دراسة مركبات بذور نبات العنب [*Vitis vinifera*] باستخدام تقنية الكروماتوكرافي السائل عالي الأداء [HPLC] ودراسة الفعالية التثبيطية لمستخلصات النبات تجاه البكتريا المعزولة من ألتهاب المجاري البولية

لقاء جميل ابراهيم الجنابي

الجامعه المستنصرية/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

الخلاصة

أجري الكشف الكيميائي النوعي للمركبات الفعالة في المستخلص الفينولي لبذور نبات العنب وبأستخدام تقنية الكروماتوكرافي السائل عالي الأداء (High performance liquid chromatography) أظهرت النتائج احتوائه على المركبات التالية Galic acid ، Catechin ، Epicatechin ، Epigallocatechin ، Epicatechin gallate، Epigallocatechin gallat و Procyanidins. وتم اجراء كشفا كيميائيا لمستخلصات بذور نبات العنب المائية والكحولية باستخدام عدة طرق للكشف وبينت النتائج وجود العديد من المركبات الفعالة منها الفينولات والتربينات، الستيرويدات، الفلافونات.تم تقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي والفينولي لبذور نبات العنب بالتراكيز(2.5,5,10,20,40,80) ملغم /مليلتر كل على أنفراد في نمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و*Klebsiella pneumonia* المعزولة من ألتهاب المجاري البولية وبطريقة الحفر في الأكار ،حيث أظهرت النتائج فعالية تثبيطية عالية تجاه العزلات البكترية قيد البحث وتنوعت بأختلاف نوع المستخلص و التركيز والبكتريا المختبرة.

المقدمة

يعد التهاب المجاري البولية مشكلة صحية كبيرة وتعتبرالقناة البولية من اكثر المناطق في الجسم عرضة للاصابة بالبكتريا. وتنتشر اخماج المجاري البولية في جميع الأفراد والأعمار وتصاب الإناث أكثر من الذكور ويرجع السبب إلى الاختلاف في الشكل التشريحي وموقع الجهاز التناسلي البولي، وان تكرار الاصابة بأخماج المجاري البولية له دور في ارتفاع نسبة الاصابة، وقد يعزى ذلك الى الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية مما يؤدي الى ظهور سلالات مقاومة وبالتالي عدم كفاءة هذه المضادات للعلاج (1). ومن المسببات البكتيرية الشائعة التي تشكل نسبة عالية في إحداث الخمج هي بكتريا *Klebsiella* spp.; *Proteus* spp. *Enterobacter* spp. ; *Staphylococcus* spp. (2). لذا اتجهت انظار العديد من الباحثين الى استخدام المستخلصات النباتية محاولة لأيجاد بدائل فعالة عن الادوية. أذ أن العلاج بالنباتات والأعشاب الطبية اخذ مكانة وحيزاً كبيراً في علوم الطب حيث أن أكثر الأدوية والعقاقير الكيميائية هي من اصل نباتي مما يتيح للمرضى الذين يستعملون الأعشاب والنباتات الطبية لعلاج أمراضهم تجنب الأعراض الجانبية التي تسببها الأدوية الكيميائية فضلاًعن ذلك فأن النبات الواحد قد يحتوي على العديد من الموادالفعالة مثل الزيوت الطيارة(3) والمركبات الفينولية(4). كما أثبتت العديد من الدراسات أن الغذاء الذي يتضمن نسبة عالية من الفاكهة والخضر يحمي الإنسان من الإصابة بالأمراض التي تسبب نسبة وفيات عالية مثل السرطان وأمراض القلب والالتهابات التي تسببها المايكروبات والامراض المزمنة(5)و(6). أن هذه الحقيقة أدت الى اهتمام عالمي واسع للتعرف على المركبات الفعالة في المصادر النباتية المسؤولة عن التأثيرات المفيدة لصحة الإنسان . حيث أظهرت الدراسات أن لبعض النباتات فعلاً فسلجياً ودوائياً واسعاً فقد استعملت في علاج الكثير من الأمراض الشائعة ومنها مرض السكر وضغط الدم ولها القابلية على قتل أو تثبيط نمو الكثير من الأحيا المجهرية المرضية التي تصيب الإنسان (7).لقد شملت الدراسة الحالية بذور نبات العنب *Vitis vinifera* التي لها تاثير تثبيطي تجاه البكتريا(8)والفطريات(9).وتكون غنية بالمركبات الفينولية فهي تمتلك فعالية مضادة للاكسدة (10) وتمتلك قابلية على حماية الغشاء الخلوي من اضرار الاكسدة (11). كما يستعمل لمعالجة عسر التبول

وكمدرر بالاضافة الى قابليته في تفتيت حصى المثانة (12) . قد ترجع فعالية بذورنبات العنب الى احتوائه على العديد من المواد الفعالة منها الفينولات ,التربينات ,الستيرويدات والفلافونات كذلك احتوائه على العديد من المركبات الفينولية منها Proanthocyanidinحيث تبلغ نسبتها (92-95)% (13).وبهذا تكون مضادة للفطريات ومضادة للبكتريا ومضادة للاكسدة (14).

المواد وطرائق البحث

تحضير المستخلصات النباتية

اولآ:جمع العينات النباتية

تم جمع بذورنبات العنب *Vitis vinifera* بعد أن صنفت هذه النباتات بالاستعانة بالاستاذ الدكتور علي الموسوي كلية العلوم/ جامعة بغداد.غسلت بذور العنب بالماء بشكل جيد،لأزالة جميع الاتربة، ثم جففت تجفيفاً طبيعياً بدرجة حرارة الغرفة، وطحنت بطاحونة كهربائية، وحفظت لحين الاستعمال.

ثانيا:تحضير المستخلصات النباتية

ا- تحضير المستخلص المائي البارد

اتبعت طريقة (15) في تحضيرالمستخلص وذلك بوزن 10 غم من المسحوق النباتي ووضعه في دورق زجاجي نظيف ليضاف له 100 مل من الماء المقطر ، ثم وضع في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 ْم ، ثم رشح المزيج بوساطة الشاش في أنابيب زجاجية ونبذت الأنابيب في جهز النبذ المركزي (Centrifuge) بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ثم رشح الرائق بوساطة أوراق الترشيح ، بعدها بخر الراشح في الفرن (Oven)للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص الذي وضع في أنبوبة محكمة الغلق ومعتمة،وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 ْم لحين الاستعمال،وعقم بأستخدام المرشحات الدقيقة (Millipore Filter) ذات ثقوب 0.22 مايكروميتر .

ب-تحضير المستخلص الكحولي الحار

اتبعت طريقة (16) في تحضير المستخلصات الكحولية لبذور نبات العنب حيث تم وزن 50 غم من المسحوق النباتي في كشتبان Thumble وتم الاستخلاص في منظومة الاستخلاص المستمر Soxhlet apparatus بأضافة 500 مل من الكحول الاثيلي بتركيز 96 % وبعد انتهاء فترة الاستخلاص ترك النموذج ليبرد، ثم ازيل المذيب

بأستخدام جهاز المبخر الدوار وتحت الضغط المخلخل للحصول على مستخلص مركز ثم اجريت عملية التجفيف الكامل للمستخلص بوساطة الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 40 م وحفظ النموذج في الثلاجة في قناني نظيفة لحين الاستعمال.

ج- استخلاص المركبات الفينولية

أتبعت طريقة (17) في تحضير المستخلص الفينولي لبذور نبات العنب أذ أخذ 10غم من المسحوق النباتي الجاف وضع في دورق زجاجي 100 مل وأضيف اليه 40 مل من حامض الخليك (2%) و جرت عملية الاستخلاص بواسطة المكثف العاكس باستخدام حمام مائي بدرجة حرارة 80 مْ ولمدة 8 ساعات بعد ذلك ترك المحلول ليبرد ثم رشح بورق ترشيح بعده أضيف اليه حجم مناسب من البروبانول واشبع المحلول باضافة كمية من كلوريد الصوديوم رج المحلول بشكل جيد فتكونت طبقتان، عزلت الطبقة العليا التي تحتوي على المركبات الفينولية بأستخدام قمع الفصل وجففت بالمبخر الدوار وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

الكشف عن المركبات والمجاميع الفعالة الموجودة في النبات

تم الكشف عن التربينات'الستيرويدات' الراتنجات ،التانينات ،الصابونيات ، الكلايكوسيدات ،الفينولات والفلافونات حسب ما ورد في (18) .

محلول الطور المتحرك المستعمل في تغذية الكروموتوكراف السائل عالي الاداء

لتقدير جميع المركبات الفينولية في المستخلص النباتي فقد أستعمل المحلول المتكون من ميثانول : حامض الخليك :ماء مقطر معاد تقطيره خال من الأيونات وبالنسبة (60:0.01:40) مزجت جيداً بالمازج vortex للتخلص الفقاعات الهوائية لتصبح جاهزة للاستعمال .اجريت عملية الفصل بأستخدام العمود C-18 (4.6 mm ID 50×) ،معدل جريان Flow rate 1.5 مل/ دقيقة ،الطول الموجي 254 نانوميتر ، حقن 20 مايكروليتر من مستخلص الفينولات الكلية في الجهاز وقورن زمن الاحتجاز للمواد الموجودة مع زمن احتجاز المركب القياسي(19).

أختبار التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا المعزولة من حالات اخماج المجاري البولية في الزجاج *(In vitro)*

تحضير المحلول الخزين للمستخلصات النباتية

حضر المحلول الخزين لمستخلصات بذور العنب بتركيز (80) ملغم/مل بأذابة 0.8 غم من المستخلص في 10مل من (10)% مركب Dimetylsulfoxid عند تحضير المستخلص الكحولي ومستخلص الفينولات و10 مل ماء مقطرعند تحضير المستخلص المائي رشحت المستخلصات بأستعمال المرشحات البكتيرية 0.45 ملغم لغرض تعقيم المستخلصات الخام,وحضرت التراكيزالتالية(0,2.5.5.10,20,40,80).

تأثير المستخلصات النباتية في نمو البكتريا المعزولة من حالات اخماج المجاري البولية

تم الحصول على عزلات كل من بكتريا *Klebsiella pneumonia*، *Pseudomonase aeruginosa* من طلاب الدراسات العليا في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم / الجامعة المستنصرية, استخدمت طريقة الحفر بالاكار (Agar well diffusion) لتحديد فعالية المستخلصات النباتية تجاه البكتريا المعزولة. أذ حضر العالق البكتيري لكل عزلة ونشر منه (0.1) مل على وسط اكار مولر هنتون Muller Hinton agar وعملت ثقوب في الوسط الزرعي بأستخدام ثاقب الفلين المعقم قطره 5 ملغم اضيف الى كل حفرة (0.05) مل من المستخلصات النباتية، اضافة الى عمل حفرة وسط كل طبق اضيف لها (0.05) مل من محلول 10% DMSO المستخدم في اذابة المستخلصات النباتية الكحولية وماء مقطر في المستخلصات المائية واعتبرت مجموعة سيطرة Control. درس تأثير المستخلصات النباتية بتركيز(0,2.5.5.10,20,40,80) ملغم/مل وحضنت الاطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة، تم بعدها قياس منطقة التثبيط حول كل حفرة بالملمتر (20).

التحليل الاحصائي

أستعمل البرنامج SAS (21) في التحليل الإحصائي لدراسة تأثير التراكيز المختلفة في الصفات المدروسة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار LSD.

النتائج والمناقشة

تعد النباتات مصدرا مهما للحصول على المركبات الفعالة التي تستخدم كمضاد بكتيري لهذا اجرينا كشفا نوعيا لمستخلصات بذور نبات العنب باستخدام عدة طرق للكشف.بينت نتائج الكشف النوعي عن بعض المركبات الفعالة احتواء المستخلص المائي والكحولي على العديد من المواد الفعالة منها الفينولات والتربينات، الستيرويدات، الفلافونات جدول (1)إذ أظهرت العديد من الدراسات احتواء بذور نبات العنب على العديد من المركبات الفينولية منهاProanthocyanidin; Catechin (22). وقد أشارت بعض الدراسات ألى أهمية وجود بعض المكونات الفعالة في النباتات لما لها من دور في الفعالية التثبيطية للأحياء المجهرية. إذ أن الفلافونات يكون عملها من خلال إرتباطها مع اللواحق البكتيرية الموجودة على سطح الخلية البكتيرية وتكوين معقد مع الجدار الخلوي (23). كما إن الفينولات تعمل على أكسدة طبقة اللبيدات الفوسفاتية في الغشاء السايتوبلازمي مسببة زيادة النفاذية، وتأثيرها على المكونات الخلوية الداخلية وخلل في وظيفة الأنزيمات البكتيرية (24). الكشف عن هذه المركبات وعزلها وتنقيتها له الأثر الفعال في توظيف نتائجها لغرض أستخدامها في السيطرة على الأمراض التي تصيب الأنسان والحيوان والمتسببة بفعل بعض أنواع البكتريا والفطريات.أظهرت نتائج الكشف بأستخدام تقنية الكروموتوكرف السائل عالي الأداء (HPLC) أن زمن الأحتجاز القياسي لكل مركب (Gallic acid، Catechin ، Epicatechin ،Epigallocatechin gallate، Epicatechin gallate،Epigallocatechin، Procyanidine) كان (1.15، 2.99 ،3.81، 4.65 ، 5.91 ، 6.47، 7.39) دقيقة على التوالي جدول (2). ويتضح من الشكل (1) المكونات الكلية لمستخلص الفينولات الخام الذي يظهر احتوائه على كل من(Gallic acid، Catechin ، Epicatechin ، Epigallocatechin gallate ، Epicatechin gallate،Epigallocatechin، Procyanidine) مقارنة مع المركبات القياسية وبنسب متفاوتة شكل (2).حيث أكد (25) أحتواء العنب على كل من (cathechins ، epicatechin ، epicatechin -، gallate ، procyanidins) .وكانت أعلى نسبة تعود لمركب Epicatechin (43.8) %يليه مركب Epigallocatechin (10.6)% فيما جاء مركبCatechin بأقل نسبة (4.6) % جدول(3).بالإضافة إلى أحتواء المستخلص على عدد من المركبات ظهرت على هيئة منحنيات صغيرة دليل على أن نسب هذه المواد قليلة في المستخلص.يمتلك مركب epigallocatechin ومركب gallate-ومركب cathechins فعالية مضادة

للبكتريا. تبين نتائج الدراسة الموضحة في الجداول (4,5,6)، ان المستخلص المائي والكحولي ومستخلص الفينولات لبذور نبات العنب فعالية تثبيطية متباينة للانواع البكتيرية قيد الدراسة. فقد اظهر المستخلص المائي لبذور نبات العنب عدم وجود فروق معنوية عند مستوى الاحتمالية $p<0.05$ في تثبيط نمو الانواع البكتيرية عند التراكيز (2.5,5) ملغم/مل، في حين اظهرت باقي التراكيزوجود فروق معنوية في تثبيط نمو الانواع البكتيرية. حيث كانت نتائج المعاملة بتركيز (40,80) ملغم/مل وهما اعلى تركيزين وجود فرق معنوي في تثبيط نمو البكتريا وباقطار تثبيط(14.67,18.33)ملم لبكتريا*Pseudomonas aeruginosa* والتي كانت اعلى من اقطار تثبيط بكتريا *Klebsiella pneumonia* (12,14.67) ملم .واظهر المستخلص الكحولي لبذور نبات العنب عدم وجود فروق معنوية عند مستوى الاحتمالية $p<0.05$ في تثبيط نمو الانواع البكتيرية عند التراكيز (2.5) ملغم/مل، بينما ظهر فرق معنوي في نمو الانواع البكتيرية في باقي التراكيزحيث كان اعلى تركيز مؤثرهو 80ملغم/مل وباقطار تثبيط (17.67)ملم لبكتريا *Klebsiella pneumonia* و(20.67)لبكتريا*aeruginosa Pseudomonas*. اظهر مستخلص الفينولات لبذور نبات العنب وجود فرقاً معنوياً عند مستوى الاحتمالية $p<0.05$ نتيجة المعاملة بتركيز 2.5ملغم/مل في تثبيط نمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فيما اظهر التركيز 5 ملغم/مل وجود فرقاً معنوياً في تثبيط نمو كل من بكتريا*Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella pneumonia*. أما عند اعلى تركيز (80) ملغم/مل فقد اظهرت نتائج المعاملة فرقاً معنوياً عند مستوى احتمالية $p<0.05$، في تثبيط الانواع البكتيرية وازدادت معدلات اقطار مناطق التثبيط بزيادة التركيز فكانت(19) ملم لبكتريا *Klebsiella pneumonia* و(22.3)ملم لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وتعتبر اعلى اقطار تثبيط مقارنة مع باقي المستخلصات. تبين من النتائج ان المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات العنب بتركيز(2.5) ملغم/مل لم يكن مؤثراً في تثبيط نمو الانواع البكتيرية المسببة لأخماج المجاري البولية. أما عند التركيز (5) ملغم/مل فأظهر المستخلص المائي عدم فعاليته فيما كان المستخلص الكحولي مؤثراً في تثبيط نمو *Pseudomonas aeruginosa* بينما *Klebsiella pneumonia* كانت مقاومة للمستخلص. في حين اظهرت نتائج المعاملة بتركيز(10) ملغم/مل مقاومتها بكتريا *Klebsiella pneumonia* للمستخلص المائي فيما اظهرت حساسيتها للمستخلص الكحولي عند هذا

التركيز. وتعود كفاءة المستخلص الكحولي في التأثير في البكتريا الى نوعية وكمية المواد الذائبة فيه جدول(1). وبزيادة التراكيز (20,40,80) ملغم/مل فقد اظهرت الانواع البكتيرية تحسساً للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات العنب, اما في مستخلص الفينولات لبذور نبات العنب فعند التركيز (2.5) ملغم/مل اظهرت بكتريا *Klebsiella pneumonia* ; مقاومتها للمستخلص عند هذا التركيز فقط شكل (3) فقد كانت حساسة لباقي تراكيز المستخلص وكذلك بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت حساسة للمستخلص في جميع التراكيزشكل (4). وجاءت نتائج الدراسة الحالية موافقة لما جاء به (26) أذ بينت نتائج الدراسة ان تركيز 20% من مستخلص بذور نبات العنب يمتلك فعالية تثبيطية لكل من بكتريا *S. aureus; E. coli; K. pneumonia* . وتبين النتائج ان هناك فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p<0.05$ بين المستخلص المائي والكحولي ومستخلص الفينولات لبذور نبات العنب شكل (3) اذ كان مستخلص الفينولات اكفأ من المستخلص الكحولي والمائي والكحولي اكفأ من المائي بظهور تأثير في الانواع البكتيرية, *Klebsiella pneumonia* , *Pseudomonas aeruginosa* عند التركيز (2.5, 5,10,20,40,80) ملغم/مل .من خلال ملاحظة زيادة معدلات اقطار مناطق التثبيط وتعود الفعالية التثبيطية لوجود المركبات الفينولية والتي تمتلك فعالية مضادة للبكتريا منها galic acid وهذا يتفق مع ما ذكره (27)ان Gallic acid مضاد بكتيري ل *Pseudomonas* وبصورة اكبر لل *Klebsiella*.وكذلك يعود السبب في فعالية مستخلص بذور نبات العنب لكونه غني بالمركبات الفينولية والفلافونويدات والتي تمتلك فعالية مضادة للبكتريا (28)، ومن هذه المركبات هي Proanthocynidin, Epicatichin, Catechins epigallocatechin gallate (29)، حيث يمتلك مركب Cetechin ومركب Proanthocynidin فعالية مضادة للمايكروبات (30) وان الميكانيكية المسؤولة عن سمية الفينولات هي حدوث عملية تثبيط انزيمي بوساطة اكسدة المركبات (24). وهذا يختلف مع ما وجده (31) اذ لم يؤثر المستخلص الفينولي على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ,*Klebsiella pneumonia*, الا في التركيز العالية(400,500)ملغم/مل.

جدول (1): المركبات الكيميائية الفعالة في بذور نبات العنب

المركبات الكيميائية الفعالة	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي

القلويدات	-	-
الفينولات	+	+
الصابونيات	-	-
التربينات	+	+
الستيرويدات	+	+
الكلايكوسيدات	-	+
الراتنجيات	-	-
التانينات	-	-
الكومارينات	-	-
الفلافونات	+	+

جدول(2) :زمن الاحتجاز القياسي للمركبات القياسية

Compound	Retention Time	Area of Standard
Gallic	1.15	109750
Catechin	2.99	118073
Epicatechin	3.81	127821
Epigallocatechin	4.65	120191
Epicatechingallate	5.91	106946
Epigallocatechingallate	6.47	151156
Procyanidins	7.39	155473

جدول (3):التراكيز والنسب المئوية للمركبات في المستخلص الفينولي

Compound	Concentration	Percentage%
Epicatechin	54483.32	43.8%
Epigallocatechin	14108.79	10.6%
Epicatechingallate	13625.21	9.1%
Epigallocatechingallate	8231.06	7.8%
Procyanidins	7379.33	7.2%
Gallic	8273.23	5.7%
Catechin	6190.45	4.6%

جدول (4): تأثير التراكيز المروسة في نسبة التثبيط للمستخلص المائي

Pseudomonas aeruginosa	*Klebsiella pneumonia*	التركيز mg/mL
0.00 ±0.00	0.00 ± 0.00	0
0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.5
0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5
9.33 ±0.33	0.00 ± 0.00	10
12.00 ± 0.58	9.33 ±0.33	20
14.67 ±0.33	12.00 ±0.58	40
18.33±0.33	14.67 ±0.33	80
*0.936	*0.854	قيمةLSD

* (P<0.05).

جدول (5): تأثير التراكيز المروسة في نسبة التثبيط للمستخلص الكحولي

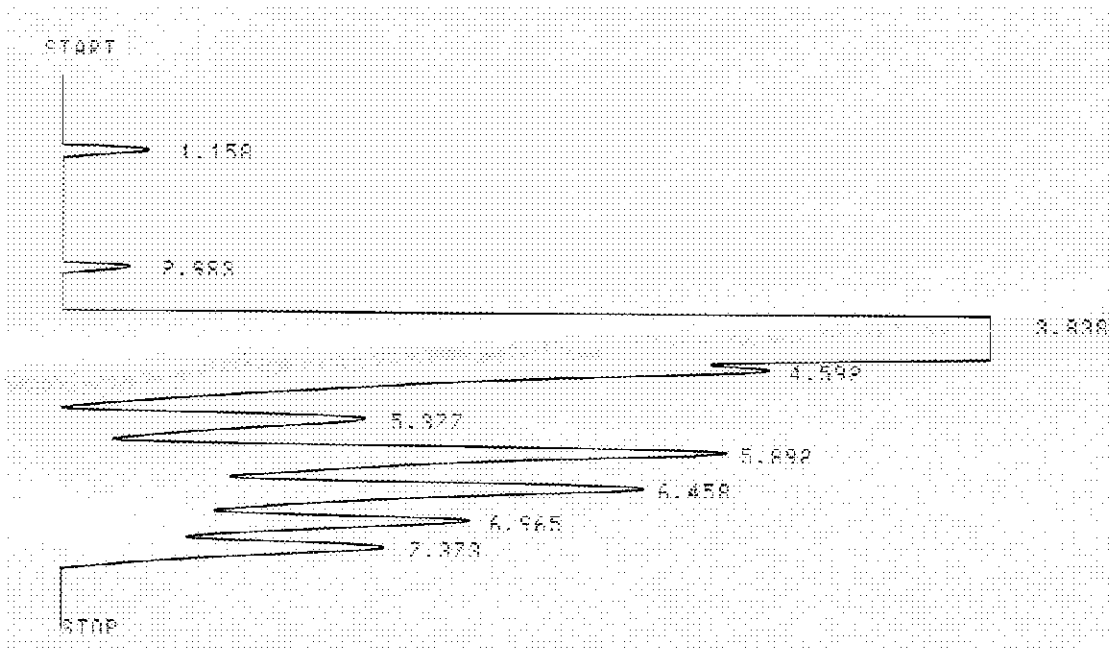
Pseudomonas aeruginosa	*Klebsiella pneumonia*	التركيز mg/mL
0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0
0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.5
0.33 ±9.33	0.00 ± 0.00	5
0.58 ± 13.00	0.33 ± 9.33	10
0.58 ± 16.00	0.58 ± 12.00	20
0.33 ± 17.33	0.33 ±14.33	40
0.33 ± 20.67	0.33 ± 17.67	80
*1.146	*0.936	قيمة LSD

* (P<0.05).

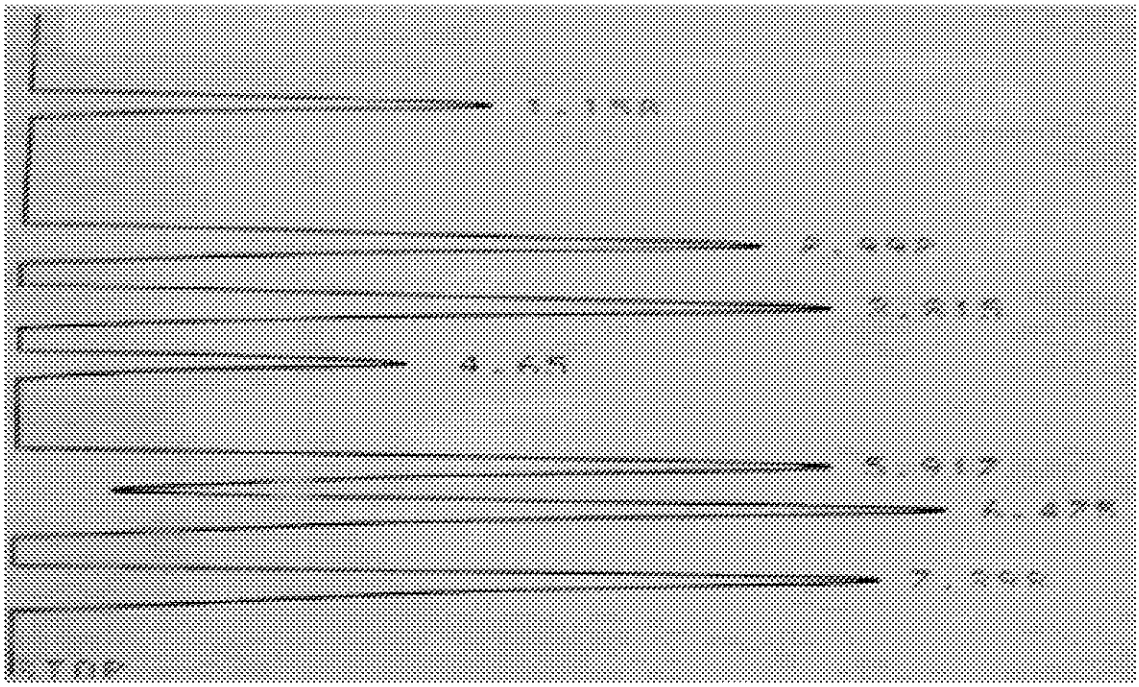
جدول (6) تأثير التراكيز المروسة في نسبة التثبيط للمستخلص الفينولي

Pseudomonas aeruginosa	*Klebsiella pneumonia*	التركيز mg/mL
0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0
0.58 ±9.00	0.00 ± 0.00	2.5
0.33 ±11.00	0.33 ±9.67	5
0.58 ±15.00	0.58 ±12.00	10
0.33 ±18.33	0.33 ±14.67	20
0.58 ±20.00	0.33 ±17.33	40
0.33 ±22.33	0.00 ±19.00	80
*1.323	*0.936	قيمة LSD

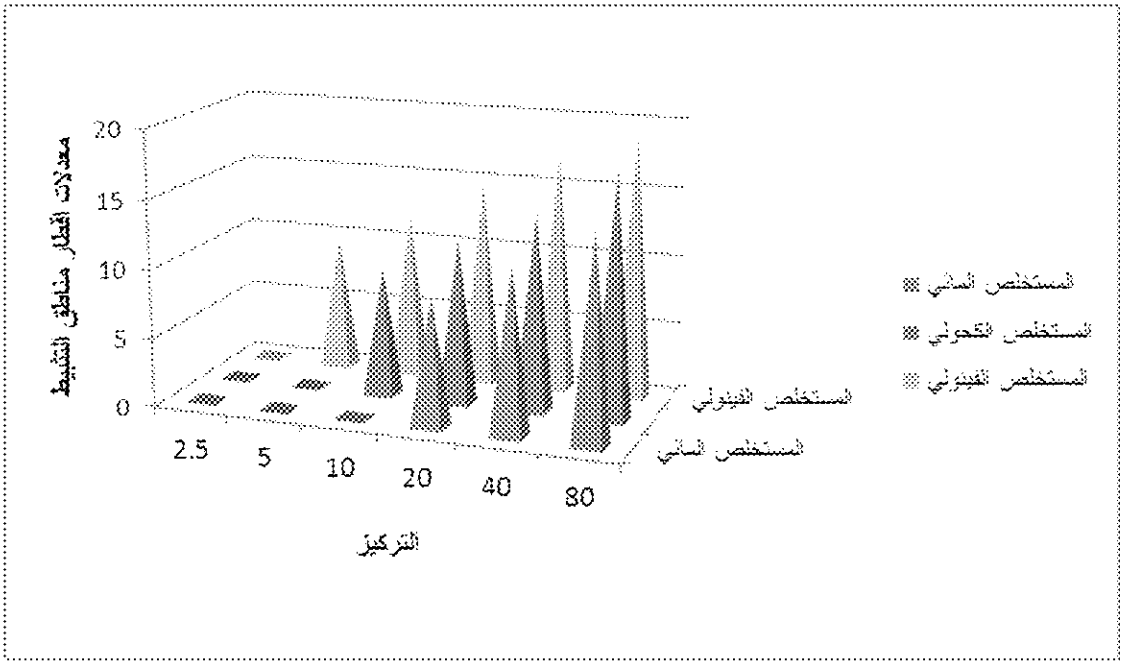
* (P<0.05).



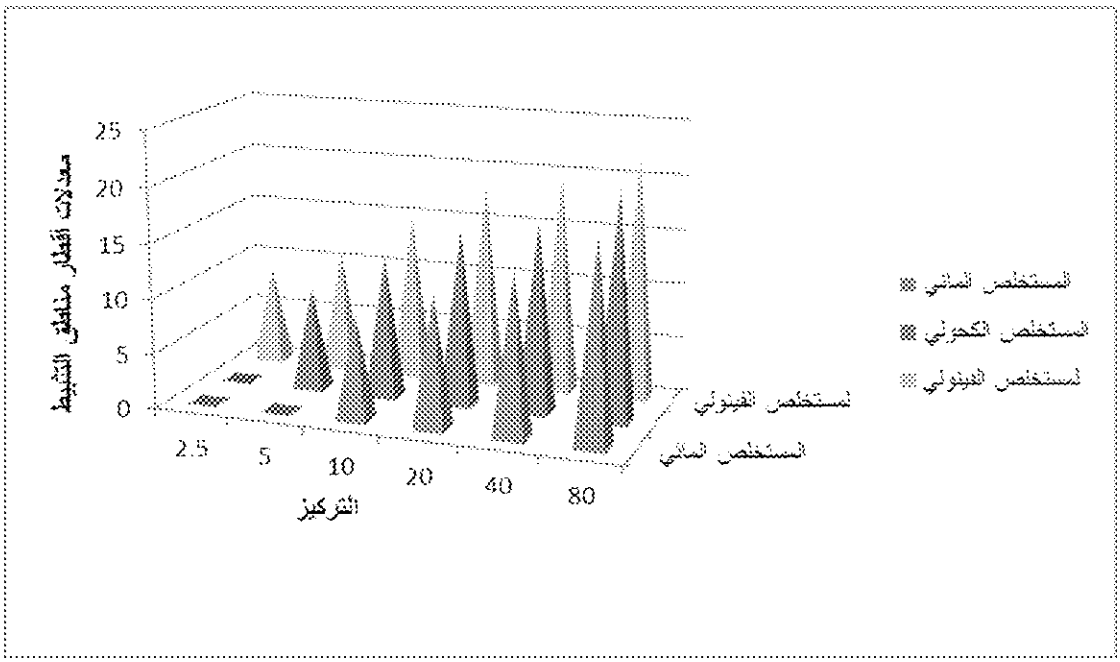
شكل (1): كروماتوكراف الكشف عن مكونات مستخلص الفينولات الكلية لبذور نبات العنب بأستخدام تقنية HPLC عند الطول الموجي 264 نانوميتر



شكل (2): كروماتوكراف المركبات القياسيه بأستخدام تقنية HPLC عند الطول الموجي 264 نانوميتر



شكل(3):معدلات أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر (ملم) لتأثير المستخلص النباتي لبذور نبات العنب في بكتريا *Klebsiella pneumonia* بتراكيز مختلفة.



شكل(4)معدلات أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر (ملم) لتأثير المستخلص النباتي لبذور نبات العنب في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بتراكيز مختلفة.

المصادر

1-Tilgner, S. (2000). Urinary tract heath. Herbal Transitions, 4(1): 1 – 12.

2-Sonavane, A.; Mathur, M.; Turbadkar, D. and Baradkar V. (2008). Antimicrobial susceptibility pattern in urinary bacterial isolates. Bombay Hospital journal, 50(2): 240-244.

3- Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R.(2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial,Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. Forsch. Komplement.med. 16(2):79-90.

4- Shan B., Cai Y., Brooks J., Corke H.(2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (Cinnmomum burmannii): Activity against foodborne pathogenic bacteria.J. Agric. Food Chem. 55(14):5484-5490.

5- Nazzaro F., Caliendo G.,Arnesi G.,Veronesi A., Sarzi P and Fratianni F., (2009) Comparative Content of Some Bioactive Compounds in Two Varieties of Capsicum Annuum L., Sweet Pepper and Evaluation of Their Antimicrobial and Mutagenic Activities. J. Food Biochem. 33(6):852-868.

6- Alviano D.,Alviano C.(2009).Plant Extract:Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. Curr.Pharm.Biotechnol. 10(1):106-121.

7-Kuete V., Dongfack M., Mbaveng A., Lallemand M., Van-Dufat H., Wansi J., Seguin E., Tillequin F and Wandji J.(2010). Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from the stem bark of Drypetes tessmanniana. Chinese Journal of Integrative Medicin 16(4):337-343.

8-Joanne, T.; Iime, B.; Olga, P.Z. and Hyun, K. (2007). Chemical characterization of red wine grape *Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 55(25): 10200-10207.

استخلاص الكاتكينات من (2012). اشراق منير, الجنابي نضال محمد و الراوي اكرم ثابت السامرائي - 9 مخلفات العنب المعصور ودراسة فعاليتها المضادة للاحياءالمجهرية. مجلة العلوم الزراعية العراقية.120-112:(43)4

10- Baydar, N.G.; Ozkan, G. and Yasar , S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. Food Control, 18: 1131- 1136.

11- Centin, A.; Kayanr, L.; Kocyigit, I; Hacioglu, S.K.; Saraymen, R.; Ozturk, A.; Orhan, O.and Sagdic, O. (2008). The effect of grape seed extract on radiation – induced oxidative stress in the rat liver. Turkish Journal Gastroenterology, 19(2):92 – 98.

12-Khare, C.P. (2007). Indian Medicinal plants. Spring Science Business Media, LL.C.

13-National Toxicology Program.Summary of Data for Chemical Selection.Oligomeric Proanthocyanidins from Grape Seeds and Pine Bark.http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumpdf/GrapeSeeds_PineBark.pdf.2000.Date Accessed 2-2-2012.

14-Gottschalck TE and Breslawes HP.International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook.14 *ed.*Washington,DC:personal Care Products Council,2012

15-Parekh , I. and Chanda , S.V. (2007). In – vitro screnning of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extract of various Indian plant species against selected pathogen from Enterobacteriaceae . African Journal of microbiology Research , 1(6):92-99.

16-Boskabady, M.H.; Rakhshandah, H.; Afiat, M.; Aelami, Z. and Amiri, S. (2006). Antitissue effect of *plantago lanceolata* in guinea pigs. Iranian Journal Medicine Science, 31(3): 143-146.

17- Gayon, T.A. (1972). Plant Phenolic.Oliver and Boyyed Edinberg. Pp:254.

18-Harbone, JB. (1984). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysisChapman and Hall. Ltd London..Pp:149-188.

19-Yan, X., Murphy, B.T., Hammond, G.B., Vinson, J.A and Neto, C.C. (2002)
Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*) J. Agr. Food Chem. 50:5844–5849.

20- Kharma, A. and Hassawi, D.S. (2006). The genetic relationship and antimicrobial activity of plantago species against pathogenic bacteria. World Journal of Agricultural Sciences, 2(3): 311-318.

21-SAS. 2010 . SAS / STAT Users Guide for Personal Computers. Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC., USA. (SAS = Statistical Analysis System).

22- Weidner, S. ; Rybarczyk, A. ; Karamać, M. ; Król , A. ;Mostek, A. ; Grębosz, J. ; and Amarowicz, R.(2013). Differences in the Phenolic Composition and Antioxidant Properties between *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* Seeds Extracts. Molecules, (18):3410-3426.

23- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12 (4): 564-582.

24- Souza , E.L.; stamford , L.M.; Lima , E.D. ; Trajano , V.n. and Filho , J.M.(2005) Antimicrobial effectiveness of spices : an approach for

use in food conservation system . Brazilian Archives of Biology and Technology-An International Journal , 48(4): 5.

25- Shrestha, B.; Theerathavaj, S.; Thaweboon, S. and Thaweboon, B.(2012). In vitro antimicrobial effects of grape seed extract on peri-implantitis microflora in craniofacial implants. Asian Pac J Trop Biomed, 2(10): 822–825.

26- Baydar, N.G.; Ozkan, G. and Sadic, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*vitis vinifera* L.) extracts. Food Control, 15: 335-339.

27-Rodrguez VMJ,Alberto MR,Nadra MMC.Food control 2007;18:93-101.

28-Furiga A.,Lonvaud-Funel A.,Badet C.(2009). In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of agrape seed extract; Food Chemistry 113:1037-1040.

29- Taguri, T; Tanaka, T and Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol Pharm Bull,27:1965–9.

30-Veluri R,Weir TL,Bais HP,Stermitz FR,Vivanco JM (2004).Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives.J.Agric.Food Chem.52:1077-1082.

31-Hasan A. M. (2013). In-Vitro Antibacterial Activity Of Proanthocyanidins Against Some Of Pathogenic Bacterial Isolates.Al-Mustansiriyah J.Sci.24(1)57.

Study compound of *Vitis vinifera* seeds using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and study its inhibitory effect in some bacteria isolated from urinary tract infection.

Abstract

Qualitative and quantitative detection of the active compounds in the phenolic extract of *Vitis vinifera* seeds was conducted by using HPLC. Results showed it contains all of the following compound (Galic acid, Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin Epicatechin gallate,Epigallocatechin gallate,Procyanidins).The result of chemical test of the active compounds showed that water and alcoholic extracts contained phenols,terpens,steroids and flavonides. Inhibitory effectiveness was evaluated for different concentration of phenolic,watery and alcoholic extracts of seeds include (2.5, 5,10,20,40 and 80) mg/ml separately against bacteria *Klebsiella pneumonia and Pseudomonas aeruginosa* Isolated from urinary tract infection by Agar well diffusion method ‹‹The results showed high inhibition effect aganist all bacterial isolates with the effect of concentration and genus of bacteria type of extract.

Key words :Antibacterial ,*Vitis vinifera* seeds, HPLC