

تحري وجود السيبترامين في المستحضرات النباتية المُنحفة المنتشرة في السوق المحليّة باستخدام تقنيّتي الـTLC و الـHPLC

الدكتور محمد هارون*

الدكتورة عزيزة إبراهيم يوسف**

نعمى علي حيدر***

(تاريخ الإيداع 24 / 11 / 2015 . قُبِلَ للنشر في 14 / 1 / 2016)

□ ملخّص □

تُشكّل المستحضرات المُنحفة أكثر المستحضرات النباتيّة انتشاراً في العالم وسوريا على حدٍ سواء، وتسوّق على أنّها مستحضرات طبيعيّة 100%، يتم الحصول عليها من مصادر مختلفة بدون وصفة طبيّة، وبالتالي تكون في كثير من الحالات غير خاضعة لأي رقابة دوائيّة، مما يجعل منها مشكلة صحيّة واقتصاديّة تُهدد بلدان العالم ولا سيما النامية منها التي تفقر عادةً إلى القوانين الناظمة لبيع وتداول هذه المستحضرات. تمّ جمع 20 عينة من المستحضرات النباتيّة المُنحفة المنتشرة في السوق المحليّة، حيث قُسمت إلى عينات مُصنّعة محلياً (8 عينات) وأخرى متواجدة بشكل غير شرعي (12 عينة)، أُجري اختبار التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم Labelling على جميع العينات ، ثم فُحصت بتقنيّتي الطبقة الرقيقة (Thin layer chromatography TLC) و الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High performance liquid chromatography HPLC) للتأكد من عدم وجود السيبترامين، إذ استخدم في الـ TLC الميثانول/ تولوين (9:1) كطور متحرك، أما بالـ HPLC استخدم الاسيتونتريل/ وقاء فوسفاتي pH=5.5 (30:70) كطور متحرك، العمود BDS Hypersil C18، معدل التدفق 0.5 مل/دقيقة عند طول موجة 225nm، وحجم الحقنة 20 ميكروليتر. أظهرت النتائج أن جميع العينات المُصنّعة محلياً مطابقة للدستور الأميركي USP30 والـ GMP من حيث الغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم والنشرة الداخلية، باستثناء عينة واحدة مُخالفة، أما المتواجدة بشكل غير شرعي، كانت جميع العينات مُطابقة للدستور والـ GMP باستثناء 6 مخالفة، أما فيما يتعلق بفحص العينات بالـ TLC و HPLC فتبيّن وجود السيبترامين في 3 عينات مُصنّعة محلياً من أصل 8، وتراوحت كميته بين (8-10) ملغ/الكبسولة، في حين احتوت جميع العينات غير الشرعيّة على مادة السيبترامين وتراوحت كميته بين (5-26) ملغ/الكبسولة الواحدة.

الكلمات المفتاحية: السيبترامين، المستحضرات النباتية المُنحفة، التديليس الدوائي، TLC، HPLC.

*مدرس - قسم الكيمياء الصيدليّة والمراقبة الدوائيّة - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقيّة - سورية.

**أستاذة - قسم العقاقير - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقيّة - سورية.

***طالبة دراسات عليا - قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدليّة - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقيّة - سورية.

Determination of Sibutramine in herbal slimming products available in local market by TLC and HPLC

Dr. Mohammad Haroun*
Dr. Aziza Yousef**
Noma Haider***

(Received 24 / 11 / 2015. Accepted 14 / 1 / 2016)

□ ABSTRACT □

Herbal slimming products are one of the most wide spreading herbal products in many countries around the world and in Syria as well, they are often advertised to contain purely natural ingredients. These products are provided by various sources and they are available over the counter, therefore, in most cases, they are not under quality control. Such these quality-uncontrolled products are considered a health and economic issue facing many countries in the world especially undeveloped countries which usually lack for regulation rules governing herbal products trading.

In this study, 20 samples have been collected from the herbal slimming products available in the local market. At the beginning, these samples have been divided into locally manufactured samples (8 samples) and illegal samples (12 samples). The packaging and labeling test has been applied to all samples. Later on, these samples have been tested with TLC and HPLC to make sure they are free of Sibutramine, using in TLC Methanol/Toluene (1:9) as a mobile phase, and in HPLC Acetonitrile/phosphate buffer pH=5.5 (70:30) as a mobile phase, column BDS Hypersil C18, flow rate 0.5 ml/min and wavelength 225nm.

The results of packaging and labeling test revealed that all of the locally manufactured samples are matching to the American pharmacopoeia USP30 and GMP in terms of packaging, labeling and internal leaf sheets with exception for one sample. As for illegal samples, all of them matched the pharmacopoeia and GMP with exception for 6 samples. With regards to testing the samples using TLC and HPLC, results indicated that 3 samples out of 8 locally manufactured samples contained Sibutramine with amount ranging between (8- 10) mg/capsule, while all illegal samples contained Sibutramine with amount ranging between (5-26) mg/capsule.

Key wards: Sibutramine, herbal slimming products, Adulteration, TLC, HPLC.

* Assistant Professor, Pharmaceutical chemistry and drugs quality control Department. Faculty of Pharmacy. Tishreen University, Syria.

** Professor in pharmacognosy Department. Faculty of Pharmacy. Tishreen University, Syria

*** Postgraduate student , pharmaceutics and pharmaceutical Technology Department. Faculty of Pharmacy. Tishreen University, Syria.

مقدمة:

زاد استخدام المستحضرات النباتية في الآونة الأخيرة بشكل كبير كبديل لبعض الأدوية الكيميائية أو كتممات غذائية، يعود ذلك إلى كونها من مكونات نباتية طبيعية ولا تملك أي آثار جانبية [7]، وتُشكل المستحضرات النباتية المنحفة والخافضة للوزن أكثرها انتشاراً بسبب رغبة الكثيرين في الحصول على وزن صحي ومثالي خلال فترة زمنية قصيرة [8].

يُعدّ التدليس الدوائي المشكلة الأبرز فيما يتعلق بسلامة هذه المستحضرات، ويعرّف بأنه إضافة مواد كيميائية إلى المستحضرات النباتية الطبيعية بشكل غير شرعي وغير مُصرّح عنه بهدف زيادة فعاليتها، مما ينتج عنه العديد من الآثار الجانبية الخطيرة. [2,4,6,11]

يتم تدليس المستحضرات النباتية المنحفة بعدد كبير من المواد الكيميائية، وتعتبر مادة السيبرترامين الأكثر استخداماً نظراً لفعاليتها العالية في كبح الشهية وخفض الوزن [1]، حيث أنه يُنبط إعادة النقاط الناقل العصبية (السيروتونين، الأدرينالين، والدوبامين) في الشقوق المشبكية في الدماغ مما يؤدي إلى زيادة الإحساس بالشبع [10]، استخدم سابقاً في علاج البدانة إلا أن مخاطره المتمثلة بإحداثه اضطرابات قلبية وعائية أدت إلى سحبه من السوق الدوائية في العام 2010. [3]

يُعدّ السيبرترامين أمين ثالثي، يكون بشكل أساس مُتسرد، ويستخدم بشكل ملح هيدروكلورايد مونوهيدرات، كان متوفراً بشكل كبسولات بعبوات ثلاثة 10,15,20 ملغ/الكبسولة، حيث إن 10 ملغ من السيبرترامين هيدروكلورايد مونوهيدرات تعادل حوالي 8.47 ملغ من السيبرترامين أساس، وتعادل 15 ملغ من السيبرترامين هيدروكلورايد مونوهيدرات حوالي 12,55 ملغ من السيبرترامين أساس [14].

تهدف هذه الدراسة إلى الكشف عن وجود هذه المادة في المستحضرات والخلطات النباتية المنحفة المنتشرة في السوق المحلية (المصنعة محلياً وغير الشرعية)، وتحديد مقاديرها في حال وجودها، باستخدام تقنيتي الـ TLC، الـ HPLC.

طرائق البحث ومواد:**1.1. المواد والأدوات:****■ المواد:**

يُبين الجدول رقم (1) المواد المستخدمة لإجراء هذا البحث مع بلد المنشأ لكل منها، كما تم تحضير المحاليل والوقاءات التالية:

- ✓ محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.2M
- أخذ 0.8 غ من هيدروكسيد الصوديوم، وحُلّت في 100 مل ماء مقطر.
- ✓ محلول فوسفات أحادية البوتاسيوم 0.2M
- أخذ 2.722 غ من فوسفات أحادية البوتاسيوم، وحُلّت في 100 مل ماء مقطر.
- ✓ محلول بيفتالات البوتاسيوم 0.2M
- أخذ 4.085 غ من بيفتالات البوتاسيوم، وحُلّت في 100 مل ماء مقطر.
- ✓ وقاء فوسفات الصوديوم pH=7

أخذ 6.25 مل من محلول فوسفات أحادية البوتاسيوم 0.2M و 3.63 مل من محلول NaoH 0.2M في بالون معايرة سعة 25 مل، وتم الإكمال حتى خط العيار بالماء المقطر.

✓ وقاء بيفتالات البوتاسيوم pH=4.4

أخذ 6.25 مل من محلول فوسفات أحادية البوتاسيوم 0.2M و 0.825 مل من محلول NaoH 0.2M في بالون معايرة سعة 25 مل، وتم الإكمال حتى خط العيار بالماء المقطر.

✓ وقاء فوسفات أحادية البوتاسيوم pH=5.8

أخذ 250 مل من محلول فوسفات أحادية البوتاسيوم 0.2M و 18 مل من محلول NaoH 0.2M في بالون معايرة سعة 1000 مل ثم تم الإكمال حتى خط العيار بالماء المقطر.

الجدول رقم (1): يبين أهم المواد المستخدمة في الدراسة

المصدر	اسم المادة
إنتاج معمل آسيا 2009	كبسولات ريداكت عيار 10 ملغ
Eurolob, UK	كلوروفورم Chloroform
Merck, Germany	ميثانول Methanol
Alpha Chemika	اسيتونتريل Acetonitrile
Merck, Germany	تولوين Toluene
Merck, Germany	بيفتالات البوتاسيوم Potassium biphthalate
Merck, Germany	كربونات الصوديوم Sodium carbonate
BDH, China	ماءات الصوديوم Sodium hydroxide
Merck, Germany	فوسفات أحادية البوتاسيوم Potassium phosphate, Monobasic
-----	ماء مقطر

■ الأدوات:

تم استخدام الأجهزة الموضحة في الجدول رقم (2) الموجودة في مخبر العقاقير والبحث العلمي في كلية الصيدلة-جامعة تشرين.

الجدول رقم (2): يبين الأجهزة المستخدمة في الدراسة

المواصفات	الجهاز
Sension3	مقياس الـ pH meter
Labofuge 200, Heraeus	مُثَقَلَة
Bandelin Sanorex digital	جهاز حل بالأمواف فوق الصوتية Ultrasonic bath

Jasco v-530 UV	مقياس الطيف الضوئي UV-Spectrophotometer
زجاجية 10*20	صفائح TLC
مضخة نوع Jasco Pu-2089 Plus	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC
الكاشف Jasco Fp-2020 Plus	
من نوع BDS Hypersil C18, 250*4.6 أبعاد الجزيئات 5µm الكاشف: UV	
Software: Borwin	
Precisa XB 220 A	ميزان حساس ذو حساسية 0.0001

1.2. الطرائق المستخدمة:

1.2.1. جمع العينات:

استخدمت في هذه الدراسة 20 عينة من المستحضرات والخلطات النباتية المنحفة المنتشرة في السوق المحلية، سواء كانت مصنعة محلياً أو متواجدة بشكل غير شرعي (مهزبة، مقلدة).

فُسمت العينات إلى:

الجدول رقم (3): يبين تقسيم عينات الدراسة

عينات متواجدة بشكل غير شرعي	عينات مصنعة محلياً
9	8
3	

1. مصنعة محلياً وبلغ عددها (8 عينات)

1. متواجدة بشكل غير شرعي والتي فُسمت بدورها

إلى:

✓ مهزبة (9 عينات)

✓ مقلدة (3 عينات)

1.2.2. فحص التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم Labelling: [14]

تتطلب دساتير الأدوية وقواعد التصنيع الجيد GMP وجود لصاقة توسيم على العبوة مع نشرة تعليمات داخلية،

يجب أن تحوي **لصاقة التوسيم** على المعلومات التالية:

- ✓ اسم المنتج الصيدلاني
- ✓ اسم المكون الفعال
- ✓ كمية المكون الفعال في كل قرص وعدد الأقراص في العبوة
- ✓ تاريخ الإنتاج وتاريخ انتهاء الفعالية ورقم الطبخة
- ✓ شروط التخزين أو أي تحذيرات تتعلق بتخزين الشكل الصيدلاني
- ✓ توجيهات الاستعمال والتحذيرات

- ✓ اسم وعنوان المصنع المُنتج للشكل الصيدلاني
- ✓ كذلك يجب أن تحوي نشرة التعليمات الداخلية على المعلومات التالية:
- ✓ اسم الشكل الصيدلاني ونوعه
- ✓ المادة الفعّالة: تركيبها، كمّيّتها في القرص الواحد ومعلومات عنها
- ✓ معلومات عن الاستطبابات وطريقة الاستعمال والجرعة
- ✓ مُضادات الاستطباب ومحاذير الاستعمال
- ✓ الآثار الجانبية
- ✓ تاريخ الإنتاج والانتها
- ✓ اسم المصنع ورقم الطبخة

1.2.3. تحري وجود السيوترامين في العينات:

1.2.3.1. تحضير العياري والسلسلة العياريّة السيوترامين: [13,15]

1. تحضير العياري:

نظراً لعدم توفر مادة عياريّة للسيوترامين الشكل رقم (1)، حُضِرَ محلول عياري من خلال استخلاصه من كبسولات الريداكت عيار (10 ملغ)، وذلك اعتماداً على الخصائص الكيمائيّة للسيوترامين الجدول رقم (5)، وخصائص السواغات الداخلة في تركيب الكبسولات، الجدول رقم (4)، حيث تمّ استخلاص الشكل الحر للسيوترامين، وفق مايلي:

إفراغ محتوى 5 كبسولات من الريداكت (10ملغ) في بيشر سعة (100مل)، ثم إضافة (50مل) ماء مقطر تثفيل المحلول السابق بسرعة (3000 دورة/دقيقة) ولمدة 15 دقيقة (للتخلص من السواغات غير المنحلة في الماء)، ثم أخذ المحلول المائي الطافي الحاوي على السيوترامين بشكله الملحي (هيدروكلورايد مونوهيدرات) قياس pH المحلول السابق وكان الوسط حمضي $pH=5$ قلونة المحلول السابق باستخدام كربونات الصوديوم، حتى تحول الوسط إلى قلوي $pH=11$ (لتحويل السيوترامين من شكله الملحي إلى شكله الحر)، ثم رُشِحَ المحلول استخلاص المحلول المائي السابق بـ (50مل) كلوروفورم (استخلاص سائل/سائل)، وذلك للحصول على السيوترامين بشكله الحر

أُخذت الطبقة الكلوروفورمية السفليّة في بيشر نظيف، جاف وموزون بدقة (وزن البيشر=51.242غ)

تبخير الكلوروفورم بشكل كامل

وُزن البيشر بعد التبخير (وزن البيشر بعد التبخير = 51.247غ)، وحُسِبَ الفرق بين الوزنين والذي يمثل

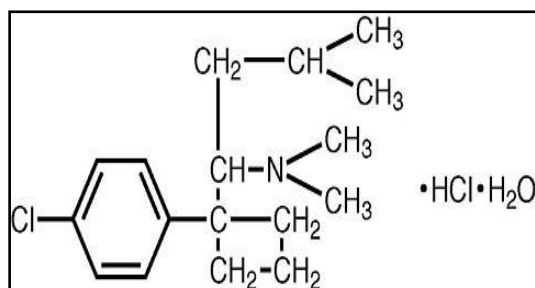
وزن السيوترامين الناتج عن عملية الاستخلاص

تم التأكد من ذاتية المركب الناتج عن عملية الاستخلاص من خلال:

1. تحديد درجة الانصهار (الدرجة المرجعيّة $192^{\circ}C-191^{\circ}C$).

2. حلّ الراسب بـ (10مل) ميثانول ورسم الطيف باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV ومقارنته مع

الطيف المرجعي للسيوترامين.



الشكل رقم (1): يبين البنية الكيميائية للسبيوترامين

الجدول رقم (4): أهم الخصائص الكيميائية للسواغات الداخلة في تركيب كبسولات الريداكت [15]

الخصائص الكيميائية	اسم السواغ
منحل بالماء وتزداد انحلاليته بزيادة درجة الحرارة غير منحل بالايترانول والكلوروفوم والايتر	Lactose لاكتوز
غير منحل بالماء غير منحل بالكلوروفوم والايتر	سيللوز دقيق التبلور microcrystalline cellulose
الانحلال بالماء (150ملغ/ل في pH=7) غير منحل بالكلوروفوم والايتر	ايروزيل colloidal silicon dioxide
غير منحل بالماء غير منحل بالايترانول والكلوروفوم	شمعات المغنيزيوم magnesium stearate

الجدول رقم (5): أهم الخصائص الكيميائية للسبيوترامين [14]

{N-[1-(4-chloro-phenyl)-cyclobutyl]-4-methyl-butyl}-N-N-dimethyl-amine	الاسم الكيميائي IUPAC name
C17H29CL2NO	الصيغة الجزيئية Molecular formula
279,85 gr/mole	الوزن الجزيئي Molar mass
بودرة كريستالينة بيضاء إلى صفراء اللون	الخواص الفيزيائية Appearance
191 - 192°C	درجة الانصهار melting point
pH= 5.2 و 2,9 mg/ml ذلك في	الانحلالية بالماء solubility in water
منحل بالميتانول بشكل كبير ومنحل بالأستون والاسيتونتريل	الانحلالية بالمحلات العضوية solubility in organic solvent
Octanol/wat=5.73 وذلك في pH=5	معامل التوزع partition coefficient

ii. السلسلة العيارية للسيوترامين (HPLC):

حضرت خمسة تراكيز للسيوترامين (100,80,60,40,20 ميكروغرام/مل)، وقيست مساحات سطوح القمم الناتجة، ثم مُتلت العلاقة بين قيم المساحات وقيم التراكيز بيانياً.

1.2.3.2. تحضير العينات:^[1,9]

تم استخلاص كل عينة (مستحضر نباتي مُنحف) بطريقتين:

i. الاستخلاص مباشرةً بالميتانول (استخلاص الشكل الملحي للسيوترامين):

تم الاستخلاص حسب المراجع وذلك وفق مايلي:

إفراغ محتوى 5 كبسولات من كل مستحضر نباتي مُنحف، وُزن محتوى كل كبسولة على حدا، ثم حُسب

متوسط هذه الأوزان

مُزج محتوى الكبسولات الخمسة بشكل جيد، أُخذ وزن يساوي متوسط الأوزان، نُقل إلى بيشر سعة (100مل)،

وأضيف (10 مل) ميتانول

وُضع البيشر في جهاز حل بالأمواف فوق الصوتية ultrasonic لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة الغرفة 25°C

تثقيل محتوى البيشر السابق بسرعة (3000 دورة/د) ولمدة 10 دقائق

أُخذ (5 مل) من السائل الطافي، نُقل إلى بالون معايرة سعة (10 مل) وتم الإكمال حتى خط العيار

بالميتانول (تمديد)، ورُشح بمراشح 0.45 ميكرون، ثم فُحص بالTLC و الHPLC.

ii. الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم (استخلاص الشكل الحر للسيوترامين):

تم استخلاص العينات بطريقة مماثلة لطريقة استخلاص العياري، وفق الخطوات التالية:

إفراغ محتوى 5 كبسولات من كل مستحضر نباتي مُنحف، وُزن محتوى كل كبسولة على حدا، وحُسب متوسط

هذه الأوزان

مُزج محتوى الكبسولات الخمسة بشكل جيد، أُخذ وزن يساوي متوسط الأوزان ونُقل إلى بيشر سعة (100مل)،

ثم أُضيف (10مل) ماء مقطر

تثقيل محتوى البيشر السابق بسرعة (3000 دورة/د) ولمدة 15 دقائق

أُخذ المحلول المائي الطافي وتم التأكد pH الوسط

فُتونة المحلول السابق باستخدام كربونات الصوديوم، حتى تحول الوسط إلى قلوي (pH=11)، ثم رُشح

المحلول

استخلاص المحلول المائي السابق بـ (10مل) كلوروفورم (استخلاص سائل/سائل)

أُخذت الطبقة الكلوروفورمية السفلية في بيشر نظيف، ثم تم تبخير الكلوروفورم بشكل كامل

حُلّت الرسابة الناتجة عن تبخير الكلوروفورم بـ (10مل) ميتانول، أُخذ منها (5 مل)، نُقلت إلى بالون معايرة

سعة (10 مل)، تم الإكمال حتى خط العيار بالميتانول (تمديد)، رُشحت باستخدام مراشح 0.45 ميكرون، ثم فُحصت

بالTLC و الHPLC

1.2.3.3 الفصل باستخدام الـTLC: [9]

استخدمت صفائح TLC زجاجية أبعادها 10 × 20 cm في الكشف الكيفي عن السيبترامين، وذلك باستخدام التولوين: ميثانول (1:9) كطور متحرك، جُففت الصفائح في الفرن لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 50°C، ثم طبقت على الصفيحة الخلاصات الناتجة عن استخلاص كل من العينات المُصنَّعة محلياً والعينات المتواجدة بشكل غير شرعي، الجدول رقم (6).

الجدول رقم (6): يبين شروط الفصل باستخدام الـTLC

Silica gel F ₂₆₀ 20×10	الطور الساكن
Toluene: Methanol (9:1)	الطور المتحرك
20 min	إشباع حجرة الترحيل بأبخرة الطور المتحرك
In 10	تجفيف الصفيحة قبل تطبيق العينات

1.2.3.4 الفصل باستخدام الـHPLC: [4,5,11]

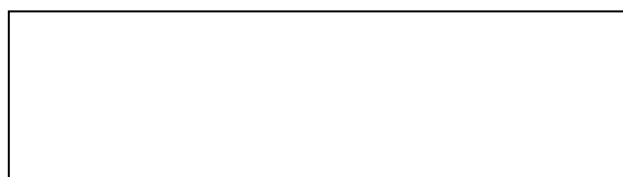
حُقن المحلول العياري الناتج عن عملية الاستخلاص والعينات بجهاز الـ HPLC وفق شروط العمل الموضحة بالجدول رقم (7).

الجدول رقم (7): يبين شروط الفصل بـHPLC

BDS Hypersil C ₁₈ , 250*4.6 أبعاد الجزيئات 5µm	عمود الفصل column
Isocratic: اسيتونتريل/ وقاء فوسفاتي 30:70	الطور المتحرك mobile phase
20 ميكروليتر	حجم الحقنة injection volume
0.5 مل/دقيقة	معدل التدفق flow rate
UV-Spectrophotometer	الكاشف detector
225nm	طول الموجة wavelength

1.2.3.5 التحليل الإحصائي:

لاختبار دلالة الفرق بين المتوسطين الحسابيين بين الطريقتين المستخدمتين في الدراسة (الاستخلاص بالميتانول، الاستخلاص سائل/سائل بالكولوروفورم)، تم إجراء اختبار t-Student استودنت، ونظراً لصغر حجم العينة المدروسة تم حساب مؤثرات المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للمتغيرات المدروسة، وفق العلاقة التالية:



حيث أن \bar{X}_1 : المتوسط الحسابي في الطريقة المرجعية (الاستخلاص بالميتانول)
 \bar{X}_2 : المتوسط الحسابي في الطريقة الثانية (الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم)
 n_1 : عدد العينات في الطريقة المرجعية
 n_2 : عدد العينات في الطريقة الثانية
 S_1 : الانحراف المعياري عن المتوسط الحسابي في الطريقة المرجعية
 S_2 : الانحراف المعياري عن المتوسط الحسابي في الطريقة الثانية

النتائج والمناقشة:

1.1. فحص التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم Labelling:

أجري الاختبار على جميع العينات النباتية المنحفة التي تم الحصول عليها، فكانت جميع العينات المصنعة محلياً مطابقة للدستور الأمريكي USP30 والـ GMP من حيث الغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم والنشرة الداخلية، باستثناء عينة واحدة طابقت الدستور بالنسبة للغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم لكن خالفته من حيث وجود النشرة الداخلية، وبالتالي تُعتبر مخالفة للدستور فيما يتعلق بهذا الاختبار، أما بالنسبة للعينات المتواجدة بشكل غير شرعي كانت:

6 عينات مطابقة للدستور والـ GMP من حيث الغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم والنشرة الداخلية

5 عينات مطابقة للدستور والـ GMP من حيث الغلاف واللصاقة ولكن خالفته بوجود النشرة الداخلية

1 عينة واحدة غير مطابقة للدستور والـ GMP من حيث الغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم والنشرة الداخلية وبالتالي تُعدّ هذه العينات غير المطابقة مخالفة للدستور فيما يتعلق بهذا الاختبار.

1.2. تحري وجود السيوترامين في العينات:

1.2.1. تحضير العياري والسلسلة العيارية:

تم التوصل من خلال الاختبارات التي أجريت إلى النتائج التالية:

- الفرق بين وزني البيشر = 0.005 غ = 5 ملغ، يُمثّل هذا الفرق وزن السيوترامين الناتج عن عملية

الاستخلاص

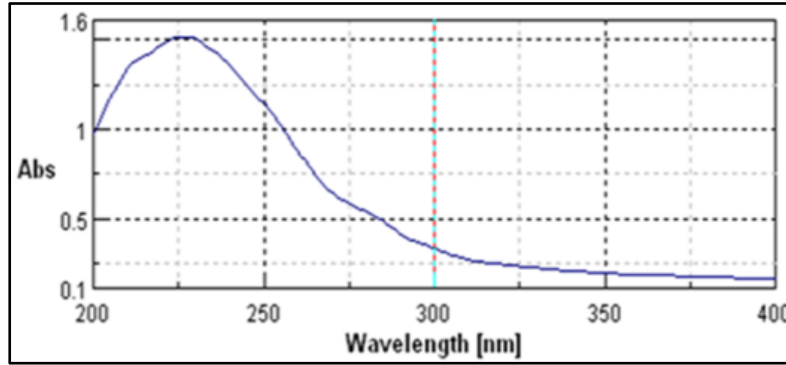
- كانت درجة انصهار الراسب 194°C وهي أعلى بقليل من المجال المرجعي، ويمكن تفسير ذلك بوجود

بعض الشوائب الناتجة عن عملية الاستخلاص

- ظهر بعد رسم الطيف باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV، قمة امتصاص أعظمية عند طول موجة

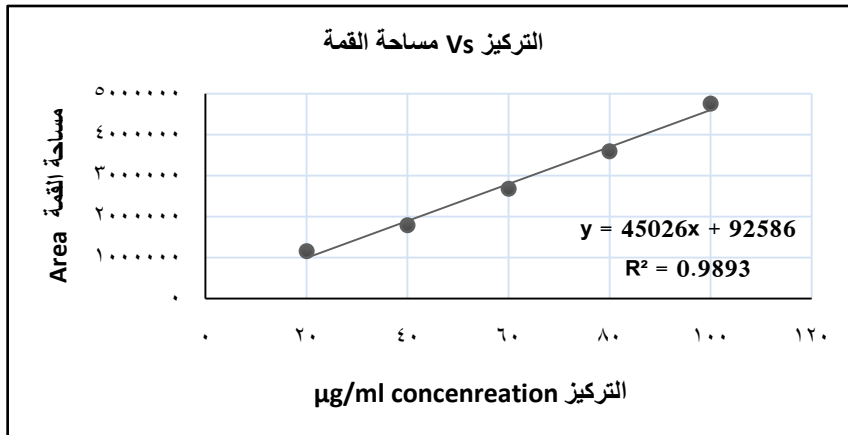
(225 nm) كما هو موضح بالشكل رقم (2)، تبين نتيجة المقارنة مع الطيف المرجعي^[12]، أن هذا الطيف يُمثّل

طيف السيوترامين العياري، وكان تركيز المحلول العياري الناتج عن عملية الاستخلاص (5 ملغ/10 مل).



الشكل رقم (2): يبين طيف السيپوترامين الناتج عن الاستخلاص

- حضرت السلسلة العيارية اعتباراً من المحلول ذو التركيز (5ملغ/10مل)، وفق خمسة تراكيز (20,40,60,80,100 ميكروغرام/مل)، وقيست مساحات سطوح القمم الناتجة، ومُثلت العلاقة بين قيم المساحات وقيم التراكيز بيانياً، كما هو موضح بالشكل (3).



الشكل رقم (3): يبين السلسلة العيارية للسيپوترامين

- تبين أن معادلة الخط المستقيم الذي تم الحصول عليه في الشكل رقم (3) هي:

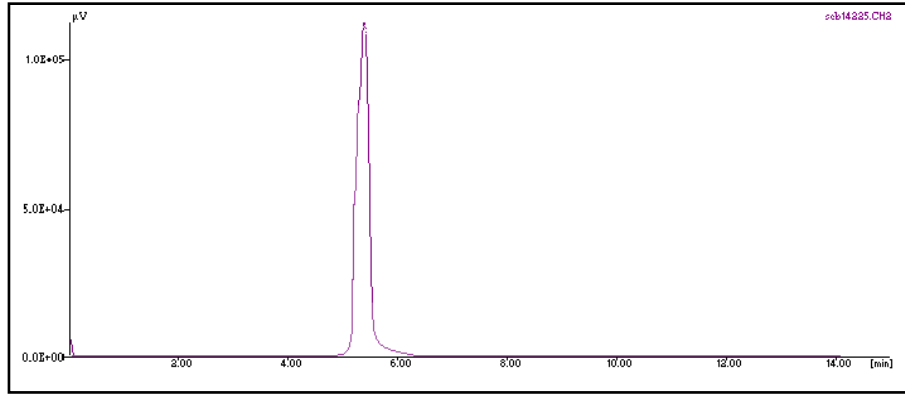
$$Y = 45026x + 92586$$

حيث: Y تعبر عن مساحة القمة، x تعبر عن التراكيز بالميكروغرام/مل

أما R^2 فقد بلغت قيمتها (0.9893) مما يدل على أن العلاقة خطية في المجال المدروس

- نتج عن حقن المحلول العياري ذو التركيز (20 ميكروغرام/مل) بجهاز الـ HPLC وفق الشروط

المذكورة في الجدول رقم (7)، الكروماتوغرام الموضح بالشكل رقم (4)، وكان زمن الاحتباس 5 دقائق.



الشكل رقم (4): يبين كروماتوغرام السيوترامين باستخدام الاسيتونتريل/وقاء فوسفاتي pH=5.5 (30:70) كطور متحرك، والعمود BDS Hypersil C₁₈ بمعدل تدفق 0.5 مل/دقيقة عند طول موجة 225 nm، وحجم الحقنة 20 ميكروليتر

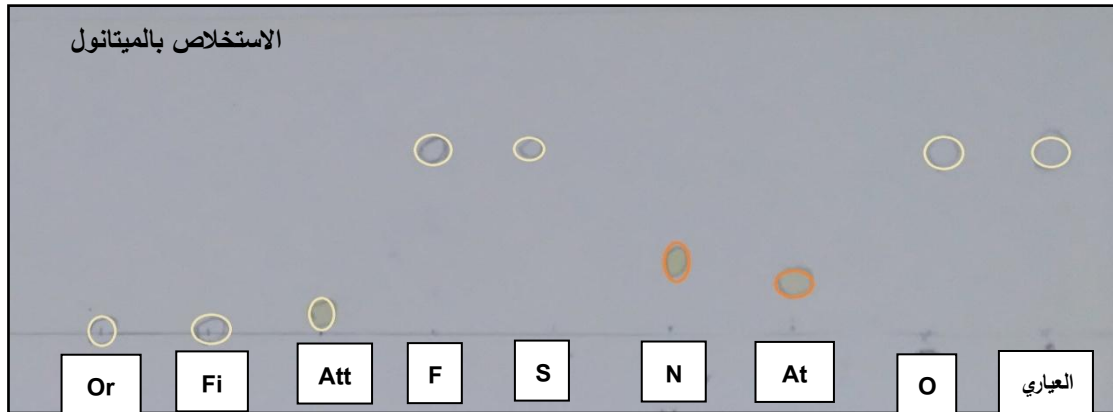
1.2.2. فحص العينات باستخدام الـTLC:

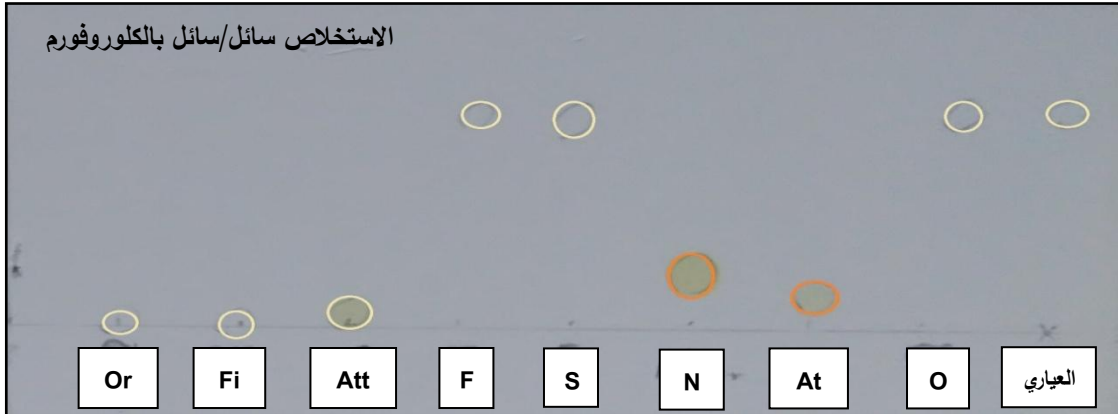
أظهرت نتائج فحص العينات باستخدام الـ TLC وجود السيوترامين في 3 عينات مُصنَّعة محلياً، من أصل 9 عينات تم فحصها، الشكل رقم (5)، ووجوده في جميع العينات المتواجدة بشكل غير شرعي، الشكل رقم (6)، واقتصرت هذه الطريقة على الكشف الكيفي ولم يتم تحديد التراكيز.

المسافة التي قطعها الطور المتحرك = 4.5

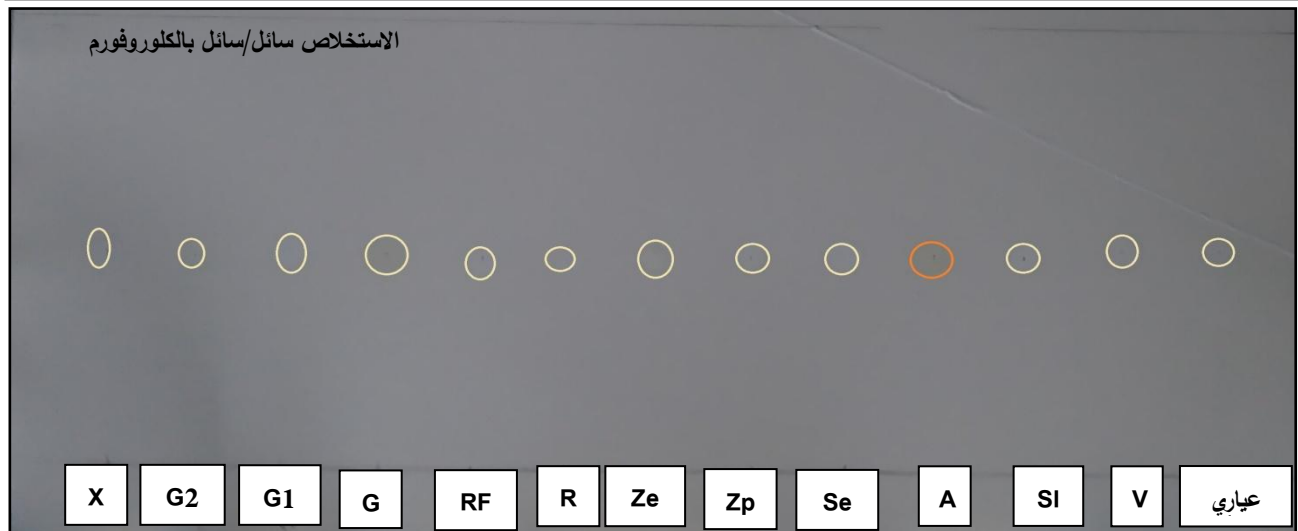
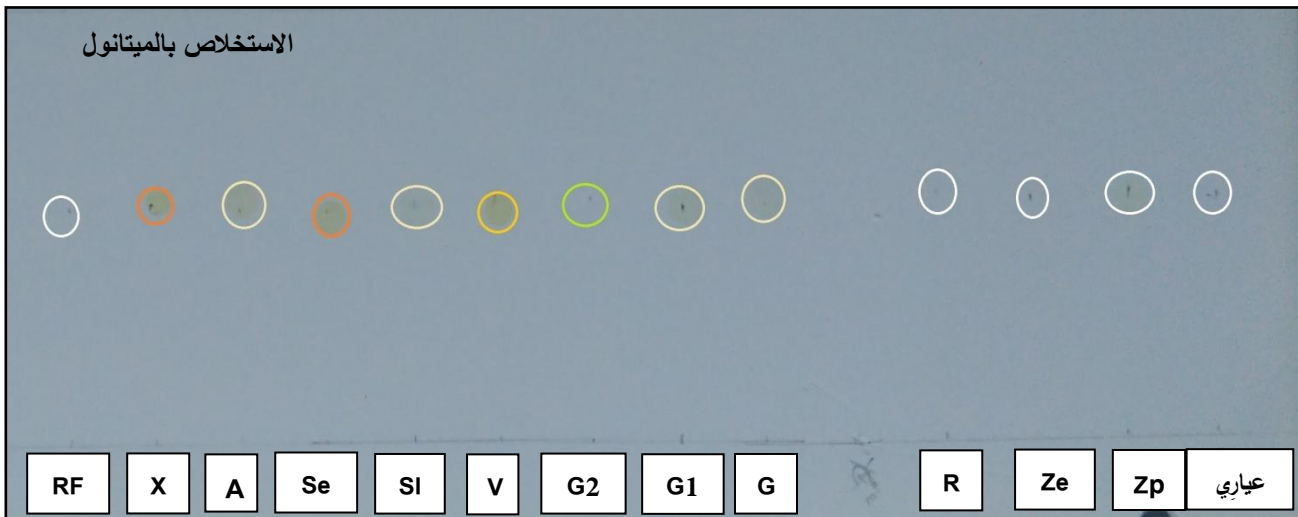
المسافة التي قطعتها النقطة = 2.5

حُسب الـ Rf للعياري وكان 0.5 ، وبلغ الـ Rf للعينات (0.5 ± 0.1)





الشكل رقم (5): يبين العينات المدروسة (At,Att.....Or,S) المُصنَّعة محلياً بعد فحصها باستخدام الـTLC



الشكل رقم (6): يبين العينات المدروسة (A,G,G1.....X,Ze) المتواجدة بشكل غير شرعي بعد فحصها باستخدام الـTLC

1.2.3. فحص العينات باستخدام الـHPLC:**☒ فحص العينات المصنعة محلياً:**

نتج عن حقن العينات بجهاز الـ HPLC وفق شروط العمل المذكورة في الجدول رقم (7)، تبعاً لطريقة الاستخلاص:

الاستخلاص مباشرة بالميتانول:

بينت النتائج اعتماداً على زمن الاحتباس ومساحة القمة وجود السيوترامين في 3 عينات من أصل 9 وتراوح كميته بين (8-10) ملغ/الكبسولة الواحدة، جدول رقم (8).

الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم:

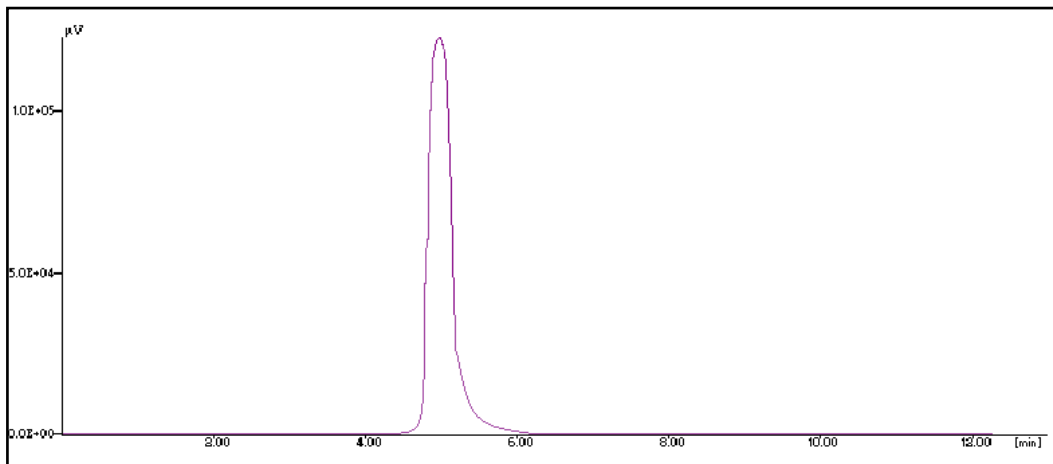
تم الحصول عند الاستخلاص بهذه الطريقة على نتائج مماثلة لطريقة الاستخلاص بالميتانول (المرجعية)، جدول رقم (9)، والشكل رقم (7) يبين كروماتوغرام العينة S بعد استخلاصها سائل/سائل بالكلوروفورم.

الجدول رقم (9): يبين زمن الاحتباس وكمية السيوترامين في العينات المصنعة محلياً بعد استخلاصها سائل/سائل بالكلوروفورم

التركيز mg/Capsule	زمن الاحتباس	رمز العينة
9.5	4.9	S
10.1	4.9	O
8.7	5	F

جدول رقم (8): يبين زمن الاحتباس وكمية السيوترامين في العينات المصنعة محلياً بعد استخلاصها بالميتانول

التركيز mg/Capsule	زمن الاحتباس	رمز العينة
9.7	4.9	S
10.2	5	O
8.6	5.1	F



الشكل رقم (7): يبين كروماتوغرام العينة S بعد الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم (استخلاص الشكل الحر للسيوترامين)

☒ فحص العينات المتواجدة بشكل غير شرعي:

نتج أيضاً عن حقن العينات غير الشرعية بجهاز الـ HPLC وفق شروط العمل المذكورة في الجدول رقم (7)، تبعاً لطريقة الاستخلاص:

الاستخلاص مباشرةً بالميتانول:

أظهرت النتائج وجود السيبيوترامين في جميع العينات وتراوحت كميته بين (10-26) ملغ/الكبسولة الواحدة باستثناء العينات (V, R, RF, GF1, GF2) حيث تراوحت كمية السيبيوترامين بين (5-9) ملغ/الكبسولة، الجدول رقم (11)، والشكل رقم (8).

الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم:

حصلنا أيضاً باستخدام هذه الطريقة على نتائج مماثلة لطريقة الاستخلاص بالميتانول (المرجعية)، جدول رقم (12)، والشكل رقم (9).

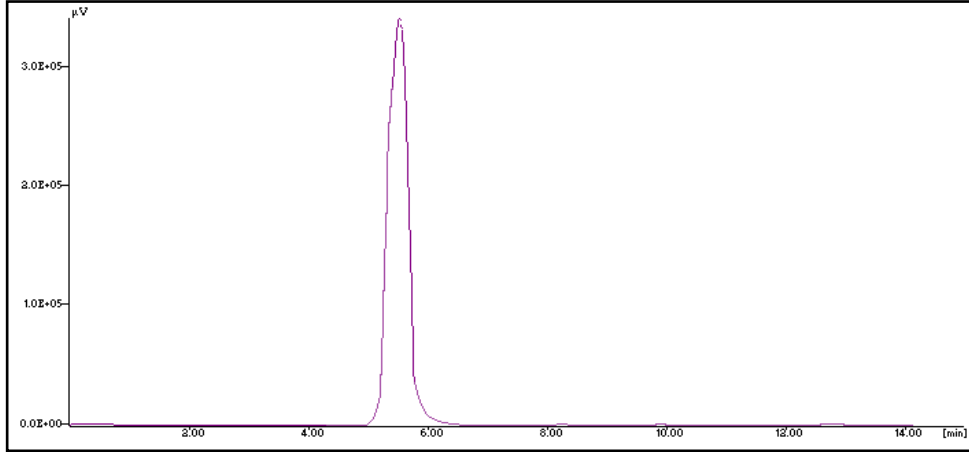
الجدول رقم (12): يبين زمن الاحتباس وكمية السيبيوترامين في العينات غير الشرعية بعد استخلاصها سائل/ سائل بالكلوروفورم

التركيز mg/Capsule	زمن الاحتباس	رمز العينة
9.3	4.9	V
9.1	5.2	R
9.8	5.1	R F
26.8	5.1	A
20.7	5.1	SI
20.8	4.9	Se
20.4	4.9	Ze
17	5	Zp
20.5	5	X
11.2	5.1	G
6.3	4.9	GF 1
6	5	GF 2

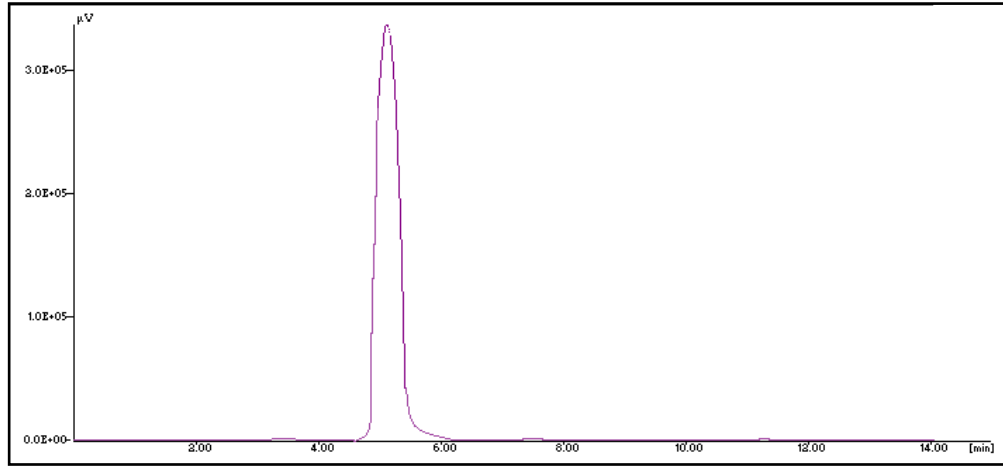
نسبة
التمديد
10

الجدول رقم (11): يبين زمن الاحتباس وكمية السيبيوترامين في العينات غير الشرعية بعد استخلاصها مباشرةً بالميتانول

التركيز mg/Capsule	زمن الاحتباس	رمز العينة
8.9	5.2	V
9.2	5.1	R
9.6	5.1	R F
26	5.1	A
20	5	SI
22.5	5	Se
21.3	4.9	Ze
20.2	5.2	Zp
16.8	5.1	X
10.7	5.2	G
6.2	5	GF 1
5.8	4.9	GF 2



الشكل رقم (8): يبين كروماتوغرام العينة A بعد الاستخلاص مباشرةً بالميتانول (استخلاص الشكل الملحي للسيوترامين)



الشكل رقم (9): يبين كروماتوغرام العينة A بعد الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم (استخلاص الشكل الحر للسيوترامين)

1.2.4. التحليل الإحصائي:

أعطى إجراء اختبار t -Student استودنت للمقارنة بين طريقتي الاستخلاص المُتبعين في البحث (الاستخلاص بالميتانول، الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفورم) النتائج التالية:

• بالنسبة للعينات المُصنَّعة محلياً:

عدم وجود فرق دال إحصائياً بين المتوسطين:

-لِزمن الاحتباس عند مستوى دلالة 5%، إذ بلغت قيمة t المحسوبة ($t=1.225$) وهي قيمة أقل من القيمة الجدولية وهذا دليل على عدم وجود فروق جوهرية بين الطريقتين.

تركيز السيوترامين عند مستوى دلالة 5%، حيث بلغت قيمة t المحسوبة ($t=0.131124$) وهي قيمة أقل من القيمة الجدولية وهذا دليل على عدم وجود فروق جوهرية أيضاً بالنسبة لتركيز السيوترامين.

• بالنسبة للعينات المتواجدة بشكل غير شرعي:

عدم وجود فرق دال إحصائياً بين المتوسطين:

زمن الاحتباس عند مستوى دلالة 5%، إذ بلغت قيمة t المحسوبة ($t = 1.228$) قيمة أقل من القيمة الجدولية وهذا دليل على عدم وجود فروق جوهرية بين الطريقتين.

تركيز السيوترامين عند مستوى دلالة 5%، حيث بلغت قيمة t المحسوبة ($t = -0.214$) قيمة أقل من القيمة الجدولية وهذا دليل على عدم وجود فروق جوهرية أيضاً بالنسبة لتركيز السيوترامين.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

نستنتج مما سبق مايلي:

على الرغم من أن طريقة الاستخلاص مباشرةً بالميتانول (الطريقة المرجعية) تعتمد على استخلاص السيوترامين بشكله الملحي (هيدروكلورايد مونوهيدرات)، وتعتمد الطريقة الثانية (الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفوم) على استخلاصه بشكله الحر، إلا أنه لا يوجد فرق بين الطريقتين، لكن طريقة الاستخلاص سائل/سائل بالكلوروفوم أكثر تكلفة بسبب استهلاك المزيد من المحالط والمواد كما تتطلب وقتاً أطول بسبب تعدد المراحل، لذا يفضل استخدام الطريقة المرجعية (الاستخلاص مباشرةً بالميتانول).

عدم وجود فروق ذات دلالة معنوية بين الطريقتين بالنسبة للمتغيرات المدروسة (**زمن الاحتباس، تركيز السيوترامين**)، وربما يعود هذا إلى صغر حجم العينة المدروسة، ومن جهة أخرى تُقبل الفرضيات الصفوية القائلة بعدم وجود فروق دالة إحصائياً بين المتوسطات لكلا الطريقتين:

ونظراً لعدم وجود فروق ذات دلالة، لا داعي لإجراء تحليل التباين Anova لاسيما صغر حجم العينة.

تبين من خلال فحص العينات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (TLC)، وجود السيوترامين في 3 عينات من أصل 9، ووجوده في جميع العينات المتواجدة بشكل غير شرعي، واقتصرت هذه الطريقة على الكشف الكيفي فقط.

تُحصت العينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High performance liquid chromatography (HPLC) من أجل تحديد كمية السيوترامين، وتبين وجوده في العينات المصنّعة محلياً بكميات تراوحت بين (8-10 ملغ/الكبسولة الواحدة)، في حين تراوحت كميته في العينات المتواجدة بشكل غير شرعي بين (5-9 ملغ/الكبسولة الواحدة) في 5 عينات، أما باقي العينات بلغت نسبته (10-26 ملغ/الكبسولة الواحدة).

التوصيات:

خلص هذا البحث إلى مجموعة من التوصيات والمقترحات وهي:

متابعة الدراسة على عدد أكبر من الخلطات والمستحضرات النباتية المنحفة.

التأكد من خلو المستحضرات المنحفة من مواد كيميائية أخرى.

مراقبة مستحضرات وخلطات نباتية أخرى كالمستحضرات الخافضة لسكر الدم، المقوية جنسياً والمنومة والتأكد من خلوها من أي مواد كيميائية مضافة بشكل غير شرعي.

للتأكد من تطبيق القرارات الناظمة لتداول وبيع المستحضرات والخلطات النباتية في السوق المحلية ومكافحة عمليات تهريب الأدوية والمتممات الغذائية. ضرورة التوعية لمخاطر المستحضرات والخلطات النباتية التي يتم تناولها بشكل عشوائي ودون إشراف طبي. للتأكيد على ضرورة مراقبة تصنيع المستحضرات النباتية المصنعة محلياً، والتأكد من مطابقتها للمواصفات الدستورية وخلوها من أي مواد كيميائية. وضع قوانين تحد من بيع هذه المستحضرات بشكل عشوائي، وحصر بيعها في الصيدليات وتحت الإشراف الطبي.

المراجع:

1. Ariburnu, E., Uludag, M., Yalcinkaya, H., Yesilada, E. *Comparative determination of Sibutramine as an adulterant in natural slimming products by HPLC and HPTLC densitometry*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2012, volume 64(65), 77-81.
2. Bhatia, Lav., Thumar, K., Tanna, R. *Determination of adulteration of anti-obesity drug in Indian herbal medicinal product: Development and validation of analytical method*. Pharma analysis and Quality Assurance, 2012, Volume 3, 177-182
3. Chong CSY. *Psychosis related to the use of Sibutramine disguised as Over-the-counter herbal weight loss remedies: a report of two patients*. East Asian Arch psychiatry, 2010, Volume20, 186-189.
4. Deconinck, E., Sacre, P., Courselle, P., De Beer, O. *Chromatography in the detection and characterization of illegal Pharmaceutical Preparations*. Journal of Chromatographic Science, 2013, 51:791-806.
5. Deconinck, E., Verlind, K., Courselle, J., De beer, J.O. *A validated Ultra High Pressure Liquid Chromatographic method for the characterization of confiscated illegal slimming products containing anorexics*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2012, volume 59, 38-43.
6. Kamboj, A. *Analytical Evaluation of Herbal Drugs*. Drug discovery in Pharmacognosy, 2012.
7. Jung, J., Clausen, M., Weinmann, W. *Anorectic Sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss*. Forensic scienceinternational, 2006, volume 161, 221-222.
8. Lam, PK., Leung, KS., Wong, TW., Lee, H., Tang, M., Mak, T. *Serotonin syndrome following overdose of a non-prescription slimming product containing Sibutramine: A case report*. Human and Experimental Toxicology, 2012, Volume 31 (4), 414-417.
9. Mathon, C., Duret, M., Ankli, A., Reich, E., Bieri, S., Christen, P. *screening and determination of Sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry*. Food additives and contaminants, 2014, volume 31 (1), 15-21.
10. Muller, D., Weinmann, W., Clausen, M. *Chinese Slimming Capsules Containing Sibutramine Sold over the Internet: A case Series*, Detaches Ärzteblatt International, 2009, Volume 106(13), 218-222.
11. Poornima, B. *Adulteration and substitution in Herbal Drugs: A critical analysis*. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy, 2010, Volume 1, Issue 1, 8-12.

12. Suthar, AP., Dubey, SA., Patel, SR. *A validated specific reverse phase liquid chromatographic method for the estimation of Sibutramine hydrochloride monohydrate in bulk drug and capsule dosage forms.* International journal of chemtech research, 2009, volume1 (4), 793-801.
13. <http://www.abbottlaboratories.com>
14. USP30 pharmacopoeia, 2007
15. Handbook of Excipients 6th edition, 2009