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

ژیلا اصغری[1*]، محمد محمودی عالمی[1]، محسن مظاهری تهرانی[1]

[1]گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۲/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/۲٤

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 اتیل‌اتر 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 (^{1}H-NMR)، فروسرخ (IR) و طیف‌سنجی جرمی ساختمان شیمیایی ترکیب استخراج شده یعنی ترکیب Stigmast-5,22-dien-3-O-α-D-glucopyranoside شناسایی گردید.

واژه‌های کلیدی: استیگمات-۵، ۲۲- دی‌ان-۳-O-α-D- گلیکوپیرانوزید، کروماتوگرافی مایع تحت خلاء، کوله خاص (*R.aculeatus* L.)

*نویسنده مسئول: asghari_jila@yahoo.com

مقدمه

تری‌ترپن‌ها 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. تری ترپن‌های آزاد و استروئیدها ترکیباتی چربی دوست هستند (ویک، ۱۳۸۹). تری ترپنوئیدها با ٦ 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 تری‌ترپنوئیدهای آزاد، استرول‌های گیاهی، استروئیدها، لیمونوئیدها، آلفا آمیرین، ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی، کوکوربیتاسین و کوآسینوئیدها را نام برد. این ترکیبات اغلب در تیره‌های گیاهی نظیر پروانه آساها، آلاله، کدوئیان، خرزهره و استبرق به وفور یافت می‌شود (قاسمی، ۱۳۸۸). از دو گروه تری‌ترپنوئیدی: استرول ها یا استروئیدهای گیاهی (فیتواسترول) و ساپونین‌های ترپنوئیدی، دارای تنوع بسیاری بوده و تاکنون در حدود ٤۰۰۰ 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 سکته‌های قلبی (Hicks, 2001; Uddin, 2015) در انسان هستند. ساپونین‌ها گروه بزرگی از تری‌ترپن‌های 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 شوینده‌گی بوده و به هنگام 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 دی اکسید 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، ۱۳۸٦). موسم گلدهی‌آن مهر– آبان می‌باشد. انتشار جغرافیایی آن جنگل‌های شمالی و دره‌های مرطوب کناره خزر، مازندران، زیارت گرگان، بندرگز، گیلان، لاهیجان و جنگل‌های رستم‌آباد در نزدیک رشت، جنگل‌های اطراف رامسر، رودبار، آستارا و طوالش می‌باشد (قهرمان، ۱۳۸٦). تمام اندام‌های گیاه گیاه، از جمله سرشاخه‌های جوان، ریشه‌ها و ریزوم دارای استفاده دارویی وسرشاخه‌های 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 ملیّن خفیف نیز مورد استفاده داشته است. اثر درمانی این گیاه به وجود ساپونین‌های استروئیدی که تا ٦ در صد از وزن خشک گیاه را شامل می‌شوند، مربوط می‌گردد. ساپونین‌های عمده موجود در این گیاه عبارتند از راسسین (تیپ اسپیروستان مونودسموزیدیک)، راسکوزید (تیپ فروستان بیوسموزیدیک) همراه با آگلیکون‌های راسکوژنین (۱ بتا– هیدروکسید دیوسژنین) و نئوروسکوژنین می‌باشد. مطالعات آزمایشگاهی نشان

داده‌است که عصاره این گیاه سبب تحریک گیرنده‌های آلفا- آدرنوژیک در ماهیچه‌های صـــاف 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 سـیاهرگی و حمله‌های حاد خواب یا سـنگین شـدن عضـو اسـتفاده می‌شـود. سـاپوژنین‌های کوله خاص هنگامی که به‌صورت دهانی مصرف شوند، جذب شده و جهت درمان نارسـایی عروق سیاهرگی و لنفی مفید است (ویک، ۱۳۸۹). استخراج هیدرو الکلی از ریزوم گیـاه کولـه خـاص به عنوان دارو در درمان بیماریهای عروقی استفاده می‌شود. (Hostettmann,1995).

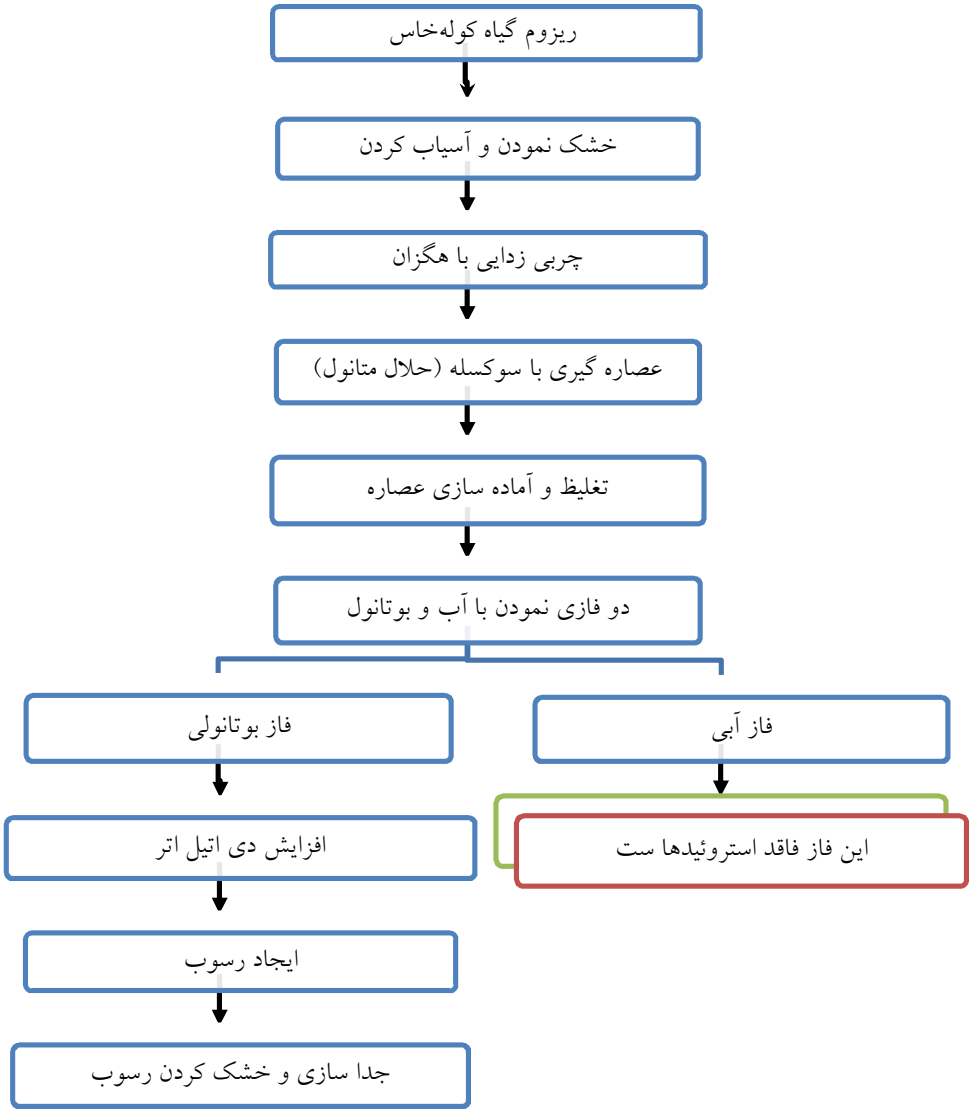
تحقیقات زیادی در خصـوص جداسازی ترکیبات سـاپونینی و اسـتروئیدی از ریزوم گیاه گزارش شـده اسـت. در تحقیقی که روی ریزوم گیاه کوله خاص در ژاپن انجام شـد شـش سـاپونین اسـپیرواسـتان و پنج سـاپونین فرواسـتان و در گزارش دیگر یک سـاپونین اسپیرواتان شناسایی شد (Mimaki, 1998, 1999). در تحقیق دیگری در فرانســه گزارش شــد دو مشــتق اسـتروئیدی سولفاته از این گیاه جداسازی و شناسایی گردید (Oulad-Ali, 1996). در بررسی دیگر بر روی ریزوم گیاه روســکوس هیرکانوس در آذربایجان یک نوع ساپوژنین استروئیدی گزارش شد (Iskenderov, 1967). در گزارش دیگر، ریزوم سـه گونه از گیاه کله خـاص به نام روســکوس آکولئاتوس، روســکوس هیپوگلوسـوم و روسـکوس کولچیکوسـمورد آزمایش قرار گرفت و سـاپونین‌های استروئیدی موجود در این سه گونه روسکوس با دستگاهHPLC-MS شناسایی و گزارش شــد (De Cobarieu, 2002). در تحقیقات دیگر که بر روی تعدادی از گونه های جنس *Ruscus* ، از جمله کوله خاص و روسـکوس هیپوفیلوم توسط آنالیز با دسـتگاه HPLC-MS انجام گرفت به ترتیب : سـاپونین‌ها و گلیکوزیدهای اسـتروئیدی از جمله دو مشتق فوروستانول و سه مشتق گلیکوزید های سولفاته از این گونه‌ها جداسـازی و شـناسـایی گردید (De Mimaki, 2008; Kite, 2007; Marino, 2012).

لـذا بـا توجه به ســطح 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 خالص‌سازی ترکیبات شیمیایی به ویژه مشتقات استروئیدی در گیاه و سپس شناسایی ترکیبات استخراج شده با روش‌های طیف‌سـنجی ^{1}H-NMR، IR و طیف‌سـنجی جرمی در منطقه سواد کوه در استان مازندران می پردازد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و آماده سـازی گیاه: نمونه‌های گیاه کوله خاس در اوایل تیرماه سـال ۱۳۹۰ از حوالی روسـتای عالم‌کلا در منطقه لفور شـهرسـتان سـوادکوه اسـتان مازندران جمع‌آوری و سپس ریزوم از سایر قسمت‌ها جدا و به قطعات کوچک تقسـیم شد و به دور از نور آفتاب در سـایه خشـک شدند. نمونه‌ها بعد از خشک شـدن با آسیاب خرد و سپس برای عصاره‌گیری آماده شــدنـد.برای چربی‌زدایی نمونـه، ۲۰۰ گرم از پودر خشـک ریزوم در قیف دکانتور ریخته و ٤۰۰ میلی‌لیتر هگزان به آن اضـافه شد. بعداز ٢٤ ساعت هگزان تازه جایگزین گردید واین کار یک بار دیگر هم تکرار شد. ۱۵۰ گرم از نمونه چربی‌زدایی شـده با ۷۰۰ میلی لیتر متانول به روش سوکسله و به مدت ٢٤ ساعت عصاره گیری شـد. حلال عصـاره حاصـل از سوکسله توسط دسـتگاه روتاری خارج شد و در مجموع ٤٦/٤٩ گرم عصـاره اولیه حاصل آمد. عصاره خشک شده متانولی در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حـل و در قیف دکـانتور ریخته و سپس به آن ۸۰ میلی‌لیتر بوتانول نرمال اضافه شد. بعد از هم زدن نمونه و جدا شدن فاز آلی و آبی، فـاز آلی جـدا و ذخیره شــد. به فاز آبی ۵۰ میلی‌لیتر

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



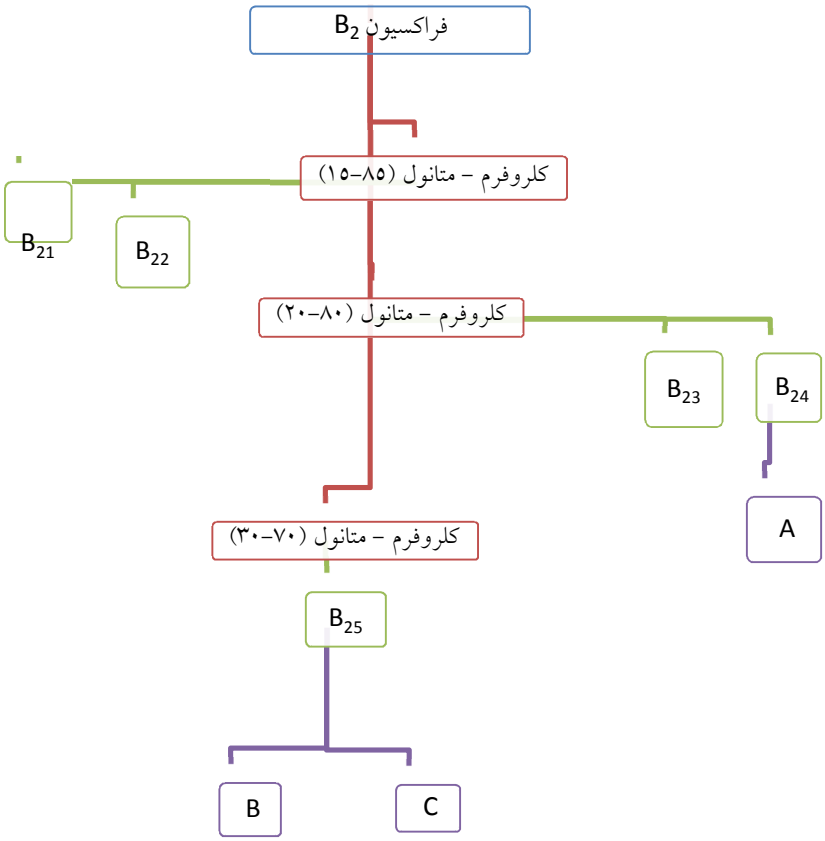
شکل ۱- شمای کلی عصاره‌گیری گیاه کوله‌خاس

کروماتوگرافی توسط ستون VLC: برای آماده کردن ستون VLC، قیف مخصوص کروماتوگرافی مایع تحت خلاء را به پمپ خلاء وصل می‌کنیم. ستون را به کمک مکش پمپ تا چند سانتی‌متر مانده به انتهای

ستون، با سلیکاژل دارای مش بالای ٤٠٠ 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 سیلیکاژل ستون VLCپخش 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 در جدول ۱ آمده است.بعد از بررسی فراکسیون‌های مختلف به‌دست آمده از شویش ستون با استفاده از کاغذ TLC و سیستم‌های مختلف حلالی فراکسیون B_2 بدلیل احتمال وجود مشتقات استروئیدی برای ادامه کار انتخاب شد.

فراکسیون B_2 شامل رسوب و بخش محلول بود که حلال بخش محلول را خارج و رسوب زرد رنگی به مقدار ۱/۷۲۱ گرم به دست آمد. ۰/٦ گرم از نمونه خشک شده B_2درستون ابتدا با سیستم حلالی کلروفرم- متانول (۸۵-۱۵)، سپس باسیستم کلروفرم- متانول (۸۰-۲۰) و در مرحله‌ی آخر با کلروفرم- متانول (۷۰-۳۰) مورد شویش قرار گرفت. حاصل شویش این ستون۵ فراکسیون بود که شمای کلی خالص‌سازی نمونه‌ها در شکل ۲ آورده شده است.



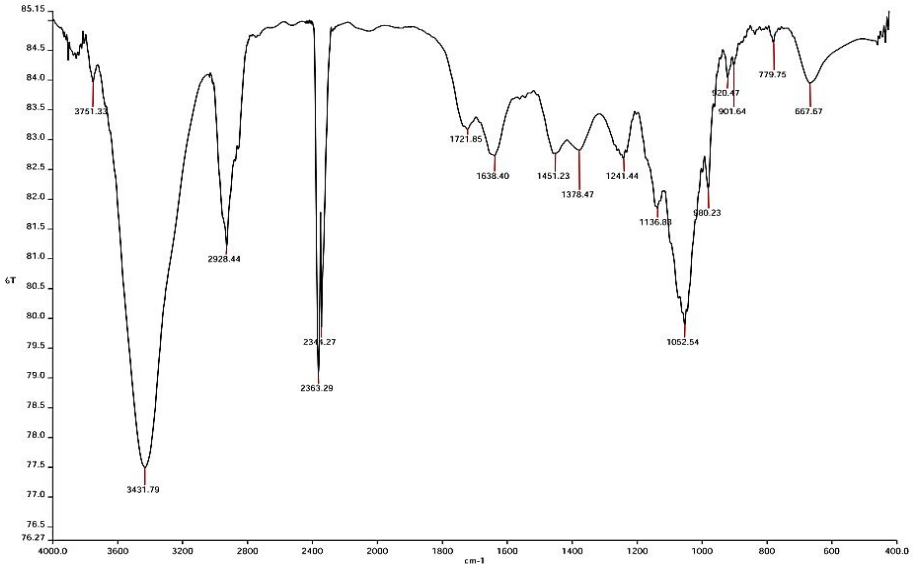
شکل ۲- شمای کلی خالص‌سازی نمونه‌ها

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

سیستم حلالی	حجم مصرفی کل (mL)	کلروفرم مصرفی (mL)	متانول مصرفی (mL)	تعداد فراکسیون
کلروفرم خالص	۱۵۰	۱۵۰	–	–
کلروفرم – متانول (۹۰–۱۰)	۲۵۸/۵	۲۳۲۸/۷۵	۲۵۸/۷۵	A_1,A_2,A_3,A_4,A_5,A_6
کلروفرم – متانول (۸۰–۲۰)	۱۲۰۰	۹٦۰	۲٤۰	B_1,B_2
کلروفرم – متانول (۷۰–۳۰)	۱۹۵۰	۱۳٦۵	۵۸۵	C_1,C_2,C_3,C_4
کلروفرم – متانول (۵۰–۵۰)	۱۲۰۰	٦۰۰	٦۰۰	D_1,D_2,D_3

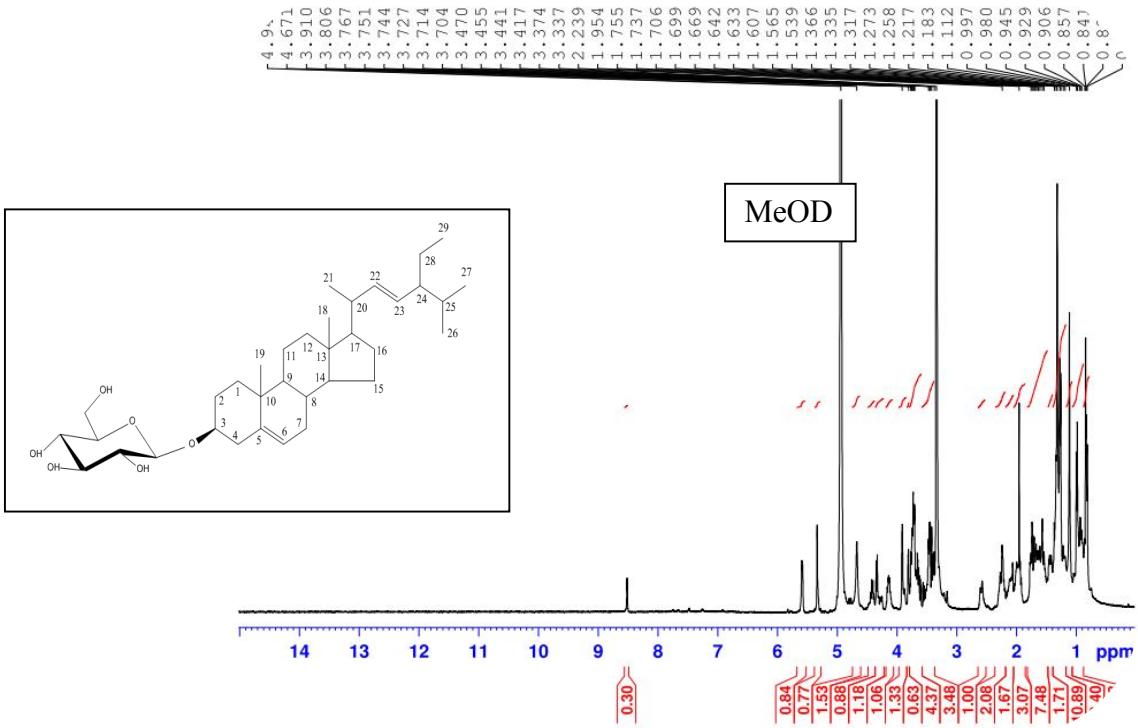
نتایج

تعیین ســـاختمان ترکیب (C): در طیف IR ترکیب (C) پیک ناحیه cm^{-1} ۳٤۳۱ نشـــان‌دهنده گروه هیدروکسیل (عامل الکلی) در مولکول می‌باشد. جذب در ناحیه‌ی $۲۹۲۸cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کشـــشـــی گروه‌های متیل است. ارتعاش کششی پیوند دوگانه در ناحیه‌ی cm^{-1} ۱٦۳۸ ووجود ارتعاش جذبی در ناحیه $۱۳۷۸cm^{-1}$ تائید کننده گروه ایزوپروپیل است. حضور جذبی پهن و بزرگ در ناحیه‌ی $۱۰۵۲cm^{-1}$ نشـــان دهنده‌ی وجود گروه قندی در ترکیب است (شکل ۵).



شکل ۵- طیف IR ترکیب (C) با KBr

طیف هیدروژن (^{1}H-NMR) ترکیب (C) در حلال متانول دوتره گرفته شده است. پیک مشاهده شده در ۰/۸۸ ppm مربوط به هیدروژن کربن‌های (۲٦، ۲۷ و۲۹) است. پیک موجود در ۰/۹ ppm مربوط به گروه متیل کربن‌های (۹، ۲۱ و ۲٤) است که همپوشانی کرده‌اند. در شکل ٦ طیف (^{1}H-NMR) ترکیب (C) نشان داده شده است.



شکل ٦- طیف ^{1}H-NMR ترکیب (C)، در حلال متانول دوتره

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

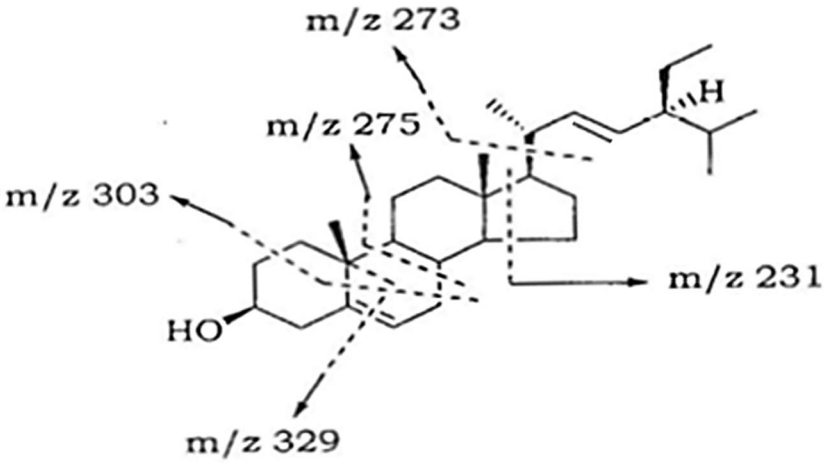
جدول ۲- پیک‌های موجود در طیف هیدروژن ترکیب (C)

شماره هیدروژن	محدوده جابجایی شیمیایی	تعداد هیدروژن
۱	۲/۳	۲
۲	۳/۱	۲
۳	۳/٤	۱
٤	۱/۷	۲
۵	-	۰
٦	۵/۳	۱
۷	۱/٤۸	۲
۸	۱/٤۹	۱
۹	۰/۹	۱
۱۰	-	۰
۱۱	۱/۱۷	۲
۱۲	۱/۱۳	۲
۱۳	-	۱
۱٤	۱/۰۷	۱
۱۵	۱/۰۳	۲
۱٦	۱/۷	۲
۱۷	۱/۰٤	۱

ادامه جدول ۲-

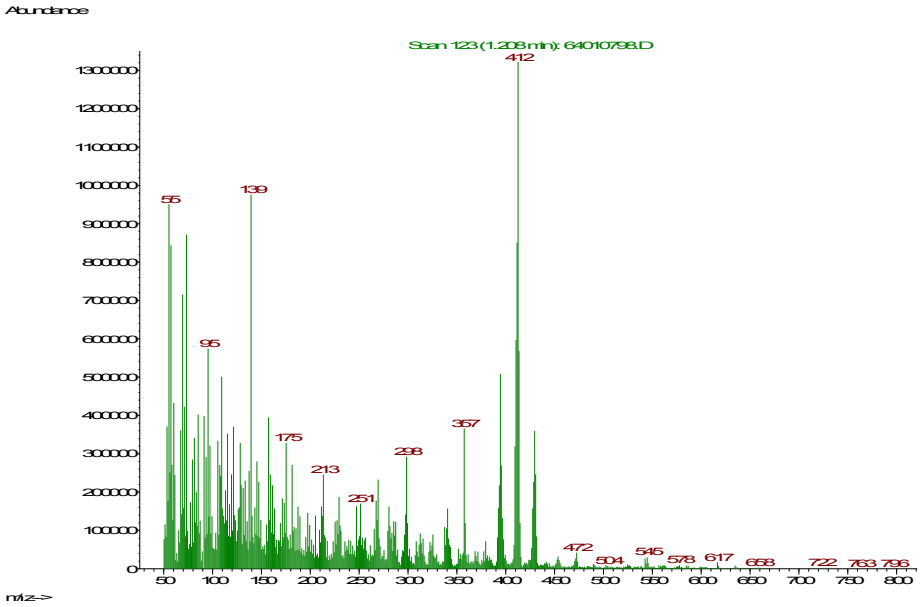
۱۸	–	۳
۱۹	۱	۳
۲۰	۱/۳	۱
۲۱	۰/۹	۳
۲۲	۵/۱	۱
۲۳	۵	۱
۲٤	۰/۹	۱
۲۵	۱/٤	۱
۲٦	۰/۸۸	۳
۲۷	۰/۸۸	۳
۲۸	۱	۲
۲۹	۰/۸۸	۳
۱’	٤/۲	۱
۲’	۳/۰۵	۱
۳’	۳/۰٤	۱
٤’	۳/۱	۱
۵’	۳/۰۷	۱
٦’a	٤/٤	۱
٦’b	٤/۲	۱

شکل ۷ شکست‌های عمده‌ای که ترکیب استیگماسترول حین طیف‌سنج جرمی (MS) متحمل می‌شود، را نشان می‌دهد.



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

فیتواستـــرول‌ها دارای اهمیت زیادی در ســـلامت انسان به ویژه در کاهش سکته‌های قلبی دارد. بنابر این توجـه زیادی به اســـتخراج این ترکیبات با روش‌های متفاوت شـــده اســـت. اســـتفاده از حلال‌های آلی که متداول‌ترین روش اســـتخراج می‌باشـــد علاوه بر آنکه برای انســـان مضـــر اســـت مشـــکلات زیســـت محیطی فراوانی را نیز منجر شـــده اســـت (Kagliwal, 2011). بنابراین روشـــی که بتواند استخراج ترکیبات طبیعی را با بازده بالا با اســـتفاده از حجم کم حلال انجام دهد حائز اهمیت است.

در این تحقیق و با استفاده از جستجوی کتابخانه‌ای دســـتگاه طیف‌ســـنج جرمی ترکیب اســـتیگماســـترول گلیکوزید با ۹۲ درصـــد تطابق تشـــخیص داده شـــد. اتصـــال گروه قنـدی باعث قطبیت این ترکیب و حل شـــدن آن در متانول می‌گردد. ترکیب خالص شده (C) در حلال‌هـای غیرقطبی و یـا بـا قطبیت کم قابل حل نمی‌باشـــد. در طیف جرمی، پیک ۵۷۵ مربوط به یون مولکولی ترکیب اســـت که با جدا شـــدن گلوکز پیک ۳۹٤ مشاهده می‌شود. قطعه جرمی با جرم ٤١٢ مربوط به β- استیگماسترول می‌باشد، که با جدا شدن زنجیر کربنی متصـــل به حلقه قطعه یونی با جرم ۲۷۳ ظاهر می‌شـــود. با جدا شـــدن گروه هیدروکســـیل به صورت مولکول آب، قطعه یونی با جرم ۳۹٤ حاصل می‌شود. همچنین وجود قطعـه بـا جرم ۲۵۵ در طیف جرمی ترکیب (C) مربوط به چهار حلقه به هم جوش خورده اســـتروئیدها اســـت، که ســـاختار اســـتروئیدی 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 stigmast-5,22-dien-3-O-α-D-glucopyranoside با فرمول مولکولی ($C_{35}H_{58}O_6$) و وزن مولکولی ٥٧٤، دارای R_f=0.5 با سیستم حلالی کلروفرم-متانول (۹۰-۱۰) و با نقطه ذوب ۷۰-۲٦۸ درجه سانتی‌گراد شناسایی شد.

بخش غیرقندی (استروئیدی) ترکیب (C) که به نام استیگماسترول شناخته می‌شود دارای نام‌های مترادفی نظیر β-Stigmasterol و stigmasterin اســـت. این ترکیـب به‌عنوان پیش ماده ســـاخت پروژســـترون و

ویتامین D_3 و همچنین ماده حدواسط ساخت آندوروژن، 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-α-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. متاسفانه به‌علت پیچیدگی طیف‌های ترکیبات A و B، این دو ترکیب قابل شناسایی و تعیین ساختار نبودند.

نتیجه‌گیری نهایی

از آنجایی که فیتواسترول‌ها دارای اهمیت زیادی در سلامت انسان به‌ویژه در پیشگیری و درمان سکته‌های 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 استیگماسترول 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 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. ۱۳۸٦. فلوررنگی ایران، انتشارات: موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع – بخش گیاهشناسی، شماره اتشار: ۱۲۲۷، کد: ۱٤۸/۰۰۳/۰۰۱.

۳. ویک، ب.، وینک، م. ۱۳۸۹. مهم‌ترین گیاهان دارویی جهان. صفایی خرم، مهدی، مجتمع آموزش کشاورزی سبز ایران، صفحات ۳۸، ٦۵، ۳٤۳-۳٤۲.

4. Alam, M.S., Chopra, N., Ali, M. and Niwa, M., 1996. Olean and stigmasterol derivatives from Ambromaaugusta, 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, stigmasterol and ergosterin in A. roxburghii using supercritical fluid extraction followed by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry.

Rapid Communication in Mass Spectrometry, 21(18): 3024-3032.
12. Iskenderov, G.B., 1967. A steroid sapogenin from *Ruscus Hyrcanus*. Khimiyaprirodnykh, 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 buckthorm 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.