Study chemical composition and inhibitor effect of Fenugreek seeds extracts aqueous and alcoholic on some positive and gram negative bacteria

دراسة المكونات الكيميائية والتأثير التثبيطي للمستخلص المائي والكحولي لمسحوق بذور نبات الحلبة على بعض البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام

فليحة حسن حسين　　عالية زيارة هاشم　　علاء رياض عبد الستار
قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة

الخلاصة

دُرس التركيب الكيميائي وبعض العناصر المعدنية النزرة والمحتوى الكلي للفينولات ومدى التأثير التثبيطي للمستخلص المائي والكحولي لمسحوق بذور نبات الحلبة على خمسة أنواع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام . أظهرت النتائج إن لطريقة الاستخلاص تأثيرا في المحتوى الكلي للفينولات ، إذ أعطى المستخلص المائي المحضر بطرقة النقع قيمة مرتفعة من الفينولات الكلية بلغت 2.77 mg/g مقارنة بطريقة الاستخلاص الكحولي (الايثانول والكلوروفورم والهكسان) والتي بلغت 0.78 ,0.74, 0.62 mg/g على التوالي، وقيمة المستخلص المائي المحضر بطريقة الغليان 2.32 mg/g . وقد تم دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية على بكتريا *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Micrococcus roseus* إن نسب التثبيط لمستخلصات بذور نبات الحلبة تباينت بتباين البكتريا وطريقة الاستخلاص، إذ أعطى الاستخلاص المائي بطريقة النقع أعلى نسب تثبيط بلغت 98.6 % مقارنة بطرق الاستخلاص الأخرى باستثناء بكتريا *E. coli* التي لم تتأثر بأي من المستخلصات المائية والكحولية لمسحوق بذور نبات الحلبة . وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين طريقة الاستخلاص الكحولي بالهكسان والاستخلاص المائي بالنقع كما ظهرت فروقا معنوية في نسب التثبيط بين أنواع البكتريا المدروسة .

Abstract

The chemical composition, trace element total phenols and the inhibitory effect of Fenugreek seeds extracts aqueous and alcoholic on five bacteria gram positive and gram negative were studied. It was found that the extract method effect of total phenolic content for Fenugreek seeds ,Aqueous extract prepared by soaking was showed the highest value of total phenols 2.77mg/g compared to alcoholic extract (ethanol, chloroform, Hexane) 0.78 ,0.74 ,0.62 mg/g respectively and aqueous extract by boiling 2.32mg/g and alcoholic extract were studied on *Bacillus subtilis ,Escherichia coli ,Staphylococcus aureus ,Pseudomonas aeruginosa and Micrococcus roseus* .The ratio of inhibitor of Fenugreek seeds extract different between bacteria types and extract method ,soaking extract gave highest ratio 98.6% compared to other methods except *E.coil* don't effect any aqueous and alcoholic extracts from Fenugreek seeds powder .The results showed significant variation in hexane extract and soaking extract and showed significant variation in all types of bacteria .

المقدمة

تعد الحلبة *Trigonella foenum - graecum* من الأعشاب الطبية التي تنتمي إلى العائلة البقولية Fabaceae (1) والتي تنمو على نطاق واسع في الباكستان والهند والشرق الأوسط وهي من أقدم النباتات الطبية المزروعة والشائعة الاستعمال في معظم دول العالم كغذاء ودواء (2 و3). تعد بذورها مصدرا غنيا بالبروتينات والدهون والكاربوهيدرات والفيتامينات وبعض المعادن كالصوديومNa والكالسيومCa والحديدFe والفسفورP والمغنيسيوم Mg والبوتاسيوم K وكميات اقل من المنغنيزMn والزنكZn والنحاسCu وغيرها من المعادن (4 و5 و6) وتحتوي على مجموعة كبيرة من المواد الفعالة أهمها القلويدات (7) وكلايكوسيدات (8) ومواد مره الطعم مثل الكومارين(9) ، والمركبات الفينولية التي تؤدي دورا مهما في نمو وتكاثر النبات فضلا عن إنها تعد عوامل مقاومة طبيعية للنبات (10) ، إذ يؤثر موقع وعدد مجاميع الهيدروكسيل للفينولات بالفعالية المضادة للأحياء المجهرية والفعالية المضادة للأكسدة (11) إذ تعرف بذور الحلبة بفعاليتها التثبيطية الواسعة ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام(12)

والفعالية المضادة للأكسدة (13و 14) وتستعمل بذور الحلبة على نطاق واسع في أوربا وأمريكا وفي معظم دول العالم كتوابل وبهارات تضاف إلى الأغذية والمشروبات (15و16و 17) وفي علاج العديد من الأمراض منها السكري (18) وانخفاض ضغط الدم (19) وعلاج أمراض القلب والجلطة (20) وتخفيض نسبة كولسترول الدم (21) وفي علاج قرحة المعدة (22و23) وتثبط الأورام الخبيثة والوقاية منها خاصة سرطان غدة المثانة وسرطان الثدي والمعدة (24 و25) ويستعمل المستخلص المائي أوالكحولي للبذور المطحونة أو مطحون البذور في كبسولات عن طريق الفم لتسهيل عملية الولادة (26 و27 و28) و تعطى البذور للنساء المرضعات لإدرار اللبن (29و30) إذ إن أكثر المستخلصات النباتية المستعملة في العلاج تحتوي على مركبات حلقية (31) وقد ازداد الاهتمام بها ونظرا لزيادة مقاومة الأحياء المجهرية المرضية للمضادات الحيوية التي كانت قبل عدد من العقود هي الحل الأفضل (13) وعلى ضوء ما تقدم ولأهمية بذور نبات الحلبة تغذويا وعلاجيا هدفت الدراسة إلى تقدير المكونات الكيميائية ومحتواها من بعض العناصر المعدنية النزرة ومعرفة التأثير التثبيطي للمستخلص المائي والكحولي لمسحوق بذور نبات الحلبة على البعض من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

المواد وطرائق العمل

تحضير العينات:

جمعت عينات بذور نبات الحلبة من السوق المحلي لمحافظة البصرة. نظفت البذور الجافة بإزالة الشوائب منها وسحقت ونخلت ثم قدر التركيب الكيميائي لها من رطوبة ، رماد ، بروتين ودهن وفقا للطريقة الواردة في (32).

تقدير العناصر المعدنية:

قدرت العناصر المعدنية لمسحوق بذور نبات الحلبة بحرق 2 غم من مسحوق البذور الجافة للتخلص من الرطوبة المتبقية من المسحوق، ورمد باستعمال (Muffle fernace) عند درجة 500 م° لمدة 16 ساعة، ثم اخذ 0.5 غم من الرماد المتخلف بعد تبريده وأذيب في 12 مل من خليط (5:1 V\V) ($HNO_3 + H_2O_2$) المركز وسخن الخليط حتى أصبح المحلول رائق ثم رفعت المادة المهضومة وخففت إلى 50 مل باستعمال الماء المقطر ، قيست العناصر المعدنية باستخدام جهاز الامتصاص الذرى Flame atomic absorption، حضرت محاليل قياسية لكل عنصر معدني بموجب الظروف القياسية وفقا لما ذكره (33) .

تحضير المستخلصات

المستخلص الكحولي:

استعملت ثلاثة أنواع من المذيبات(ايثانول، كلوروفورم والهكسان)في الاستخلاص الكحولي لمسحوق بذور نبات الحلبة .اجري الاستخلاص بوضع 20غم من المسحوق مع 200 مل من كل مذيب في دورق زجاجي ،وترك على المحرك الدوارMagnetic Stirrer عند درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة، بعدها رشح المستخلص باستعمال أوراق ترشيح Whatman No.1ثم ركز الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوار rotary vacuum evaporator وبعد الحصول على المستخلص الجاف حضر المستخلص النهائي بإذابة 0.15 غم في 1مل من الماء المقطر المعقم ثم وضع في قناني معقمة محكمة الغلق وحفظ بدرجة (-18م°) لحين الاستعمال (34) .

المستخلص المائي:

شملت طريقة الاستخلاص بالماء كل من:

الاستخلاص بالغليان:

في هذه الطريقة وضع 20 غم من مسحوق بذور نبات الحلبة في 200 مل من الماء المقطر المعقم وغلي لمدة خمس دقائق، رشح المستخلص باستعمال أوراق ترشيح Whatman No.1 وركز الراشح باستعمال المبخر الدوار rotary vacuum evaporator وبعد الحصول على المستخلص الجاف حضر المستخلص النهائي بإذابة 0.15 غم في 1مل من الماء المقطر المعقم ثم وضع في قناني معقمة محكمة الغلق بدرجة حرارة (-18م°) لحين الاستعمال (35).

الاستخلاص بالنقع :

وضع 20غم من مسحوق بذور نبات الحلبة في 200 مل من المقطر المعقم البارد في دورق زجاجي وترك على المحرك الدوار عند درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة ثم رشح المستخلص باستعمال أوراق ترشيح Whatman No.1 ثم ركز الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوار، حضر المستخلص النهائي كما في الطريقة المذكورة أعلاه وحفظ في قناني معقمة على نفس درجة الحرارة السابقة الذكر(34) .

تقدير الفينولات الكلية :

قدر المحتوى الكلي للفينولات في المستخلصات المائية والكحولية لمسحوق بذور نبات الحلبة باستعمال كاشف فولن (Folin-Ciocalteu) حسب الطريقة المذكورة من قبل(36) وذلك بوضع 0.125 غم من المستخلص المائي أو الكحولي في أنبوبة اختبار وأضيف له 0.5 مل من الماء المقطر و0.125 مل كاشف فولن وخلط المزيج جيدا وترك لمدة 6 دقائق ، بعدها أضيف له 0.125 مل كربونات الصوديوم بتركيز 7% وخفف الخليط بالماء المقطر إلى 3 مل وترك لمدة 90 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة مع التحريك

المستمر ثم قيست الامتصاصية بجهاز Spectrophotometer على طول موجي 760 نانوميتر ثم قورنت النتائج بعمل منحني قياسي من حامض الكالك .

الطرق البكتريولوجية

العزلات البكتيرية:

استعملت خمسة أنواع من العزلات البكترية، ثلاثة منها موجبة لصبغة كرام وهي *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Micrococcus roseus* والاثنان المتبقيان مثلا البكتريا السالبة لصبغة كرام وهي *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* وجميع هذه الأنواع تم الحصول عليها من قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة –جامعة البصرة. وقد تم تشخيص هذه العزلات بدراسة خصائصها الشكلية وقابلية اصطباغها بصبغة كرام وفقا لما ذكر في كل من (37 و 38) ، نشطت العزلات وحضر اللقاح البكتيري والتخافيف المناسبة قبل إن نختبر فعاليتها التثبيطية اعتمادا على (39) ثم حسبت النسبة المئوية للتثبيط من المعادلة الآتية:

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{عدد المستعمرات في الوسط بدون المستخلص} - \text{عدد المستعمرات في الوسط مع المستخلص}}{\text{عدد المستعمرات في الوسط بدون المستخلص}} \times 100$$

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لمسحوق بذور نبات الحلبة :

اختبرت الفعالية التثبيطية بأخذ 0.1 مل بطريقة معقمة من كل مستخلص من المستخلصات (المائية والكحولية) بتركيز 0.15غم/مل ، وضع في أطباق بتري معقمة وأضيف له 0.1 مل من العزلات البكترية النشطة للتخفيف 10^{-5} وفي الوقت نفسه عملت أطباق سيطرة ثم أضيف الوسط ألزرعي Nutrient Agar ورج الطبق وترك ليتصلب ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 18- 24 ساعة بعدها تم حساب المستعمرات النامية واستخدمت المعادلة المذكورة أعلاه لحساب النسبة المئوية للتثبيط .

التحليل الإحصائي:

استعمل البرنامج الإحصائي الجاهز(special package for social science (SPSS في تحليل البيانات إحصائيا.

النتائج والمناقشة

يتضح من نتائج جدول (1) امتلاك التركيب الكيميائي لبذور نبات الحلبة قيمة غذائية جيدة خاصة بالنسبة للبروتين الذي يحتل المرتبة الأولى والذي تقدر نسبته ب 24.33% إذ يعد مصدرا للبروتينات الغنية باللايسين والتربتوفان ، وهذه النتيجة جاءت مقاربة لما توصل إليه(40) إن نسبة البروتين في بذور نبات الحلبة كانت24.7% ومختلفة عما توصلا إليه (41) من إن نسبة البروتين في بذور نبات الحلبة كانت27.20 %. في حين يلاحظ من الجدول إن نسبة دهن بذور الحلبة بلغت 6.48 % وهذه النتيجة تقاربت مع ماشارا إليه (41) من إن نسبة دهن بذور نبات الحلبة كانت 6.20 %. وذكر (42) من إن نسبة الدهون في بذور نبات الحلبة تتراوح بين 5-8 % . أما بالنسبة لمحتوى البذور من الرطوبة والرماد فقد كان (2.38 و3.72%) على التوالي، وهذه النتيجة مقاربة لما توصلا إليه (41) من إن نسبة الرماد في بذور نبات الحلبة كانت 4.10 %. وقد يعود التباين في التركيب الكيميائي لبذور الحلبة ظروف النمو المتعددة كالتربة والتسميد ومناطق زراعتها والري . فقد وجد (43) إن التركيب الكيميائي لبذور الحلبة يتنوع بتنوع الحلبة ومناشئها في دول العالم .

جدول (1) التركيب الكيميائي لبذور نبات الحلبة

المحتوى الكيميائي %	بروتين	دهن	رطوبة	رماد
	24.33	6.48	2.38	3.72

أما نتائج تقدير العناصر المعدنية النزرة لبذور نبات الحلبة يمكن ملاحظتها في جدول(2) الذي يوضح محتوى بذور الحلبة من بعض العناصر المعدنية النزرة من رصاص ، حديد ، زنك ، كروم وكادميوم، إذ أظهرت الدراسة إن أعلى تركيز للرصاص كان 1.7772 µg/g واقل تركيز 0.0036 µg/g كان للكادميوم . .بينما كان تركيز الحديد في بذور نبات الحلبة 0.1836 µg/g كما احتوت بذور نبات الحلبة على الكروم والزنك وبتراكيز 0.0049 و0.1047 µg/g ، واتفقت هذه النتيجة مع (44)، إذ يحتاج جسم الإنسان إلى العناصر المعدنية وغير المعدنية لأجل النمو والتطور وضمن الحدود المسموح بها وبالتراكيز التي يحتاجها لهذا الغرض ، وتبدأ الحاجة إلى العناصر المعدنية من الأطفال إلى البالغين من الرجال والنساء وان تحديد هذه العناصر في الشراب والغذاء والماء يعتبر ضروري ، ففي العديد من البحوث حدد المتناول اليومي والذي يشمل تقريبا كل العناصر الرئيسية التي نحتاجها لأجل النمو والتغير الفيزيائي في جسم الإنسان (45 و46)، أما إذا تجاوزت عن حدها وخصوصا المعروفة بتأثيراتها السمية كالرصاص والكادميوم فأنها تسبب مشاكل صحية للإنسان (47) ، وفقا لهذه النتائج كانت محتويات بذور الحلبة من العناصر المعدنية النزرة منخفضة في الدراسة الحالية اقل من الحدود المسموح بها من قبل وزارة الصحة الألمانية في مشروع التوصية لحدود المعادن الثقيلة في المنتجات الطبية ذات الأصل النباتي والحيواني (48) وقد يعود سبب الانخفاض إلى عوامل كثيرة أثرت في محتوى بذور نبات الحلبة من هذه العناصر، إذ تعد بيئة النمو المصدر الرئيسي للعناصر المعدنية النزرة في النباتات كنوع التربة وظروفها ، الري والطقس ، حالة النضج للنبات و التسميد والمبيدات (49 و 50) وسوء الخزن والعرض بطريقة مكشوفة

يعرضها إلى الغبار ومصادر التلوث الأخرى ، إلا إن استعمالها بكميات قليلة قد لا يتعدى عدة غرامات مما يقلل من خطورتها على الإنسان ولكن يبقى الخطر من قابليتها للتراكم وعدم التحلل داخل الجسم (51).

جدول (2) تراكيز بعض العناصر المعدنية النزرة لمسحوق بذور الحلبةµg/g

العنصر	Pb	Fe	Zn	Cr	Cd
التركيز	1.7772	0.1836	0.1047	0.0049	0.0036

يوضح جدول (3) تأثير طريقة الاستخلاص المائي والكحولي لبذور نبات الحلبة على المحتوى الكلي للفينولات ،إذ أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقا معنوية بين طريقتي الاستخلاص المائي بالنقع والكحولي بالايثانول على المحتوى الكلي للفينولات . وقد تبين إن طريقة تحضير المستخلص المائي تؤثر في قيمة المركبات الفينولية إذ تزداد هذه المركبات عند تحضير المستخلص مائيا بطريقة النقع مقارنة مع طريقة الغليان ، إذ بلغت قيمة الفينولات الكلية 2.77 و2.32 mg\g لكلا الطريقتين على التوالي، واللذان تفوقا على قيم الفينولات الناتجة عن الاستخلاص الكحولي الذي كانت اعلي قيمة له للمستخلص الكحولي بالايثانول 0.78 mg\g واقل قيمة 0.62 mg\g للمستخلص الكحولي بالهكسان . وقد يعود سبب انخفاض المحتوى الكلي للفينولات في المستخلصات المحضرة كحوليا إلى نوع المذيب وقابليته على استخلاص المركبات الفعالة ، إما احتواء مستخلص بذور الحلبة المحضر بطريقة النقع على كمية اكبر من الفينولات مقارنة بالمستخلص المحضر بطريقة الغليان قد يكون ناتج عن تحطم قسم من هذه المركبات أثناء الغليان وتطاير الزيوت الطيارة وهذا مخالف لما حدث في طريقة النقع إذ احتوى المستخلص على اكبر كمية من المركبات الفينولية.

جدول (3) تأثير طريقة الاستخلاص لبذور الحلبة على المحتوى الكلي للفينولات (mg/g)

الاستخلاص المائي		الاستخلاص الكحولي		
نقع	غليان	ايثانول	كلوروفورم	هكسان
2.77	2.32	0.78	0.74	0.62

يبين جدول (4) النسب المئوية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحلبة ، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين طريقة الاستخلاص وبعض أنواع البكتريا المدروسة. إذ أعطت طريقة الاستخلاص المائي بالنقع والغليان أعلى نسب تثبيط لأغلب أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام إلا إن الاستخلاص المائي بالنقع كان واضح التأثير إذ بلغت أعلى نسبة تثبيط لـه 98.6 % ضد بكتريا*Pseudomonas aeruginosa* واقل نسبة تثبيط للاستخلاص المائي بالغليان بلغت 10 % ضد بكتريا*Staphylococcus aureus* وعند مقارنة هذه النتائج مع نتائج طريقة الاستخلاص الكحولي نجد أنها أعطت نسب تثبيط منخفضة عما هو عليه في الاستخلاص المائي إذ بلغت أعلى نسبة تثبيط للاستخلاص الكحولي بالايثانول 64 %ضد بكتريا *aeruginosa Pseudomonas* واقل نسبة تثبيط للاستخلاص الكحولي بالهكسان بلغت 29% ضد بكتريا *Bacillus subtilis* بينما لم يلاحظ أي تأثير للهكسان ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa*،أما بكتريا *Micrococcus roseus* فلم تتأثر بأي نوع من المستخلصات الكحولية الأانها أعطت نسبة تثبيط 7. 66 % للاستخلاص المائي بالنقع مقارنة بالاستخلاص المائي بطريقة الغليان والتي بلغت 57.1%، في حين لم تتأثر بكتريا *E coli* بأي من المستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحلبة . وقد يكون سبب التأثير القاتل للبكتريا ناتج عن عملية التنقيع بصورة كافية والتي حررت اكبر كمية من المواد الفعالة من فلافونويدات وقلويدات وكلايكوسيدات التي أعطت خصائص التثبيط. فقد أشار (52) الى إن بذور الحلبة المستخلصة بالطريقة المائية والكحولية قادرة على إظهار تثبيط واضح في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. إما (53) بين إن المستخلص الكحولي لبذور الحلبة لم يظهر أي تأثير تثبيطي على نمو البكتريا والخمائر . من النتائج أعلاه يمكن القول إن لمستخلصات بذور الحلبة المائية والكحولية تأثير فعال على نمو بعض أنواع البكتريا وذلك لان مستخلصات نبات الحلبة تحوي العديد من المركبات الفعالة التي لها تأثيرات في الأحياء المجهرية مثل مركبات Digonellin وTrigonelline و Cholineبالإضافة إلى البروتينات والسكريات المتمثلة بـMannogalactan وتحوي مركبات الصابونيات والقلويدات والفلافونويدات وغيرها التي وصلت إلى أكثر من 39 مركب من الأجزاء الطيارة بالإضافة إلى حامض النيكوتينيك (31).وبعض هذه المركبات تؤدي إلى اضطراب الجهد الكهربائي على جانبي الأغشية الحيوية للأحياء المجهرية الحساسة لها مما يؤدي إلى اضطراب وظيفتها وبالتالي موت الخلايا ، كما إن مركبات أخرى تؤثر في السلاسل التنفسية للخلايا مؤدية إلى توقف عمليات إنتاج الطاقة عبر الأغشية وبالتالي ظهور تأثيرها القاتل نحو الأحياء المجهرية (13).

جدول (4) نسب التثبيط (%) لبذور نبات الحلبة على بعض أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام

المستخلص	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Bacillus subtilis*	*Escherichia coli*	*Micrococcus roseus*
ايثانول	28.6	64	60	-	-
كلوروفورم	-	63	50	-	-
هكسان	-	-	29	-	-
نقع	50	98.6	83.3	-	66.7
غليان	10	82.5	40	-	57.1

العلامة (-) تشير الى انعدام التثبيط

المصادر

1- Shaprio,K.and Gong,W.C.(2002).Natural products used for diabetes.Journal of the American pharmaceutical Association,42:217-226.

2-Grower,J.K.; Yadav,S. and Vats, V. (2002).Medicinal plants of India with anti- diabetic potential.J.E thnopharmacol ,81:81-100.

3-Oubre A.Y.;Carlson,T.J.;Kindy,S.R.and Reaven,G.M.(1997).From plant to patient- an ethnomedical approach to the identification of new drugs to the treatment of NIDDM.Diabetologia,40:614-7.

4-Makai,S.;Balatincz,J.and pocza,V.(1999).Examinations on biology of germination of the fenugreek (Trigonella foenum- graecum L.) Acta Agronomica Ovariensis,41(1):27-34.

5- القباني ، صبري (1985). الغذاء لا الدواء .دار العلم للملايين، بيروت / لبنان .

6-Mansour,E.H. and El-Adawy,T.A.(1994). Nutritional potential and functional properties of heat-treated and germinated fenugreek seeds Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie,27(6):568-572.

7-Daglia,M.;Tarsi,R.;Papetti,A.;Grisoil,P.;Dacarro,C.;Pruzzo,C.and Gazzani,G.(2002).Antiadhesive effect of green and roasted coffee on streptococcus mutants Adhesive properties on saliva coated Hydroxyapatite Beads .Journal of Agricultural and Food Chemistry,50:1225-1229.

8-Han,Y.;Nishibe,S.;Noguchi,Y.and Jin,Z. F. (2001). lavonol glycosides from the stems of Tringonella foenum-graecum .Phytochemistry,58(4):577-580.

9-Khurana,S.K.; Krishnamoothy, V.; Parmar,V.S.; Sanduja,R. and Chawla,H .(1982).3,4,7-Trimethylcoumarin from *Tringonella foenum-graecum* steems.phytochemistry,21:2145-2146

10- Butler,L.G.,(1992). Ant nutritional effects of condensed and hydrolyte Sabletannins in Heming way,R.W.&Laks,P.E.(eds) plant polyphone, plenumpress,New York City,: 693-698.

11- Devasagayam,T.P.A. and Sanis ,K.B. (2002). Immune System and antioxidants, especially those derived from Indian medicinal plants .Indian J.Exper.Biol.,40:639-955.

12-Thomas, J.E.;Baus,S.K. and Acharya,S.N.(2006).Identification of Trigonella accessions which lack antimicrobial activity and are suitable for forage development .Dep.of Biological Sciences,Univer.of Leth bridge,Canada,: 727-732.

13- Cowan , M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. Clin. Microbial. Rev. 12:564-582.

14-Shetty ,K.,Asia Pac.J.Ctin.Nutr.(1997).21-79.

15-سعد، شكري أبراهيم (1985) . نباتات العقاقير والتوابل . الفكر العربي . القاهرة – مصر .

16-Blank, L.; Lin, J.; Devaud, S.; Fumeaux, R. and Fay, L. B.(1997). The principal flavor components of fenugreek (Trigonella foeum-graecum L.) .Spices flavor chemistry and antioxidant properties.Washington, DC (USA). American chemical Society, : 12- 28.

17-Naumann, C.A. and Bohrmann,H.(1993).Condiment.Makati,Metro Manila (Philippines). Bureau of patents,Trademarks,and Technology Transfer Library.1Feb. 19 leaves.

18-Devi,B.A.,Kamala-Kannan,N. and prince,P.S.(2003). Supplementation of fenugureek leaves to diabetic liver and Kidney. Phytother Res,17 110:1231-1233.

19-Gupta,A.; Gupta ,R. and Lal,B.(2001).Effect of Trigonella foenum- graecum (Fenugreek) seeds on glycogenic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus : Adouble blind placebo controlled study. JAPI,49:1057-1061.

20-Fetrow,C.W. and Avila,J.R. (1999).Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicines. Philadelphia: Springhouse, :250- 253.

21-Zia,T.;Siddiqu,I.A.and Hasnain,N.(2002).Nematicidal activity of Trigonella foenum- graecum L. Phytother Res.,15(6):538-540.

22-Langmead,L.;Dawson,C.;Hawkins,C.Banna,N.;Loo,S.andRampton, D.S.(2002).Antioxidant effects of herbal therapies used by patients with inflammatory bowel disease:an in vitro study. Aliment pharmacology,16(2):197-205.

23-Pandian,R.S.;Anuradha,C.V. and Viswanathan,P.(2002).Gastro protective effect of fenugreek seeds (Trigonella foenum-graecum) on experimental gastric ulcer in rats.J.Ethnopharmacol, 81(3):393-397.

24-Duham,W.(2001).U.S. researchers launch big prostate Cancer Study.Reuters.July.

25-Sur,P.; Das, M .; Gomes ,A .; Vedasiromonis ,J .R . ;Sahu , N. P. ; Banerjee,S.;Sharma,R.M. and Ganguly,D.K.(2001).Trigonella foenum-graecum (fenugreek) seed extract as antineoplastic agent. Phytother Res.,15(3):257-259.

26-الحسني، أيمن (1993) . أعشاب ونباتات في خدمة الجنس اللطيف 100 وصفة طبيعية لمتاعب المرأة الصحية والجمال . مكتبة ابن سينا للنشر والتوزيع والتصدير. القاهرة – مصر .

27-Bingel, A.S.and Farnsworth,N.R.(1994).Higher plants as potential sources of galactagogues,economic and medicinal plant research.Academic Press New York ,6:1-5.

28-Willard,T.(1991). The wild rose. Scientific Herbal.Calgary Alberta:Wild Rose College in Natural Healing,Ltd.,123:62-173.

29-Hale,T.(2002).Medications and mothers milk, 10th edition. Pharmacist Medical Publishing,:27 – 279.

30-Swafford,S. and Berens,B.(2000).Effect of fenugreek on breast milk production. ABM News and Views:Annual Meeting Abstracts ,6(3):11-13.

31-Evans, W.C.(1999). Treas and Evans pharmacognosy.4th ed. W.B. Saunders Comp.Ltd.London and Philadelphia.

32-A O A C (1990) .Official methods of analysis (15 edition).

33-Lasheen,Y.F.;Awwad,N.S.; EL-Kalafawy,A. and Abdel-Rassonl,A.A (2008)Annual effective dose and concentration levels of heavy metals in different types of tea in Egypt. Int.J.Phys.Sci.:112-119.

34-Alarcon-Aguilar, F.G.; Roman –Romos ,R.; Perez-Gutierrez,S.;Conteras -Weber ,C.C.and Flores-Saenz,J.(1997).Study of the antihyperglycemic effect of plants used as antidiabetics.J Ethnopharmacol ,39:119-128

35- Anesini,C.and Perez.(1993).Screening of plants used in Argentina folk medicine for antimicrobial activity J.Ethnopharmacol, 39:119-129.

36-Sakanaka,S.;Tachibana,W.and Okada,W.(2005).Preparation and antioxidant properties of extracts Japanse persimmon leaf tea (Kakinona- Che) Food Chem.,189:569-575.

37- Cowan ,S.T.and Steel ,K.G.(1975).Manual of the identification of medical bacteria .Cambridge Univ.Londn.

38-Holt,J.G.;Krieg,N.R.;Sneath,P.H.A.;Staley,J.T.and Williams,S.T.(eds.).(1994) . Bergey´s manual of Determinative Bacteriology,9th ed.,William and Wilkins company,Baltimor.U.S.A.

39-Asuzuiu.(1986).Pharmacological evaluation of folkore of sphenostylic slenocarpa. .J Ethnopharmacol ,16:236-237.

40-Elmadfa, I. (1975). Fenugreek (*Trigonella foenum- graecum)* protein Nahrung, 19(8):683-686.

41-الحميد ، سناء والياسين علي (2011) . تأثير مجروش بذور الحلبة والحبة السوداء في بعض الصفات النوعية لبيض دجاج المائدة مجلة ديالى للعلوم الزراعية . المجلد 3 العدد (2) ص 31- 48.

42-Abdalla, A.E. and Melton ,S.L. (1991). Lipids extracted from fenugreek seeds by different methods and seed composition. Mansoura–Journal – of Agricultural – Sciences (Egypt). Apr.,16(4) :850 -861.

43-Taylor, W .G .; Zulyniak ,H . J.; Richards ,K .W .;Acharya ,S .N.; Bittman,S.and Elder,J.L.(2002).Variation in diosgenin leveis among 10 accessions of fenugreek seeds produced in western Canada.J.Agric. Food Chem.50:5994-5997.

44- Ozcan, M.(2004).Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey Food Chemistry, 84:437-440.

45-Jakson,I.S. and Lee,K. (1988). Chemical forms of iron,Calcium,magnesium and Zinc in black oolong, green and instant black tea .J . Food Sci., 53 :181-184.

46-Marcos, A.;Fisher,A.;Ree,G. and Hill,S.J. (1996). Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geological origin of tea .J.Agric.Atom.Spect.,113:521-525.

47-Kumar,A.; Nair,A.G.C.; Reddy, A.V.R. and Garg,A.N.(2005). Availability of essential elements in Indian and US tea brands.Food Chem. ,89 :441-448.

48-Gaedcke,F. and Steinhoff, B.(2003). Herbal medicinal products, Medpharm GmbH Scientific publishers, :107,Stuttgart.

49-Seenivasan, S. ;Manikandan, N. ;Muraleedharan,N.N.; Selvaundaram, R. (2008). Heavy metal content of black teas from south India. Food control 19:746-749.

50-Hardisson,A.,Rubio, C., Baez, A., Martin, M.,Alvarez,R.,& Diaz,E.(2001). Mineral composition of the banana (Musa acuminate) from the island of Tenerife Food Chemistry,73:153-161.

51-الصابونجي ، أزهار علي والصابونجي ،عبد المجيد علي واليكسيف ،س.ف. وبيفوفاروف ، ي.ب. ويانوشايتس ، و.ي (2005) . "بيئة الإنسان " جامعة البصرة – البصرة –العراق .

52-Bhatti,M.A.;Khan,M.T.J.;Ahmed,B. and Jamshaid,M.(1996). Antimicrobial activity of Trigonella foenum- graecum seeds. Fitoterapia,67:372-374.

53- De,M.;De,A.K.and Banerjee, A.B.(1999). Antimicrobial screening of some Indian spices. Phytother.Res,13:616-618.