Iraqi Journal of Science

دراسة الفعالية البايولوجية لبعض مستخلصات نبات كف مريم (vitex agnus castus L.)

جمال سلمان جياد[1*]، اطلال نايف جواد[1]، حنان رشيد عبدالحميد[1]، عبير فائق كامل [1]، جاسم محمد عبدالله[2]

[1]وزارة الصناعة والمعادن ،هيأة البحث والتطوير الصناعي / مركز بحوث ابن البيطار

[2]وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة النهرين ، مركز بحوث التقنيات الاحيائية

الخلاصة

اختبرت الفعالية البايولوجية لمستخلصات نبات كف مريم *vitex agnus castus L.* وتضمنت المستخلصات : مستخلص الدهون الاساســية ومستخلص ميثـانولي (70%) ومستخلص ايثانولي (70%) ومستخلص فلافونيدي ومستخلص الزيوت الطيارة، اختبرت فعالية المستخلصات ضد انواع من البكتريا وهي المكورات الذهبية *Staphylococus aureus* والبكتريا العصوية *Bacillus pumilus* وبكتريا القولون *Escerichia coli* وبكتريا *Pseudomonas* وبكتريا المكورات المسبحية *Streptococcus sp.* والبكتريا المعوية *Enterobacter* ، واظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هنالك تباينا ملحوظا بين فعالية تلك المستخلصات مع وجود افضلية للمستخلص الفلافونيدي اذ اعطى قطر تثبيط (20) ملم تجاه *E.coli* و *Staphyloccocus aureus* و *Pseudomonas* ، واعطى قطر تثبيط بمقدار (15) ملم تجاه بكتريا *Bacillus pumilus* ، و (9) ملم تجاه *Streptococcus sp.* ،اما المستخلص الايثانولي فقد اعطى قطر تثبيط (15) ملم تجاه *Staphyloccocus aureus* وقطر تثبيط (11) ملم تجاه *Streptococcus sp* . والمستخلص الميثانولي اعطى قطر تثبيط (15) ملم تجاه *Bacillus pumilus* و(15) ملم تجاه بكتريا *Streptococcus sp.*، فيما لم يظهر مستخلص الدهون الاساسية اي فعالية.

اجري فحص الخصوبة على الفئران المختبريه بعد التاكد من فحص السمية للمستخلص الكحولي وبينت النتائج ان للمستخلص تاثير في زيادة الخصوبة للذكور والاناث.

وبينت نتائج الكشوفات النوعية لمكونات نبات كف مريم انها تحتوي على العفصيات والكاربوهيدرات والكلايكوسيدات والفينولات والراتنجات والفلافونيدات والصابونين وعدم احتواءها على القلويدات والبروتينات والستيرويدات والكومارينات .

Study of Biological Activity for Some Extracts of Vitex agnus castus L.

Gamal S. Chiad[1*], Atlal N. Jwad[1], Hanan R. Abdulhameed[1], Abeer F. Kamel[1], Jassim M. Abdulla[2]

[1]Ministry of Industry and Minerals , Corporation of research and industrial development/ Ibn Albetar research center

[2]Ministry of Higher Education And Scientific Research AL-Nahrain University Research Center For Biotechnology

*Email: gschiad2000@yahoo.com

Abstract

The biological activity of *vitex agnus castus L*. was tested which including the following extracts: essential oil extract, methanol extract, (70%), ethanol extract(70%), flavonoid extract and volatile oils extract were tested against many types of bacteria which are *Staphylococus aureus , Bacillus pumilus, Escerichia coli, Pseudomonas, Enterobacter and Streptococcus sp.*, The results of this study showed difference activity of these extracts .The flavonoid extract considers the best activities which gave inhibition zone (20) mm on *E. coli, Pseudomonas* ; *Staphylococus aureus* of (15) mm on *Bacillus pumilus* and (9) mm on *Streptococcus sp*. Ethanol extract gave inhibition zone (15) mm on *Staphylococus aureus*, (11) mm on *Streptococcus sp*. (15) mm on *Bacillus pumilus* and (15) mm on *Streptococcus sp.*,while the essential oil extract did not have any antimicrobil activity.

Fertility test was made in laboratory animals (mice) after confirming from toxicity test of alcoholic extract and, the results showed that this extract had effected on increasing the fertility for both males and females.

The results of chemical tests of *vitex agnus castus L*. compounds showed contain tannins, carbohydrates, glycosides, phenols, resins, flavonoids, saponins and didn't have alkaloids, proteins, steroids and cumarines.

Keywords: *vitex agnus castus L.* extraction, Biological activity.

المقدمة

رغم التطور الهائل في علم الادوية الكيمياوية ورواجها وظهور اعداد كبيرة منها للعلاج الا ان الفترة الماضية شهدت عودة الى استخدام النباتات الطبية في علاج الامراض كبدائل طبيعية لانها تمتلك العديد من الخصائص العلاجية المعروفة [1] .

نبات كف مريم *Vitex agnus –castus L.* شجرة جميلة متساقطة الاوراق يمكن ان تنمو لحوالي (6,7) متر ، وتنتشر على ضفاف الانهار في جنوب اوروبا وبلدان البحر الابيض المتوسط ووسط اسيا والشرق الاوسط ، الاوراق بحجم كف اليد وتحوي من خمس الى سبع وريقات تشبه الاصابع ذات لون اخضر غامق لامعة من الاسفل[2] . .وهو من النباتات الطبية المشهورة واختير في الدراسة الحالية لوفرته في البيئة العراقية وتركزت الدراسة في اختبار الفعالية التثبيطية لاكتشاف خصائص علاجية.

يحتوي النبات على عدة مكونات فعالة اهمها الفلافونيدات والكلايكوسيدات والتربينات والعفصيات والفينولات والكاربوهيدرات والصابونينات وزيت طيار تقريبا(1,5)% كما يحتوي النبات على نسبة ضئيلة من الزيوت الاساسية لاتتعدى (0,5 %) واهمها زيت الليمونين [3] .

اظهرت بعض الدراسات ان مستخلصات النبات تحفز اطلاق هرمون Leteinizing Hormone (LH) ويثبط اطلاق الهورمون المحفز للجريبات Follicle stimulating Hormone ، ويعمل على زيادة التبويض والخصوبة ، ويحفز انتاج هورمون البرولاكتين Prolactine [3] .هدفت الدراسة الحالية الى اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات كف مريم ، حيث اختبرت ضد انواع من البكتيريا .ودرس تأثير المستخلص الكحولي لنبات كف مريم على زيادة الخصوبة (الكفاءة التناسلية) وكذلك فحص السمية على الحيوانات المختبرية (الفئران).

الجزء العملي

جمعت اوراق نبات كف مريم من حدائق جامعة بغداد وارسلت الى معشب كلية العلوم – قسم علوم الحياة/ جامعة بغداد لتصنيفها وتبين بان النبات يعود الى جنس *Vitex agnus– castus L.* حسب الصفات التشخيصية المعتمدة من قبل دليل تصنيف النبات .

1- تحضير المستخلصات النباتية:

أ- مستخلص الزيوت الثابتة:

استخلصت زيوت اوراق نبات كف مريم بطريقة الاستخلاص المستمر[4] . باستخدام منظومة الساكسوليت وباستخدام الهكسان كمذيب وذلك بوضع (150) غم من مسحوق الاوراق في Thimble و (750) مل من الهكسان لمدة (24) ساعة ، بعدها ركز المحلول بواسطة جهاز المبخر الدوار وفصل المذيب ونتج زيت ذي لون بني غامق بكمية (25) مل.

ب- المستخلص الايثانولي والميثانولي (70%)

مزج (50) غم من مسحوق الاوراق المزال عنها الزيوت وفقا للفقرة (أ) مع (300) مل من الايثانول والميثانول المائي (70%) واجريت عملية الاستخلاص الترجيعيReflex لمدة (16) ساعة ، برد المحلول ورشح بواسطة اوراق الترشيح ، ركز بواسطة المبخر الدوار الى حوالي (20) مل ، جفف المستخلص وكانت الكمية الناتجة (5) غم للمستخلص الايثانولي و (4) غم للمستخلص الميثانولي ، جمع في قنينة معتمة لحين الاستخدام [4] .

ج - المستخلص الفلافونيدي:

مزج (50) غم من مسحوق الاوراق المزال عنها الزيوت وفقا للفقرة (أ) مع (250) مل من الايثانول المائي (70%)واجريت عملية الاستخلاص الترجيعي Reflex للمحلول لمدة (16) ساعة ، برد المحلول ورشح بواسطة اوراق الترشيح ، ركز بواسطة المبخر الدوار الى حوالي (50) مل . وضع المحلول المتبقي في قمع فصل واستخلص بمذيب خلات الاثيل (50مل 3x) جففت طبقة خلات الاثيل للحصول على الفلافونيدات بكمية (6) غم [1] .

د- مستخلص الزيوت الطيارة:

عزلت الزيوت الطيارة من العينة النباتية وذلك بمزج (70) غم من الاوراق مع (750) مل من الماء المقطر في دورق سعة (2) لتر الخاص بجهاز الكلافنجر . سخن الخليط بدرجة حرارة (100) مئوي ولمدة (6) ساعات لمحاولة جمع الزيت الطيار .

2- الكشف عن المكونات الفعالة:

اجريت مجموعة من الكشوفات النوعية للتعرف على المكونات الكيميائية في مستخلص نبات كف مريم للمستخلص الفلافونيدي.

1- كشف العفصيات Tannins Test :

يتم اجراء الكشف باضافة (1) مل من خلات الرصاص المائية (1%) lead acetate الى (1) مل من المستخلص ، عند تكون راسب ابيض تعتبر النتيجة موجبة تدل على العفصيات [5].

2- كشف الكاربوهيدرات Carbohydrate test :

يتم اجراء الكشف عن الكاربوهيدرات باستخدام كاشف مولش، اذ مزج (1) مل من المستخلص مع (5) قطرات من الفا نفثول الكحولي في انبوبة وترج جيدا ويضاف بعد ذلك (2,5) مل من حامض الكبريتيك وعند تكون حلقة زرقاء تدل على وجود الكاربوهيدرات [6].

3- كشف الكلايكوسيدات Glycosides test :

يتم الكشف عن الكلايكوسيدات بواسطة كاشف فهلنك ، وان ظهور راسب احمر يدل على وجود الكلايكوسيدات [5].

4- كشف الفينولات Phenols test

يتم اجراء الكشف باذابة (0,1) غم من المستخلص في (1) مل من الماء المقطر ويضاف له (1-2) قطرة من محلول كلوريد الحديديك $Fecl_3$ ،عند ظهور اللون الازرق او الاخضر تعتبر النتيجة موجبة ويدل على وجود الفينولات [7].

5- كشف الراتنجات Resins test

يتم الكشف باضافة (1) مل من خلات الرصاص (1%) lead acetate الى (1) مل من المستخلص ، وعند تكون راسب ابيض تكون النتيجة موجبة وتدل على وجود الراتنجات [5].

6- كشف الفلافونيدات Flavonoids test

يتم اجراء الكشف باضافة (1) مل من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي [5N] الى (1) مل من المستخلص ، وعند ظهور راسب اصفر تعتبر النتيجة موجبة ويدل على وجود الفلافونيدات [8] .

7- كشف الصابونين Saponin test

يتم اجراء الكشف باضافة (1) مل من كاشف كلوريد الزئبق المائي (5%) الى (1) مل من المستخلص، وعند تكون راسب ابيض تعتبر النتيجة موجبة وتدل على وجود الصابونينات [5] .

8- كشف القلويدات Alkaloid test

يتم الكشف عن القلويدات باستخدام كاشف واكنر wagners reagent باضافة عدة قطرات من الكاشف الى (ا) مل من المستخلص وعند ظهور عكورة تعتبر النتيجة موجبة ويدل على وجود القلويدات [9].

9- كشف البروتين Protein test

يتم الكشف عن البروتينات باستخدام كشف بابوريت والذي يتكون من (80%) كبريتات النحاس مذابة بالماء المقطر و (1) مل من (10%) من الكاشف، وعند تكون اللون البنفسجي يدل على وجود البروتينات [10].

10- كشف الكومارينات Coumarins test

يتم الكشف عن الكومارينات بوضع كمية من المستخلص الكحولي للنبات في انبوبة اختبار ، ثم تغطى الانبوبة بورقة ترشيح مرطبة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف، ثم تسخن الانبوبة على حمام مائي مغلي لبضعة دقائق ثم تعرض ورقة ترشيح الى مصدر للاشعة فوق البنفسجية ، فعند تلون الورقة باللون الاصفر المخضر البراق يدل على وجود الكومارين [7].

11- كشف التربينات Terpens test والستيرويدات Steroides test

يذاب (1) غم من المستخلص الايثانولي الى قليل من الكلوروفورم ويضاف اليه قطرة من انهايدريد الخليك ثم قطرة من حامض الكبريتيك المركز ، فعند ظهور اللون البني دلالة على احتواء المستخلص التربيني ، اما اذا تكون بعد مدة لون ازرق داكن فيدل احتواء المستخلص على الستيروييد [5].

فحص الفعالية البايولوجية

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر وذلك لاختبار فعالية المستخلصات ، اذ نشطت الانواع البكتيرية في وسط (Nutrient Broth)، حضر(250) مل من الوسط المذكور بحسب تعليمات الشركة المصنفة للوسط الزراعي (HIMEDIA) وعقم بجهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة(121) مئوي لمدة (15) دقيقة وترك ليبرد بدرجة (25) مئوي ولقح بواحد مل من عالق الخلايا البكتيرية المذكورة مسبقا كل على حدة . حضر (250) مل من وسط (Muller Hinton agar) حسب تعليمات الشركة وعقم بجهاز المؤصدة Autoclave وترك ليبرد بدرجة (25) مئوي ولقح بواحد مل من عالق الخلايا البكتيرية . صب (20) مل من الوسط لكل طبق زجاجي قياس (9) سم . تركت الاطباق لتبرد وعملت عدد من الحفر لكل طبق بقطر (8) ملم لكل حفرة .اضيف (50) مايكروليتر من المستخلص لكل حفرة باستخدام ماصة دقيقة ، عملت حفر لمقارنة المستخلصات بالمضادات الحيوية[11].

4- فحص السمية Toxicity test: اجري فحص السمية للمستخلص الكحولي لنبات كف مريم على الحيوانات المختبرية (الفئران) على ثلاثة مجاميع ، كل مجموعة تحتوي على ثلاثة فئران وبتراكيز مختلفة . اجريت التجربة في جامعة النهرين /مركز بحوث التقنيات الاحيائية (البيت الحيواني) وتنص الطريقة على مايلي:اخضع المستخلص الكحولي لنبات كف مريم الى ثلاث تراكيز(10 %، 20%، 40%) . اعطي المستخلص الكحولي Intropretonial(حقنا بالتجويف البطني تحت الغشاء البطني) . والكمية التي حقنت تتراوح بين (0,1 – 0,2) مل وحقنت مرتان في اليوم ، بعدها تركت الفئران لمدة 72 ساعة .عرف من جدول النتائج ان المستخلص سام ام غير سام LD_{50}.

فحص الخصوبة

اجري فحص الخصوبة للمستخلص الكحولي لنبات كف مريم على الحيوانات المختبرية (الفئران) على ثلاثة مجاميع كل مجموعة تحتوي على (9) فئران وبتراكيز مختلفة في مختبرات جامعة النهرين/مركز بحوث التقنيات الاحيائية وتم ملاحظة النتائج باستخدام المجهر المقلوب (Germany Mod. Ppm 75 – Inverted microscope) زيادة الخصوبة بالنسبة للذكور والاناث مقارنة مع السيطرة (مجموعة السيطرة) .

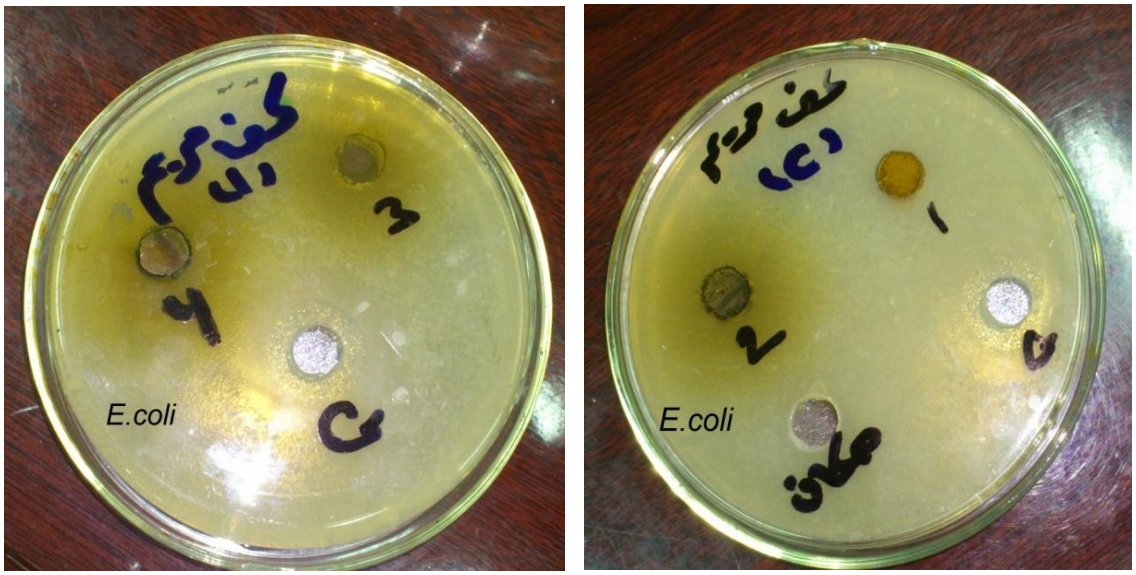
النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج التحليل النوعي الكيميائي لمستخلص نبات كف مريم احتوائها على مركبات فلافونيدية وتانينات وصابونين وفينولات وكاربوهيدرات وكلايكوسيدات وراتنجات وعدم احتواءها على القلويدات والبروتينات والستيرويدات والكومارينات كما في جدول- 1

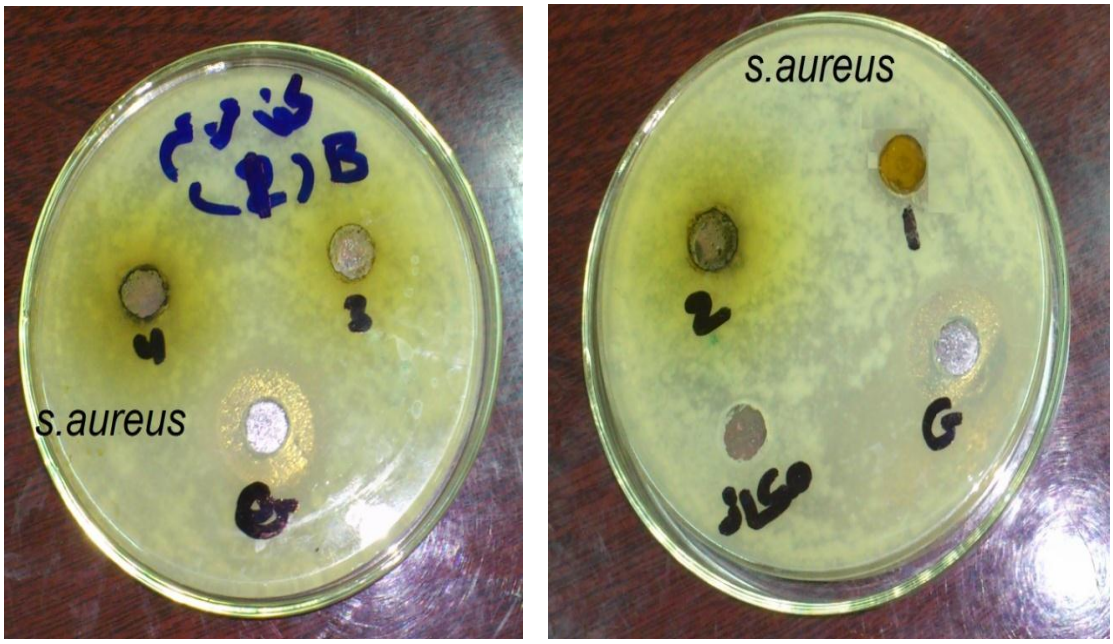
جدول -1 الاختبارات النوعية الكيميائية لمستخلص نبات كف مريم

الكشوفات النوعية					
عفصيات	**+**	**فينولات**	**+**	**قلويدات**	**-**
كومارين	**-**	**راتجات**	**+**	**بروتين**	**-**
كاربوهيدرات	**+**	**فلافونيدات**	**+**	**تربينات**	**-**
كلايكوسيدات	**+**	**صابونين**	**+**	**ستيرويدات**	**-**

اظهرت نتائج الدراسة للمستخلص الكحولي (الميثانولي والايثانولي) والمستخلص الفلافونيدي لنبات كف مريم – *Vitex agnus castus L.* فعالية تثبيطية عند تراكيز (100%) ملغم / مل مقارنة بمستخلص الزيوت الاساسية ، شكل (1a,1b,1c,1d,1e,1f) (جدول – 2).



الشكل 1 a- يبين فعالية المستخلصات تجاه بكتريا *E.coli* (1 المستخلص الزيتي ، 2 المستخلص الايثانولي ، 3 المستخلص الميثانولي ، 4 المستخلص الفلافونيدي)

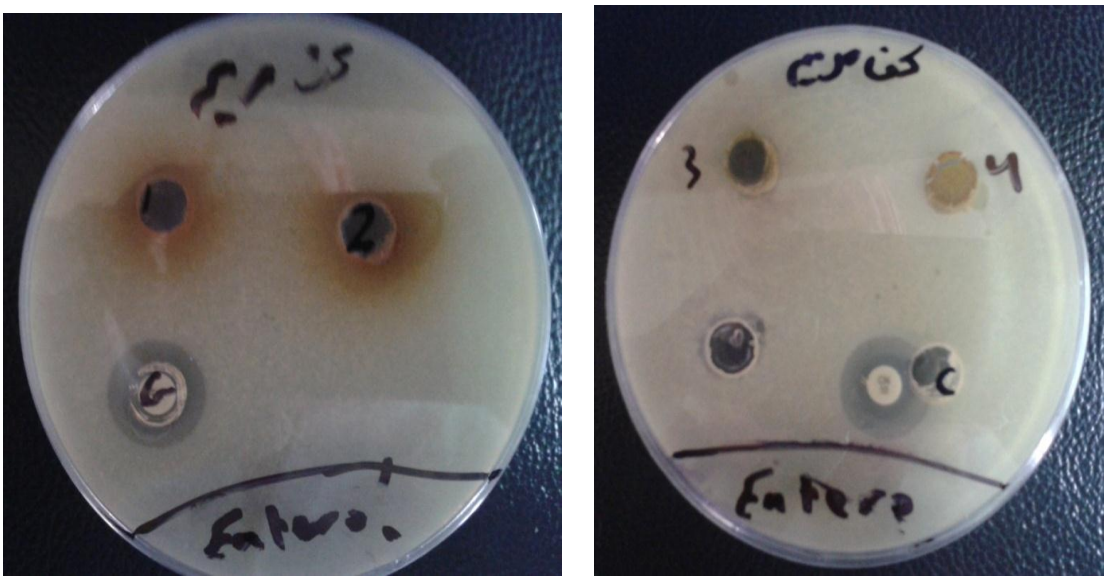


الشكل b 1- يبين فعالية المستخلصات تجاه بكتريا *Staphyllococcus aureus* (1 المستخلص الزيتي ، 2 المستخلص الايثانولي ، 3 المستخلص الميثانولي ، 4 المستخلص الفلافونيدي)

الشكل **c 1-** يبين فعالية المستخلصات تجاه بكتريا *Bacillus pumilus* (1 المستخلص الزيتي ، 2 المستخلص الايثانولي ، 3 المستخلص الميثانولي ، 4 المستخلص الفلافونيدي)

الشكل 1 d- يبين فعالية المستخلصات تجاه بكتريا *Pseudomonas* (1 المستخلص الزيتي ، 2 المستخلص الايثانولي ، 3 المستخلص الميثانولي ، 4 المستخلص الفلافونيدي)

الشكل 1 e- يبين فعالية المستخلصات تجاه بكتريا .*Streptococcus sp* (1 المستخلص الزيتي ، 2 المستخلص الايثانولي ، 3 المستخلص الميثانولي ، 4 المستخلص الفلافونيدي)



الشكل f 1- يبين فعالية المستخلصات تجاه بكتريا *Enterobacter sp.* (1 المستخلص الزيتي 2 المستخلص الايثانولي ، 3 المستخلص الميثانولي ، 4 المستخلص الفلافونيدي)

جدول 2- يوضح نتائج الفعالية البايولوجية لمستخلصات نبات كف مريم على انواع من البكتريا

ت	نوع المستخلص	قطر منطقة التثبيط (ملم)					
		E.coli	*Enterobacter*	*Streptococcus sp.*	*Bacillus pumilus*	*Pseudomona*	*Staphylococus aureus*
1	الدهون الاساسية	-	-	-	-	-	-
2	الايثانولي	-	-	11	-	-	15
3	الميثانولي	-	-	15	15	-	-
4	الفلافونيدي	20	-	9	15	20	20

ان كفاءة المستخلص الكحولي (الميثانولي والايثانولي) في تثبيط نمو البكتريا تعود الى قطبية الكحول في الاستخلاص اذ يرسب العديد من المركبات الفعالة حيويا منها القلويدات والفلافونيدات والفينولات والتانينات [11] .

اظهرت نتائج الفعالية البايولوجية ضد البكتريا الى ان بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus sp.* و *Bacillus pumilus* الموجبة لصبغة كرام كانت اكثر تحسسا تجاه المستخلصات مقارنة ببكتريا *Escerichia coli* ام و *Enterobacter sp.* و *Pseudomonas* السالبة لصبغة كرام وهذا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة .[12] كما ابدى المستخلص الفلافونيدي ابدى فعالية قوية ضد جميع الانواع البكترية المستخدمة في الدراسة عدا بكتريا *Enterobacter sp.* (جدول – 2)

كون المركبات الفلافونيدية هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع الكاربوكسيل (COOH) ومجموعة او اكثر من مجاميع الهيدروكسيل فان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة تلك المجاميع، التي تمتلك القدرة على الارتباط مع المجاميع الفعالة لانزيمات الاحياء المجهرية بواسطة اواصر هيدروجينية ، وتعمل على تحطيم الغشاء الخلوي للخلية البكتيرية [13].

بينت نتائج فحص السمية (LD_{50}) للمستخلص الكحولي المجرع للفئران وبتراكيز مختلفة ، خلو المستخلص من اي مادة سامة ، جدول – 3 .

جدول 3- :نتائج فحص السمية لمستخلص نبات كف مريم

ت		عدد الفئران	المكررات	التراكيز	كمية المستخلص	المدة الزمنية	النتائج
1	المستخلص الكحولي لنبات كف مريم	3	6	%10	(0،1 - 0,2) مل	72 ساعة	غير سام
2	المستخلص الكحولي لنبات كف مريم	3	6	% 20	(0،1 - 0,2) مل	72 ساعة	غير سام
3	المستخلص الكحولي لنبات كف مريم	3	6	%40	(0،1- 0,2) مل	72 ساعة	غير سام

اظهرت نتائج فحص الخصوبة المستخلص الفلافونيدي زيادة في نشاط حركة وكثافة الحيامن للذكور. كما اظهرت النتائج بان المستخلص ذات تركيز (20%) كان الافضل في زيادة حجم الخصى وزيادة في النشاط والحركة وكثافة الحيامن .اما في الاناث فكان للمستخلص بتركيز (40 %) تاثير واضحاعلى وجود نشاط جريبي على المبيض ، لوحظ وجود نشاط جريبي مع تضخم المبيض كما نستنتج بان للمستخلص تاثير على الخصوبة (الكفاءة التناسلية) بالنسبة للاناث والذكور كما موضح في جدول -4 .

جدول 4- نتائج فحص الخصوبة لمستخلص نبات كف مريم

ت	مستخلص نبات كف مريم	التراكيز %	عدد الفئران	المكررات	كمية المستخلص (مل)	المدة الزمنية	النتائج
1	المستخلص الكحولي (للاناث)	10	3	12	(0,2)	10 ايام	وجود نشاط جريبي على المبيض
2	المستخلص الكحولي (للاناث)	20	3	12	(0,2)	10 ايام	وجود نشاط جريبي اكثر على المبيض
3	المستخلص الكحولي (للاناث)	40	3	12	(0,2)	10 ايام	وجود نشاط جريبي مع تضخم المبيض جيد جدا
4	المستخلص الكحولي (للذكور)	10	3	12	(0,2)	10 ايام	زيادة في نشاط الحيامن بشكل ملحوظ
5	المستخلص الكحولي (للذكور)	20	3	12	(0,2)	10 ايام	زيادة في حجم الخصى وزيادة نشاط حركة وكثافة الحيامن
6	المستخلص الكحولي (للذكور)	40	3	12	(0,2)	10 ايام	زيادة في نشاط حركة الحيامن

المصادر

1. Harborne , J. **1984**: *Phytochemistry methods : a guide of modern teaching use of plant analysis* 2th (ed.) , Chapman and Hill , New York , USA .
2. Dombek, C. **1998:** *Lawerence Anonymous*. Louis: Facts and Comparisons.
3. Christie, S. and walker, A**. 1997**: vitex agnus castus, Areview of is traditional and modern therapeutic use , current use form a survey practitioners. .*Euro.s. Herb med*, 3, pp: 29-45.
4. Plummer , D. **1971** . *Introduction to practical biochemistry*. McGraw Hill Book Co. LTD.. England, pp:186-190 .

5. Jawad , A. **1997**. *Ethnological studies in assessing the anti-aggressive effects of some Iraqi medical plants in laboratory mice* .PhD.Thesis, Coll. Edu. Univ. Basrah .

6. Du Mee C. **1993.** *Vitex agnus castus.* Aust J. Med. Herbalism. 5, pp:63-65.

7. Gayon , P. **1972.** *Plant phenolics*. 11th (ed.) , Oliver and Boye , Edinburge, p:254.

8. Newall ,C., Anderson, L. and Phillipson, J. **1996**. *Herbal medicines : a guide for health-care professionals.* London: Pharmaceutical Press, PP:296.

9. Tyler , V. ,Braady , L. and Robber , J. **1988** . *Pharmacology* . (19^{th} ed.) , Lea. And Febiger , USA

10. McGuffin, M., Hobbs, C., Upton, R. and Goldberg, A. **1997**. *American Herbal Products* Association's Botanical Safety Handbook. Boca Raton. New York: CRC Press, PP:231.

11. Kelmanson , J. , Jager , A. and Standen , J. **2000** . Zulu medicinal plants with antibacterial activity . *J. Ethnopharmacol.* , 69, pp: 241-246 .

12. Reed , J. **1995** . Nutritional toxicology of tannins and related poly phenols. *J . Anim. Soc*., 7, pp:1511-1528.

13. Cowan , M. **1999** . *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clin. Microbiol. Rev., 12, pp: 564-582.