

تحري وجود السيلدينافيل في بعض المستحضرات النباتية المقوية جنسياً المسوقة محلياً باستخدام الـ TLC وتقانة الـ HPLC

د. هلا بركات*

سيمون اسكيف**

(تاريخ الإيداع 6 / 4 / 2021. قُبِلَ للنشر في 9 / 6 / 2021)

□ ملخص □

تهدف هذه الدراسة إلى التحري عن السيلدينافيل في بعض المستحضرات النباتية المقوية جنسياً المسوقة محلياً أو المستوردة أو المهربة باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وتقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء. لذا قُمنَا بدراسة 10 عينات مُصنعة محلياً، ومُستوردة، ومُهربة من المستحضرات العشبية المقوية جنسياً المُنتشرة في السوق السورية، وأُجري لها اختبار التغليف ولصاقات التوسيم، ثم حُللت كروماتوغرافياً للتحري عن وجود السيلدينافيل فيها. فُحصت العينات باستخدام TLC مع طور متحرك ميثانول: إيثيل أسيتات (2:1)، والـ HPLC باستخدام عمود (C18, 10 μm, 125*4 mm)، وطور متحرك ميثانول: ماء (35:65)، ومعدل تدفق 1.5 مل/دقيقة، وتم الكشف عند طول موجة 240 نانومتر. أظهر فحص التغليف أن جميع العينات المُصنعة محلياً مُطابقة لإرشادات WHO، بينما خالفت التوصيات العينة المُهربة، وعينة واحدة مُستوردة. وأظهر التحليل الكروماتوغرافي وجود السيلدينافيل في عينة واحدة من العينات المدروسة بكمية (12.754) ملغ/الكبسولة وهي العينة P المُهربة.

الكلمات المفتاحية: السيلدينافيل، المستحضرات النباتية المقوية جنسياً، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، التدليس الدوائي.

* مدرسة - قسم الكيمياء الصيدلية و المراقبة الدوائية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

** طالب ماجستير - قسم الكيمياء الصيدلية و المراقبة الدوائية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

Determination of Sildenafil in herbal aphrodisiac products available in local market by TLC and HPLC

Dr. Hala Barakat*
Simon Skef**

(Received 6 / 4 / 2021. Accepted 9 / 6 / 2021)

□ ABSTRACT □

The study aims to detect sildenafil in some herbal aphrodisiac products available in Syrian market from different sources. Therefore, we studied 10 samples of herbal aphrodisiac preparations available in Syrian market. packaging and labelling test applied to all samples, then, these samples were analyzed chromatographically to detect sildenafil. Samples were examined using TLC methanol/ethyl acetate (2: 1). Then, HPLC analysis was conducted, using a column (C18, 10 µm, 125 * 4 mm), mobile phase: methanol/water (35:65), flow: 1.5 ml/min, UV detection: 240 nm. Packaging test revealed that all of the locally manufactured samples matching to WHO guidelines, while the illegal sample and one of the imported samples violated the recommendations. The chromatographic analysis confirmed the presence of Sildenafil in one of the tested samples, with an amount of (12.754) mg/capsule.

Key Words: Sildenafil, herbal aphrodisiac products, TLC, HPLC, Adulteration.

* Assistant Professor in Pharmaceutical Chemistry and Drug Design Department, Faculty of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.

** Postgraduate Student, Pharmaceutical Chemistry and Drug Design Department, Faculty of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة:

تُعد المستحضرات العشبية المقوية جنسياً من أكثر منتجات الطب البديل انتشاراً في السوق العالمية والمحلية، كونها تُمثل خياراً آمناً لمشكلة الضعف الجنسي لدى الرجال. إلا أن ظاهرة التدليس الدوائي التي تتعرض لها هذه المستحضرات جعلت منها مشكلة صحية خطيرة تُهدد الدول التي تغيب فيها القوانين الناظمة لعمليات تصنيع وتسويق هذه المستحضرات (Tuker *et al.*, 2018).

يشهد العالم اليوم اهتماماً متزايداً بالمستحضرات النباتية في الدول النامية والمتقدمة على حد سواء. فقد وصلت نسبة مستخدميها إلى 80% من المرضى حول العالم، كما حظيت باهتمام كبير من المجتمع الطبي. تُشير المُعطيات الحالية إلى اتساع السوق العالمية للأدوية النباتية، فقد تجاوزت مبيعاتها عالمياً 60 مليار دولار أميركي في عام 2010. ومع مُعدل نمو سنوي يُقدَّر بـ 7% من المتوقع أن يستمر هذا التطور ليصل إلى 500 مليار دولار أميركي بحلول عام 2050 حسب ما أقرته مُنظمة الصحة العالمية (Nirmal *et al.*, 2013).

سهل انتشار الأدوية النباتية كثرة التأثيرات الجانبية المرافقة لاستخدام الأدوية الكيميائية (Jibril *et al.*, 2019)، والاعتقاد بأن الأدوية العشبية آمنة لمجرد أنها غير مُصنَّعة، وأن صرفها لا يحتاج إلى وصفة طبية، بالإضافة لاعتبارها من المتممات الغذائية الأمر الذي جنبها الكثير من الاجراءات الصارمة التي تُطبق على المستحضرات الدوائية (Bent *et al.*, 2008).

وبالفعل تعاني هذه المستحضرات من التدليس الدوائي الذي يعد المشكلة الأبرز فيما يتعلق بسلامة وأمان استخدامها، ويعرّف بأنه إضافة مواد كيميائية إلى المستحضرات النباتية الطبيعية بشكل غير شرعي وغير مُصرَّح عنه بهدف زيادة الفعالية أو خفض سعر التكلفة (Haroun *et al.*, 2016).

ومن المستحضرات النباتية شائعة الاستعمال نذكر المنتجات النباتية المقوية جنسياً، والتي لاقت انتشاراً واسعاً بسبب شيوع مشكلة ضعف الانتصاب لدى الرجال، لاسيما أنها شكّلت لدى المرضى بديلاً آمناً عن الأدوية المصنَّعة كيميائياً والتي ترافق استعمالها مع العديد من الآثار الجانبية (Kamboj, 2012).

وقد كشفت الدراسات عن تدليس الأدوية العشبية المقوية جنسياً بعدد كبير من المواد الكيميائية، وعلى رأسها مادة السيلدينافيل نظراً لفعاليتها الكبيرة في تحسين الوظيفة الانتصابية، حيث تعمل كمُثبِّط انتقائي لإنزيم الفوسفوديستراز من النمط الخامس (PDE5) Phosphodiesterase type-5، مما يؤدي لتعزيز دور أكسيد النتريك Nitric Oxide في إرخاء العضلات الملساء وزيادة وصول الدم إلى الأجسام الكهفية للقضيب (Hatzimouratidis, 2006). مما تقدم نجد أن التنظيم الحالي للمستحضرات العشبية لا يزال غير كاف مما يخلق حاجة ماسّة لمراقبتها لضمان فعاليتها وأمانها، وحمايتها من التسويق غير القانوني، والادعاءات الكاذبة المتعلقة بتركيب وفعالية وأمان هذه المستحضرات (Bent *et al.*, 2008)

أهمية البحث وأهدافه:

تتبع أهمية البحث من الانتشار الكبير للمستحضرات النباتية المقوية جنسياً في السوق السورية بعيداً عن رقابة وزارة الصحة (مهرية) وبالتالي إمكانية احتوائها على مواد دوائية مُصنَّعة غير مصرَّح بوجودها مثل السيلدينافيل، وتكمن

خطورة ذلك في أن هذه المادة قد تكون مُضافة بجرعة أكبر من الجرعة العلاجية أو أن يكون لدى المريض مضاد استجابة على السيلدينافيل واحتمال تداخلها مع الأدوية الأخرى التي يتناولها المريض.

يهدف هذا البحث إلى التحري عن السيلدينافيل في بعض المستحضرات النباتية المقوية جنسياً المتوفرة في السوق السورية سواء كانت مُصنعة محلياً أو مُستوردة أو مُهربة باستخدام تقنيتي TLC، و HPLC. وتحديد التراكيز في حال وجودها بطريقة تحليلية ذات مصدوقية.

طرائق البحث ومواده

1-المواد والتجهيزات المستخدمة:

- استخدم في إنجاز هذه الدراسة مجموعة من المواد وهي موضحة في الجدول (1):

الجدول (1) المواد المستخدمة في الدراسة

المصدر	المادة
مقدمة من إحدى الشركات الدوائية الوطنية	سيلدينافيل سيترات Sildenafil Citrate
Sham Lab, Syria	ميتانول مناسب للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (نقاوته < 99.9%) Methanol HPLC grade
Sham Lab, Syria	ميتانول (نقاوته % 99.8)
Surechem Products LTD, England	خلات الإيثيل Ethyl acetate
-	ماء مقطر Distillated water

- استخدمت مجموعة من الأجهزة المتوفرة في مخابر كلية الصيدلة ومخابر المعهد العالي لبحوث البيئة في كلية العلوم في جامعة تشرين، كما هو موضح في الجدول رقم (2):

الجدول رقم (2): يُبين الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الطرز	الجهاز
Labofuge 200 Heraeus	مثقلة Centrifuge
DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV ₂₅₄	TLC: Thin Layer صفائح سيليكات جل Chromatography
الجهاز: Shimadzu (DGU-20A3)	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High Performance Liquid Chromatography
مضخة: LC-20AT	
الكاشف: SPD-M20A	
الحاقن آلي: SIL-20A	
العمود: Knauer GmbH C18, 4 × 125 mm ID الطور الثابت: Lichrosorb – 100 RP 18, 10 µm	

Radwag AS 220C/2	ميزان حساس ذو حساسية 0.0001 غ
UVP, UVGL-25	لمبة إظهار الأشعة فوق البنفسجية UV Lamp 254 nm
Jeken PS-40A	جهاز حل بالأمواج فوق الصوتية Ultrasonic bath
باستخدام محرك كهربائي لتحقيق ضغط سلبي	جهاز الترشيح تحت الفراغ
Dragonlab	ميكروبيبيت Micropipette
MX-F Dragonlab	مازج Mixer

الطرائق المستخدمة:

جمع العينات:

استخدمت في هذه الدراسة 10 عينات من المستحضرات النباتية المقوية جنسياً المنتشرة في السوق المحلية سواء كانت مُصنَّعة محلياً، أو مُستوردة، أو مُتواجدة بشكل غير شرعي (مُهرية).
فُصِّمَت العينات كما يُوضح الجدول (3):

الجدول (3): تصنيف العينات الواردة في البحث

المستحضرات المقوية جنسياً مع رموزها	تصنيف العينات
K, L, M, N, O	عينات مُصنَّعة محلياً
R, Q, S, T	عينات مُستوردة بشكل نظامي ومُسجلة في وزارة الصحة السورية
P	عينات موجودة على نحو غير شرعي

فحص التغليف الخارجي وأصاقة التوسيم Labeling: (WHO technical report, 2002)

تقرض منظمة الصحة العالمية WHO وجود أصاقة توسيم على عبوة كل منتج صيدلاني نهائي مع نشرة تعليمات داخلية. يجب أن تحوي الأصاقة على المعلومات التالية:

- اسم المنتج الصيدلاني.
- اسماء المكونات الفعالة مع الكميات التي تتواجد بها في كل وحدة جرعية.
- عدد الوحدات الجرعية الموجودة في المنتج.
- تاريخ الإنتاج وانتهاء الفعالية ورقم الطبخة.
- توجيهات الاستعمال والتحذيرات الهامة في حال وجودها.
- شروط الحفظ والتحذيرات الخاصة المتعلقة بتخزين المنتج في حال وجودها.
- اسم المصنع للمنتج الصيدلاني وعنوانه.
- ويجب أن تحوي نشرة التعليمات الداخلية على المعلومات التالية:
- اسم الشكل الصيدلاني ونوعه.

- المادة الفعالة مع تركيبها وكميتها في كل وحدة جرعية ومعلومات عنها.
- معلومات عن الاستطبابات وطريقة الاستعمال والجرعة.
- مضادات الاستطباب ومحاذير الاستعمال والآثار الجانبية.
- تاريخ الانتاج والانتهاء.
- اسم المصنّع ورقم الطبخة.

تحري وجود السيلدينافيل في العينات المدروسة:

تحضير العينات:

تم استخلاص كل العينات المدروسة مباشرة بالميتانول وفق ما أورده الباحث (Jalili *et al*, 2015) مع بعض التعديلات كما يلي:

- أُفْرِغَ محتوى 6 كبسولات من كل مُستحضر نباتي ووزن محتوى كل كبسولة على حدة، ثم حُسِبَ متوسط الأوزان.
- مُزِجَ محتوى الكبسولات الست جيداً ثم أُخِذَ وزن يعادل متوسط الأوزان ونُقلَ إلى بيشر سعة 50 مل ثم أُضيفَ له 8 مل ميتانول.

- وُضِعَ البيشر السابق على حمام الأمواج فوق الصوتية بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.
- تم التثقيف بسرعة 4000 دروة/دقيقة لمدة 5 دقائق، وأُخِذَ السائل الطافي وتم ترشيحه بمرشحة ميكرونية (0.45 ميكرون)، ثم فُحِصَ باستخدام الـTLC والـHPLC.

الفصل الكروماتوغرافي باستخدام الطبقة الرقيقة (TLC):

استُخدمت هذه الطريقة لإجراء كشف كيميائي عن السيلدينافيل في العينات المدروسة وفق الشروط الواردة في الجدول رقم (4). وللقيام بذلك تم تجفيف الصفائح في الفرن بالدرجة (120 °C) لمدة 20 دقيقة، وتحضير طور متحرك مناسب ووضعه في حجرة مغلقة لتأمين وسط مُشبع، ثم طُبِّقَت المادة العيارية وخلصات المستحضرات التجارية المدروسة على الصفيحة بواسطة أنبوب شعري، على خط البداية الذي يبعد مسافة 1 سم عن حافة الطبقة. بعدها تم تجفيف البقع قبل البدء بعملية الفصل ضمن حجرة الرحلان. وبعد انتهاء الفصل تم تجفيف الطبقة في درجة حرارة الغرفة ومن ثم إظهار البقع الناتجة باستخدام لمبة الأشعة فوق البنفسجية (UV)، (The US pharmacopeia, 2009).

الجدول (4): شروط الفصل باستخدام TLC

ميتانول	محل المادة العيارية
10 X 10	أبعاد الطبقة
silica gel F ₂₅₄	الطور الثابت
ميتانول : أيتيل أسيتات (2:1)	الطور المتحرك
60 دقيقة	زمن إشباع حجرة الترحيل
لمبة (UV)	إظهار العينات
(Saeed <i>et al</i> , 2015)	المرجع

الفصل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC):

استُخدمت هذه التقانة لتأكيد الكشف الكيفي في العينات التي أعطت نتيجة إيجابية عند دراستها بالـ TLC ولإجراء التحديد الكمي لها، حيث حُقنت المحاليل العيارية للسيلدينافيل، وخلصات المستحضرات التجارية المدروسة في جهاز الـ HPLC وفق شروط العمل الموضحة في الجدول رقم (5)، وهي الشروط التي حددها الباحث (Jalili et al, 2015) مع إدخال بعض التعديلات (طول العمود المستخدم ومعدل تدفق الطور المتحرك ونسب المحلات فيه)، وتم اعتماد الطريقة التحليلية بعد دراسة مصدوقيتها.

الجدول (5): شروط الفصل باستخدام الـ HPLC

الشروط	السيلدينافيل العياري والعينات المقوية جنسياً
عمود الفصل Column	Knaur GmbH C18, 125 * 4 mm ID أبعاد الجزيئات 10 µm
الطور المتحرك Mobile phase	ميتانول : ماء 35:65
حجم الحقنة Injection volume	20 ميكروليتر
معدل التدفق Flow rate	1.5 مل/دقيقة
الكاشف Detector	SPD-M20A
طول الموجة Wavelength	240 نانومتر
البرمجية Software	LC solution
حرارة الفرن Oven temperature	50°C

دراسة مصدوقية طريقة الـ HPLC المستخدمة:

□ دراسة دقة الطريقة التحليلية:

لتقييم دقة الطريقة التحليلية المتبعة تم دراسة تكرارية النتائج خلال يوم واحد (Intra-day precision) والدقة الوسطى خلال عدة أيام (Inter-day precision)، ولذا تم تحديد المحتوى من السيلدينافيل في المستحضر (P)، وتكرار القياس ثلاث مرات وتحديد المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والانحراف المعياري النسبي ICH, (Q2AR1 2005).

□ دراسة الاسترداد للطريقة التحليلية المتبعة:

لدراسة الاسترداد تم إضافة مقدار 0.625 ملغ من السيلدينافيل إلى العينة (M) من المستحضرات النباتية المقوية جنسياً غير المغشوشة بالسيلدينافيل، وتحديد محتوى السيلدينافيل في العينة فيها، وتكرار القياس ثلاث مرات وحساب المتوسط الحسابي للنسبة المئوية للاسترداد والانحراف المعياري النسبي ICH RSD: Relative Standard Deviation (Q2AR1, 2005).

□ تحديد حد الكشف الكيفي وحد القياس الكمي للطريقة المتبعة:

لتحديد حد الكشف الكيفي (LOD: Limit of Detection)، وحد القياس الكمي (Limit of Quantitation)، تم حقن خلاصة المستحضر M مع إضافة تراكيز متناقصة من السيلدينافيل في جهاز الـ HPLC، حتى الحصول على قمة للسيلدينافيل يبلغ ارتفاعها 3 أضعاف ضجة الجهاز في حالة LOD، و 10 أضعاف ضجة الجهاز

في حالة LOQ، عندها تم تسجيل ارتفاع 6 قمم لضجة الجهاز تسبق وتلي القمة العائدة للسيلدينافيل. ومن ثم حساب كل من المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لها، ليتم تطبيق المعادلات الرياضية التالية (Shrivastava and Gupta, 2011).

$$\text{LOD}=3 S_a/b , \text{ LOQ}=10 S_a/b$$

حيث أن:

S_a : الانحراف المعياري للاستجابة (التشويش).
 b : ميل معادلة السلسلة العيارية.

النتائج والمناقشة

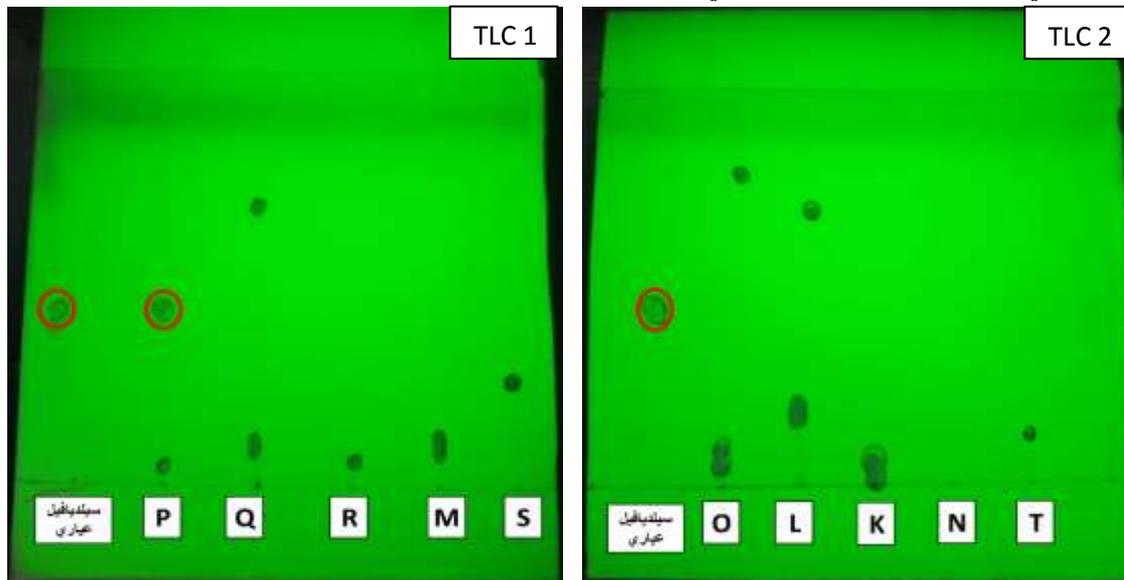
فحص التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم:

أجري الاختبار على جميع العينات النباتية المقوية جنسياً الداخلة في البحث. كانت جميع العينات المصنعة محلياً مطابقة لإرشادات منظمة الصحة العالمية من حيث الغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم والنشرة الداخلية. أما بالنسبة للعينات المستوردة كانت عينة واحدة من أصل 4 عينات غير مطابقة فيما يتعلق بوجود نشرة داخلية مرفقة، وكذلك الأمر بالنسبة للعينة المتواجدة بشكل غير شرعي.

تحري وجود السيلدينافيل في العينات النباتية المدروسة:

فحص العينات باستخدام الـ TLC:

أظهرت نتائج فحص العينات باستخدام الـ TLC وفق الشروط الواردة في الجدول رقم (5) وجود السيلدينافيل في عينة واحدة (P) من العينات العشرة المدروسة كما هو موضح في الشكل (1)، امتلكت العينة (P) بقعة لها قيمة $R_f = 0.4$ وهي مطابقة لقيمة R_f العائدة لبقعة السيلدينافيل، ويجدر بنا الذكر أن العينة المغشوشة هي المتواجدة على نحو غير شرعي.



الشكل (1): العينات المقوية جنسياً بعد فحصها باستخدام الـ TLC

قام الباحث Saeed وزملائه (Saeed *et al*, 2015) بدراسة مماثلة للتحري عن السيلدينافيل والتادالافيل المُضافين بشكل غير مُعلن إلى 30 مستحضر عشبي مقوي جنسياً. كشفت الدراسة وجود السيلدينافيل في 4 مستحضرات، والتادالافيل في 3 مستحضرات.

فحص العينات باستخدام الـ HPLC:

- تم استخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء لدراسة العينات التي أعطت نتيجة إيجابية عند فحصها بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وهي المستحضر (P)، كما أُجري اختبار عشوائي لإحدى العينات التي أعطت نتيجة سلبية بالـ TLC وهي المستحضر (M)، بهدف أخذ فكرة أكبر عن مدى تطابق النتائج بين الـ TLC و الـ HPLC، وتم استخدام العينة M في دراسة النسبة المئوية للاسترداد للطريقة التحليلية المُتبعة.

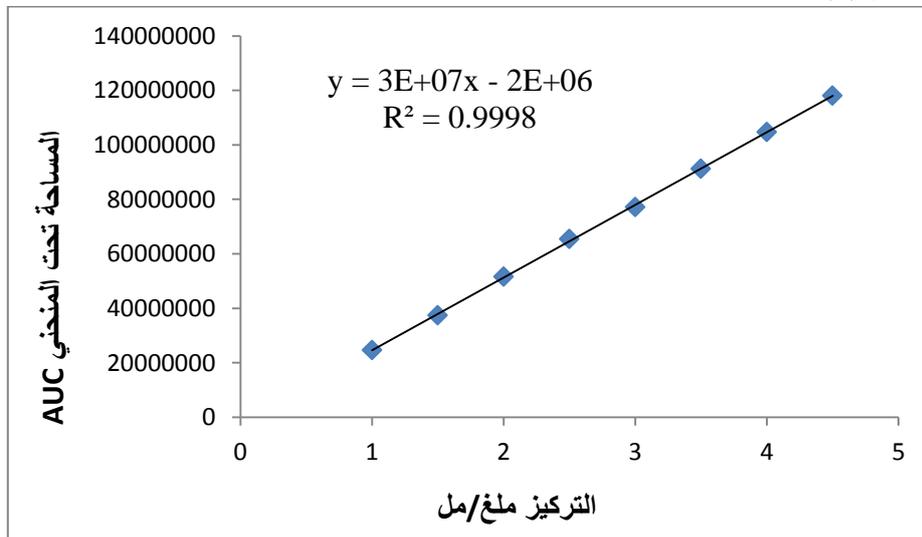
حُضرت سلسلة عيارية من السيلدينافيل اعتباراً من المحلول الأم ذي التركيز (5 ملغ/مل) وأخذت حجوم متعددة من المحلول الأم ومُددت إلى 10ml في بالون معايرة، وحصلنا على التراكيز التالية: (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 ملغ/مل)، حُفنت جميعها في جهاز الـ HPLC وقيست المساحات تحت المنحني للقمم الناتجة عنها، ومُثلت العلاقة بين قيم المساحات وقيم التراكيز بيانياً، كما هو موضح بالشكل (2).

وكانت معادلة الخط المستقيم الذي تم الحصول عليه:

$$y = 3E+07x - 2E+06$$

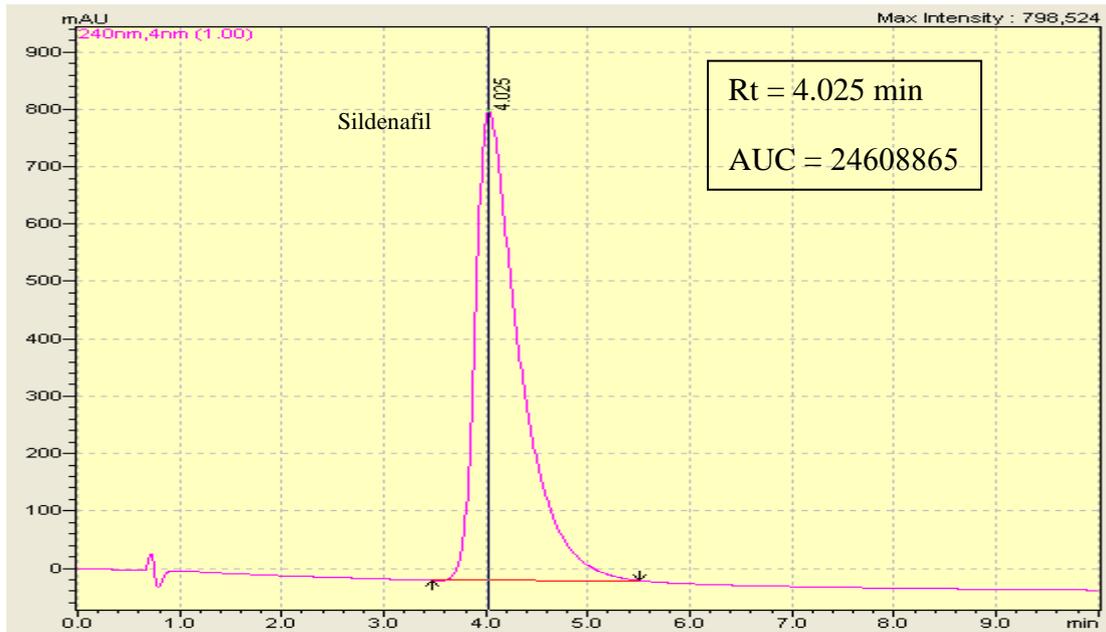
حيث: Y تعبر عن مساحة القمة، X تعبر عن التراكيز ملغ/مل، $10^{(7)} = E+07$

أما R^2 فقد بلغت قيمتها (0,9998) مما يدل على أن العلاقة خطية في المجال المدروس، وهذا ما تم تمثيله في الشكل رقم (2).



الشكل (2): السلسلة العيارية للسيلدينافيل

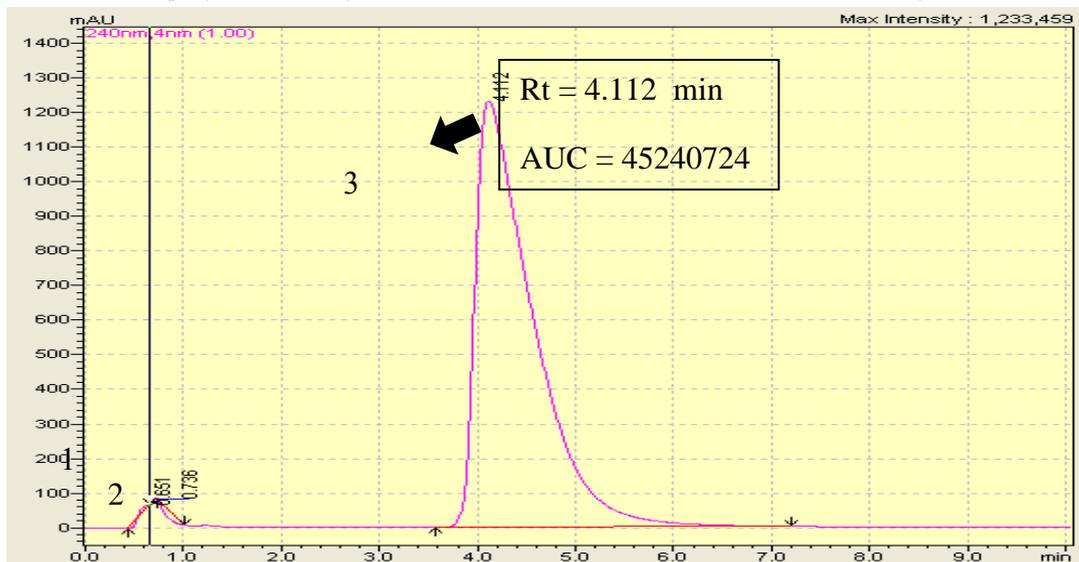
- عند حقن المحلول العياري للسيلدينافيل (1 ملغ/مل) بجهاز الـ HPLC حصلنا على الكروماتوغرام المُوضح بالشكل (3)، وكان زمن احتباس السيلدينافيل العياري ($R_t = 4.025$ min) والمساحة تحت المنحني $AUC = 24608865$.



الشكل (3): كروماتوغرام السيلدينافيل العياري عند طول موجة 240 nm

الكشف الكيفي عن السيلدينافيل باستخدام الـ HPLC:

- عند حقن خلاصة العينة P في جهاز HPLC حصلنا على الكروماتوغرام الموضح في الشكل (4)، تملك القمة رقم 3 زمن احتباس (4.112 دقيقة)، وهو قريب من زمن احتباس السيلدينافيل (4.025 دقيقة) في الشروط المدروسة ذاتها.



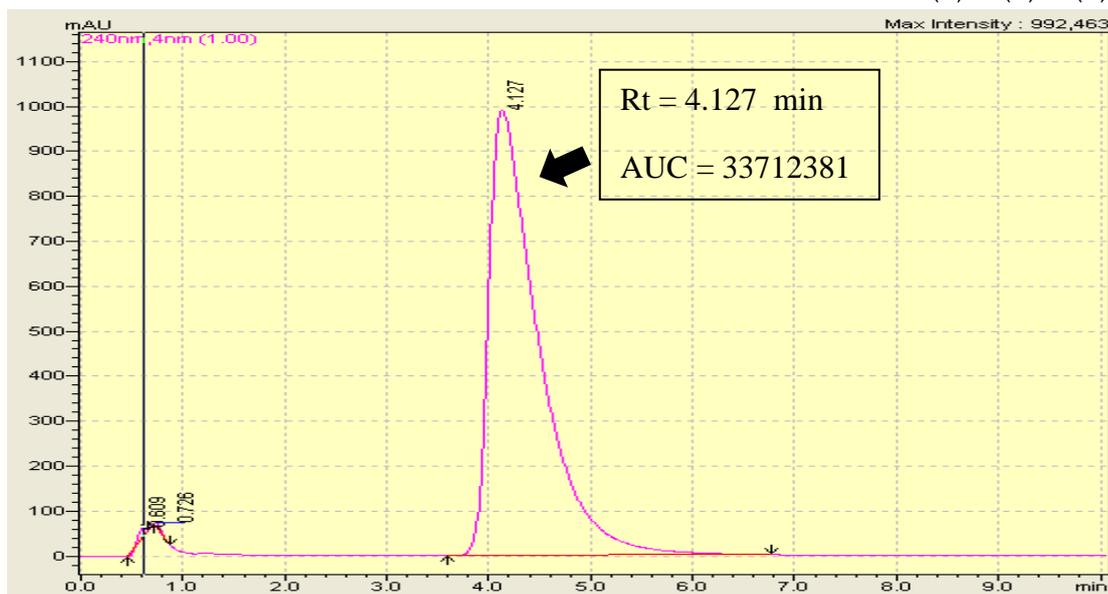
الشكل (4): كروماتوغرام خلاصة المستحضر P عند طول موجة 240 nm

- للتأكد من أن القمة رقم 3 عائدة للسيلدينافيل تم إضافة تراكيز متزايدة من عياري السيلدينافيل لخلاصة المُستحضر P وحقنها في جهاز HPLC كما هو موضح في الجدول التالي (6):

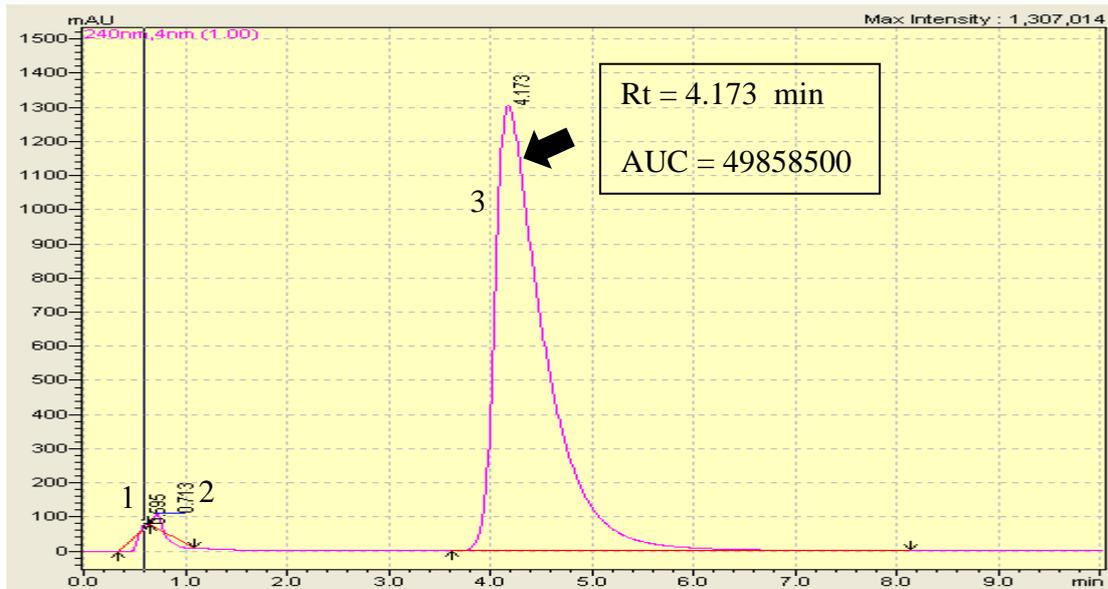
الجدول (6): التراكيز المتزايدة المضافة من عياري السيلدينافيل لخلاصة المستحضر P

AUC للقمة 3	Rt للقمة 3	التركيب			المحلول
		عياري سيلدينافيل (1 ملغ/مل)	ماء مقطر	خلاصة المستحضر P	
33712381	4.127min	-	300 µl	800µl	المحلول P ₁
49858500	4.173 min	150 µl	150 µl	800µl	المحلول P ₂
71621791	4.109min	300µl	-	800µl	المحلول P ₃

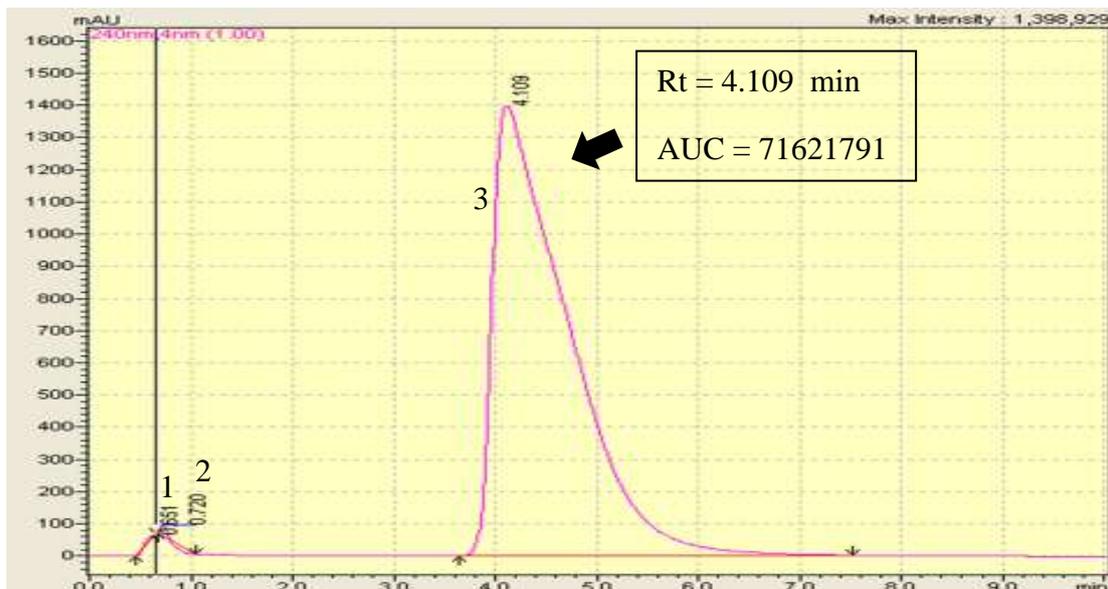
لاحظنا عدم ظهور أي قمم جديدة في الكروماتوغرام بعد إضافة عياري السيلدينافيل إلى خلاصة المستحضر P مما يدل على أن إحدى القمم في كروماتوغرام الخلاصة تعود للسيلدينافيل، وبالمقارنة بين الكروماتوغرامات العائدة للمحاليل (P₁,P₂,P₃) نجد ازدياد في قيمة الـ AUC للقمة 3 بشكل متزايد عند إضافة كميات متزايدة من عياري السيلدينافيل للخلاصة، في حين تناقصت قيم الـ AUC لباقي القمم، مما يدل على أن القمة 3 عائدة للسيلدينافيل، وهذا ما يثبت أن العينة P مغشوشة بإضافة السيلدينافيل، كما هو موضح في الأشكال رقم (5) و (6) و (7):



الشكل (5): كروماتوغرام خلاصة المستحضر P "المحلول P₁" عند طول موجة 240 nm



الشكل (6): كروماتوغرام خلاصة المستحضر P "المحلول P₂" عند طول موجة 240 nm



الشكل (7): كروماتوغرام خلاصة المستحضر P "المحلول P₃" عند طول موجة 240 nm

تتوافق نتائج دراستنا مع ما وجدته الباحثة Gilard وزملائه (Gilard *et al*, 2015)، حيث قاموا بتحليل 150 عينة من المكملات الغذائية الطبيعية المقوية جنسياً باستخدام الرنين المغناطيسي النووي (NMR) ومطياف الكتلة (MS) وتبين أن 61% من العينات كانت مغشوشة بمثبطات الفوسفوديستراز ومن ضمنها السيلدينافيل. كما خلصت الدراسة التي قام بها الباحث Gratz وزملائه (Gratz *et al*, 2004) إلى نتائج مشابهة. فقد تم تحليل 40 مستحضر نباتي مستخدم في زيادة القدرة الجنسية باستخدام (LC-ESI-MS)، وعُثر على مثبطات (PDE-5) مضافة بشكل غير مُعلن في 21 مستحضر.

التحديد الكمي للسيلدينافيل باستخدام الـ HPLC:

لإجراء التحديد الكمي تم تعويض قيمة المساحة تحت المنحني (AUC) العائدة للسيلدينافيل في معادلة السلسلة العيارية، وحساب التركيز (ملغ/مل)، وضرب التركيز الناتج بمعامل التصحيح، الذي تم تحديده بناءً على النسبة المئوية للاسترداد للطريقة التحليلية المستخدمة والمحسوبة كما هو وارد في الفقرة (4.3.2)، ومن ثم حساب كمية المادة في الكبسولة الواحدة من المنتج كما هو موضح في الجدول رقم (7).

الجدول رقم (7): كمية السيلدينافيل في العينة P

رمز العينة	زمن الاحتباس Min	المساحة تحت المنحني AUC	التركيز mg/ml	النسبة المئوية للاسترداد %	معامل التصحيح	الكمية mg/Cap
P	4.116	45240724.33	1.574690811	%98.77189504	1.01243	12.754

كانت كمية السيلدينافيل في العينة P 12.754 ملغ/الكبسولة، وهي أقل من الجرعات العلاجية للسيلدينافيل، ومن الممكن أن يُعول المُصنعون في هذه الحالة على تكرار الجرعة لاسيما أن جرعة السيلدينافيل لكبار السن هي 25 ملغ، ويمكن أن يعزى ذلك أيضاً بالاعتماد على التأثير المشترك للمكونات النباتية والسيلدينافيل لتحقيق الغاية العلاجية دون ظهور آثار جانبية صريحة للسيلدينافيل.

تتطابق نتائج دراستنا مع بعض الكميات التي تم العثور عليها في دراسة الباحث Podder وزملائه (Podder et al, 2014) باستخدام HPLC، حيث أظهرت الدراسة وجود السيلدينافيل في 5 من أصل 25 مستحضر عشبي، وفي 7 من أصل 10 متمات غذائية داخلية في الدراسة. تراوحت كمية السيلدينافيل في المستحضرات المعشوشة 15.87-165.87 ملغ/الكبسولة، ويمكن أن يُعزى الاختلاف في كمية السيلدينافيل المحددة في الدراسة الحالية ودراسة Podder وزملائه إلى اختلاف الشروط التحليلية المستخدمة كالطور المتحرك وطول موجة الامتصاص الأعظمي التي تم اعتمادها، كما قد يعود اختلاف النتائج إلى طبيعة المستحضرات العشبية واختلاف طرق معالجتها.

نتائج دراسة مصدوقية طريقة HPLC المستخدمة في البحث:

نتائج دراسة دقة الطريقة التحليلية:

يُعبّر عن التكرارية بالانحراف المعياري النسبي RSD، ومن أجل دقة جيدة يجب أن يكون الانحراف المعياري النسبي أقل من 10% (ICH Q2AR1, 2005). تُشير قيم الانحراف المعياري النسبي للقياسات المُكررة في اليوم الواحد وبين الأيام إلى أن الطريقة المُتبعة تتمتع بتكرارية جيدة، كما هو موضح في الجداول (8)، حيث كانت قيم RSD أقل من 10%.

جدول (8): تكرارية طريقة التحديد الكمي للسيلدينافيل في العينة P بطريقة HPLC في نفس اليوم وبين الأيام

الانحراف المعياري النسبي RSD	الانحراف المعياري SD	المتوسط الحسابي \bar{x}	تركيز السيلدينافيل		العينة P
			التركيز المقاس	AUC	
0.835887829 %	0.013162649	1.574690811	1.576206	45286190	في نفس اليوم
			1.560836	44825080	
			1.58703	45610903	
1.346872039 %	0.021235164	1.576628189	1.569464	45083914	بين الأيام
			1.559902	44797056	
			1.600519	46015567	

نتائج دراسة الاسترداد للطريقة التحليلية المتبعة:

يجب أن تكون النسبة المئوية للاسترداد ضمن المجال (90-110%) حتى تكون الطريقة التحليلية ذات استرداد مقبول (ICH Q2AR1, 2005). كان متوسط النسبة المئوية لاسترداد السيلدينافيل 98.77% مما يؤكد أن النتائج ضمن المجال المطلوب، كما هو موضح في الجدول (9).

جدول (9): دراسة الاسترداد لطريقة معايرة السيلدينافيل بطريقة HPLC

متوسط النسبة المئوية للاستعادة %	الانحراف المعياري النسبي RSD%	الانحراف المعياري S	المتوسط الحسابي \bar{x}	تركيز السيلدينافيل المقاس mg/ml	تركيز السيلدينافيل النظري mg/ml
98.77189504	1.510628072	0.009325475	0.617324344	0.623484633	0.625
				0.6218929	
				0.6065955	

تعيين حد الكشف الكيفي والقياس الكمي للطريقة التحليلية المتبعة:

تشير النتائج أن الطريقة التحليلية استطاعت كشف وتعيين تراكيز أصغر بكثير من تلك التي تم العثور عليها في العينة المدروسة. حيث كانت الحدود المقاسة من رتبة جزء بالترليون (ppt: part per trillion)، وكانت قيمة حد الكشف الكيفي للسيلدينافيل (117 ppt) وحد القياس الكمي (310 ppt)، كما هو موضح في الجدول (10).

الجدول (10): حساب حد الكشف الكيفي وحد القياس الكمي للسيلدينافيل

LOQ	LOD	ميل المعادلة	الانحراف المعياري SD	المتوسط الحسابي	الارتفاع	رقم القمة التشويش
310 PPT	117 PPT	30000000	1.169	9.167	9	1
					10	2
					11	3
					8	4
					9	5
					8	6

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

- أظهر فحص التغليف الخارجي ولصاقات التوسيم أن جميع العينات المصنعة محلياً المقوية جنسياً مطابقة لإرشادات منظمة الصحة العالمية، في حين خالفت العينة المهرية وعينة واحدة من أصل 4 عينات مستوردة التوصيات.
- تبين من خلال فحص العينات باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، وجود السيلدينافيل في عينة واحدة من أصل عشرة من العينات المقوية جنسياً وهي العينة P المهرية.
- فُحصت العينة ذات نتيجة TLC الإيجابية باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (HPLC) من أجل تأكيد الكشف الكيفي وإجراء تحديد كمي للسيلدينافيل، وتبين وجود السيلدينافيل في العينة P بكمية (12.754) ملغ/ الكبسولة الواحدة.
- أجريت دراسة مصدوقية طريقة HPLC المستخدمة في البحث وتوصلنا إلى النتائج الآتية:
 - تتمتع الطريقة بتكرارية جيدة للتحديد الكمي للسيلدينافيل حيث كانت قيم الانحراف المعياري النسبي RSD أقل من 10%.
 - كانت الطريقة ذات استرداد مقبول حيث كان متوسط النسبة المئوية لاسترداد السيلدينافيل (98.77%).
 - امتلكت الطريقة التحليلية حساسية عالية تسمح بإجراء كشف الكيفي للسيلدينافيل ضمن الشروط المستخدمة (LOQ=310, LOD=117 ppt).

التوصيات

- خُص هذا البحث إلى مجموعة من التوصيات والمقترحات وهي:
 - وضع المزيد من الضوابط على تداول المستحضرات العشبية وطرائق تسويقها وحصر بيعها في الصيدليات وتحت الإشراف الطبي، ومكافحة عمليات تهريب الأدوية والمنتجات الغذائية.
 - متابعة الدراسة على عدد أكبر من المستحضرات والخلطات النباتية والمستحضرات العشبية المقوية جنسياً للتأكد من خلوها من السيلدينافيل أو مواد كيميائية أخرى باستخدام تقانات تحليلية أكثر تطوراً كالرنين المغناطيسي النووي الموصل بمطياف الكتلة.

References

1. BENT,S. *Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation*. Society of General Internal Medicine, U.S.A, 2008, 854-859.
2. GILARD,V; BALAYSSAC,S; TINAUGUS,A; MARTINS,N; MARTINO,R; MALET-MARTINO,M. *Detection, identification and quantification by ¹H NMR of adulterants in 150 herbal dietary supplements marketed for improving sexual performance*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, France, 2014, 1-61.
3. GRATZ,S,R; FLURER,C,L; WOLNIK,K,A. *Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, USA, 2004, 525-533.
4. HAROUN, M; YOUSEF, A; HAIDER,N. *Determination of Sibutramine in herbal slimming products available in local market by TLC and HPLC*. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies, Vol.38, 2016, 157-175.
5. HATZIMOURATIDIS,K. *Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction: an overview of the clinical evidence*. Dovepress Clinical Interventions In Aging, Greece, Vol.1(4), 2006, 403-414.
6. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirement for Registration of Pharmaceutical for Human Use, Topic Q2R1, Validation of Analytical Procedures. (2005). <https://www.ich.org>.
7. JALILI, R; MIRAGHAEI,S; MOHAMADI,B; BABAIE,A; BAHRAMI,G. *Detection of corticosteroid compounds and phosphodiesterase inhibitors (PDH-5) as counterfeit in herbal products available in Iranian market by HPLC method*. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, Iran, Vol.4(1), 2015, 75-81.
8. JIBRIL,A,B; KWARTENG,M,A; CHOVANCOVA,M. *A demographic analysis of consumers' preference for green products*. International Scientific Conference VGTU Press, Lithuania, 2019, 426-435.
9. KAMBOJ,A. *Analytical Evaluation of Herbal Drug*. Drug Discovery Research in Pharmacognosy. India, 2012, 23-60.
10. NIRMAL,S,A; PAL,S,C; OTIMENYIN,S,O; AYE,T; ELACHOURI,M; KUNDU,S,K; THANDAVARAYAN,R,A; MANDAL,S,C; *Contribution of Herbal Products In Global Market*. The Pharma Review, India, 2013, 95-104.
11. PODDER,A,K; CHAKROBARTY,J,K; FAROQUE,A. *QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF SILDENAFIL IN TRADITIONAL MEDICINES AND DIETARY SUPPLEMENTS*. Asian Journal Of pharmaceutical and Clinical Research. Vol(7), 2014, 25-30.
12. SAEED, S.M; MOHAMED, M.A; SHANTIER, S.W; GADKARIEM, E.A; ISMAIL, E.M. *Determination of undeclared Sildenafil Citrate and tadalafil in aphrodisiac herbal preparations by TLC and HPLC*. International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research, Vol.3(6), 2015, 688-696.
13. SHRIVASTAVA,A; GUPTA,V. *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. Chronicles of Young Scientists, Vol.2, 2011, 21-25.
14. The United State Pharmacopoeia 29. Thin-layer chromatography, 2009, Retrieved from http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c621s5.html
15. TUKER,J; FISCHER,T; UPJOHN,L; MAZZERA,D; KUMAR,M. *Unapproved Pharmaceutical Ingredients Included in Dietary Supplements Associated With US Food and Drug Administration Warnings*. JAMA Network Open, America, 2018, 1-11.
16. WHO, World Health Organization Technical Report Series, No. 902, *Guidelines on packaging for pharmaceutical products*, 2002, Retrieved from https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/GuidelinesPackagingPharmaceuticalProductsTRS902Annex9.pdf.