

## تقييم الفعالية الحافظة للخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا المزروع في سورية ضمن المعلقات الصيدلانية باستخدام اختبار التحدي

طالبة الماجستير: لبنى صلاح علي

قسم الكيمياء الصيدلانية والمراقبة الدوائية - كلية الصيدلة - جامعة حمص

الدكتور المشرف: أ.م.د يوسف الأحمد

قسم الكيمياء الصيدلانية والمراقبة الدوائية - كلية الصيدلة - جامعة حمص

الدكتور المساعد: د وسام زم

قسم الكيمياء التحليلية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة طرطوس

### ملخص البحث

يعد التلوث الميكروبي أحد المشاكل الرئيسية المرتبطة بالمستحضرات الصيدلانية السائلة، ولهذا السبب تضاف المواد الحافظة لضمان الجودة وإطالة عمر الاستخدام لهذه المستحضرات عن طريق تحسين ثباتها الميكروبي. ونظراً للتأثيرات الصحية الضارة للمواد الحافظة الصناعية وتطور آليات المقاومة الجرثومية تجاهها، كان لابد من البحث عن مصادر طبيعية بديلة تستخدم لحفظ المستحضرات السائلة.

أثبتت العديد من الدراسات المرجعية فعالية نبات الستيفيا المضادة للجراثيم والمضادة للفطور، لذلك تم تحضير خلاصة إيثانولية من أوراق نبات الستيفيا ودراسة التأثير المثبط للأحياء الدقيقة (المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، الإيشيريكية القولونية *Escherichia coli*، فطور المبيضات البيض *Candida albicans*) باستخدام طريقة الانتشار من الآغار، تم في هذه الدراسة أيضاً تحديد

التركيز المثبط الأدنى (MIC) للخلاصة الإيثانولية 70%. ومن تمّ إدخال هذه الخلاصة كبديل عن المواد الحافظة الصناعية في معلق للباراسيتامول، وتمّ تطبيق اختبار التحدي وفقاً لمستور الأدوية الأمريكي USP42 لتقييم فعالية الخلاصة المدروسة. أظهرت الخلاصة الإيثانولية 70% لنبات الستيفيا فعالية تثبيطية تجاه الأحياء الدقيقة المدروسة وبكل التراكيز وكانت أكثر فعالية تجاه المكورات العنقودية الذهبية. وتباينت قيم التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص تبعاً لاختلاف نوع الجراثيم حيث سُجلت أقل قيمة MIC ب 12.5 mg/ml لكل من المكورات العنقودية الذهبية فطور المبيضات البيض. وقد أظهرت نتائج اختبار التحدي أنه يمكن استخدام الخلاصة الإيثانولية 70% لنبات الستيفيا كبديل فعال عن المواد الحافظة الصناعية في المعلقات الصيدلانية.

**الكلمات المفتاحية:** الستيفيا-المواد الحافظة-معلق الباراسيتامول-اختبار التحدي

### **Evaluation of the preservative efficacy of ethanolic stevia extract planted in Syria in pharmaceutical suspensions using challenge test**

Microbial contamination is one of the major problems associated with liquid pharmaceutical preparations. Therefore, preservatives are added to enhance quality and prolong shelf-life of pharmaceutical formulations by improving their antimicrobial stability, but they are frequently associated with negative health consequences, and bacterial resistance to it. This growing awareness on these effects resulted on the search for

alternative sources. Several studies confirm antimicrobial and antifungal efficacy of stevia, So alcoholic extract was extracted for stevia leaves and the inhibitory activity of microorganisms isolates was selected (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* and *Candida albicans*) by using Well Diffution Method. In the present study, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the ethanolic extract was measured. Then we insert this extract in paracetamol suspension without adding preservative. We operate challenge test whereby USP42 pharmacopoeia to confirm the effectiveness of the studied extract. The ethanolic extract demonstrated inhibitory activity against all tested isolates at various concentrations, and the results of MIC demonstrated variability depending on the bacterial species, with the lowest MIC value recorded at 12.5 mg/ml, for *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Based on the criteria for product category 3 of the USP, suspensions of stevia extract demonstrated acceptable preservative activity against selected microorganisms, therefor we can use this extract as a natural preservative in pharmaceutical suspensions.

**KEY WORDS: Stevia–Preservatives–paracetamol suspension–challenge test.**

## 1. المقدمة

تستخدم المواد الحافظة في الصناعة الصيدلانية من أجل حفظ المستحضرات الصيدلانية من التلوث الميكروبيولوجي [1] وخاصة المستحضرات السائلة كالمعلقات الفموية لأنها تحتوي على الماء وهو الوسط المفضل لنمو الجراثيم والفطريات [2]، وتُعتبر بنزوات الصوديوم وميتيل بارابين وبروبيل بارابين من أهم المواد الحافظة الصناعية التي تستخدم في المستحضرات الصيدلانية السائلة، ولكن هناك قلق دائم من استخدام هذه المواد فقد أثبتت العديد من الدراسات أنّ للمواد الحافظة الصناعية تأثيرات جانبية عديدة أبرزها التفاعلات التحسسية وتوليد جذور الأوكسجين الحر الذي يعتبر أحد العوامل المؤهبة لمرض السرطان [3] [4].

وبسبب التكيف الجرثومي وظاهرة المقاومة الجرثومية من جهة، وزيادة وعي المستهلك وقلقه بشأن المواد الحافظة الصناعية من جهة أخرى، كان لابدّ من البحث عن بدائل فعالة لهذه المواد، فتم التوجه إلى المملكة النباتية كونها مصدر غني جداً بالعقاقير ولا سيما التي تمتلك فعالية مضادة للأحياء الدقيقة إذ ثبت أن المواد الطبيعية فعالة كمضادات للأحياء الدقيقة عند إضافتها مباشرة كمكونات في تركيبات الغذاء [5]، حيث تحتوي النباتات الطبية على أكثر من مادة فعالة تعمل مع بعضها بشكل متوازن لتعطي الفعالية المضادة للجراثيم وهذا ما لا نجده في المواد الحافظة الصناعية [6].

يعتبر نبات الستيفيا *Stevia Rebaudiana bertonii* الذي ينتمي إلى العائلة النجمية ذو أهمية اقتصادية وطبية كبيرة، وهو نبات عشبي معمر موطنه الأصلي البارغواي ودول أمريكا الجنوبية [7] [8]، ويعرف باسم الورق الحلو أو ورق العسل نظراً لحلاوته الشديدة التي تعود لوجود غليكوزيدات الستيفيول Steviol glycosides وأهمها الستيفيوزيد والريبوديوزيد A وتصل قدرتها المحلية إلى حوالي 300 ضعف القدرة المحلية للسكروروز [9]. ويعدّ نبات الستيفيا مصدراً للمركبات الفعالة (مثل الفينولات، الفلافونويدات، القلويدات، السكريات المتعددة، الأحماض الأمينية، الزيوت الأساسية، الدهون، البروتينات، السكريات الحرة والعناصر المعدنية) مع خصائص مضادة

للأحياء الدقيقة ومضادة للأكسدة [10]. كما أثبتت العديد من الدراسات أنّ مستخلصات الستيفيا لها خصائص علاجية مختلفة فهي مضادة لارتفاع سكر الدم، مضادة لارتفاع الضغط، مضادة للأورام، مضادة للالتهابات ومضادة للإسهال [11].

تحتوي النباتات على مجموعة متنوعة من المركبات بالتالي يجب اختيار المذيب المناسب لاستخلاصها، تنتمي مركبات التحلية الموجودة في الستيفيا إلى نوع Diterpenoid وهي ذات طبيعة غليكوزيدية، هذه المركبات لها سلوك قطبي في الطبيعة وبالتالي يتم استخلاصها باستعمال مذيبات قطبية مثل الإيثانول والميثانول [12].

درست الفعالية المضادة للجراثيم لأوراق نبات الستيفيا في العديد من الأبحاث، وقد شملت إحدى الدراسات العمل على عدة مستخلصات لأوراق الستيفيا (إيثانولية وميثانولية وكلوروفورمية ومائية) إضافة إلى استخدام مستخلصات إيثانولية ومائية وخلاتية لأزهار النبات، تُرس النشاط المضاد للميكروبات لتلك المستخلصات ضد عزلات جرثومية ممرضة على الجسم الحي وفي الزجاج، ولوحظ أنّ تلك المستخلصات أبدت نشاطاً جيداً كمضادات للجراثيم المختبرة كافةً، وقد تفوق المستخلص الإيثانولي لأوراق نبات الستيفيا على بقية المستخلصات من ناحية إعطائه لقطر تثبيط لنمو الزائفة الزنجارية بلغ 22 mm في حين كانت مقاومتها لأغلب الصادات الحيوية عالية [13].

كما وجد (2015) Kumari and Chandra أنّ مركبات الأيض الثانوي للستيفيا كان لها نشاط مضاد للأحياء الدقيقة في المختبر ضد البكتريا بما في ذلك *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, و *Pseudomonas fluorescense* [14]. ويبيّن Khiraoui and Guedira (2018) أن وجود مركبات *stevioside* و *Rebaudioside A* يمنع نمو كل من *Streptococcus mutans* و *Pseudomonase aeruginosa* و *Proteus vulgaris*. [15].

## 2. أهمية البحث

1. الاستفادة من المُستقلبات الطبيعية الثانوية لأوراق نبات الستيفيا، بوصفها مواد فعالة حيويًا وبدلياً للمواد الحافظة الصناعية في المستحضرات الصيدلانية
2. ازدياد البحث عن المواد الحافظة الطبيعية المشتقة من النباتات، في ظل زيادة وعي المستهلك وقلقه بشأن التأثيرات الضارة للمواد الحافظة الصناعية من ناحية، وظهور سلالات جرثومية مقاومة للصادات الحيوية من ناحية أخرى
3. زيادة السعي لزراعة وإكثار نبات الستيفيا في سورية، مما يعود بفائدة اقتصادية كبيرة آخذين بعين الاعتبار سهولة وقلة تكاليف زراعته

### 3. الهدف من البحث

1. دراسة فعالية الخلاصة الإيثانولية %70 لنبات الستيفيا المضادة للميكروبات تجاه المكورات العنقودية المذهبة والزائفة الزنجارية والإشريكية القولونية وفطور المبيضات البيض
2. تحديد التركيز الأدنى المثبط لنمو الجراثيم والفطور
3. متابعة أداء الخلاصة المدروسة في صيغة معلق صيدلاني محضر مخبرياً باستخدام اختبار التحدي.

### 4. المواد وطرائق العمل:

-المواد:

- ماء مقطر Distilled water
- إيثانول (Eurolab, UK) Ethanol
- وسط موللر هينتون آغار (HiMedia, India) Mueller Hinton Agar

- وسط دكستروز البطاطا (HiMedia, India) Potato Dextrose Agar
- محلول ثنائي ميثيل سلفوكسيد (Roth, Germany) DMSO
- باراسيتامول (بنقاوة %99.70 مقدم من معمل هيومن للصناعات الدوائية)
- صمغ الكثيراء (Sigma-Aldrich، ألمانيا)
- سيترات الصوديوم (Sigma-Aldrich، ألمانيا)
- لوريل سلفات الصوديوم (BASF، ألمانيا)
- منكه الفانيللا

-السلالات الجرثومية المستخدمة: (تمّ الحصول عليها من كلية الصيدلة\_ جامعة حمص)

- Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) كمثال عن الجراثيم إيجابية الغرام
- Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) كمثال عن الجراثيم سلبية الغرام
- Escherichia coli* (ATCC 8739) كمثال عن لجراثيم سلبية الغرام
- Candida albicans* (ATCC 10231) كمثال عن الفطور

-الأجهزة المستخدمة في البحث:

- ميزان حساس (Sartorius TE214, Germany)
- جهاز المبخر الدوار (Heidolph Instruments, Switzerland)
- جهاز قياس الطيف الضوئي (Shimaduz, Japan) Spectrophotometer
- حاضنة جرثومية (Mammert, Germany) Incubator
- الصاد الموحد (JSR-JSAK-100) Autoclave
- طاحونة كهربائية Waring blender

-الأدوات المستخدمة:

- عبوات عقيمة وماسحات قطنية عقيمة وأطباق بترى وملقط.
- أنابيب سعة 1.5 ml وأنابيب سعة 15 ml.
- ورق ترشيح وورق بارافيلم
- صفائح مكروية وميكروبيبت
- أدوات زجاجية مخبرية (أرلينات، بياشر، دوارق حجمية)

-الطرائق:

جمع النبات:

جُمعت أوراق نبات الستيفيا من مدينة بانياس في محافظة طرطوس، في فصل الربيع وخلال ساعات الصباح الباكر مع مراعاة كون النبات كامل النمو، نُظفت الأوراق وجُففت في الظل حتى الجفاف التام، ثم طُحنت باستعمال طاحونة مختبرية، وحفظ المسحوق في أكياس محكمة الإغلاق في درجة حرارة التلاجة لحين إجراء الاختبارات [16] ويوضح الشكل (1) نبات الستيفيا قيد الدراسة



الشكل (1): نبات الستيفيا قيد الدراسة

### تحضير الخلاصة النباتية:

استخلص 30 g من مسحوق الأوراق الجافة لنبات الستيفيا باستخدام 300 ml من الإيثانول 70% بالتعطين وذلك حسب طريقة المرجع [17]، حيث خضعت الخلاصة للتعطين بدرجة حرارة الغرفة لمدة ثلاثة أيام، وبعدها جرى الترشيح باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman (No.4) ومن ثم تم تركيز الخلاصة باستخدام جهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 50 C<sup>o</sup>، وتم الاحتفاظ بالخلاصة في البراد لحين الاستخدام.

ونحسب مردود الاستخلاص بالمعادلة التالية: [18]

$$R\% = \left( \frac{\text{وزن المستخلص}}{\text{وزن النبات}} \right) \times 100$$

### تحضير أوساط الزرع الجرثومية والفطرية:

#### وسط موللر-هينتون آغار (MHA) Mueller Hinton Agar للجراثيم:

يتم وزن الكمية المطلوبة والمسجلة على العبوة 48 gr من الوسط وتعلق في 1000 ml من الماء المقطر مع التحريك المستمر، يعقم الوسط الزرعى بالصاد الموصل بدرجة حرارة 121C<sup>o</sup> لمدة 15 دقيقة. يترك لتصبح حرارته أقل من 40 درجة مئوية، ثم يصب في أطباق بتري قياس 9 cm بسماكة 3 mm، يترك حتى يجمد ويوضع الطبق بوضعية معاكسة.

#### وسط دكستروز البطاطا (PDA) Potato Dextrose Agar:

تقييم الفعالية الحافظة للخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا المزروع في سورية ضمن المعلقات الصيدلانية باستخدام اختبار التحدي

يتم وزن الكمية المطلوبة والمسجلة على العبوة 39 gr م الوسط وتعلق في 1000 ml من الماء المقطر، يعقم الوسط الزراعي بالصاد الموصد بدرجة حرارة  $121^{\circ}\text{C}$  لمدة 15 دقيقة. يترك لتصبح حرارته أقل من 40 درجة مئوية، ثم يصب في أطباق بتري قياس 9 cm بسماكة 3 mm تترك الأطباق حتى تجمد ثم توضع بوضعية معاكسة.

دراسة الفعالية المضادة للجراثيم والفطور:

تم اتباع طريقة الانتشار في حفر الآغار Well Diffusion Method وذلك حسب المرجع [19]. حيث تم في البداية تحضير تركيزين من الخلاصة النباتية عن طريق القيام بحل 100 mg من الخلاصة الجافة ب 1 ml من محل 10% DMSO، ومن ثم عمل تمديد آخر ب 1 ml من المحل، أي أن التراكيز التي تمت دراستها هي (50-100 mg/ml). حصر المعلق الجرثومي وفقاً لمعياري عكره 0.5 ماكفرلاند لتكون الامتصاصية عند الطول الموجي 625 nm ضمن المجال [0.8-1.6]، فرش المعلق الجرثومي على كل الطبق بواسطة ماسحة قطنية، ثم أحدثت ثلاثة آبار باستخدام ثاقبة معقمة، وتم ووضعت في الآبار ما يلي {1-خلاصة الستيفيا بتركيز 50 mg/ml، 2-خلاصة الستيفيا بتركيز 100 mg/ml، 3-شاهد سلبي وهو المحل المستخدم لحل الخلاصة 10% DMSO، بالإضافة إلى استخدام شاهد إيجابي حيث تم استخدام صا حيوي حسب نوع الجرثوم Linzolid, , Gentamicin, Amikacin لكل من المكورات العنقودية المذهبة، الزائفة الزنجارية، الاشريكية القولونية على التوالي، لم تتمكن من الحصول على شاهد إيجابي للفطور}.

تم الحضان بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  لمدة 24 ساعة بالنسبة للجراثيم وبدرجة حرارة  $25^{\circ}\text{C}$  بالنسبة للفطور، ومن ثم تم قياس أقطار التنشيط المتشكل حول الآبار لمعرفة قدرة المستخلص المحضر على تنشيط نمو الجراثيم والفطور.

### تحديد التركيز المثبط الأدنى للخلاصة MIC:

تم اعتماد طريقة Broth Dilution method المذكورة في المرجع [20] لتحديد ال MIC، حيث تم استخدام عدة تراكيز من الخلاصة الإيثانولية 70% لأوراق نبات الستيفيا وهي (12.5, 25, 50, 100, 200 mg/ml)، وبعد أول تركيز لم يظهر فيه النمو الجرثومي أو الفطري هو التركيز المثبط الأدنى.

### تحضير معلق الباراسيتامول:

تم تحضير معلق الباراسيتامول بجرعة 125 ملغ/5مل بالاعتماد على طريقة Venkateswarlu, Chnadrsekhar and Ramachandra المذكورة في المرجع [21]، حيث نمزج Sodium Lauryl Sulphat مع sodium citrate لمدة دقيقتين، ثم نضيف للمزيج كمية من الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا (7.5%) وكمية كافية من المنكه، وبعدها يضاف الصمغ وتمزج جيداً، ثم تضاف بودرة الباراسيتامول إلى المزيج ويمزج جيداً لمدة ثلاث دقائق، وأخيراً تضاف كمية كافية من الماء بالتدرج ومع التحريك حتى يتشكل المعلق. وتظهر مكونات المعلق المحضر في الجدول (1)

الجدول (1): مكونات المعلق المحضر

المادة	% التركيز (W/V)
Paracetamol	2.5
Tragacanth gum	0.6
Sodium benzoate	0.5
Sodium citrate	0.5
Sodium Lauryl Sulphat	0.02
Stevia extract	7.5
Vanilla flavour	0.5

### اختبار التحدي:

تم إجراء اختبار التحدي بالاعتماد على دستور الأدوية الأمريكي USP 42 [22] حيث تم تحضير معلقات الميكروبات التي ينصح باستخدامها لدراسة فعالية المادة الحافظة وهي المكورات العنقودية الذهبية، *Staphylococcus aureus*، الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، والإيشيريكية القولونية *Escherichia coli* وفطور المبيضات البيض *Candida albicans*، وتم ضبط امتصاصية معلق الميكروبات عند قيمة تتراوح بين (0.08-0.1) عند الطول الموجي 625 nm باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر [23]، وهذا يتطابق مع عكارة ماكفرلاند (0.5 McFarland) ومن ثم قمنا بتحضير سلسلة تمديدات من المعلق الجرثومي الناتج حتى الوصول إلى معلق تركيزه  $10^6$  CFU/ml، يؤخذ 0.1 ml من المعلق الجرثومي الأخير ويوضع في وعاء يحوي 9.9 ml من المعلق الدوائي الحاوي على خلاصة الستيفيا كمادة حافظة، ويتم حضن العينات بدرجة حرارة الصيدلية ( $22 \pm 2$  C°)، وخلال الفترات الزمنية المحددة في دستور الأدوية الأمريكي USP 42 (وهي 6-3-0 ساعة و 28-14-1 يوم) تؤخذ العينات من العبوات ويتم حساب عدد الميكروبات من القانون

$$Cfu/ml = cfu\plate \times dilution\ factor \times 1\aliquot$$

CFU/ml: تعداد المزارع الجرثومية في 1 ml

dilution factor: عامل التمديد

Cfu\plate: تعداد المزارع الجرثومية النامية في الطبق

Aliquot: حجم الزرعة المأخوذة

## 5. النتائج والمناقشة:

### نتائج الخلاصة الإيثانولية 70% لأوراق نبات الستيفيا:

تم الحصول على الخلاصة الإيثانولية 70%، ويوضح الجدول 1 شكل الخلاصة ومردودها

#### الجدول 2: نتائج الخلاصة الإيثانولية 70% لنبات الستيفيا

نوع الخلاصة	القوام	اللون	القابلية على الالتصاق	المردود
إيثانولية	شبه صلب	زيتي داكن	ملتصقة	2,85

### الفعالية الحيوية للخلاصة الإيثانولية 70% لنبات الستيفيا:

درس تأثير المستخلص الإيثانولي لأوراق نبات الستيفيا على نمو الزائفة الزنجارية، الإشريكية القولونية، المكورات العنقودية الذهبية وفطور المبيضات البيض قيد الدراسة.

بعد حضن الأطباق ليلة كاملة بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  بالنسبة للجراثيم و  $25^{\circ}\text{C}$  بالنسبة للفطور، كانت النتائج كما هو موضح في الجدول (2) التي تبين تأثير خلاصة الستيفيا على الميكروبات المدروسة.

أظهرت نتائج الخلاصة المحضرة أن أعلى متوسط قطر تثبيط نمو كان 25 mm للمكورات العنقودية الذهبية عند التركيز 100 mg/ml، وكانت النتيجة قريبة من قطر تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية بفعل المضاد الحيوي المستخدم كشاهد إيجابي وهذه النتيجة توافق ما ورد في دراسة حميدة وآخرون (2019) من حيث فعالية الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا في تثبيط نمو المكورات العنقودية الذهبية [24]. بلغ متوسط أقطار تثبيط نمو الزائفة الزنجارية 10mm و 19mm عند التراكيز 50 mg/ml و 100 mg/ml من الخلاصة الإيثانولية على التوالي. في حين بلغ متوسط هالات أقطار تثبيط الإشريكية القولونية 9mm و 15mm عند التراكيز 50

تقييم الفعالية الحافظة للخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا المزروع في سورية ضمن المعلقات الصيدلانية باستخدام اختبار التحدي

mg/ml و 100 mg/ml على التوالي، أما بالنسبة لفظور المبيضات البيض فقد كان متوسط حالات أقطار التثبيط 5mm و 11mm عند التراكيز 50 mg/ml و 100 mg/ml على التوالي. أي أن الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا كانت فعالة تجاه جميع الأحياء المدروسة، كما نلاحظ أن قطر التثبيط ازداد بازدياد التركيز المستخدم من الخلاصة وهذا يتوافق مع دراسة أجريت من قبل أحمد وآخرون (2023) [25]. وهذا يؤكد أهمية استعمال نبات الستيفيا السورية كمادة حافظة ومضادة للأحياء الدقيقة.

**الجدول 3:** معدل أقطار تثبيط نمو الجراثيم العائدة إلى المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية والمبيضات البيض بتأثير المستخلص الإيثانولي لأوراق نبات الستيفيا مقاسة بالمليمتر

الخلاصة الإيثانولية (Mm)		DMSO (mm)	الشاهد الإيجابي (mm)	
100 mg/ml	50 mg/ml			
25	20	-	27	<i>Staph.au</i>
15	9	-	18	<i>E.coli</i>
19	10	-	20	<i>P.aur</i>
11	5	-	-	<i>C.alb</i>

نستنتج مما سبق أنّ الخلاصة الإيثانولية 70% لنبات الستيفيا تحوي مركبات فعالة ذات قدرة واضحة على تثبيط نمو الميكروبات المدروسة، فهي تحتوي على غليكوزيدات الستيفيول، التانينات، الفلافونويدات والزيوت الأساسية، كما تحتوي على الفينولات وهي مركبات معروفة بخصائصها المضادة للجراثيم بآليات مختلفة أهمها تخريب الجدار الخلوي للجراثيم وتغيير طبيعة البروتينات للخلية الجرثومية [26]. فقد أثبتت عدة دراسات فعالية المواد الطبيعية الموجودة في النبات كمضادات للأحياء الدقيقة ووجد أن استعمال هذه المواد يؤدي إلى منع أو إبطاء تكاثر الجراثيم وإطالة عمر التخزين للأغذية والمستحضرات الصيدلانية [27] [28].

### نتائج التركيز المثبط الأدنى:

يبين الجدول 3 قيم التركيز المثبط الأدنى MIC لتأثير المستخلص الإيثانولي على الميكروبات قيد الدراسة، حيث أعطت الخلاصة الإيثانولية 70% أعلى قيم MIC تجاه الزائفة الزنجارية بعد إعادة التجربة ثلاث مرات وأخذ المتوسط الحسابي، وكان أقل MIC للخلاصة الإيثانولية 70% لنبات الستيفيا تجاه كل من المكورات العنقودية الذهبية وفطور المبيضات البيض بتركيز 12.5 mg/ml، في حين كان أكبر MIC للخلاصة الإيثانولية 70% تجاه الزائفة الزنجارية بتركيز 50 mg/ml.

### الجدول 4: نتائج ال MIC للميكروبات المدروسة

	MIC (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
<i>Candida albicans</i>	12.5

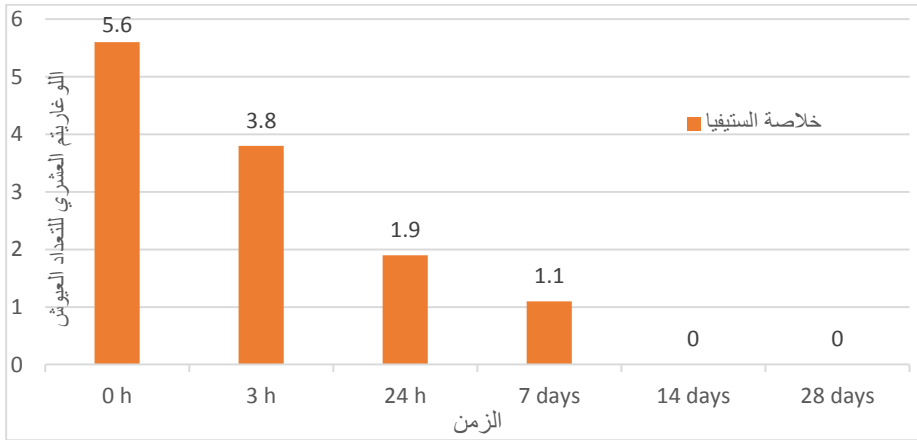
### نتائج اختبار التحدي:

تقييم الفعالية الحافظة للخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا المزروع في سورية ضمن المعلقات الصيدلانية باستخدام اختبار التحدي

بعد تحديد عدد المستعمرات في الأطباق، تمّ حساب اللوغاريتم العشري للتعاد العيوش للسلاطات الميكروبية المدروسة، ومن ثمّ حساب التناقص في اللوغاريتم بعد كل فاصل زمني ومقارنتها مع الدستور

### المكورات العنقودية الذهبية:

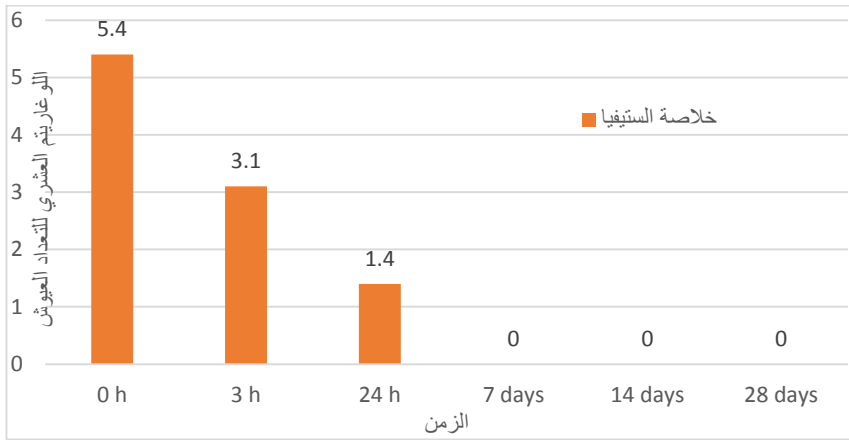
أظهرت نتائج اختبار التحدي على معلق الباراسيتامول الحاوي على الستيفيا أنّ هناك تناقصاً في عدد الخلايا القادرة على الحياة ضمن المعلق المدروس بشكل كبير خلال الساعات الأولى من الحضانة حيث حدث تناقص في قيم اللوغاريتم العشري للتعاد العيوش للمكورات العنقودية الذهبية بمقدار  $4 \log$  بعد 24 ساعة مقارنةً بالتعداد البدئي، ويصل العدد إلى الصفر (عدم النمو) في اليوم الرابع عشر، أي أن تركيز المعلق الجرثومي المضاف انخفض بما لا يقل عن درجة لوغاريتمية واحدة خلال 14 يوم، ولم تحصل زيادة في تركيز المعلق الميكروبي حتى إتمام 28 يوم حضانة، وهذا يوافق شرط دستور الأدوية الأمريكي وبالتالي النتيجة مقبولة كما هو موضح في الشكل (2)



**المخطط 1:** قيم تناقص اللوغاريتم العشري للتعاد العيوش للمكورات العنقودية الذهبية بعد الفواصل الزمنية الدستورية

### الزائفة الزنجارية:

لم تبدي الزائفة الزنجارية مقاومة للقتل بفعل خلاصة الستيفيا المستخدمة كمادة حافظة حيث لوحظ التناقص المباشر في عدد الخلايا القادرة على الحياة بعد الحضان، وكان التناقص في قيم اللوغاريتم العشري للتعداد العيوش للسلالة البكتيرية بمقدار  $\log 2$  بعد 3 ساعات مقارنةً بالتعداد البدئي، ووصل عدد الجراثيم إلى الصفر في اليوم السابع من الحضان، ولم تحصل زيادة في تركيز المعلق الميكروبي حتى إتمام 28 يوم حضان. وهذا يوافق شرط أن تنخفض الجراثيم بقدر  $\log 2$  في اليوم الرابع عشر على الأقل، وألا تحدث زيادة من اليوم 14 وحتى اليوم 28، وبالتالي فإن النتيجة مقبولة حسب دستور الأدوية الأمريكي، كما هو موضح في الشكل (3):



**المخطط 2:** قيم تناقص اللوغاريتم العشري للتعداد العيوش للزائفة الزنجارية بعد الفواصل الزمنية الدستورية

### الإشريكية القولونية:

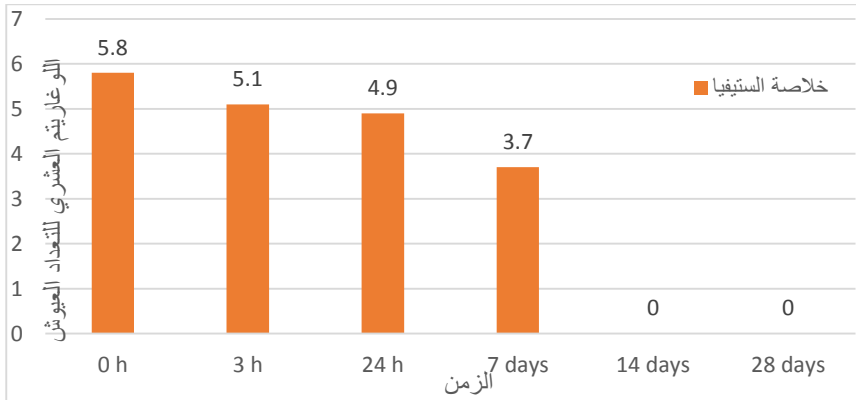
لم تبدِ الإشريكية القولونية أيضاً أي مقاومة للقتل بفعل الخلاصة الإيثانولية 70% للستيفيا، حيث أنّ تركيز المعلق الجرثومي انخفض بمقدار 4 درجات لوغاريتمية تقريباً بعد 24 ساعة، ونلاحظ غياب تام للإشريكية القولونية بعد مرور 7 أيام ولم تحصل زيادة في تركيز المعلق الميكروبي حتى إتمام 28 يوم حضان، وهذا يوافق شرط أن تتخفض الجراثيم بقدر  $2 \log$  في اليوم الرابع عشر على الأقل، وألا تحدث زيادة من اليوم 14 وحتى اليوم 28، وبالتالي فإنّ النتيجة مقبولة حسب دستور الأدوية الأمريكي، كما هو موضح في الشكل (4):



**المخطط 3:** قيم تناقص اللوغاريتم العشري للتعداد العيوش للإشريكية القولونية بعد الفواصل الزمنية الدستورية

### المبيضات البيض:

يبين الشكل (5) أنّ المعلق لم يبدِ فعالية واضحة في الساعات الثلاثة الأولى، ولكن بدأت المبيضات البيض بالتناقص خلال 24 ساعة، واستمر التناقص في عدد الخلايا القادرة على الحياة من المبيضات البيض بشكل ملحوظ بعد مضي 7 أيام، ولاحظنا غياب تام لفتور المبيضات البيض بعد مضي 14 يوم. ولم يلاحظ أي نمو في اليوم 28، بالمقارنة مع شرط القبول لفعالية المادة الحافظة بأن لا يحدث زيادة عن التعداد العيوش البدئي في الأيام 14 و28 فإنّ هذه النتيجة مقبولة حسب دستور الأدوية الأمريكي.



**المخطط 4:** قيم تناقص اللوغاريتم العشري للتعداد العيوش للمبيضات البيض بعد الفواصل الزمنية الدستورية

حسب دستور الأدوية الأمريكي 42 لكي تكون المادة الحافظة فعالة ضد الجراثيم المختبرة يجب أن يحصل نقص بمعدل درجة لوغاريتمية واحدة على الأقل بعد 14 يوم حضن، وألاً يزداد العدد

بعد مرور 28 يوم حضن. أما بالنسبة للفطور يجب ألا يزداد العدد البدئي (عند الزمن صفر) بعد 14 و 28 يوم من الحضن [29].

وفقاً لذلك، نلاحظ أن معلق الباراسيتامول المحضر والحاوي على الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا كمادة حافظة كان موافقاً لمتطلبات دستور الأدوية الأمريكي USP 42 حيث أظهر المعلق تناقصاً واضحاً بنسبة الجراثيم ولم يزداد العدد بعد حضن 28 يوم. أما في حالة الفطور فلم يحصل زيادة في التركيز البدئي (عند الزمن صفر) بعد مرور 7 و 14 و 28 يوم حضن. ومنه نجد أنّ الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا المستخدمة ضمن التركيز المستخدم كانت مطابقة لشرط اختبار التحدي بالنسبة للجراثيم والفطور المدروسة وبالتالي يمكن استخدام هذه الخلاصة كمادة حافظة في المعلقات الصيدلانية.

## 6. الاستنتاجات:

- أبدت الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا فعالية واضحة في تثبيط نمو الجراثيم والفطور المدروسة وازدادت الفعالية التثبيطية للخلاصة بازدياد تركيزها، وكانت الخلاصة أكثر فعالية على الجراثيم إيجابية الغرام منها على الجراثيم سلبية الغرام.
- أقل قيمة MIC للخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا كانت لكل من المكورات العنقودية الذهبية وفطور المبيضات البيض وذلك بتركيز 12.5 mg/ml.
- أظهرت نتائج اختبار التحدي أنه يمكن استخدام الخلاصة الإيثانولية لنبات الستيفيا كبديل فعال عن المواد الحافظة الصناعية في المعلقات الصيدلانية.

## 7. التوصيات:

- دراسة فعالية أوراق نبات الستيفيا على الخمائر وعلى سلالات جرثومية أخرى
- محاولة عزل المكونات الفعالة من نبات الستيفيا وتحديد بنيتها
- تحضير أشكال صيدلانية أخرى تحتوي على خلاصة نبات الستيفيا كمادة حافظة مثل الكريما والإيمولجل.
- الحث على زراعة نبات الستيفيا في سورية نظراً لاحتياجاته المائية القليلة وفوائده التغذوية والصحية والدعوة إلى زيادة الدراسات حوله وعمل برامج تثقيفية للتوعية بأهمية نبات الستيفيا

1. Almhemed, M. ALAHMAD, Y. (2023). Evaluation of the preservative efficacy of chamomile and rosemary extracts in skin preparations using challenge tests, HOMS university, 35(3).
2. Hunlon, g. Hodges, n. (2013). Eessential Microbiological For Pharmacy And Pharmaceutical Science, Jone Wily and Sons.
3. ABDEL-AZI, SM. AERON, A. KAHIL, TA. (2016). Health benefits and possible risks of herbal medicine. In: Microbes in Food and Health, Switzerland: Springer International Publishing. 98p.
4. ILSO, BG. BAHNA, SL. (2005). Adverse reactions of food additives. Asthma Immunol, 95: 499 – 507.
5. Pina-Pérez, M. C. Rivas, A. Martínez, A. and Rodrigo, D. (2018). Effect of thermal treatment, microwave, and pulsed electric field processing on the 147 antimicrobial potential of açai (*Euterpe oleracea*), stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), and ginseng (*Panax quinquefolius* L.) extracts. Food control. 90: 98-104.
6. Nasim, N. Sandeep, IS. Mohanty, S. (2022). Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. The Nucleus. 65(3):399-411.
7. Ranjan. R, Jaiswal. J, and Jena. J. 2011- Stevia as a natural sweetener, International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, 1(4): 1199-1202.

8. Brandle, J. Starratt, A. Gijzen, M. (1998). Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological and chemical properties, Can J Plant Sci. 78:527–536.
9. Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., Tripathi, P., & Rai, G. (2016). Stevioside and rebaudioside a – Predominant ent–kaurene diterpene glycosides of therapeutic potential: A review. In Czech Journal of Food Sciences (Vol. 34, Issue 4, pp. 281–299). Czech Academy of Agricultural Sciences.
10. Criado, M. N. Barba, F. J. Frígola, A. and Rodrigo, D. (2014). Effect of Stevia rebaudiana on oxidative enzyme activity and its correlation with antioxidant capacity and bioactive compounds. Food and bioprocess technology, 7(5): 1518–1525.
11. Ferrazzano, G. F. Cantile, T. Alcidi, B. Coda, M. Ingenito, A. Zarrelli, A. and Pollio, A. (2016). Is Stevia rebaudiana Bertoni a noncariogenic sweetener? A review. Molecules, 21(1): 38.
12. Erkucuk, A. Akgun, I. H. and Yesil Celiktas, O. (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of glycosides from Stevia rebaudiana leaves: Identification and optimization. The Journal of Supercritical Fluids, 51(1): 29–35.
13. Preethi, D. (2011). Studies on Antibacterial Activity, Phytochemical Analysis of Stevia rebaudiana (Bert.) – An Important Calorie Free Biosweetner. J Ecobiotechnology.

14. Kumari, M. and Chandra, S. (2015). Stevioside glycosides from in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* and antimicrobial assay. Brazilian Journal of Botany, 38(4): 761–770.
15. Khiraoui, A. and Guedira, T. (2018). Effect of *Stevia rebaudiana*, sucrose and aspartame on human health: A comprehensive. J Med Plants Res, 6(1): 102– 108.
16. Subudhi, E., Nayak, S., & Ghosh, S. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia Rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens  
Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni Regular  
International Journal of Integrative Biology A journal for biology beyond borders  
Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *Article in International Journal of Integrative Biology*.
17. Seidel, V. (2012). Initial and bulk extraction of natural products isolation, Methods Mol Biol, 864:27–41.
18. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray–Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies, 331:372–379.
19. Sahm, D.F. Washington, J.A. (1990). Antibacterial susceptibility Test Dilutions Methods: In: Manuals of Clinical Microbiology, Lennette, E. H. 5th Edition, 1105–1116.

20. Ghosh, S. Subudhi, E. Nayak, S. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. International Journal of Integrative Biology, 2(1), 27–31.
21. Venkateswarlu, K. Chnadraseshar, KB. Ramachandra, R. (2016). Development and in-vitro evaluation of reconstitutable suspension of flucloxacillin. Marmara Pharmaceutical Journal, 20 (3): 280–28.
22. United States Pharmacopeial Convention, Council of Experts and its Expert Committees. The United States Pharmacopeia: The National Formulary USP41 NF36. Rockville, Md.;2018.
23. Rajab, R. ALAHMAD, Y. (2022). Evaluation of Technological and Microbiological Quality Aspects for Ophthalmic Tobramycin Preparations according to Editions of Different Pharmacopeias. – A Comparative Study HOMS university, 44(8).
24. Al-hamdani, m., & al. (2019). Evaluation of inhibitory efficiency of stevia's extract in microorganisms that cause food spoilage. In Fayoum J. Agric. 33(1).
25. Ahmed, M. I., & Mazin, H. (n.d.). *Phytochemical Screening and Antibacterial Effect of Stevia Rebaudiana (Bertoni) Alcoholic Leaves Extract on Streptococcus Oralis (Dental Plaque's Primary Colonizer)*. www.jrmds.in
26. Chandna, S. Thakur, NS. Reddy, YN. Kaur, R. Bhaumik, J. Engineering Lignin Stabilized Bimetallic Nanocomplexes: Structure, Mechanistic Elucidation, Antioxidant, and Antimicrobial Potential. ACS Biomater Sci Eng.
27. Rasooli, I. (2007). Food preservation–A biopreservative approach. Food, 1(2): 111–136.

28. Ferrer, M. Soliveri, J. Plou, F. J. López-Cortés, N. Reyes-Duarte, D. Christensen, M. Copa-Patiño, J. L. and Ballesteros, A. (2005). Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* 132 and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. Enzyme and Microbial Technology, 36(4): 391–398.
29. United States Pharmacopeia (USP). 2003. Microbiological examination of nonsterile products: Tests for specified microorganisms. *Pharm Forum*, 29(5): 1722–1733.