

*A Separate Evaluation of *Echium Amoenum L.* and *Viola Odorata L.* Extracts on Solving Gall Stones*

Ali Maghsoodi¹
Mohammad Azadbakht^{2,3}
Gholamali Godazandeh⁴
Fatemeh Akbari⁵
Abbas Nodehi¹
Aghil Mollaei⁶

¹ Medicinal Plant Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of General Surgery, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, School of Pharmacy, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

⁶ MSc in Biostatistics, Faculty of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 27, 2023; Accepted November 6, 2023)

Abstract

Background and purpose: Gallstones are caused by the accumulation and density of fat-soluble substances inside the gallbladder. In traditional medicine *Echium amoenum* increases gallbladder secretions. so the aim of this study was to investigate the effect of *Echium amoenum* extract and *Viola odorata* on gallstone dissolution.

Materials and methods: At first, gallstones were collected and the stone compounds were identified by UV and DSC. Gallstones are divided into equal parts in terms of size and weight (200 mg). Three acidic, alkaline and distilled water media were prepared as a control group along with the experimental groups which contained *Echium amoenum* and *viola odorata* extracts with concentrations of 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml and 500 mg/ml, respectively. A gallstone sample was placed in it and sampled after 24 and 48 hours and the dissolution rate of the stone compounds was measured by an auto-analyzer.

Results: The UV spectrum showed the presence of bilirubin in the gallstones and the DSC thermogram showed the presence of cholesterol in the stones. Examination of isolated gallstone compounds showed *Echium* extract with a concentration of 500 mg was able to dissolve 70% of the calcium and the *Viola* extract with a concentration of 500 mg has been able to dissolve 50% of the cholesterol and 80% of the stone's calcium.

Conclusion: *Echium amoenum* and *Viola odorata* have a significant effect on the dissolution of gallstones (P<0.0001).

Keywords: Gallstones, *Echium amoenum*, *Viola odorata*, triglycerides, cholesterol

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 1): 295-301 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Azadbakht⁰ Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

بررسی جداگانه اثر عصاره‌های گل‌گاوزبان و گل بنفشه بر انحلال سنگ صفراوی

علی مقصودی¹

محمد آزادبخت^{2,3}

غلامعلی گدازنده⁴

فاطمه اکبری⁵

عباس نودهی¹

عقیل مولایی⁶

چکیده

سابقه و هدف: سنگ کیسه صفرا به علت انباشتگی و تراکم مواد محلول در چربی در داخل کیسه صفرا ایجاد می‌شود. در طب سنتی گل‌گاوزبان صفرا آور است. بنابراین این مطالعه به بررسی اثر عصاره گل‌گاوزبان و گل بنفشه، در سنگ صفرا می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر نخست سنگ صفرا جمع‌آوری گردید و ترکیبات سنگ به وسیله دستگاه UV و DSC شناسایی شد. سنگ صفرا به قسمت مساوی (200 mg) تقسیم شد. سه محیط اسیدی، قلیایی و آب مقطر به عنوان گروه کنترل در کنار گروه‌های آزمایش که به ترتیب حاوی عصاره گل‌گاوزبان و بنفشه با غلظت 1 mg/ml، 10 mg/ml، 100 mg/ml و 500 mg/ml بودند تهیه شد. نمونه سنگ صفراوی در آن قرار داده شد و پس از 24 و 48 ساعت نمونه‌گیری شدند. سپس میزان انحلال ترکیبات سنگ توسط دستگاه اتوانالایزر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: طیف UV حضور بیلی روبین در سنگ صفرا و ترموگرام DSC حضور کلسترول در سنگ صفرا را نشان داد. عصاره گل‌گاوزبان با غلظت 500 mg/ml توانسته است تقریباً 80 درصد کلسیم را در خود حل کند و عصاره گل بنفشه با غلظت 500 mg/ml توانسته است تقریباً 50 درصد کلسترول و 90 درصد کلسیم سنگ را در خود حل کند. **استنتاج:** گل‌گاوزبان و بنفشه اثر قابل توجهی بر انحلال ترکیبات سنگ صفرا دارند ($P < 0/0001$).

واژه‌های کلیدی: سنگ کیسه صفرا، گل‌گاوزبان، بنفشه، تری‌گلیسرید، کلسترول

مقدمه

سنگ صفرا یک بیماری رایج است که به دنبال رعایت نکردن رژیم غذایی مناسب، چاقی، بی‌حرکی، افزایش سن و عوامل وراثتی ایجاد می‌گردد (1). سنگ‌های کیسه صفرا رسوبات جامد کلسترول، تری

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: azadbakht@hotmail.com

1. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، گروه فارماکولوژی و بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استاد، گروه جراحی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. استادیار، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

6. کارشناس ارشد آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1402/5/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/5/30 تاریخ تصویب: 1402/8/15

و کوئرتستین با روش اسپکتوفوتومتری در طول موج 415 انجام شد (7).

جداسازی و آماده‌سازی سنگ صفرا

این مطالعه با کد اخلاق IR.MAZUMS. REC.1400.8117 در دانشگاه علوم پزشکی مازندران تصویب شد. با مراجعه به بیمارستان شفای ساری سنگ‌های صفراوی جدا شده از بیماران مبتلا، جمع‌آوری گردید و به قسمت‌های مساوی از نظر ابعاد و وزن (200mg) تقسیم شد و به لوله‌های آزمایش شماره‌گذاری شده منتقل شدند تا میزان انحلال آن‌ها در گروه‌های کنترل و آزمایش بررسی شود.

بررسی طیف سنگ صفرا توسط دستگاه DSC (Differential scanning calorimetry)

برای بررسی طیف نقطه ذوب سنگ صفراوی از دستگاه DSC استفاده می‌گردد. ترموگرام DSC پیک‌های مختلفی را در دماهای مختلف نشان می‌دهد که هر یک بیانگر ترکیبات شیمیایی ویژه‌ای است. در مطالعه حاضر 20 mg از سنگ پودر و به مدت چهار ساعت در دستگاه DSC گذاشته و پس از آن طیف نقطه ذوب به دست آمد (8).

بررسی طیف UV سنگ صفرا

1 mg پودر سنگ صفرا با آب مقطر مخلوط کرده و درون دستگاه اسپکتروفوتومتری گذاشته و جهت بررسی ترکیبات آن طیف UV استخراج شد (8).

بررسی ترکیبات سنگ صفرا

15 mg پودر سنگ با میزان مشخص آب مقطر به وسیله سونیکاتور مخلوط گردید و توسط دستگاه اتوانالایزر در آزمایشگاه سرولولوژی، ترکیبات سنگ مشخص گردید.

گلیسیرید، کلسیم، بیلی روبین و فسفر هستند (1). گل‌گاوزبان (*Echium amoenum L.*) در طب سنتی ایران صفرا آور است (2). بیش‌ترین اثر این گیاه به دلیل داشتن رزمارینیک اسید، آنتوسیانین، فلاونوئید، ساپونین ترپنویدها و اسیدهای غیراشباع و آلکالوئید پیرولیزیدین است که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی است (3).

بنفشه، با نام علمی *Viola odorata L*، دارای ترکیباتی مانند استرها، کومارین، فلاونوئید، ساپونین‌ها، تانن‌ها، موسیلاژ و آنتوسیانین است. با وجود مطرح‌شدن مصرف خوراکی این گیاهان در طب سنتی (4) دانستن نحوه عملکرد و قدرت تأثیر انحصاری عصاره‌ها بر انواع رسوبات سنگ‌های صفراوی مانند رسوبات کلسترولی، تری‌گلیسیریدی بیلی روبینی، امری ضروری است. هم‌چنین با دانستن پروفایل رسوبات می‌توان درمان مؤثرتری ارائه داد (5). این مطالعه به بررسی اثرات گیاهان بنفشه و گل‌گاوزبان بر انحلال سنگ صفراوی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر به بررسی اثرات بنفشه و گل‌گاوزبان به صورت مجزا از هم بر انحلال سنگ صفراوی در محیط آزمایشگاهی (*in vitro*) می‌پردازد.

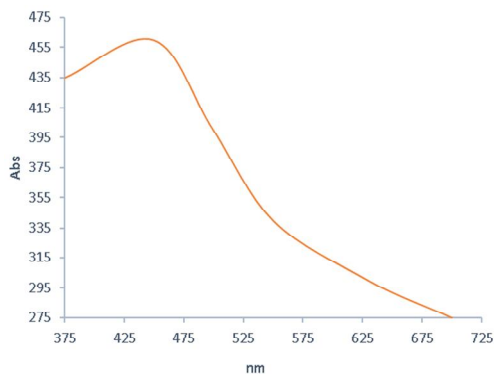
جمع‌آوری و عصاره‌گیری

گل بنفشه و گل‌گاوزبان از بازار مازندران، خریداری شد. گیاهان، جداگانه خشک و خرد شدند. عصاره‌گیری به روش سوکسله به مدت پنج ساعت با اتانول 80 درصد انجام گردید. عصاره تغلیظ و خشک شده، در یخچال نگهداری شد (6).

فنول و فلاونوئید تام

آنالیز فیتوشیمیایی گل‌گاوزبان و بنفشه با اندازه‌گیری فنول و فلاونوئید به ترتیب بر اساس استاندارد گالیک اسید

عصاره بیش تر شد. سنجش ترکیبات سنگ صفرای با روش وزن سنجی حرارتی (DSC) و جذب UV روش رایج شناسایی ترکیبات است (11). بررسی طیف UV نشان داد بیش ترین میزان جذب در 455 nm است که این جذب مشخصه بیلی روبین (تصویر شماره 1) است. طیف نقطه ذوب به دست آمده از دستگاه DSC نقطه اوج خود را در دمای 149°C نشان می دهد که بیانگر حضور کلاسترول است (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 1: طیف UV سنگ صفرای جدا شده از بیمار. در این شکل نقطه اوج خود جذب UV در پیک 455 نانومتر دیده می شود

رایج ترین بازده زمانی برای بررسی انحلال سنگ های 48 ساعت است که مطابق روش کار این مطالعه است. در مطالعات دیگر بررسی های کاهش وزن سنگ تا دو هفته ادامه می یابد (12). مطالعه حاضر تغییرات را در املاح سنگ گروه های درمان بررسی می کند (تصویر شماره 3).

عصاره بنفشه و گل گاوزبان با غلظت 500 mg/ml به ترتیب توانسته است حدود 90 درصد و 80 درصد از کلسیم اولیه را در خود حل کنند و اختلاف معنی داری با گروه های کنترل (اسیدی، قلیایی، آبی) ($P < 0/0001$) دارد. کاهش وزن سنگ با عصاره های بنفشه و گل گاوزبان در پایان آزمایش نسبت به وزن ابتدایی سنگ به ترتیب 44 درصد و 37 درصد ($P < 0/0001$) بود. گروه بنفشه و گل گاوزبان با غلظت 500 mg/ml باعث کاهش قابل توجهی از سطح تریگلیسرید، بیلی روبین سنگ

سنجش اثر عصاره گل گاوزبان و بنفشه بر انحلال سنگ های صفرای

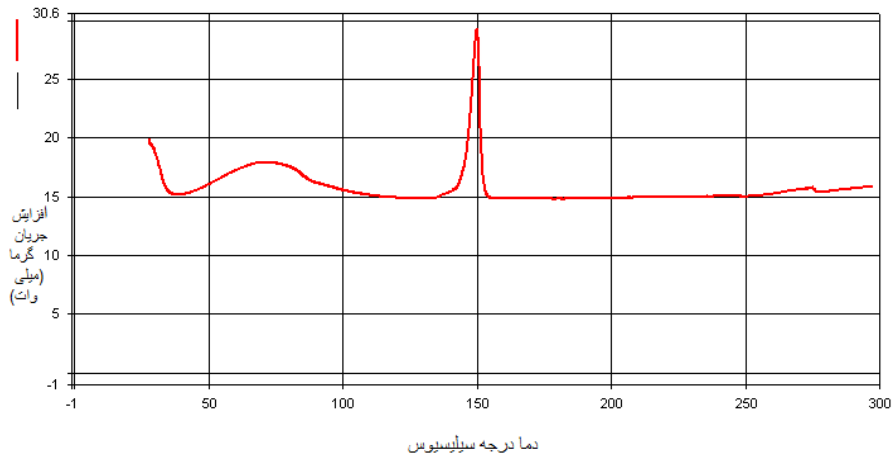
برای این منظور سنگ صفرای در مجاورت گروه های درمان، به ترتیب حاوی عصاره گل گاوزبان و بنفشه که هر کدام با غلظت 1 mg/ml، 10 mg/ml، 100 mg/ml و 500 mg/ml بودند، قرار گرفته و میزان انحلال سنگ بر اساس ترکیبات موجود در سنگ ها که شامل کلاسترول، تریگلیسرید، بیلی روبین، کلسیم و فسفر بود در زمان 24 ساعت و 48 ساعت توسط دستگاه اتوآنالیزر بررسی گردید (8). هم چنین محیط های اسیدی (استیک اسید با PH 4/5)، قلیایی (سدیم بیکربنات با PH 9/5) و آب مقطر دیونیزه به عنوان گروه کنترل تهیه شد.

آنالیز آماری

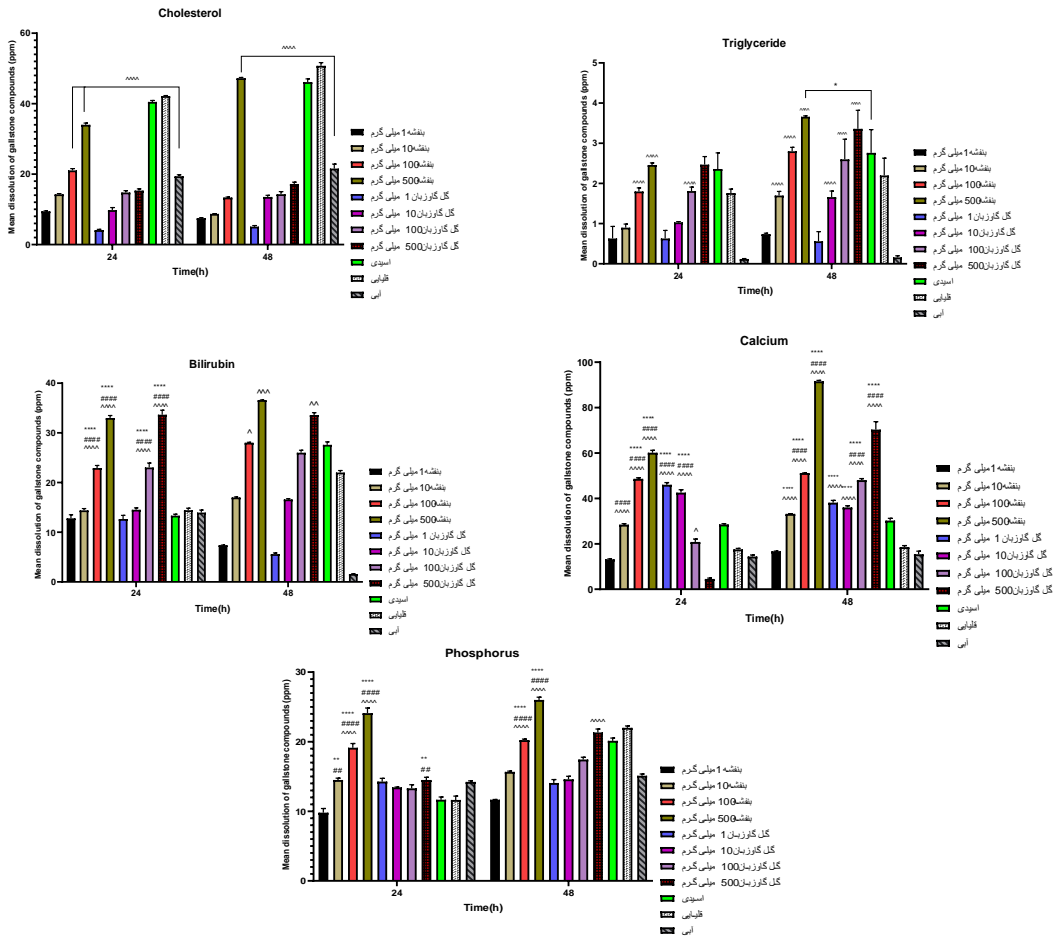
تمامی اطلاعات به دست آمده به کمک نرم افزار پریم (GraphPad Prism 8) و آنالیز واریانس دوطرفه (2-way ANOVA) و به دنبال آن آزمون t-test انجام شد. به عنوان سطح تفاوت معنی داری گروه ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها و بحث

عصاره های گل گاوزبان و بنفشه بر سنگ صفرای انحلال سنگ صفرای را نشان داد. این گیاهان دارای مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی هستند. میزان فنول گل گاوزبان و بنفشه به ترتیب 31/6 mg/g و 5/3 mg/g و میزان فلاونوئید بنفشه و گل گاوزبان به ترتیب 20/8 mg/g و 8/29 mg/g است (9). به علت حضور این ترکیبات دارای خواص به دام اندازی رادیکال های آزاد و بهبود فاز التهابی دارند و از طریق تنظیم التهاب، حساسیت به تشکیل سنگ کیسه صفرای را کاهش داده، از تشکیل سنگ های صفرای کلاسترولی جلوگیری می کنند (10). در این مطالعه با افزایش غلظت عصاره گیاهان و هم چنین افزایش زمان آزمایش میزان انحلال ترکیبات سنگ صفرای در



تصویر شماره 2: ترموگرام DSC سنگ صفرآ جداشده از بیمار. در این شکل نقطه اوج در دمای 149°C دیده می شود.



تصویر شماره 3: تغییرات میزان ترکیبات کلسترول، تری گلیسرید، بیلی روبین، کلسیم و فسفر در بازه زمانی 24 و 48 ساعت در بین گروه های ****P < 0/0001 در مقایسه با گروه کنترل قلیایی (##### P < 0/0001, ### P < 0/001, ## P < 0/01, # P < 0/05) در مقایسه با گروه کنترل اسیدی (**** P < 0/0001, *** P < 0/001, ** P < 0/01, * P < 0/05) در مقایسه با گروه کنترل آب.

و مواد مورد نیاز پیشنهاد می شود در مطالعات تخصصی بعدی نوع ترکیبات و میزان ماده مؤثر گیاه با روش HPLC تعیین شود و مطالعات حیوانی انجام گردد. بنفشه و گل گاوزبان بیشترین اثر کاهشی را بر کلسیم موجود در سنگ صفرا می گذارند و عصاره 500 mg/ml هر دو گیاه در محیط آزمایشگاهی به طور مؤثری در انحلال سنگ صفرا مؤثر است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کارکنان آزمایشگاه فارماکولوژی تشکر و قدردانی می گردد.

شد ($P > 0/05$). بین گروه بنفشه و گل گاوزبان با غلظت 500 mg/ml وجود انحلال بیش تر کلسیم و وزن سنگ در گروه بنفشه تفاوت معنی دار نبود ($P > 0/05$). در مطالعات از مایع صفرا برای انحلال نمونه گیاهی استفاده شد که در این مطالعه عصاره ها در آب حل شده، در دمای اتاق در تماس با سنگ قرار گرفتند. در مطالعه ای، آزمایش در شرایط استاندارد بدن (37°C و $\text{PH}=6$) انجام گردید (8) و ursodiol به عنوان داروی استاندارد استفاده شد که در این مطالعه استفاده نشده است (12). با توجه به محدودیت بررسی های بیش تر فیتوشیمیایی گیاه، هزینه بر بودن آن، دشواری تهیه استانداردهای ترکیبات آزمایشگاهی

References

- Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. *The Lancet* 2006; 368(9531): 230-9.
- Azizi H, Ghafari S, Ghods R, Shojaii A, Salmanian M, Ghafarzadeh J. A review study on pharmacological activities, chemical constituents, and traditional uses of *Echium amoenum*. *Pharmacognosy Reviews* 2018; 12(24): 208-213.
- Safaeian L, Javanmard SH, Ghanadian M, Seifabadi S. Cytoprotective and antioxidant effects of *Echium amoenum* anthocyanin-rich extract in human endothelial cells (HUVECs). *Avicenna J Phytomed* 2015; 5(2): 157.
- Jafari H, Mokaberinejad R, Raeis-Abdollahi E. *Echium amoenum* from viewpoint of Avicenna: a brief review. *Journal of Contemporary Medical Sciences*. 2018;4(4): 187-190.
- Feyzabadi Z, Ghorbani F, Vazani Y, Zarshenas MM. A critical review on phytochemistry, pharmacology of *Viola odorata* L. and related multipotential products in traditional Persian medicine. *Phytother Res* 2017; 31(11): 1669-75.
- Chaichi M, Mehrzad J. GC-MS analysis of chemical compounds from acetone extract of *Echium amoenum* Fisch. *Research Journal of Pharmacognosy* 2017; 4(Supplement): 9.
- Sikander T, Bhatti AA, Mushtaq Z, Shahid M, Nighat F, Anwar S. Evaluation of the bioactive role of indigenous *viola odorata* leaf extracts. *Pak J Bot* 2021; 53(2): 541-9.
- Chekroune M, Benamara S. Gallstones-dissolving capacity of lemon (*Citrus limon*) juice, *Herniaria hirsuta* L. extract and lemon juice-based natural vinaigrette in vitro 2017.
- Aslam MS, Ahmad MS, Riaz H, Raza SA, Hussain S, Qureshi OS, et al. Role of flavonoids as wound healing agent. *Phytochemicals-source of antioxidants and role in disease prevention* 2018: 95-102.
- van Dooren I, Foubert K, Bijttebier S, Theunis M, Velichkova S, Claeys M, et al. Saponins and flavonoids from an infusion of *Herniaria hirsuta*. *Planta Med* 2016 ; 82(18): 1576-1583.
- Arshad R, Tabish TA, Naseem AA, ul Hassan MR, Hussain I, Hussain SS, et al. Development of poly-L-lysine multi-

functionalized muco-penetrating self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for improved solubilization and targeted delivery of ciprofloxacin against intracellular *Salmonella typhi*. *Journal of Molecular Liquids* 2021; 333: 115972.

12. Tiwari SW, Sah AN. Effect of Apricot Fruit and Kernel Extracts on in-vitro Dissolution of Cholesterol Gallstones: Implication for Development of Potent Anti-cholilithiatic agent. *Indian J Pharm Educ Res* 2020; 54: 755-60.