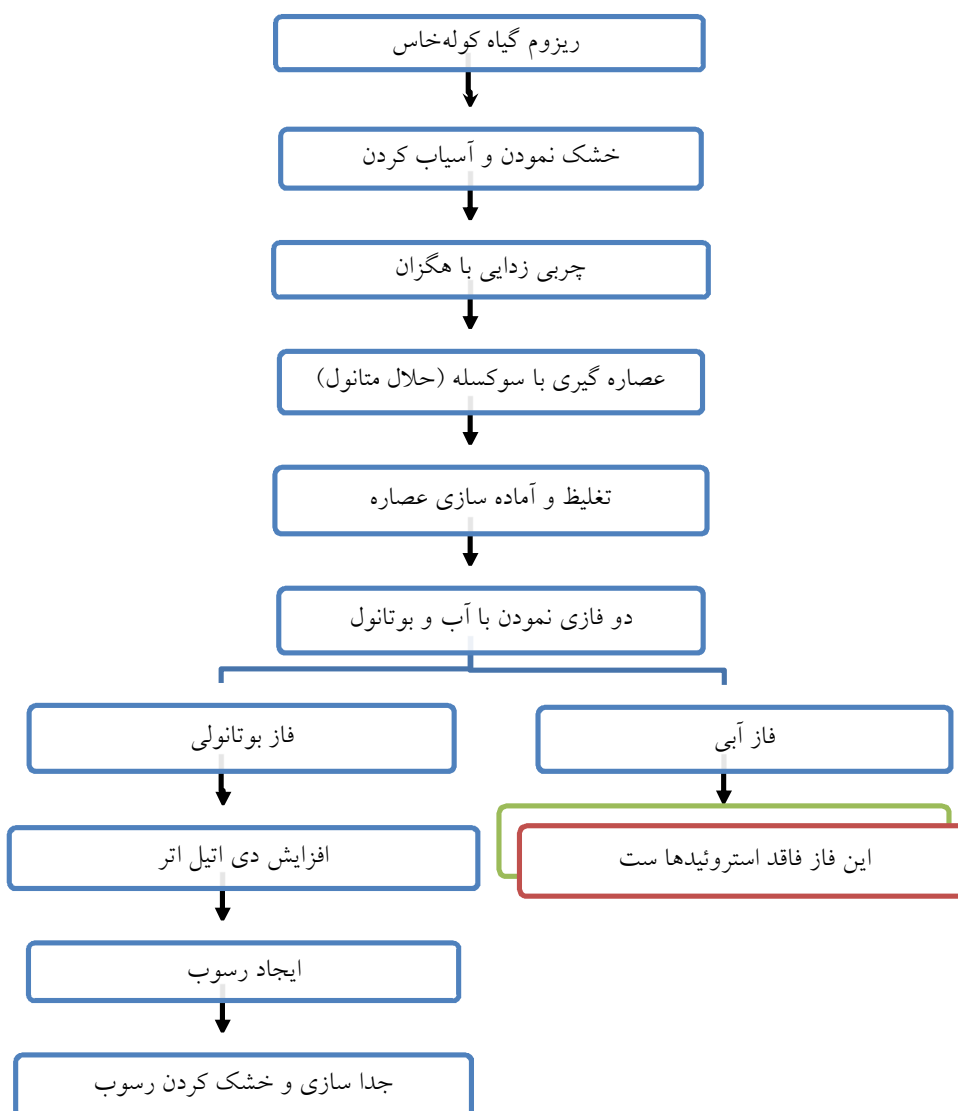
**جمع آوری و آماده سازی گیاه:** نمونه‌های گیاه کوله خاص در اوایل تیرماه سال ۱۳۹۰ از حوالی روستای عالم‌کلا در منطقه لغور شهرستان سوادکوه استان مازندران جمع‌آوری و سپس ریزوم از سایر قسمت‌ها جدا و به قطعات کوچک تقسیم شد و به دور از نور آفتاب در سایه خشک شدند. نمونه‌ها بعد از خشک شدن با آسیاب خرد و سپس برای عصاره‌گیری آماده شدند. برای چربی‌زدایی نمونه، ۲۰۰ گرم از پودر خشک ریزوم در قیف دکانتور ریخته و ۴۰۰ میلی‌لیتر هگزان به آن اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت هگزان تازه جایگزین گردید و این کار یک بار دیگر هم تکرار شد. ۱۵۰ گرم از نمونه چربی‌زدایی شده با ۷۰۰ میلی‌لیتر متانول به روش سوکسله و به مدت ۲۴ ساعت عصاره گیری شد. حلال عصاره حاصل از سوکسله توسط دستگاه روتاری خارج شد و در مجموع ۴۶/۴۹ گرم عصاره اولیه حاصل آمد. عصاره خشک شده متانولی در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و در قیف دکانتور ریخته و سپس به آن ۸۰ میلی‌لیتر بوتانول نرمال اضافه شد. بعد از هم زدن نمونه و جدا شدن فاز آلی و آبی، فاز آلی جدا و ذخیره شد. به فاز آبی ۵۰ میلی‌لیتر

داده‌است که عصاره این گیاه سبب تحریک گیرنده‌های آلفا-آدرنورژیک در ماهیچه‌های صاف دیواره عروق می‌گردد و در نتیجه عروق سیاهرگی تقویت می‌گردند. راسکوژنین و دیگر اجزای مرتبط با آن به‌عنوان مسکن و ضدالتهاب جهت کاهش درد، التیام مربوط به عروق سیاهرگی و حمله‌های حاد خواب یا سنگین شدن عضو استفاده می‌شود. ساپونین‌های کوله خاص هنگامی که به‌صورت دهانی مصرف شوند، جذب شده و جهت درمان نارسایی عروق سیاهرگی و لنفی مفید است (ویک، ۱۳۸۹). استخراج هیدرو الکلی از ریزوم گیاه کوله خاص به عنوان دارو در درمان بیماریهای عروقی استفاده می‌شود. (Hostettmann, 1995).

تحقیقات زیادی در خصوص جداسازی ترکیبات ساپونینی و استروئیدی از ریزوم گیاه گزارش شده است. در تحقیقی که روی ریزوم گیاه کوله خاص در ژاپن انجام شد شش ساپونین اسپیرواستان و پنج ساپونین فرواستان و در گزارش دیگر یک ساپونین اسپیرواتان شناسایی شد (Mimaki, 1998, 1999). در تحقیق دیگری در فرانسه گزارش شد دو مشتق استروئیدی سولفات‌ها از این گیاه جداسازی و شناسایی گردید (Oulad-Ali, 1996). در بررسی دیگر بر روی ریزوم گیاه روسکوس هیرکانوس در آذربایجان یک نوع ساپونین استروئیدی گزارش شد (Iskenderov, 1967). در گزارش دیگر، ریزوم سه گونه از گیاه کله خاص به نام روسکوس آکولئاتوس، روسکوس هیپوگلو سوم و روسکوس کولچیکوسمورد آزمایش قرار گرفت و ساپونین‌های استروئیدی موجود در این سه گونه روسکوس با دستگاه HPLC-MS شناسایی و گزارش شد (De Cobarieu, 2002). در تحقیقات دیگر که بر روی تعدادی از گونه های جنس *Ruscus*، از جمله کوله خاص و روسکوس هیپوفیلوم توسط آنالیز با دستگاه HPLC-MS انجام گرفت به ترتیب: ساپونین‌ها و گلیکوزیدهای استروئیدی از جمله دو

افزودن دی‌اتیل‌اتر به نمونه رسوب قهوه‌ای رنگی بدست آمد. خلاصه مراحل آماده‌سازی عصاره را در شکل ۱ مشاهده می‌نمایید.

بوتانول نرمال اضافه شد و بعد از هم زدن، فاز آلی جدا گردید برای جداسازی بهتر فاز آلی، این کار یک بار دیگر نیز تکرار شد. در ادامه حلال بوتانول نرمال از فاز آلی با دستگاه روتاری خارج شد. سپس با



شکل ۱- شمای کلی عصاره‌گیری گیاه کوله‌خاس

تحت خلاء را به پمپ خلاء وصل می‌کنیم. ستون را به کمک مکش پمپ تا چند سانتی‌متر مانده به انتهای

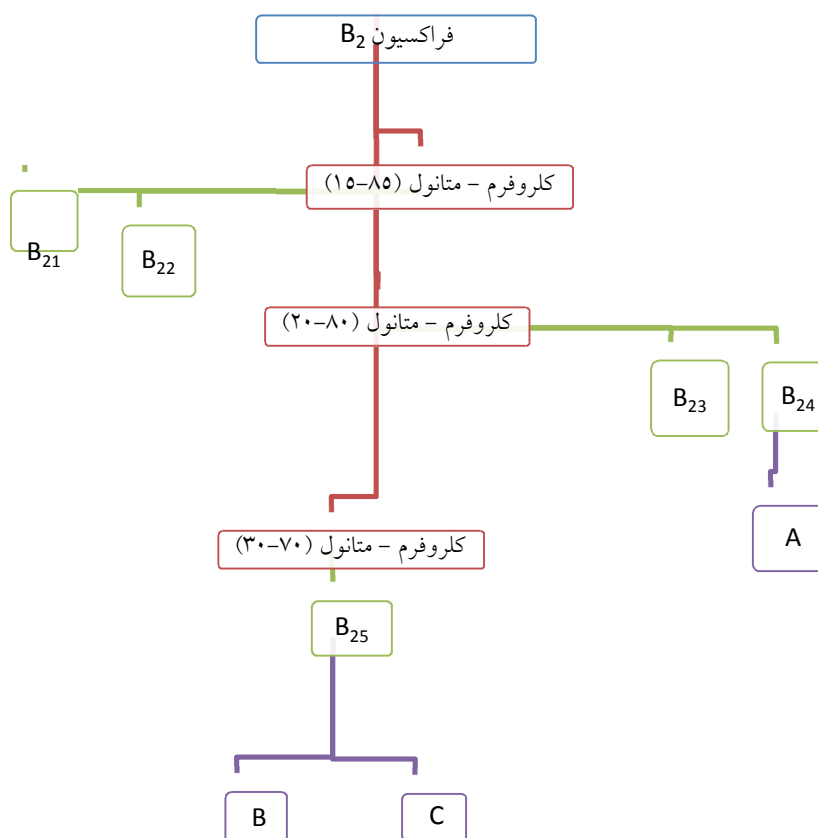
کروماتوگرافی توسط ستون VLC: برای آماده کردن ستون VLC، قیف مخصوص کروماتوگرافی مایع

در جدول ۱ آمده است. بعد از بررسی فراکسیون‌های مختلف به دست آمده از شویش ستون با استفاده از کاغذ TLC و سیستم‌های مختلف حلالی فراکسیون B<sub>۲</sub> بدلیل احتمال وجود مشتقات استروئیدی برای ادامه کار انتخاب شد.

فراکسیون B<sub>۲</sub> شامل رسوب و بخش محلول بود که حلال بخش محلول را خارج و رسوب زرد رنگی به مقدار ۱/۷۲۱ گرم به دست آمد. ۰/۶ گرم از نمونه خشک شده B<sub>۲</sub> در ستون ابتدا با سیستم حلالی کلروفرم-متانول (۸۵-۱۵)، سپس با سیستم کلروفرم-متانول (۸۰-۲۰) و در مرحله‌ی آخر با کلروفرم-متانول (۷۰-۳۰) مورد شویش قرار گرفت. حاصل شویش این ستون ۵ فراکسیون بود که شمای کلی خالص‌سازی نمونه‌ها در شکل ۲ آورده شده است.

ستون، با سلیکاژل دارای مش بالای ۴۰۰ فشرده می‌نماییم. سطح سلیکاژل نباید دارای ترک باشد به همین منظور بعد از پر کردن ستون، آنرا با یک حلال بی‌اثر مثل هگزان مورد شویش قرار می‌دهیم. ۱۲/۱۷ گرم نمونه را به کمک هگزان بر روی سطح سلیکاژل ستون VLC پخش می‌کنیم. سطح نمونه را صاف و سپس با استفاده از پمپ خلا حباب‌های موجود در نمونه را از بین برده و نمونه برای شویش با حلال‌های مناسب آماده می‌باشد.

ابتدا ستون کروماتوگرافی با حلال کلروفرم خالص مورد شویش قرار گرفت. در مراحل بعد، از سیستم حلالی کلروفرم-متانول (۹۰-۱۰)، (۸۰-۲۰)، (۷۰-۳۰) و (۵۰-۵۰) برای شویش ستون استفاده شد. میزان حلال‌های استفاده شده و فراکسیون‌های به دست آمده



شکل ۲- شمای کلی خالص‌سازی نمونه‌ها

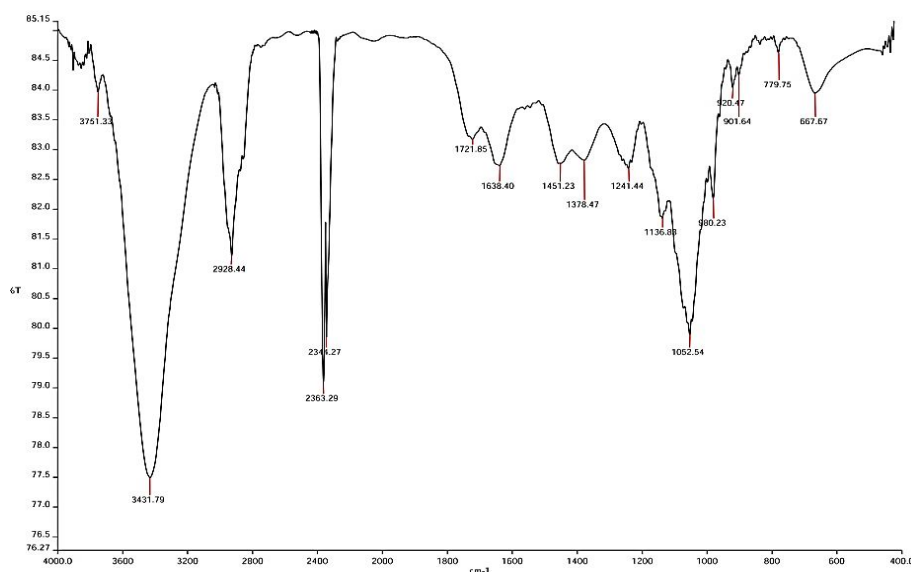
جدول ۱- نوع و میزان حلال استفاده شده در شویش ستون VLC

تعداد فراکسیون	متانول مصرفی (mL)	کلروفرم مصرفی (mL)	حجم مصرفی کل (mL)	سیستم حلالی
-	-	۱۵۰	۱۵۰	کلروفرم خالص
A <sub>1</sub> ,A <sub>2</sub> ,A <sub>3</sub> ,A <sub>4</sub> ,A <sub>5</sub> ,A <sub>6</sub>	۲۵۸/۷۵	۲۳۲۸/۷۵	۲۵۸۷/۵	کلروفرم - متانول (۱۰-۹۰)
B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub>	۲۴۰	۹۶۰	۱۲۰۰	کلروفرم - متانول (۲۰-۸۰)
C <sub>1</sub> ,C <sub>2</sub> ,C <sub>3</sub> ,C <sub>4</sub>	۵۸۵	۱۳۶۵	۱۹۵۰	کلروفرم - متانول (۳۰-۷۰)
D <sub>1</sub> ,D <sub>2</sub> ,D <sub>3</sub>	۶۰۰	۶۰۰	۱۲۰۰	کلروفرم - متانول (۵۰-۵۰)

## نتایج

گروه‌های متیل است. ارتعاش کششی پیوند دوگانه در ناحیه  $1638\text{ cm}^{-1}$  وجود ارتعاش جذبی در ناحیه  $1378\text{ cm}^{-1}$  تأیید کننده گروه ایزوپروپیل است. حضور جذبی پهن و بزرگ در ناحیه  $1052\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده وجود گروه فنلی در ترکیب است (شکل ۵).

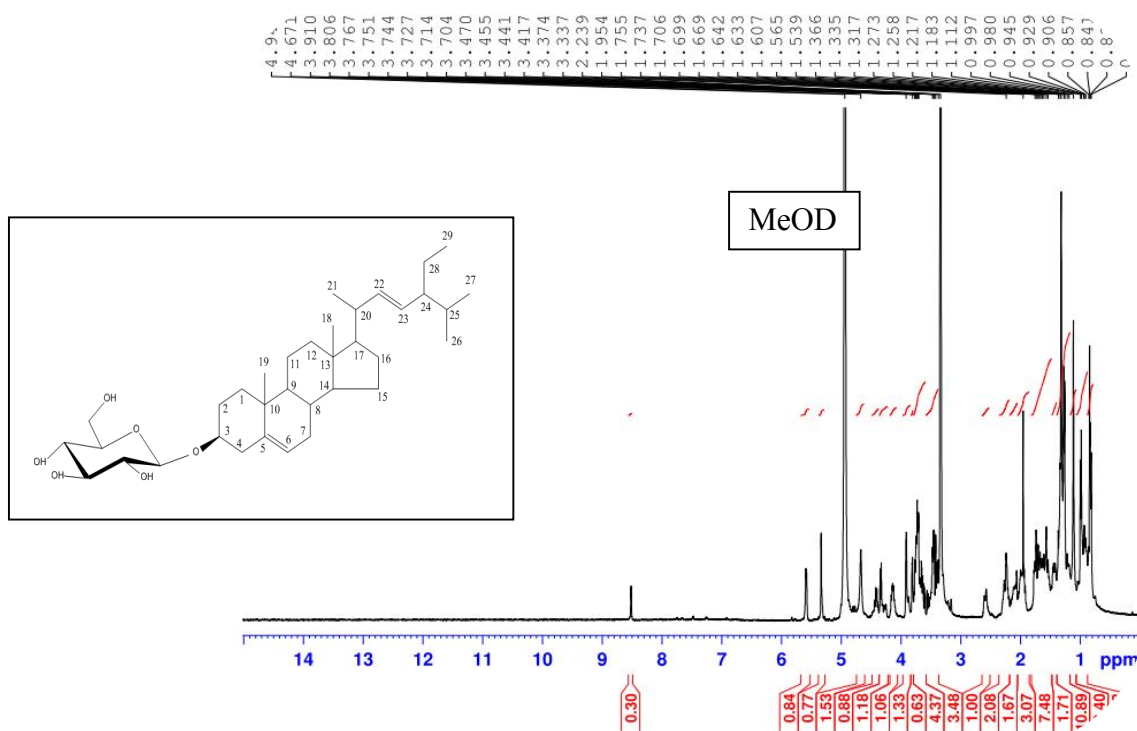
تعیین ساختمان ترکیب (C): در طیف IR ترکیب (C) پیک ناحیه  $3431\text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده گروه هیدروکسیل (عامل الکلی) در مولکول می‌باشد. جذب در ناحیه  $2928\text{ cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش کششی



شکل ۵- طیف IR ترکیب (C) با KBr

متیل کربن‌های (۹، ۲۱ و ۲۴) است که همپوشانی کرده- اند. در شکل ۶ طیف  $^1\text{H-NMR}$  ترکیب (C) نشان داده شده است.

طیف هیدروژن ( $^1\text{H-NMR}$ ) ترکیب (C) در حلال متانول دوتره گرفته شده است. پیک مشاهده شده در  $0/88\text{ ppm}$  مربوط به هیدروژن کربن‌های (۲۶، ۲۷ و ۲۹) است. پیک موجود در  $0/9\text{ ppm}$  مربوط به گروه



شکل ۶- طیف  $^1\text{H-NMR}$  ترکیب (C)، در حلال متانول دوتره

در جدول ۲ تعداد هیدروژن ترکیب (C) به همراه جایجایی شیمیایی آن آورده شده است.

جدول ۲- پیک‌های موجود در طیف هیدروژن ترکیب (C)

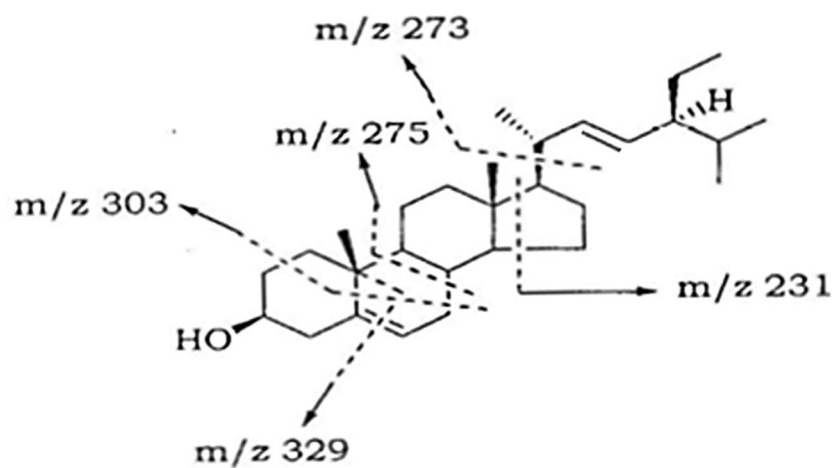
شماره هیدروژن	محدوده جایجایی شیمیایی	تعداد هیدروژن
۱	۲/۳	۲
۲	۳/۱	۲
۳	۳/۴	۱
۴	۱/۷	۲
۵	-	۰
۶	۵/۳	۱
۷	۱/۴۸	۲
۸	۱/۴۹	۱
۹	۰/۹	۱
۱۰	-	۰
۱۱	۱/۱۷	۲
۱۲	۱/۱۳	۲
۱۳	-	۱
۱۴	۱/۰۷	۱
۱۵	۱/۰۳	۲
۱۶	۱/۷	۲
۱۷	۱/۰۴	۱

ادامه جدول ۲-

۱۸	-	۳
۱۹	۱	۳
۲۰	۱/۳	۱
۲۱	۰/۹	۳
۲۲	۵/۱	۱
۲۳	۵	۱
۲۴	۰/۹	۱
۲۵	۱/۴	۱
۲۶	۰/۸۸	۳
۲۷	۰/۸۸	۳
۲۸	۱	۲
۲۹	۰/۸۸	۳
۱ <sup>۰</sup>	۴/۲	۱
۲ <sup>۰</sup>	۳/۰۵	۱
۳ <sup>۰</sup>	۳/۰۴	۱
۴ <sup>۰</sup>	۳/۱	۱
۵ <sup>۰</sup>	۳/۰۷	۱
۶ <sup>۰</sup> a	۴/۴	۱
۶ <sup>۰</sup> b	۴/۲	۱

شکل ۷ شکست‌های عمده‌ای که ترکیب استیگماسترول می‌شود، را نشان می‌دهد.

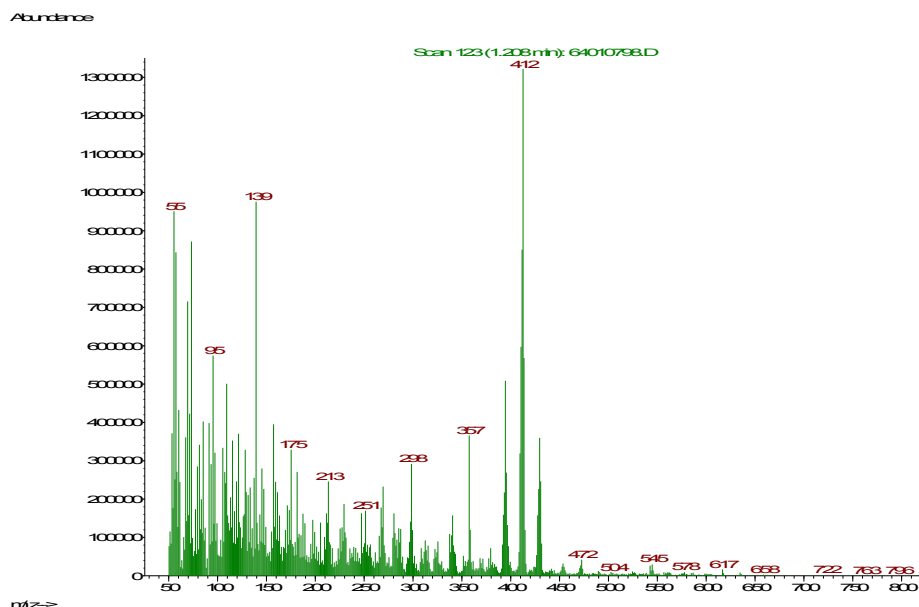
حین طیف‌سنج جرمی (MS) متحمل



شکل ۷- شکست‌های عمده ترکیب استیگماسترول

شکل ۸ طیف جرمی ترکیب (C) را نشان می‌دهد. پیک ۵۷۵ مربوط به یون مولکولی ترکیب است





شکل ۸- طیف جرمی ترکیب (C)

## بحث

فیتواسترول‌ها دارای اهمیت زیادی در سلامت انسان به ویژه در کاهش سکت‌های قلبی دارد. بنابر این توجه زیادی به استخراج این ترکیبات با روش‌های متفاوت شده است. استفاده از حلال‌های آلی که متداول‌ترین روش استخراج می‌باشد علاوه بر آنکه برای انسان مضر است مشکلات زیست محیطی فراوانی را نیز منجر شده است (Kagliwal, 2011). بنابراین روشی که بتواند استخراج ترکیبات طبیعی را با بازده بالا با استفاده از حجم کم حلال انجام دهد حائز اهمیت است.

در این تحقیق و با استفاده از جستجوی کتابخانه‌ای دستگاه طیف‌سنج جرمی ترکیب استیگماسترول گلیکوزید با ۹۲ درصد تطابق تشخیص داده شد. اتصال گروه قندی باعث قطبیت این ترکیب و حل شدن آن در متانول می‌گردد. ترکیب خالص شده (C) در حلال‌های غیرقطبی و یا با قطبیت کم قابل حل نمی‌باشد. در طیف جرمی، پیک ۵۷۵ مربوط به یون مولکولی ترکیب است که با جدا شدن گلوکز پیک ۳۹۴ مشاهده می‌شود. قطعه جرمی با جرم ۴۱۲ مربوط

به  $\beta$ -استیگماسترول می‌باشد، که با جدا شدن زنجیر کربنی متصل به حلقه قطعه یونی با جرم ۲۷۳ ظاهر می‌شود. با جدا شدن گروه هیدروکسیل به صورت مولکول آب، قطعه یونی با جرم ۳۹۴ حاصل می‌شود. همچنین وجود قطعه با جرم ۲۵۵ در طیف جرمی ترکیب (C) مربوط به چهار حلقه به هم جوش خورده استروئیدها است، که ساختار استروئیدی را تایید می‌کند

با توجه به نتایج حاصل از طیف‌های این ترکیب و مقایسه و تطبیق آن با مقالات دیگر به‌عنوان مرجع (Alam, 1996; Koay, 2013)، ترکیب (C) به‌عنوان استروئیدی با نام  $\text{stigmast-5,22-dien-3-O-}\alpha\text{-D-}$  glucopyranoside با فرمول مولکولی  $(\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6)$  و وزن مولکولی ۵۷۴، دارای  $R_f=0.5$  با سیستم حلالی کلروفورم-متانول (۹۰-۱۰) و با نقطه ذوب ۲۶۸-۷۰ درجه سانتی‌گراد شناسایی شد.

بخش غیرقندی (استروئیدی) ترکیب (C) که به نام استیگماسترول شناخته می‌شود دارای نام‌های مترادفی نظیر  $\beta$ -Stigmasterol و stigmasterin است. این ترکیب به‌عنوان پیش ماده ساخت پروژسترون و

نظر اقتصادی مقرون به صرفه است در توسعه شیمی سبز نیز حائز اهمیت می‌باشد.

#### منابع

۱. قاسمی.ع. ۱۳۸۸. گیاهان دارویی و معطر (شناخت و بررسی اثرات آن‌ها). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، سامان دانش، صفحه ۳۹۲.
۲. قهرمان. ا. ۱۳۸۶. فلوررنگی ایران، انتشارات: موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع - بخش گیاهشناسی، شماره اتشار: ۱۲۲۷، کد: ۱۴۸/۰۰۳/۰۰۱.
۳. ویک، ب.، وینک، م. ۱۳۸۹. مهم‌ترین گیاهان دارویی جهان. صفایی خرم، مهدی، مجتمع آموزش کشاورزی سبز ایران، صفحات ۳۸، ۶۵، ۳۴۳-۳۴۲.
4. Alam, M.S., Chopra, N., Ali, M. and Niwa, M., 1996. Olean and stigmaterol derivatives from *Ambromaugusta*, *Phytochemistry*, 41: 1197-1200.
5. Beveridge, T.H.J., Li, T.S.C. and Drover, J.C.G., 2002. Phytosterol content in american ginseng seed oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 744-750.
6. De Combarieu, E., Falzoni, M., Fuzzati, N. and Gattesco, F., 2002. Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis. *Fitoterapia*, 73: 583-596.
7. De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Iorizzi, M., 2012. Novel steroidal components from the underground parts of *Ruscus aculeatus* L. *Molecules*, 17: 14002-14014.
8. Ge, Y., Ni, Y., Yan, H., Chen, Y. and Cai, T., 2002. Optimization of the supercritical fluid extraction of natural vitamin E from wheat germ using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 67: 239-243.
9. Hicks, K.B., and Moreau, R.A. 2001. Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol busters. *Food Technology*, 55: 63-67.
10. Hostettmann, K., and Marston, A. 1995. *Saponins*; Cambridge University Press: Londen, UK, 302-303.
11. Huang, L., Zhong, T., Chen, T., Ye, Z. and Chen G. 2007. Identification of beta-sitosterol, stigmaterol and ergosterin in *A. roxburghii* using supercritical fluid extraction followed by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry.

ویتامین D<sub>3</sub> و همچنین ماده حدواسط ساخت آندروژن، استروژن و کورتیکوئید کاربرد دارد. از خواص درمانی این ترکیب می‌توان به خاصیت پیشگیری از انواع بیماری سرطان نظیر سرطان روده بزرگ، پروستات، پستان و تخمدان اشاره کرد (Huang, 2007). در مقایسه با سایر پژوهش‌ها ترکیب stigmast-5, 22-dien-3-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside برای اولین بار است که در گونه‌های روسکوس گزارش می‌شود و تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر استخراج این ترکیب در این گونه و سایر گونه‌های جنس روسکوس گزارش نشده است. متأسفانه به علت پیچیدگی طیف‌های ترکیبات A و B، این دو ترکیب قابل شناسایی و تعیین ساختار نبودند.

#### نتیجه‌گیری نهایی

از آنجایی که فیتواستروئول‌ها دارای اهمیت زیادی در سلامت انسان به‌ویژه در پیشگیری و درمان سکت‌های قلبی دارد، بنابراین توجه زیادی به استخراج این ترکیبات با روش‌های متفاوت شده است. استفاده از حلال‌های آلی که متداول‌ترین روش استخراج می‌باشد علاوه بر آنکه برای انسان مضر است مشکلات زیست محیطی فراوانی را نیز منجر شده است، بنابر این روشی که بتواند استخراج ترکیبات طبیعی را با بازده بالا با استفاده از حجم کم حلال انجام دهد حائز اهمیت است.

روش VLC یک تکنولوژی موثر برای استخراج انواع ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله استیگماترول از بستر گیاهان متفاوت است که دارای مزایای زیادی نسبت به روش‌های متداول می‌باشد که می‌توان به انتخاب پذیری و سرعت استخراج بالا، کاهش هزینه‌ها، استفاده از حجم کم حلال و بازده بالای استخراج اشاره نمود. لذا این روش علاوه بر اینکه از

- Rapid Communication in Mass Spectrometry, 21(18): 3024-3032.
12. Iskenderov, G.B., 1967. A steroid saponin from *Ruscus Hyrcanus*. Khimiyaprirodnikh, 3: 216-217.
  13. Kagliwal, L.D., Patil, S.C., Pol, A.S., Singhal, R.S. and Patravale, V.B., 2011. Separation of bioactives from sea buckthorn seeds by supercritical carbon dioxide extraction methodology through solubility parameter approach, Separation and purification Technology, 80: 533-540.
  14. Kite, G.C., Porter, E.A. and Simmonds, M.S.J., 2007. Chromatographic behavior of steroidal saponins studied by HPLC-MS. Journal of chromatography A., 1148: 177-183.
  15. Koay, Y.C., Wong, K.C., Osman, H., Eldeen, I. and Zaini Asmawi, M., 2013. Chemical constituents and biological activities of *Strobilanthes crispus* L., Records of Natural Products, 7(1): 59-64.
  16. Lopez, M., Arce, L., Garrido, J., Rios, A. and Valcarcel, M., 2004. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide, Talanta, 64: 726-731.
  17. Mimaki, Y., Aoki, T., Jitsuno, M., Kilic, C.S. and Coskun, M., 2008. Steroidal glycosides from the rhizomes of *Ruscus hypophyllum*. Phytochemistry, 69: 729-737.
  18. Mimaki, Y., Kuroda, M., Kameyama, A., Yokosuka, A. and Sashida, Y., 1998. Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells. Phytochemistry, 48: 485-493.
  19. Mimaki, Y., Kuroda, M., Yokosuka, A. and Sashida, Y., 1999. A spirostanolsaponin from the underground parts of *Ruscus aculeatus*. Phytochemistry, 51: 689-692.
  20. Oulad-Ali, A., Guillaume, D., Belle, R., David, B. and Anton, R., 1996. Sulphated steroidal derivatives from *Ruscus aculeatus*. Phytochemistry, 42: 895-897.
  21. Uddin, M.S., Sarker, M.Z., Ferdosh, S., Akanda, M.J., Easmin, M.S., Bt Shamsudin, S.H., Bin Yunus, K., 2015. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review, Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(7):1385-1394.
  22. Uddin, M.S., Ahn, H.M., Kishimura H. and Chun, B.S., 2009. Comparative study of digestive enzymes of squid (*Todarodes pacificus*) viscera after supercritical carbon dioxide and organic solvent extraction. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 338-344.