تاثير المستخلص الكحولي الحار لثمار نبات الكرفس على تفتيت بعض انواع من حصى الكلى خارج الجسم الحي

Influence of hot alcohol extraction of Celery fruits on renal stones dissolution *in vitro*.

ضحى بهاء محمد سعد حسين خضير نبال خليل موسى شهد شكري صبار
وزارة العـــــلوم والتكـــــنولوجيا
Duha B. Mohamed Saad H. Khudier Nibal Kh. Mousa Shahad Sh Sabbar
Ministry of Science and Technology

المستخلص

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تاثير المستخلص الكحولي الحار لثمار الكرفس على تفتيت نوعين من حصى الكلى الشائعة وهي (Uric acid, Ca-OX) ، استعملت تقنية ال- HPLC للتحري عن انواع وتراكيزالمركبات الطيارة لثمار نبات الكرفس اذ اعطت النتائج 14 مركب وهي α-pinene، Cineole، P- cymene، Terpinene، α- phellandrene، β-pinene ، Geraniol، α-terpinole، Linalol، Rutin، Myrcene Camphane , Limonene Menthone, أما بالنسبة لتراكيز هذه المركبات فقد كان مركب الـ α-pinene أعلاها 19.2 µg/ml، واقل تركيز كان لمركب الـ Camphane 6.3. µg/ml اظهرت نتائج دراسة معاملة حصى الكلى من نوع Ca-OX بالمستخلص الكحولي الحارلثمار الكرفس وجود انخفاض معنوي في وزن الحصى حيث بلغت اعلى نسبة انخفاض بالوزن وصلت الى 17.02% عندالتركيز 5%، وعند المقارنة مع دواء Rowatine تبين وجود تقارب كبير بين نسب التفتيت للمستخلص الكحولي لثمار الكرفس و دواء Rowatine، لذا يمكن اعتماد المستخلص الكحولي الحار بتركيز 5% لفعاليته العالية في تفتيت الحصى نوع Ca-OX بالدرجة الاولى و uric acid بالدرجة الثانية .

الكلمات المفتاحية : المستخلص الكحولي الحار ، ثمار الكرفس ، حصى الكلى

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of hot alcohol extraction activity of *Apium graveolens* fruits on the common Renal stones dissolution (Ca-OX ,Uric acid) kinds and volatile oils concentrations on *Apium graveolens* via HPLC were estimated. Fourteen compounds which were (α-pinene, Cineole, P- cymene, Terpinene, α- phellandrene, β-pinene, Geraneole, α-terpinole, Linalool, Menthone, Limonene, Myrcene, Camphen, Rutin) were measured. In regard to concentration, α -pinene has the highest concentration since it reaches 19.2 µg/ml, while the lower concentration was achieved with Camphen which was 6.3 µg/ml. Results of Ca-Ox renal stones treated with extract of *Apium graveolens* showed significant decrease in stone weight since highest weight decrease percentage, using the hot alcoholic extract reaches 17.02 % at 5 % concentration and in comparison with Rowantinex drug, the results showed a high similitude between the hot alcoholic extract at 5% concentration and Rowantinex drug in respect of percentage of renal stones dissolution, so hot alcohol extraction of apium gravedens in 5% concentration was the best and active in dissolution Ca-OX at first degree and uric acid at second degree.

Key words: hot alcohol extraction, Celery fruits, renal stones

المقدمـــــــة

تعد حالة مرض حصى الكلى احد أمراض الجهاز البولي الخطيرة وأكثرها شيوعاً بين الأمراض التي تصيب الكلى بعد أمراض الفشل الكلوي، ومرض البروستات [1]. ينتج مرض حصى الكلى عن تكوين حصى غير ذائبة في القناة البولية تتكون عادة في إحدى الكليتين، و تبقى في الحوض الكلوي أو تمر إلى الحالب ثم المثانة البولية وغالباً ما تقوم بسد مجرى الإدرار، وهذا يرافقه الم شديد [2]. يحصل الترسيب نتيجة لتوافر شرطين: بقاء المحلول ساكناً لمدة زمنية كافية وتوافر مادة تعمل نواة تتكون حولها الحصاة وتتأثر هذه المرحلة بعوامل عدة مثل : الحرارة، وتوافر الغرويات، ومعدل جريان السائل، واضطرابه . يبقى العامل الأهم هو تركيز الذائبات في السائل وبعد هذه المرحلة (منطقة ما بعد الثبات) تبدأ البلورات بالترسب سواء توافرت نواة أم لا لذا تدعى هذه المرحلة بالتنوي (Nucleation)[3,4]، فالحصى لا تتكون من المادة بالتبلور فقط بل لها تركيب خاص فهناك مادة عضوية مطمورة في المادة المتبلورة وتترسب المادة المتبلورة على شكل حلقات كما في حلقات النمو للأشجار، أي يمكن تمي يز مكونين أساسيين في كل حصاة الأول الدعامة أي المادة العضوية والاخر الحشوة المتمثلة بالراسب المتبلور [5] .

نظراً لما يتمتع به الكرفس من فيتامينات ومعادن فهو يستعمل مقوياً عاما ، مرمماً لخلايا الجسم ، مرطباً ومدراً للبول ، منحفاً، ضد الروماتزم، مطهراً لمجاري الدم، مضاداً للتعفن وعسر الهضم، للوهن والحمى المتقطعة مثل: حمى الملاريا وكذلك الصرع وأمراض السمنة والصدر والارق وكذلك ضيق التنفس والسعال والبحة والنقرس والتهاب المفاصل . إما خارجياً فيمكن استعماله ضد الجروح

والخراجات والسرطانات والتشققات الناتجة في القدم في وقت البرد ويستعمل غرغرة وغسولاً ضد تقرحات الفم والخناق وخفوت الصوت وورم اللوزتين . لقد بينت الأبحاث في ألمانيا والصين ان للزيت العطري مفعولاً مهدئاً للجهاز العصبي المركزي ولبعض مكوناته مفعولاً مضاداً للتشنج، كما أثبتت الدراسات في الصين فعالية الزيت في معالجة فرط ضعف الدم [6]. نتيجة لتوجهات العلماء الاخيرة بتصنيع مواد علاجية من مصادر نباتية رخيصة ومتوفرة. هدف البحث الى معرفة التركيز الامثل وذو الفعالية من المستخلص الكحولي الحار لثمار الكرفس في تفتيت حصى الكلى من نوع uric acid و Ca-OX بالمقارنة مع عقار الـRowatine .

المواد وطرائق العمل:

1.جمع عينات النبات وتحضير المستخلص الكحولي الحار.

تم وزن 20 غم من مسحوق العينة النباتية الجافة ووضعت في الكشتبان Thimble، ووضع في جهاز Soxhlet، واستعمل 100 مل من محلول الكحولي وبتركيز 80 % ولمدة 8 ساعات ، بعدها رُكز المستخلص بجهاز المبخر الدوار Rotary evaporator، ثم جمع كل على حدة في عبوات زجاجية نظيفة ومعقمة بعد تدوين اسم المستخلص عليها وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 م.

تم استخلاص الزيت باستعمال طريقة التقطير المائي [7] اذ تم استعمال جهاز كليفنجر Clevenger. اخذ 100 غم من الثمار الجافة المطحونة المراد استخلاص زيتها و وضعت في الدورق الخاص بالجهاز وأضيف لها 1000مللتر من الماء . أجريت عملية التقطير المائي بتسخين الدورق لمدة 3 ساعات لكل عينة لحين الحصول على اكبر كمية من الزيت، بعدها استخلصت نماذج الزيت باستعما ل قمع الفصل separator funnel. اذ اخذ محلول الاستخلاص ووضع في القمع وترك ليبرد . انفصلت طبقة الزيت الى الأعلى والطبقة السفلى هي خليط من الزيت والماء ثم أعيدت العملية لثلاث مرات لكي تستخلص وتفصل اكبر كمية من الزيت . بعد استخلاص الزيت من كل نموذج (مكرر) . وضعت النماذج على درجة حرارة 4م في ثلاجة لحين إجراء الاختبارات الأخرى.

2.فصل مكونات زيت ثمار الكرفس باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي

استعملت طريقة الفصل والتقدير الكروماتوغرافية HPLC لتقدير كمية ونوعية الزيوت الطيارة في ثمار نبات الكرفس بوصف هذه الطريقة من الطرق الحديثة والفعالة لكفاءتها العالية ودقتها وسرعتها فقد استعملت في فصل الزيوت الطيارة والحصول على تقدير كمي ونوعي في آن واحد [8]، وكانت الظروف المستخدمة في فصل مكونات ثمر الكرفس بكروموتوغرافيا السائل العالي الاداء كما موضح جدول (1) .

وتم حساب تركيز المركبات في النموذج وفق المعادلة الآتية : -

$$\text{تركيز المركب في العينة} = \frac{\text{مساحة حزمة المركب}}{\text{مساحة حزمة النموذج القياسي}} \times \text{تركيز النموذج القياسي (المعلوم)}$$

جدول (1) الظروف المستخدمة في فصل مكونات ثمار نبات الكرفس بكروموتوغرافيا السائل العالي الاداء.

العمود	عمود الطور المعكوس (250 × 4.6 mmI.d) حجم دقائق الحشوة 5 ميكرومتر
الطور المتحرك	1% Acetic acid in deionized water : Acetonitrile (60:40 V/V)
سرعة جريان الطور المتحرك	1 مل / دقيقة .
حجم الخلية	8 ميكرومل .
نوع الكاشف	الأشعة فوق البنفسجية (UV) عند طول موجي 275 نانوميتر .
درجة حرارة الفصل	25 م° .
سرعة ورق التسجيل على الحاسبة	2 سم / دقيقة .

3.تقدير الاس الحامضي pH: تم خلط 10 غم من المسحوق النباتي مع 50 مل ماء مقطر بوساطة الخلاط المغناطيسي Magnetic stirrer لمدة 10 دقائق ، رشح المحلول وتم تقدير الاس الهيدروجيني باستخدام جهاز pH- meter [9] .

4. التقدير النوعي عن المركبات الفعالة بالمستخلص الكحولي الحار لثمار نبات الكرفس.

اولا: تحضير الكواشف وتشمل:

1. **تحضير كاشف دراجندروف [10]. Dragendroffs reagent**
2. **تحضير كاشف ماير [11]Mayer's Reagent .**
3. **تحضير كاشف واكنر [11]Wagner's reagent.**
4. **تحضير كاشف بندكت (Benedict Reagent) [12] .**

ثانيا: الكشف الكيميائي عن بعض المركبات الفعالة :

1. **الكشف عن القلويدات [13]Alkaloids .**
2. **الكشف عن الكلاكيوسيدات [12]Glycosides .**
3. **الكشف عن التانينات [14]Tannins.**
4. **الكشف عن الصابونينات [6]Saponins.**
5. **الكشف عن الفلافونات [15Flavones].**

6. **الكشف عن الفينولات [10]Phenols .**
7. **الكشف عن الراتنجات [6]Resins**
8. **الكشف عن التربين والستيرويد[17].**

5.جمع عينات الحصى: تم جمع عينات من حصى الكلى من المرضى الراقدين في المستشفيات و المشخصة حالتهم من قبل الجراحين الاختصاص في بعض مستشفيات محافظة بغداد مثل مستشفى اليرموك التعليمي، ومستشفى الجراحة التخصصية ، و مستشفى وليد الخيال. جمعت عينات الحصى بعد إجراء العمليات الجراحية الخاصة بالاستئصال.

6.تحليل الحصى Kidney stone analysis : لغرض عزل، وتحديد حصى Ca-ox، Uric acid من باقي أنواع الحصى تم تحليل حصى الكلى بوساطة عدة مجهزة من قبل معهد المصول واللقاحات العراقية :

اولا: المحاليل المستخدمة : المحلول (Nessler reagen,1), المحلول (2)Saturated Ammonium oxalate.,المحلول Ammonium Molybdate Solution 0.04 M(3),المحلول(4) $KMNO_4$ 0.01 M,المحلول (5)Na_2CO_3,المحلول(6) Phosphotugenestic acid,المحلول(7) HCl1N Concentration.

ثانيا:الكشف النوعي للتركيب الكيميائي للحصى : طحنت الحصى بوساطة هاون خزفي Mortar . أضيف لها (10) مل من حامض الهيدروكلوريك HCl عيارية 1N لكل 0.1 غم من مسحوق الحصى ففي حالة ظهور فقاعات من المزيج دلالة على وجود الكربونات في تركيب الحصى ومزج المحلول جيداً . ترك لمدة 5 دقائق، ثم رشح بوساطة ورقة الترشيح . استخدمت 6 انابيب اختبار نظيفة، وضعت في كل منها 0.5 مل من الراشح، ثم اضيفت المحاليل المبينة اعلاه. تم تحضير المستخلص بتركيز 20 % الكحولي الحار، والمائي الحار والمائي والبارد، ولغرض إعداد التخافيف الباقية 5 ، 10%. تم اتباع قانون التخفيف: $C_1V_1 = C_2V_2$

7.التحليل الاحصائي : حللت النتائج إحصائيا بحسب تصميم تام التعشية Completely Randomized Design CRD[17] وباستخدام طريقة اقل فرق معنوي Least Significant Difference وفي بعض التجارب تم استخدام أختبار t وبمستوى معنوي 0.05 لكلا الاختبارين .

النتائج والمناقشة

1.**مركبات الزيوت الطيارة لمستخلص الكحولي الحار لثمار نبات الكرفس .**

أظهرت النتائج وجود 14 مركبا للزيوت الطيارة لثمار نبات الكرفس بالقياس مع مركبات الزيوت الطيارة القياسية المستخدمة في جهازHPLC وهي:- (α-pinene, Cineole, P- cymene , Terpinene, α- phellandrene, β-pinene, Geraniol, α- terpinol, Linalool, Menthone, Limonene, Myrcene, Camphane , Rutin) . أما بالنسبة لتراكيز هذه المركبات فقد كان مركب الـ α-pinene أعلاها فقد بلغ تركيزه 19.2 µg/ml عند زمن ظهور (12.283 min) وان اقل تركيز كان لمركب الـ Camphane إذ بلغ تركيزه 6.3µg/ml عند زمن ظهور (2.313 min) جدول(2). وقد اتفقت نتائج الدراسة لأنواع مركبات الزيوت الطيارة[18،19،20].

جدول (2) تراكيز بعض مركبات الزيوت الطيارة و زمن الاحتجاز تحت ظروف الفصل الكروماتوغرافي(HPLC) لثمار نبات الكرفس

المركبات القياسية	زمن الاحتجاز القياسي (min)	زمن الاحتجاز لزيوت ثمار لكرفس(min)	التركيز µg/ml
Rutin	**1.075**	**1.043**	**15.4**
Camphane	**2.302**	**2.313**	**6.3**
Myrcene	**3.855**	**3.848**	**14.8**
Limonene	**4.558**	**4.603**	**12.1**
Menthone	**5.313**	**5.332**	**15.3**
Linalool	**6.815**	**6.072**	**18.2**
α-terpinol	**7.503**	**7.072**	**15.2**
Geraniol	**8.225**	**7.842**	**14.6**
β-pinene	**8.998**	**8.608**	**15.7**
α- phellandrene	**10.02**	**9.348**	**12.9**
Terpinene	**11.182**	**10.087**	**7.30**
P- cymene	**11.91**	**10.86**	**10.6**
Cineole	**12.241**	**11.585**	**9.9**
α-pinene	**19.332**	**12.283**	**15.2**
Fenchone	**3.521**	**12.99**	**8.421**
Anethol	**9.789**	**13.732**	**10.952**

2. **نتائج قيم الأس الهيدروجيني:** بالنسبة لمستخلص ثمار الكرفس أظهرت النتائج إن قيمة الـ pH لها تميل للحامضية إذ بلغت 5.74.

3.كشوفات المركبات الفعالة للمستخلص الكحولي الحار لثمار الكرفس : وجد من نتائج الكشف للمكونات الفعالة والموضحة في جدول (3) وجود التانينات، والفلافونويدات والفينولات، و الكلايكوسيدات في المستخلص المائي والكحولي لثمار النبات . بينما وجدت الصابونينات، والراتنجات، والقلويدات، والتربينات في المستخلص الكحولي فقط [21] .

جدول (3): نتائج كشوفات المركبات الفعالة في ثمار نبات الكرفس Apium graveolens

نوع المستخلص	كشوفات المركبات الفعالة							
	تانينات	صابونينات	راتنجات	فينولات	فلافونات	قلويدات	كلايكوسيدات	تربينات وستيرويدات
كحولي	+	+	+	+	+	+	+	+

4.الكشف النوعي لتركيب الكيمياوي للحصى: جدول (4) يوضح نتائج الكشوفات.

جدول (4) الكشف النوعي للتركيب الكيميائي لأنواع الحصى .

الراشح رقم الأنبوبة	محاليل الكواشف	كشف الأمونيوم	كشف الكالسيوم	كشف الفوسفات	كشف الأوكزالات	كشف حامض اليوريك	كشف الكاربونات
1	Nessler reagent 0.5 mL	برتقالي بني	-	-	-	-	-
2	Saturated solution of ammonium 1 mL	-	راسب ابيض	-	-	-	-
3	Ammonium molybdate solution 1 mL	-	-	لون اصفر	-	-	-
4	$KMnO_4$ 1N0.01 mL	-	-	-	اختفاء اللون الأرجواني	-	-
5	Na2co31ml+ phosphotungestic acid mL	-	-	-	-	ظهور لون ازرق	-
6	HCl 1 mL	-	-	-	-	-	ظهور فقاعات

4. فعالية مستخلص ثمار الكرفس على حصى الكلى عند تراكيز مختلفة.

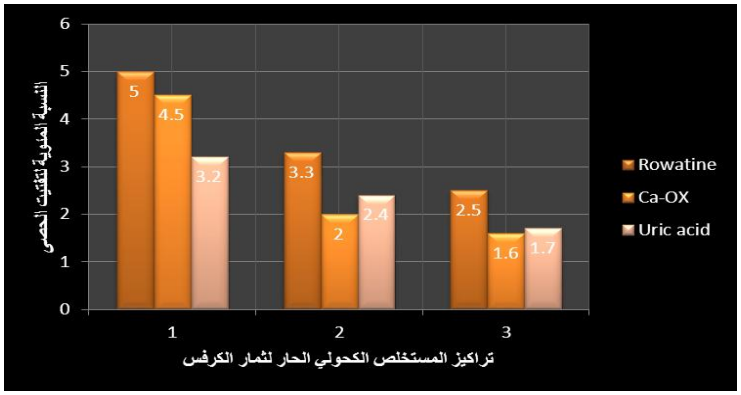
أظهرت نتائج معاملة حصى الكلى نوع Ca-Ox بمستخلص الكحولي الحار لثمار الكرفس عند التراكيز (20،10،5) % ولمدة 7 أيام متتالية انخفاض وزن الحصى معنوياً عند المستوى 0.05 ($P<0.05$) إذ بلغت أعلى نسبة انخفاض بالوزن في المستخلص الكحولي الحار 17.02 % عند التركيز 5 % شكل (1) .

وعند القياس مع دواء الـ Rowatinex اظهرت النتائج تقاربا كبيرا بين المستخلص الكحولي الحار بتركيز 5 % و الدواء الـ Rowatinex وبشكل معنوي عند المستوى 0.05 ($P<0.05$) عن قيم الدواء شكل(1) [22،6]، كما يعود سبب تفتيت الحصى الى ان المواد الفعالة التي تحتويها من تانينات، وقلويدات، وفلافونويدات ساعدت على تفتيت المركبات التي تتكون منها حصاة الـ Ca-Ox [23] 3، وكذلك من العوامل التي ساعدت على تفتيت الحصى هو احتواء النبات على Vitamin C [24].

إن السبب كون المستخلص الكحولي هو الأفضل في تفتيت الحصى يعود الى ان المستخلص الكحولي هو الأفضل في استخلاص الزيوت الطيارة ، والزيوت الثابتة من النبات [25]. في حين اظهرت نتائج معاملة حصى الكلى من نوع Uric acid بمستخلصات الكحولي الحار لثمار الكرفس عند التراكيز (5 ، 10 ، 20) % ولمدة (7) ايام متتالية انخفاض وزن الحصى معنوياً عند المستوى 0.05 ($P < 0.05$) إذ بلغت أعلى نسبة انخفاض بالوزن في المستخلص الكحولي 8.57 % عند التركيز 5 % شكل (1) وعموماً قياسا مع قيم معاملة السيطرة ودواء الـ Rowatinex وبالشكل معنوي $P < 0.05$.

أظهرت نتائج الدراسة ان مستخلص ثمار الكرفس يكون أكثر فاعلية في تفتيت حصى الـ Ca-Ox من حصى اليوريك اسيد Uric acid، وذلك لرقة الطبقة الخارجية لحصى الـ Ca-Ox ً قياسا مع حصى الـ Uric acid والتي تكون فيها اصلب ، وأكثر سمكاً [27].كما ان قابلية ذوبان حصى الـ Uric acid في المستخلص الكحولي تكون بنسبة قليلة بالقياس مع حصى الـ Ca-Ox التي أعطت أفضل نسبة إذابة [25] شكل (1). أما بالنسبة لدواء الـ Rowatinex فقد اظهر أنه أكثر فاعلية في تفتيت حصاة الـ Ca-Ox من Uric acid [28].

أظهرت نتائج الدراسة قلة نسبة تفتت حصى الـ Uric acid عند المعاملة مع معاملة السيطرة (كحولي حار) قياسا مع حصاة نوع Ca-Ox، وذلك لان الكحول يساعد على تكوين الـ Uric acid، ونسبة التفتيت الواطئة التي احدثتها معاملة السيطرة الكحولي هو استخدام الكحول المخفف بنسبة 80 % [29].



شكل (1) النسب المئوية لتفتت حصاة نوع Ca- Ox وحصاة نوع Uric Acid بعد المعاملة بمستخلصات ثمار الكرفس
1=تركيز5% ، 2= تركيز 10% ، 3=تركيز 20%

الاستنتـــاجات:

1. وجود 14 مركبا للزيوت الطيارة لثمار نبات الكرفس كان أعلاها تركيزا مركب الـ α-Pinene واقلها تركيزا مركب الـCamphene.
2. إن تركيز 5% للمستخلص الكحولي هو الأفضل في تفتيت الحصى من باقي التراكيز .
3. الكرفس مدرر أكثر مما هو مفتت بسبب احتوائه على مركب Glycolic Acid,Isoquercitrin .
4. وجود تقارب كبير بين نسب تفتيت حصاة الكلى نوع Ca-Ox للمستخلص الكحولي الحار لثمار نبات الكرفس ودواء الـ Rowatenix .

المصـــــادر

1. Stoller, M. and Shekarriz, B. (2001). Metabolic evaluation of stone disease. Braz. J Urol. 27 (1), 10 – 18.
2. Nowk, Th. and Handford, A. (1999). Essential of Pathophysiology 2nd ed. PP. 179- 401. Brown Communication. USA.
3. Balndy, J. (1983). Lecture notes on urology. BlackwellScientific Publication. Oxford.
4. Grerabo, L. (1985). Ureaplasma urealyticium and infection stones in the urinary tract. A Clinical and experimental study. University of Goteborg, Faculty of Medicine. Goteborg .
5. Kok, D. J. (1997). Intratubular crystallization events. World J. Urol. 15 (4), 219 – 228.
6. Spriggs, D., and Mehzer, M. (2000). Natural Health Encyclopedia. CD ROM, Hopkins Technology.
7. British Pharmacopoeia. (1968). The Pharmaceutical Press. London.
8. Chen, B.H., Vhuang, J.R., Lin, J.H., and Chiu, C.P. (1993). Quantification of Provitamin A compounds in Chinese vegetables by high Performance liquid chromatography, J. of Food Protection. 56 (1), 51 – 54.
9. Shihata, I.M. (1951). Apharmacological Study of *Anagallis arvensis*. M.D.Vet. Thesis Cairo Univ.
10. Harborne, J. B. (1973). Phytochemical Methods. A Guide to modern Techniques of Plant Analysis. Pp. 159 – 155. Chapman and Hall. Ltd. London.
11. Smolensk, S.J., Silnis, H., and Farnsworth, N.R. (1972). Alkaloid Screening 1.Libya. 35(1),31-34.
12. الشيخلي، محمد عبد الستار، عبد الجليل ، فريال حسن الغراوي، حسن فياض . (1993). الكيمياء التحليلية الجامعة المستنصرية.
13. Fahmy, I.R. (1933). Constituents of plants and drugs .1st. ed. Poul. Barby. Cairo.
14. دلالي، باسل كامل والحكيم، صادق حسن. (1987). تحليل الاغذية، دار الكتب، جامعة الموصل.
15. Jaffer, H.J., Mohammed, M.J., Jawad, A.M., Naji, A. and Al-Naib, A. (1983). Phytochemical and biological Screening of some Iraqi Plant. Fitoterapia,LIX.299.
16. Al-Bid, M.R. (1985). Zurrzusame mestarung der Abschla B membrane in *Phoenix dactylifera*. Warzburg University Warzburg F.R of Germany.
17. الراوي، خاشع محمود، عبد العزيز محمود خلف الله . (1980). تصميم تحليل التجارب الزراعية . مؤسسة دارالكتب للطباعة و النشر – جامعة الموصل .
18. Najda, A.D. (2005). Dependences between the length of vegetation period of field plants and the content and composition of essential oil in Celery leaves. Electronic Journal of Polish Agricultural universities. (8), 1-5
19. Fuchs,S., Beck, T. and Mosandl, A. (2000). Biogenetic research into essential oils using SPME enantio –MDGC/MS. GIT Lab. J. (2),199-201.
20. Duke, J. A. (1992). Handbook of Phytochemical constituents of Grass Herbs and other Economic Plants. F. CRC Press.
21. Gruenwald, J., Brandler, T. and Jaenicke, C. (Editors). (1998). PDR for Herbal Medicins. 1st Ed. Medical Economics Company, USA.
22. El-Darier, S.M., Kamal, S.A. and Yousef, R.S. (2001). Diuretic Plant Ecology and Medicine in the Western Mediterranean Coastal Region of Egypt. The Sciences J. 1(4), 258-266.
23. Bedir, E. and Khan, I.A. (2000). New steroidal glycosides from the fruit of Troublous territories J. Nat. Prod. 63(12),1599-701.
24. Zilvo, J.F, Peter. R. and Pannal, P.R. (1984). Clinical chemistry in diagnosis and treatment 4th ed., Lioydlukedleel.17-158.
25. الشماع، علي عبد الحسين. (1989). العقاقير وكيمياء النباتات الطبية، دار الكتب للطباعة والنشر، نينوى/العراق.
26. حنش، كمال أنطوان. (1974). الجديد في الطب عن حصيات الكلى والجهاز البولي (الأسباب العوارض، التشخيص المعالجة)وزرع الكلى ، مركز مليو الطبي (الولايات المتحدة)، ص(140).
27. Buduvari, S., Oneil, M.J., Smith, A., Hekelman, P.A. (1989). Encyclopedia of chemicals and biological drugs Merck &. Co. Inc, Rahway, N. J., U.S.A.

28. Summary of Product Characteristic. (1998). A Joint Publication of Rowatenix Drug from Rowa-Wagner GmbH & Co KG Manufacturers Association and Regional Research Laboratory. Germany.

29. Monk, R.D., and Bushinsky, O. A. (2000). Nephrolitothiasis and nephrocal cinosis. In Johanson, R. J. and Feehally, J. (eds.), Comprehensive Clinical Nephrology. Mosby Company. Section 11, pp. 1 – 11.