مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (35) العدد (3) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (35) No. (3) 2013

مراقبة محتوى بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على أحماض أمينية

الدكتورة آيات عبود*
عفراء متوج**

(تاريخ الإيداع 2 / 6 / 2013. قُبِل للنشر في 24 / 7 /2013)

□ ملخّص □

يهدف هذا البحث إلى مراقبة محتوى بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على الحمض الأميني الأرجينين والمستخدمة كأدوية أو متممات غذائية إضافة إلى مراقبة بعض المستحضرات المتوفرة محلياً الحاوية على كرياتين وبروتين والمستخدمة كمتممات غذائية. تم اتباع ثلاث طرائق في تحديد كمية الأحماض الأمينية في العينات المدروسة وهي طريقة كلدال بالاعتماد على نسبة الآزوت العام, الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي بعد الاشتقاق بالنينهيدرين وكذلك باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء بعد الاشتقاق قبل العمود باستخدام أورتوفتال دي الدهيد والكشف بمقياس الفلورة. لم يلاحظ وجود اختلافات هامة في النتائج بين الطرائق الثلاث المستخدمة. فقد كانت النتائج بالنسبة للمستحضرات الحاوية على كرياتين و بروتين المستخدمة كمتممات غذائية مطابقة لما يتطلبه دستور الأدوية الأوروبي, وكذلك الأمر بالنسبة للمستحضرات الدوائية الحاوية على الأرجينين والمصنعة محلياً, أما المتممات الغذائية المهربة الحاوية على الأرجينين فقد خالفت متطلبات الدستور.

الكلمات المفتاحية: الأرجينين, طريقة كلدال, الاشتقاق بالنينهيدرين, الاشتقاق بالأورتو فتال دي الدهيد, الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

* مدرسة– قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
** طالبة دراسات عليا (ماجستير)– قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (35) العدد (3) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (35) No. (3) 2013

Content control of some commercial products containing amino acid available in the local market

Dr. Ayat Abboud*
Afraa Mtaweg**

(Received 2 / 6 / 2013. Accepted 24 / 7 / 2013)

□ ABSTRACT □

The aim of this study was to control the content of some commercial products containing amino acid (Arginine) available in the local market in addition to other products containing creatine and protein. Three methods were used for quantitative determination of amino acids: Kjeldahl method depending on the total content of nitrogen, assay by the visible radiation using Spectrophotometer after ninhydrin derivatization and high performance liquid chromatography with pre-column O-phtadelaldehyde derivatization using fluorescence detector. There were no significant differences in the results obtained by the three used methods. The results revealed that dietary supplements containing creatine and protein were conform to the European pharmacopoeia specifications. Regarding products containing arginine, used as medication and locally manufactured, they were conform to pharmacopoeia specifications while the illegal dietary supplement containing arginine were not conform.

Keywords: Arginine; Kjeldahl method, ninhydrin derivatization, O-phtadelaldehyde derivatization, high performance liquid chromatography

*Assistant Professor, Pharmaceutical chemistry and drug quality control Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.
**Postgraduate Student, Pharmaceutical Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة:

تعد الأحماض الأمينية من نوع L-α وحدة البناء الأساسية للببتيدات والبروتينات لذلك يطلق عليها الأحماض الأمينية البروتينية. كذلك فإن بعضها يمكن أن يوجد بشكله الحر في الدم. تملك الأحماض الأمينية دوراً هاماً في الجسم, فالبعض منها يشكل نواقل عصبية, والبعض الآخر يشكل طلائع لاصطناع البورفيرينات, البورينات, البريميدينات واليوريا, أو لاصطناع بعض النواقل والوسائط العصبية والهرمونات. ولها دور ناقل للجزيئات (ناقل لمجموعة الأمين), كذلك تعد من مكونات الفوسفولبيدات مثل السيرين أو تدخل في تركيب الأملاح الصفراوية مثل الغليسين (Murray et al, 2009).

انطلاقاً من الأهمية الفيزيولوجية للأحماض الأمينية البروتينية فقد استخدمت بشكلها الحر دون تعديل لعلاج بعض الأمراض مثل الأرجينين المستخدم في معالجة ارتفاع كولسترول الدم.(Hess., 2004). تم أيضاً إجراء تعديلات في بنية الأحماض الأمينية البروتينية لزيادة فعاليتها أو تغيير خواصها الفيزيولوجية بهدف استخدامها كأدوية: فمثلاً تم إجراء دراسة لمعرفة تأثير مركب 5 -هيدروكسي التريبتوفان 5-Hydroxy tryptophane (5-HTP) في علاج حالات الاكتئاب فكان تأثيره العلاجي مكافئاً لتأثير الفلوكسيتين على مرضى الاكتئاب (Jangid, 2013)

بالإضافة إلى أهميتها العلاجية, تستخدم الحموض الأمينية أيضاً كمتممات غذائية وعليه تصنف بناءً على أهميتها الغذائية إلى: (1) أحماض أمينية أساسية Essential amino acids وهي الأحماض التي لا تصنع في الجسم, ويجب الحصول عليها مع الطعام وعددها عشرة أحماض أمينية منها: المتيونين, الفينيل ألانين ويمكن اعتبار الهيستيدين و الأرجينين أحماضاً شبه أساسية, (2) أحماض أمينية غير أساسية Nonessential amino acids وهي التي تصنع في الجسم ومنها الغليسين والبرولين (Belitz et al., 2009).

في الواقع يعد الرياضيون الأكثر استخداماً للأحماض الأمينية كمتممات غذائية, وذلك لزيادة الكتلة العضلية ومنع تقويض البروتينات خلال التمارين لفترة طويلة, إضافة لتحسين إعادة تصنيع الغليكوجين في العضلات بعد التمرين, كما تحسن تصنيع الهيموغلوبين والميوغلوبين وبعض الأنزيمات المؤكسدة حيث تستخدم عادة قبل إجراء التمرين أو بعده بمدة 3-1 ساعات (Melvin Williams., 2005). وإضافة إلى الأحماض الأمينية البروتينية تستخدم الأحماض الأمينية غير البروتينية (الأحماض الأمينية غير المرمزة وراثياً) كمتممات غذائية ومنها الكرياتين ($C_4H_9N_3O_2$) الذي يصنع في الجسم اعتباراً من الأحماض الأمينية (ل-أرجينين, ل-غليسين ول-ميتيونين) ويعد أكثر المكملات الغذائية المستخدمة لتحسين الأداء الرياضي وزيادة القوة العضلية (Bemben, 2005).

تتوافر المتممات الغذائية بعدة أشكال صيدلانية (مضغوطات, كبسولات, مساحيق, سوائل..) لكنها مصنفة حسب وزارة الصحة السورية والـ FDA كأغذية (وزارة الصحة, 2005). على الرغم من اعتبارها كالأغذية تباع المتممات الغذائية حصراً في الصيدليات وتراقب بعد طرحها في السوق من قبل مديرية الرقابة الدوائية في وزارة الصحة ومن قبل دوائر الرقابة الدوائية في مديريات الصحة (وزارة الصحة, القرار 24/ ت عام 2004) وبالتالي فحالها كحال المستحضرات الصيدلانية الحاوية عليها والمستخدمة لغايات علاجية يجب أن تتوافق مواصفاتها مع المتطلبات الدستورية. في الواقع تباع معظم المتممات الغذائية المتناولة من قبل الرياضيين بشكل غير شرعي في النوادي الرياضية مما قد يعرض متناولي هذه المنتجات لمخاطر صحية ناجمة عن غش هذه المواد وعدم تطابقها مع المعلومات المذكورة على اللصاقة.

في دراستنا تم استخدام ثلاث طرائق لتحديد كمية الأحماض الأمينية في العينات التجارية المدروسة وهي طريقة كلدال, الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي بعد الاشتقاق بالنينهيدرين وكذلك تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High performance liquid chromatography (HPLC).

تعد طريقة كلدال من الطرائق القديمة المرجعية المستخدمة لتحليل البروتينات والأحماض الأمينية اعتماداً على تحديد نسبة الآزوت العام في العينة لذلك تعد من الطرائق المستخدمة غير النوعية, يتم إجراء الاختبار بتحضير العينة ومجانستها ثم أخذ وزن محدد منها اعتماداً على نسبة البروتين فيها وبشكل عام يتراوح الوزن بين 0.2-2g ثم يتم تهضيم العينة لتحويل الآزوت إلى أمونيا ثم تقطيرها ومعايرتها. تسمح هذه الطريقة بمقايسة الأحماض الأمينية سواء في المستحضرات الدوائية أو في المتممات الغذائية لكن المشكلة أنها طريقة غير نوعية وبالتالي يمكن أن يحدث تداخل مع بعض المواد الاخرى الحاوية على الآزوت والموجودة مع الأحماض الأمينية في المستحضرات المدروسة لذلك كان لابد من استخدام طرائق نوعية كالطرائق الطيفية أو الطرائق الكروماتوغرافية.

لا تمتص معظم الأحماض الأمينية في مجال الأشعة فوق البنفسجية UV باستثناء تلك الحاوية في بنيتها على حلقة عطرية (الفينيل ألانين, التريبتوفان, التيروزين) لذلك لابد من إجراء عملية اشتقاق للحمض الأميني باستخدام عدة مواد منها (النينهيدرين ninhydrin, أورتو فتال دي ألدهيد O-phtadelaldehyde (OPA) وفينيل ايزوثيوسيانات (phenylisothiocyante (Molnár- Perl., 2001).

استخدمت طريقة النينهيدرين في التحديد الكمي للأحماض الأمينية باستخدام مطيافية الأشعة المرئية منذ عام 1940ولا تزال مستخدمة حتى الآن على الرغم من وجود طرائق أخرى كالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء بالضغط وذلك كونها طريقة بسيطة, معداتها غير مكلفة وملائمة للتحليل الروتيني في حال وجود عدد كبير من العينات(Sun et al, 2006). يعد تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية حالة خاصة من تفاعلات تحطم ستريكر Strecker degradation. يعطي هذا التفاعل مركباً ذاً لون أزرق بنفسجي له امتصاصية أعظمية عند طول موجة 570nm بينما يعطي مع البرولين مركباً ذا لون أصفر له امتصاصية عند طول موجة 440nm (Friedman., 2004) و يتراوح حد الكشف للأحماض الأمينية باستخدام هذه الطريقة بين 0.5-1 nmol (Sun et al., 2006).

كما هو الحال في تحديد الأحماض الأمينية باستخدام مطيافية الأشعة المرئية أيضاً لابد من إجراء عملية اشتقاق للأحماض الأمينية عند التحليل باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء. يمكن أن تتم عملية الإشتقاق قبل العمود pre-column derivatization (أورتو فتال ألدهيد) أو بعد العمود post-column derivatization (النينهيدرين). يستخدم عادة في التحليل طور متحرك قادر على فصل الأحماض الأمينية على العمود ويتم اختيار الكاشف المستخدم (أشعة فوق البنفسجية, مرئية, فلورة) حسب طريقة الاشتقاق المستخدمة (European Pharmacopoeia, 2005).

في دراستنا تم استخدام الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء ذات الطور العكوس, والتفريق وإجراء الاشتقاق قبل العمود باستخدام OPA وتم الكشف بمقياس الفلورة (Fluorescence detector). تعد هذه الطريقة من طرائق الفصل والتحديد الكمي والكيفي كما أنها ذات حساسية وتكرارية العاليتين (Tcherkas et al., 2001), ويعد OPA الكاشف الأكثر استخداماً في الاشتقاق قبل العمود, يتفاعل فقط مع مجموعات الأمين الأولية بوجود مركب سلفهدريل مثل كبريتيت الصوديوم (Na_2SO_3) أو2-ميركابتوايتانول (2-ME 2-mercaptoethanol)

(Gatti et al., 2004; Tcherkas et al., 2001). على الرغم من قلة الدراسات التي أجريت على ثباتية مشتقات OPA فقد لوحظ أن نصف عمر مشتقات OPA-2-ME هو بين 7-40 دقيقة (Tcherkas et al, 2001).

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث

يملك البحث أهمية صحية من خلال التحقق من مدى مطابقة المستحضرات المدروسة دوائية كانت أم متممات غذائية للمواصفات الدستورية وللمعلومات الموجودة على العبوة, ومعرفة مدى مأمونية المتممات الغذائية المباعة بشكل مرخص في الصيدليات, أو بشكل غير مرخص في النوادي الرياضية .

يهدف هذا البحث المنجز في كلية الصيدلة- جامعة تشرين إلى:

مراقبة عينات عشوائية لهذه المستحضرات من شركات وطبخات مختلفة من خلال:

1 - دراسة وجود الحمض الأميني فيها.

2 - تحديد كمية الحمض الأميني.

3 - تحديد كمية البروتين في بعض العينات المتوفرة.

حيث تم التركيز على الأشكال الحاوية على الأرجينين نظراً لأهميته ولتوفره محلياً.

طرائق البحث ومواده:

المواد والتجهيزات المستخدمة:

استخدمت في الدراسة مجموعة من المواد والمحلات المذكورة في الجدول (1), كما تم الحصول على مجموعة من العينات من مصادر مختلفة (صيدليات, نوادي رياضية) موضحة في الجدول (2). استخدمت مجموعة من التجهيزات المتوفرة في مخابر الكلية موضحة في الجدول (3).

الجدول (1) يبين المواد والمحلات المستخدمة في الدراسة

المادة	الشركة	المادة	الشركة
الأرجينين العياري	تقدمة من معمل آسيا	النينهيدرين	BDH,China
البوتانول	ROMIL, England	2- ميركابتو ايتانول	SERVA, Germany
الميتانول	SCP, England	حمض الكبريت	Sham lab, Syria
حمض الخل الثلجي	Merck, Germany	ايتانول مطلق	Sham lab, Syria
خلات الصوديوم	HIMEDIA, India	حمض البور	HIMEDIA, India
ماءات الصوديوم	BDH, China	حمض السيتريك	Merck, Germany
حمض الأسكوربيك	Merck, Germany	أورتوفتال دي الدهيد	Merck, Germany
اسيتونتريل	SDS	ماء مقطر حديثاً	

الجدول(2) يوضح العينات التجارية المدروسة مبينا الشكل الصيدلاني , التركيب, المصدر, استخدامه وتاريخ الصلاحية

الاستخدام	التركيب	العينة	الشكل الصيدلاني	المصدر	تاريخ الانتاج/تاريخ انتهاء الصلاحية
متمم غذائي	كرياتين	A	مسحوق	نوادي رياضية	معلومات غير متوفرة
		B			
		C			
		D			
	بروتين	E	مضغوطات		
	أرجينين	F	كبسولات		2010/2013
دوائي	أرجينين	G	حبابات شرب	صيدليات	2011/2014
					2012/2015
					2102/2015
		H	شراب		2011/2014
		I	كبسولات		2010/2014
					2012/2016
		J	كبسولات		2011/2014

الجدول (3) يبين التجهيزات المستخدمة في الدراسة

الجهاز	الطراز
ميزان حساس ذو حساسية 0.0001غ	Precisa XB 220 A
مقياس الطيف الضوئي	Jasco v-530 UV
جهاز كيلدال	Buchi, Digest system K-437 وحدة التهضيم
	Distillation unit B-324 وحدة التقطير
HPLC	Jasco Pu-2089 Plus مضخة نوع
	Jasco Fp-2020 Plus الكاشف
	BDS Hypersil C18, 250*4.6 العمود من نوع mmأبعاد الجزيئات5µ
	Software: Borwin

الطرائق

1 - الاعتيان

تم الحصول على مجموعة من المتممات الغذائية الحاوية على بروتين و كرياتين والموجودة بشكل غير شرعي من النوادي الرياضية وكذلك تم الحصول على بعض المستحضرات الصيدلية الحاوية فقط على الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو كمتممات غذائية من الصيدليات و النوادي الرياضية. في التحديد الكمي للكرياتين والبروتين تم أخذ عينة

عشوائية من العبوات الحاوية عليها, أما في العينات الحاوية على الأرجينين قد تم أخذ عشر كبسولات من الشركات والطبخات المدروسة وكذلك خمس حبابات شرب من كل طبخة وشراب من طبخة محددة وتم التحديد الكمي لها إفرادياً ثم حساب متوسط النسبة المئوية للمحتوى فيها نسبة إلى ما هو مصرح به.

2 – طريقة كلدال

تم إجراء التفاعل بوزن العينة مباشرة بعد مجانستها ثم تهضيمها بإضافة 20 مل من حمض الكبريت المركز ومحفز مكون من أكاسيد معدنية مختلفة والتسخين لدرجة حرارة مرتفعة 510 درجة مئوية لمدة 5 ساعات حتى الحصول على محلول رائق شفاف حيث يتشكل في هذه المرحلة كبريتات الأمونيوم ثم يتم تقطير الأمونيا بإضافة 75 مل من هيدروكسيد الصوديوم (تركيزه 33%) و50 مل من الماء المقطر واستقبال الأمونيا في دورق يحوي حمض البور مع كاشف من أحمر الفينيل وأخضر البروموكريزول ليتشكل في هذه المرحلة بورات الأمونيوم التي تتم معايرتها حجمياً باستخدام حمض كلور الماء 0.1N.

3 – طريقة النينهيدرين

تم إجراء هذا الفحص للتحديد الكمي للأرجينين في الأدوية والمتممات الغذائية حيث يتم اشتقاقها بمحلول النينهيدرين ثم إجراء القياس باستخدام مقياس الطيف الضوئي UV/Vis.

3 ,1. تحضير محلول كاشف النينهيدرين: تم أخذ 200 ملغ من النينهيدرين وأضيف لها 7.5 مل من الميتانول و2.5 مل من وقاء خلات الصوديوم 4N مع 250µL من محلول فيتامين C في الماء تركيزه 95غ/ل.

3 ,2. إجراء التفاعل: تم أخذ 1 مل من كل عينة وإضافة 2 مل من كاشف النينهيدرين والتسخين لمدة 10 دقائق في الماء المغلي ثم تركها 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة بعدها إضافة 5 مل من الايزوبوتانول وتركها لمدة 15 دقيقة حيث يظهر لون أزرق بنفسجي ثم تقاس الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة570 nm.

3 ,3. تحضير السلسة المعيارية للأرجينين: تم تحضير خمسة محاليل من المادة العيارية للأرجنين بتراكيز بين (0.1 µM/mL-0.3 µM/mL) في الماء المقطر. تم تحضير كل تركيز ثلاث مرات ثم قيست امتصاصية هذه المحاليل بعد اشتقاقها بالنينهيدرين وحسبت القيمة المتوسطة للامتصاصية عند طول موجة 570 نانومتر ومثلت العلاقة بين متوسط الامتصاصيات والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً.

3 ,4. تحضير العينات التجارية المدروسة : بالنسبة للأشكال الصلبة تم استخلاص الأرجينين بالحل بالماء المقطر والتحريك ثم الترشيح أما الأشكال الفموية السائلة فقد تم الاستخلاص بالتمديد المباشر.

4 – طريقة HPLC

تم إجراء هذا الفحص باستخدام تفاعل الاشتقاق بالـ OPA بوجود مركب 2-ME قبل العمود للتحديد الكمي للأرجينين في الأدوية والمتممات الغذائية حيث تم الكشف بمقياس الفلورة عند طول موجة امتصاص (Excitation) 340 nm وطول موجة إصدار(Emission) 470nm, والطور المتحرك استيونتريل: وقاء سيترات وبدرجة pH تساوي 9.5, حجم الحقنة 20 ميكرولتر, تدفق 1 مل/دقيقة, العمود من نوع BDS Hypersil C18 أبعاده 250*4.6 mm.

4 ,1. تحضير كاشف OPA: أخذ 27 ملغ من OPA وأضيف إليها 500µL من الايتانول 99% و20µL من 2-ME و4.5 مل من وقاء بورات الصوديوم 0.4M وترك لمدة 24 ساعة قبل الاستعمال في جو بارد ومظلم.

4 .2. تحديد نسبة الطور المتحرك: تم استخدام ثلاث نسب مختلفة من مكوني الطور المتحرك (اسيتونتريل: وقاء سيترات) لتحديد النسبة الأفضل التي سيتم استخدامها في هذه الدراسة اعتماداً على زمن الاحتباس الذي سيتم الحصول عليه, كذلك تم دراسة تأثير تغيير طبيعة الطور العضوي على زمن الاحتباس.

4 .3. إجراء التفاعل: تم إجراء تفاعل الاشتقاق بأخذ 1 مل من كل عينة وإضافة 1 مل من OPA و تركها لمدة دقيقة واحدة ثم حقنها يدوياً بجهاز HPLC.

4 .4. تحضير السلسة المعيارية للأرجينين: تم تحضير خمسة محاليل من المادة العيارية للأرجنين بتراكيز بين (18 µM/mL–72 µM/mL) في الماء المقطر. تم تحضير كل تركيز ثلاث مرات ثم قيست مساحات سطوح القمم الناتجة عن المحاليل بعد اشتقاقها بالـOPA وحسبت القيمة المتوسطة لهذه المساحات ثم مثلت العلاقة بين متوسط المساحات والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً.

النتائج والمناقشة:

في البداية تم دراسة مجموعة من المتممات الغذائية الحاوية على بروتين أو كرياتين والمستخدمة بشكل غير شرعي في النوادي الرياضية ومن ثم تم التركيز على مجموعة من المستحضرات الصيدلية الحاوية فقط على الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو بشكل متممات غذائية مباعة في الصيدليات أو في النوادي الرياضية.

1. المتممات الغذائية الحاوية على البروتين والكرياتين:

تم الحصول على هذه العينات من مجموعة من النوادي الرياضية والتي تبيعها بشكل غير شرعي. تم تحديد المحتوى في هذه العينات باختبار كلدال حيث تم حساب نسبة الآزوت العام في العينات المدروسة بعد إجراء الاختبار بالطريقة الحسابية التالية (AOAC, 2000):

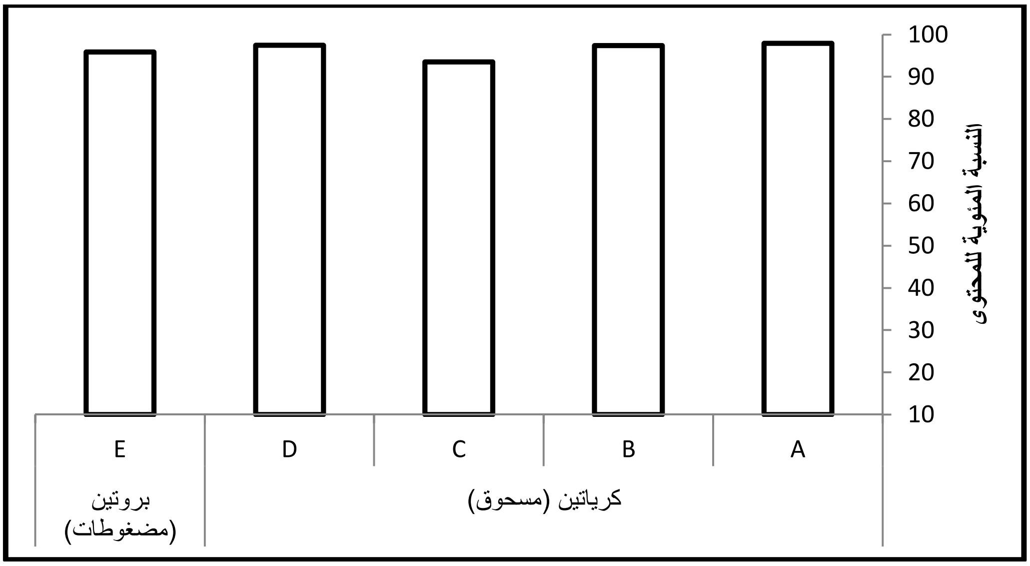
$$N_t\% = (0.0014 * V * 100) / W$$

حيث إن: $N_t\%$ هي النسبة المئوية للآزوت العام في العينة, V هي الحجم المستهلك من Hcl (0.1N) في المعايرة, W هي وزن العينة مقدراً بالغرام.

تم حساب نسبة البروتين المئوية في العينة الحاوية على بروتين بالطريقة التالية:

$$P_t\% = N_t\% * 6.25$$

طبقت الطريقة الحسابية السابقة في حالة العينات الحاوية على البروتين أما العينات الحاوية على الكرياتين فتم تحديد المحتوى بالاعتماد على نسبة الآزوت في الكرياتين 32.01% وتمت مقارنة النتيجة التي تم الحصول عليها مع ما هو مصرح على العبوة, فكانت النسبة المئوية للمحتوى في العينات المدروسة موضحة في الشكل 1.

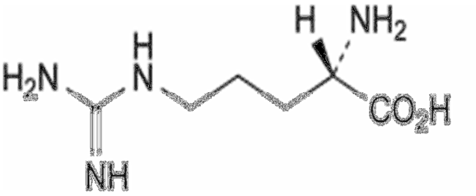


الشكل (1) يبين النسبة المئوية للمحتوى في بعض العينات التجارية المباعة بشكل غير شرعي في النوادي الرياضية والحاوية على بروتين أو كرياتين باستخدام اختبار كلدال

تراوحت النسبة المئوية للمحتوى من البروتين أو الكرياتين في العينات المدروسة بين (93-98%) وبالتالي فهي متوافقة مع متطلبات الدستور الأوروبي بالنسبة للمحتوى في المساحيق والمضغوطات (85-115%).

2. العينات الحاوية على الأرجينين

الأرجينين مسحوق أبيض بلوري أو بشكل بلورات عديمة اللون, ذواب بسهولة بالماء وقليل الذوبان في الكحول, صيغته العامة $C_6H_{14}N_4O_2$ موضحة في الشكل (2) (European Pharmacopeia 5.0, 2005), يعد من الناحية الغذائية من الأحماض الأمينية شبه الأساسية عند الأطفال وغير الأساسية عند البالغين, يستخدم دوائياً في معالجة ارتفاع الكولسترول وتحسين الاستجابة المناعية ضد الجراثيم والفيروسات والخلايا السرطانية, كما أنه يحرض على إفراز هرمون النمو وله أهمية في الحفاظ على التوازن الآزوتي ضمن الجسم.(Hess., 2004), و يعد طليعة لاصطناع البروتينات, اصطناع أوكسيد الآزوت, اليوريا وعديدات الأمين (Wu G et al., 1998) .



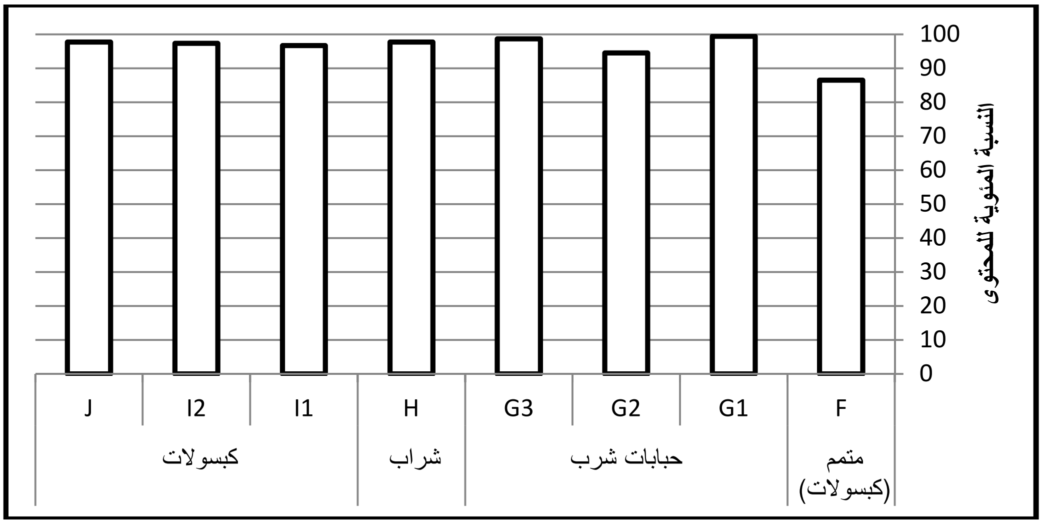
الشكل (2) يوضح الصيغة العامة للأرجينين

تم دراسة العينات الحاوية في تركيبها على الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو كمتممات غذائية بأشكال صيدلية متعددة (حبابات شرب, شراب, كبسولات). تم مقارنة الأدوية بين شركات مختلفة ومن طبخات مختلفة. أيضا تم دراسة الأرجنين في مستحضر صيدلاني /كبسولات/ والمعد للاستخدام كمتمم غذائي والمباع في النوادي الرياضية بشكل غير شرعي لكن للأسف لم نتمكن من الحصول إلا على عينة من هذا المتمم الغذائي.

تم تحديد المحتوى في هذه العينات بثلاث طرائق مختلفة ومقارنة النتائج مع المتطلبات الدستورية حيث إن دستور الأدوية البريطاني يتطلب أن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الأشكال الفموية السائلة الحاوية على الأرجينين بين (95-105%), بينما يتطلب الدستور الأميركي بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الكبسولات الحاوية على الأرجينين بين (90-110%).

2 ,1. اختبار كلدال

تم حساب نسبة الآزوت العام في العينات المدروسة بعد إجراء اختبار كلدال بالاعتماد على نسبة الآزوت في الأرجينين 32.18% وتمت مقارنة النتيجة التي تم الحصول عليها مع ما هو مصرح على العبوة, فكانت النسبة المئوية للمحتوى في العينات المدروسة موضحة في الشكل 3.

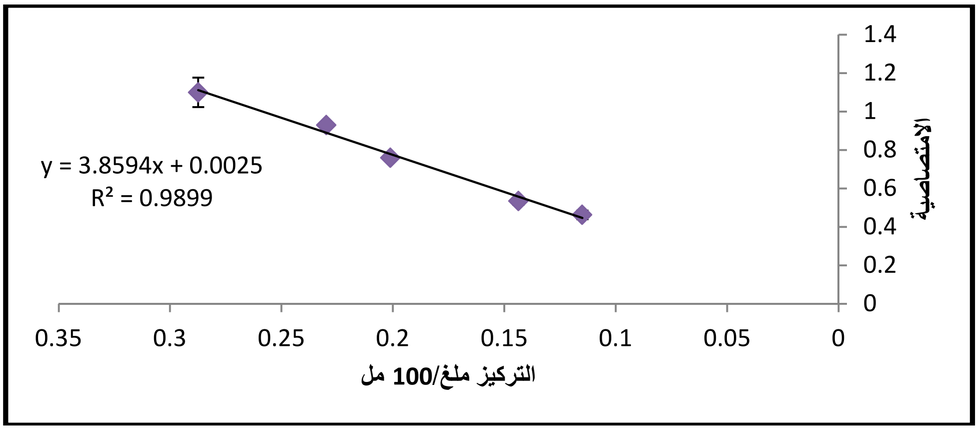


الشكل (3) يبين النسبة المئوية للأرجينين في العينات المدروسة باستخدام اختبار كلدال

نلاحظ أن النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في المستحضرات الدوائية المدروسة أكبر من 94% بالنسبة للأشكال الفموية السائلة وأكبر من96% بالنسبة للكبسولات وبالتالي فهي متوافقة مع المتطلبات الدستورية, أما فيما يتعلق بالمتمم الغذائي والذي هو على شكل كبسولات كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى أقل من 90% وبالتالي فهي غير متوافقة مع المتطلبات الدستورية.

2 ,2. طريقة النينهيدرين

بداية تم التأكد من تكرارية الطريقة من خلال تحضير محلول تركيزه (0.2 ميكرومول/ مل) واشتقاقه بالنينهيدرين كما ذكر سابقاً وتكرار التجربة ست مرات وحساب متوسط الامتصاصيات فكانت قيمة الانحراف المعياري النسبي للامتصاصية مساوية 0.49% مما يدل على تكرارية الطريقة, ثم تم تحضير السلسلة العيارية للأرجينين بتراكيز بين 0.1-0.3 ميكرو مول/مل وقيست الامتصاصيات كما ذكر سابقاً في الطريقة (3) ثم مثلت العلاقة بين متوسط الامتصاصيات والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً كما هو موضح في الشكل (4).



الشكل (4) يوضح السلسلة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق بالنينهيدرين
وقياس الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 570 nm

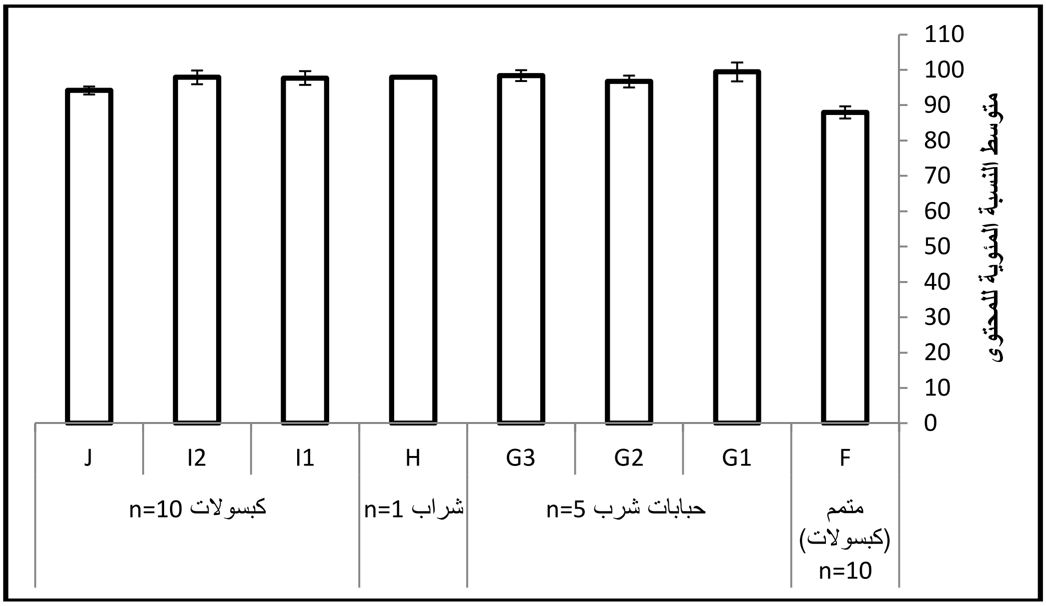
استناداً إلى الخط المستقيم الذي تم الحصول عليه في الشكل(4) كانت معادلة المستقيم:

$$Y=3.8594X + 0.0025$$

حيث: Y تعبر عن الامتصاصية, X تعبر عن التراكيز بالميكرومول /مل.

و كانت قيمة R^2 تساوي (0.9899), مما يدل على أن الخطية محققة ضمن المجال المدروس.

تم إجراء تفاعل الاشتقاق لجميع العينات بعد تحضيرها ثم قيست الامتصاصيات باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 570 nm وبإسقاط الامتصاصية في معادلة المستقيم الناتجة عن السلسلة العيارية, تم حساب كمية الأرجينين في العينات المدروسة و مقارنة النتيجة التي تم الحصول عليها مع ما هو مصرح على العبوة, فكان متوسط النسبة المئوية للمحتوى في العينات المدروسة موضحاً في الشكل 5.



الشكل (5) يبين متوسط النسبة المئوية للأرجينين في العينات المدروسة باستخدام طريقة النينهيدرين. n يمثل حجم العينة

نلاحظ أن متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في المستحضرات الدوائية المدروسة أكبر من 95% بالنسبة للأشكال الفموية السائلة وأكبر من92% بالنسبة للكبسولات وبالتالي فهي متوافقة مع المتطلبات الدستورية, أما فيما يتعلق بالمتمم الغذائي فكان متوسط النسبة المئوية للمحتوى أقل من 90% وبالتالي فهي غير متوافقة مع المتطلبات الدستورية.

2 .3. طريقة HPLC

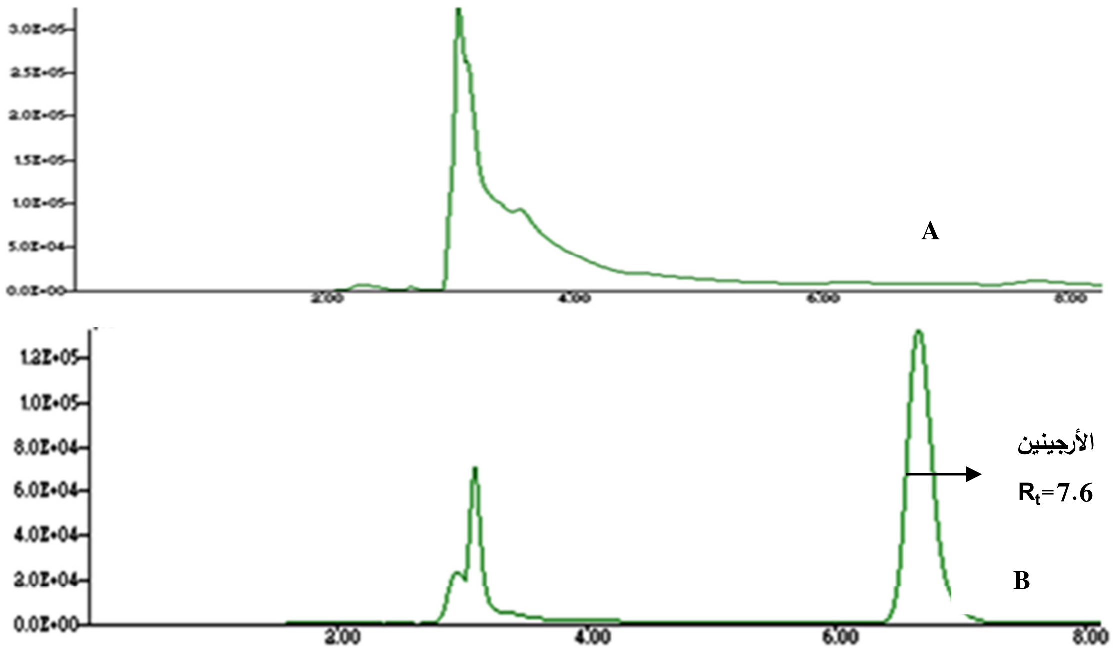
كما ذكرنا سابقاً في الطرائق, فقد استخدمنا تقنية الـHPLC باستخدام كاشف الفلورة بعد الاشتقاق بـOPA في التحديد الكيفي والكمي للأرجينين في العينات التجارية المدروسة. في البداية تم إيجاد الشروط المناسبة لتحليل الأرجينين ومن تم تطبيق الطريقة على العينات التجارية.

2 , 3 , 1. تحديد الطور المتحرك

تم استخدام طور متحرك مكون من وقاء السيترات واسيتونتريل. في البداية تم اختبار نسب مختلفة من اسيتونتريل وتحديد زمن الاحتباس الموافق لها ومن ثم تم تغيير طبيعة الطور العضوي حيث استبدل الاسيتونتريل بالميتانول عند النسبة (25:75) ومقارنة زمن الاحتباس (جدول 4). تم اختيار الطور المتحرك المكون من اسيتونتريل: وقاء السيترات بنسبة (20:80) والشكل 6 يوضح كروماتوغرام لحقن عينة من الأرجينين العياري بعد اشتقاقه بـOPA .

الجدول (4) يوضح النسب المختلفة من (وقاء السيترات: طور عضوي) التي تمت دراستها وزمن الاحتباس المرافق لها

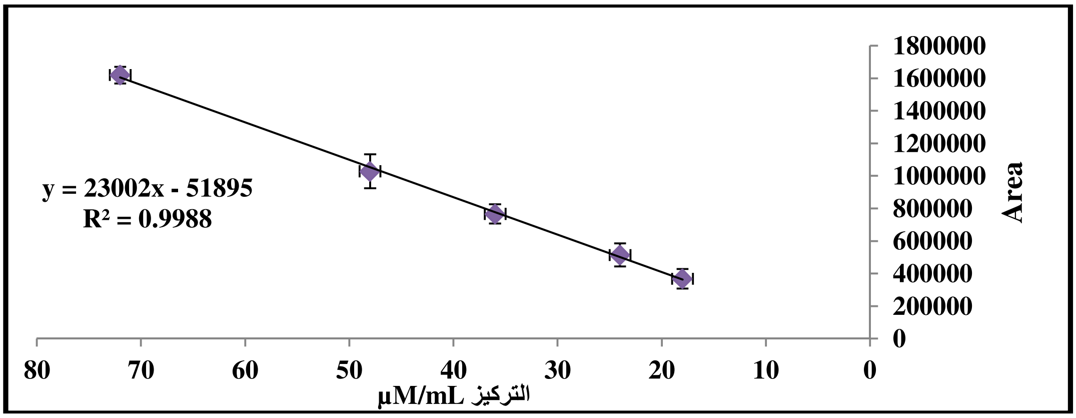
نسبة (وقاء السيترات :الطور العضوي)		زمن الاحتباس (min)
اسيتونتريل	25:75	3
	20:80	7.2
	15:85	16.6
ميتانول	25:75	33.3



الشكل (6) A: يوضح كروماتوغرم OPA بعد حقنه بجهاز الـHPLC
B: يوضح كروماتوغرام الأرجينين العياري بعد اشتقاقه باستخدام OPA وحقنه بجهاز الـHPLC والكشف باستخدام مقياس الفلورة

2 ، 3 ، 2. التحديد الكمي للأرجينين في العينات المدروسة

بداية تم التأكد من تكرارية الطريقة من خلال تحضير محلول تركيزه (72ميكرومول/ مل) واشتقاقه بالـOPAثم حقنه بجهاز HPLC وقياس مساحة القمة الناتجة بعد الكشف بالفلورة كما ذكر سابقاً وتكرار التجربة خمس مرات وحسبت القيمة المتوسطة لمساحات القمم الناتجة فكانت قيمة الانحراف المعياري النسبي للمساحة مساوية 0.55% مما يدل على تكرارية الطريقة, ثم تم تحضير السلسة العيارية للأرجينين بتراكيز بين 72-18 ميكرو مول/ مل تم إجراء تفاعل قبل العمود وقيست مساحات القمم بعد الكشف بمقياس الفلورة عند طول موجة امتصاص (Excitation) 340nm وطول موجة إصدار(Emission) 470nm كما ذكر سابقاً ثم مثلت العلاقة بين متوسط مساحات القمم والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً الشكل (7)



الشكل (7) يوضح السلسة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق باستخدام OPA وحقنه بجهاز HPLC وحساب مساحة القمم الناتجة بعد الكشف بمقياس الفلورة

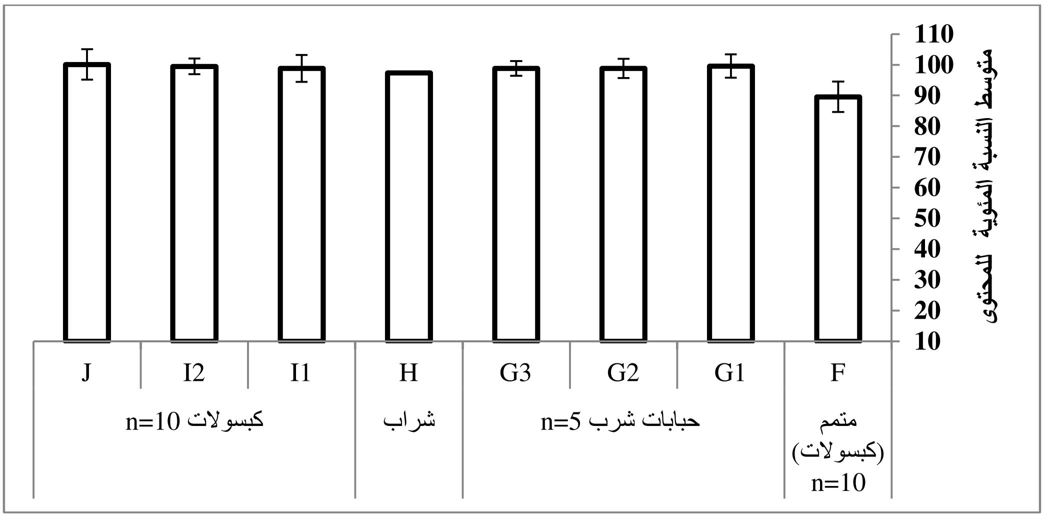
استناداً إلى الخط المستقيم الذي تم الحصول عليه في الشكل(7) كانت معادلة المستقيم:

$$Y=23002X- 51895$$

حيث: Y تعبر عن مساحة القمة, X تعبر عن التراكيز بالميكرومول /مل.

و كانت قيمة R^2 تساوي (0.9988), مما يدل على أن الخطية محققة ضمن المجال المدروس.

تم حقن العينات بعد تحضيرها بنفس الشروط الموضحة مسبقاً فكانت النتيجة مطابقة كروماتوغرامات المستحضرات التجارية للكروماتوغرام العياري مما يدل على وجود الحمض الأميني الأرجينين في العينات. ثم قيست مساحات القمم الناتجة وبإسقاط مساحة القمم الناتجة في معادلة المستقيم الناتجة عن السلسلة العيارية, تم حساب كمية الأرجينين في العينات المدروسة و مقارنة النتيجة التي تم الحصول عليها مع ما هو مصرح على العبوة, فكان متوسط النسبة المئوية للمحتوى موضحاً في الشكل 8.



الشكل (8) يبين متوسط النسبة المئوية للأرجينين في العينات المدروسة

باستخدام طريقة HPLC بعد الاشتقاق باستخدام OPA والكشف بمقياس الفلورة. n يمثل حجم العينة

نلاحظ أن متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في المستحضرات الدوائية المدروسة أكبر من 95% بالنسبة للأشكال الفموية السائلة وأكبر من94% بالنسبة للكبسولات وبالتالي فهي متوافقة مع المتطلبات الدستورية, أما فيما يتعلق بالمتمم الغذائي كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى أقل من 90% وبالتالي فهي غير متوافقة مع المتطلبات الدستورية.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات

-تم في هذا البحث تحديد المحتوى لبعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على الأرجينين, وكذلك لبعض العينات المتوفرة الحاوية على كرياتين وبروتين.

- تم الاعتماد على المرجعيات العالمية ومتطلبات دساتير الأدوية العالمية لدراسة جودة هذه المستحضرات من

حيث:

- التحديد الكمي للكرياتين والبروتين في العينات الحاوية عليها.
- التأكد من وجود الأرجينين في جميع العينات المدروسة الحاوية عليه.
- التحديد الكمي للأرجينين في جميع العينات المدروسة.

– تم تطبيق اختبار كلدال على المستحضرات الحاوية على الكرياتين والبروتين فكانت النسبة المئوية للمحتوى (%98-93) وهي مطابقة لما يتطلبه الدستور الأوروبي بالنسبة للمساحيق والمضغوطات.

– تم تطبيق ثلاث طرائق للتحديد الكمي للأرجينين في مستحضراته المتوفرة وهي طريقة كيلدال, الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي بعد الاشتقاق بالنينهيدرين وكذلك باستخدام HPLC بعد الاشتقاق قبل العمود باستخدام أورتوفتال دي الدهيد والكشف بمقياس الفلورة, لم يلاحظ وجود اختلافات هامة في النتائج بين الطرائق الثلاث المستخدمة, فقد كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى في المستحضرات الحاوية على الأرجينين المستخدمة دوائياً والمصنعة محلياً:

- بطريقة كيلدال: في الأشكال الصيدلية السائلة (%100-95), في الكبسولات (%98-96).
- بالكشف ضمن مجال الأشعة المرئية: في الأشكال الصيدلية السائلة (%100-96), في الكبسولات (%98-94).
- باستخدامHPLC في الأشكال الصيدلية السائلة (%100-97), في الكبسولات (%100-96).

–أما الكبسولات المهربة الحاوية على الأرجينين والمستخدمة كمتمم غذائي فكان متوسط النسبة المئوية للمحتوى:

- طريقة كلدال: %86.
- الكشف في مجال الأشعة المرئية:%88 .
- باستخدام HPLC: %89.

جميع النتائج بما يخص المستحضرات المستخدمة دوائياً كانت موافقة لمتطلبات دساتير الأدوية وهذا ما يتطابق مع النتيجة التي حصل عليها العالم Hess عام 2004 عند قيامه بالتحديد الكمي للأرجينين في أشكاله الصيدلية المدروسة (مضغوطات وكبسولات) حيث وجد أن النسبة المئوية للمحتوى تتراوح بين %110-90 من الكمية المصرح عنها وهي تتوافق مع متطلبات دستور الأدوية الأمريكي, أما الكبسولات المهربة الحاوية على الأرجينين والمستخدمة كمتمم غذائي فقد خالفت متطلبات الدستور فيما يتعلق بالتحديد الكمي لها.

التوصيات

–يوصى بضرورة إجراء فحوص مراقبة الجودة وذلك وفقاً لما تتطلبه دساتير الأدوية والمراجع العالمية للمستحضرات المستخدمة دوائياً أو كمتممات غذائية والمتوفرة في السوق المحلية للتأكد من مدى تحقيقها للفائدة المرجوة منها.

–متابعة الدراسة على المستحضرات الأخرى المتوفرة محلياً والحاوية في تركيبها أحماضاً أمينية مختلفة.

–دراسة التوافر الحيوي لهذه المستحضرات في الأوساط الحيوية.

–التأكد من تطبيق التشريعات والقرارات الناظمة لوجود الدواء والمتممات الغذائية في السوق المحلية ومكافحة عمليات التهريب.

–ضرورة توعية المواطن للمخاطر الصحية التي تنجم عن المستحضرات المهربة حيث إنها مجهولة المصدر فقد تكون متخربة أو مزورة.

المراجع:

1. AOAC International, *Official Methods of Analysis*, 17th ed., AOAC International, Arlington, VA, 2000.
2. BELTIZ. H.D.; GROSCH. W.; SCHIEBERLE. P. *Food Chemistry*. 4th revised and extended . Springer, Germany, 2009, 8-89.
3. BEMBEN. MG.; LAMONT. HS. *Creatine supplementation and exercise performance: recent findings*. Sports Med, (35) 2005 , 107-25.
4. British Pharmacopoeia Volume III , 2012.
5. European pharmacopoeia, the Council of Europe, 2005.
6. FRIEDMAN, M. *Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences.* Journal of Agricultural and food chemistry, (52) 2004, 385–406.
7. GATTI, R.; GIOIA. M. G.; ANDREATTA. P.; PENTASSUGLIA. G. *HPLC-fluorescence determination of amino acids in pharmaceuticals after pre-column derivatization with phanquinone*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (35) 2004, 339-348.
8. HESS, B.; SHERMA, J., *Quantification of arginine in dietary supplement tablets and capsules by* silica gel high performance thin layer chromatography with visible mode densitometery. Acta Chromatographica (14) 2004, 60-69.
9. JANGID. P.; MALIK. P.; SINGH. P.; SHARMA. M.; GULIA. D. A, *Comparative study of efficacy of L-5-hydroxytryptophan and fluoxetine in patients presenting with first depressive episode.* Asian Journal of Psychiatry, (6) 2013, 29-34.
10. MOLNAR-PERL. I, *Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH- group-containing additives.* Journal of chromatography A, (913) 2001, 283-302.
11. MURRAY. R. K.; BENDER. D. A.; BOTHAM. K. M.; KENNELLY. P.G.; RODWELL. V. W.; WEIL. P. A. *Harper's Illustrated Biochemistry.* 28^{th} edition, The McGraw-Hill Companies, USA, 2009.
12. SUN. W. S.; LINA. CH. Y.; WENGA. M. Y.; CHEN. J.M. *Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification.* Journal of Food Composition and Analysis ,(19) 2006, 112–117.
13. TCHERKAS, V. Y.; KARTSOVA. A. L.; KRASNOVA. N. I. *Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* Journal of Chromatography A, (913) 2001, 303–308.
14. The United States Pharmacopeia: National Formulary, 2007**.**
15. WILLIAMS, M. *Dietary Supplements and Sports Performance: Amino Acids.* Journal of the International Society of Sports Nutrition, (2) 2005, 63-67.
16. WU. G.; MORRIS. SM. JR. *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.* Journal of Biochemistry, (336) 1998, 1-17.
17. تقارير وزارة الصحة ومديرية الرقابة الدوائية السورية عام 2004,2005.