الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة تشرين
كلية الصيدلة
قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية

مراقبة جودة بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على أحماض أمينية

دراسة أعدّت لنيل درجة الماجستير في اختصاص تصميم ومراقبة الأدوية

إعداد الطالبة

عفراء أديب متوج

إشراف

د. آيـــات عـــبود

اللاذقية العام الدراسي2013-2014

قُدّمت هذه الدراسة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في تصميم ومراقبة الدواء في قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين.

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of requirement for the degree of master in Drug Design and control at Pharmaceutical Department- Faculty of Pharmacy- Tishreen University.

المرشّحة

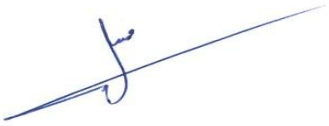
عفراء متوج

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2014/3/4 وأجيزت:

لجنة الحكم:

الدكتور: محمّد هارون

مدرّس في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين



الدكتورة: آيات عبود

مدرّسة في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين

الدكتورة عفراء زريقي

مدرّسة في قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين

بعد الاطلاع وقيام الطالبة بالتصويبات المطلوبة:

لجنة الحكم:

الدكتور: محمّد هارون

مدرّس في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين

الدكتورة: آيات عبود

مدرّسة في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين

الدكتورة عفراء زريقي

مدرّسة في قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية– كلية الصيدلة– جامعة تشرين

- تصريح -

أصرّح بأن هذا البحث "مراقبة جودة بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على أحماض أمينية" لم يسبق أن قُبِل للحصول على شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على أية شهادة أخرى.

المرشحة

عفراء متوج

تاريخ: ٩/٤/٢٠١٤

-Declaration-

This is to declare that, this work "Quality control of some commercial products containing amino acid available in the local market", has not been being submitted concurrently for any other degree.

Candidate

Afraa Mtaweg

Date: 9/4/2014

جامعة تشرين

كلية الآداب والعلوم الإنسانية

قسم اللغة العربية

السيد الدكتور عميد كلية الصيدلة

بجامعة تشرين

عملا بقرار مجلس **قسم اللغة العربية** رقم / ٢١٩ /تاريخ ١٨/ ٣ /٢٠١٤ **المتضمن**

مدققا لغويا لرسالة **الماجستير** لمؤلفها الطالبة عفراء مشوح

وهي بعنوان (مراقبة جودة بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على أحماض أمينية)

وتم تصويب الرسالة **وتدقيقها** بعد المناقشة **النهائية ، كما تم الالتزام بملاحظات المدقق اللغوي** أصولا

وتفضلوا بقبول **الاحترام**

اسم المدقق وتوقيعه : د. حورية حمو

عميد كلية الآداب والعلوم الإنسانية

الدكتور يوسف جابر

رئيس قسم اللغة العربية

الدكتور عدنان أحمد

الجمهورية العربية السورية
جامعة تشرين
مجلة جامعة تشرين
للبحوث والدراسات العلمية
تأسست عام 1978
اللاذقية - سورية

Syrian Arab Republic
Tishreen University
Tishreen University Journal
for Research and Scientific Studies
Established 1978
Lattakia – SYRIA

الرقم: / 775 / ص م ج
التاريخ: 24/ 7/ 2013 م.

السيدة الدكتورة **آيات عبود**– مدرسة– كلية الصيدلة – جامعة تشرين.
السيدة **عفراء متوج**– طالبة ماجستير– كلية الصيدلة – جامعة تشرين.

يسرّنا إعلامكم أنّه تمّت الموافقة على نشر بحثكم المحكّم المقدّم للنشر في مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية بتاريخ 2013/6/2 وهو بعنوان:

مراقبة محتوى بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على أحماض أمينية

في سلسلة العلوم الصحية من مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية.

أ. د. عصام محمد الدالي

-شهادة-

نشهد بأن البحث في هذه الأطروحة "مراقبة جودة بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على أحماض أمينية" هو نتيجة لدراسة أجرتها طالبة الدراسات العليا (عفراء أديب متوج)، لصالح قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية. كلية الصيدلة. جامعة تشرين. لنيل درجة الماجستير اختصاص تصميم ومراقبة الدواء بإشراف الدكتورة آيات عبود (مدرّسة باختصاص مراقبة دوائية في قسم الكيمياء الصيدلية والمراقبة الدوائية).

إن البحث لم يقدم سابقاً، وهو غير مقدم حالياً للحصول على أية شهادة أو درجة علمية أخرى. كما أن الرجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع موثق في النص.

المرشّحة

عفراء متوج

الدكتور المشرف

د. آيات عبود

كلمة الشكر

أتوجه بالشكر والعرفان إلى:

الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي

جامعة تشرين

كلية الصيدلة ممثلة بكادرها الإداري والتدريسي

السادة الدكاترة أعضاء لجنة الحكم على ملاحظاتهم القيّمة

الدكتورة آيات عبود لجهودها في إنجاح هذا البحث

الدكتورة حورية حمو على تدقيقها اللغوي لهذه الأطروحة

عائلتي لدعمها لي في كل المراحل التي مررت بها

أصدقائي وزملائي

كما أتقدّم بالشكر والامتنان لكل من ساندني ومد لي يد العون، وأهدي هذا العمل إلى أرواح شهدائنا الأبرار ولبلدي الغالي ولقائدي

المرشحة

عفراء متّوج

المحتويات

الموضوع	الصفحة
جدول الرموز	4
جدول الأشكال	5
جدول الجداول	7
الملخص	8
مقدّمة	9
الدراسة النظرية	
الفصل الأول: أهمية الأحماض الأمينية	12
1.1 مقدّمة عن الأحماض الأمينية	12
2.1 أهمية الأحماض الأمينية	13
1.2.1 الأهمية الطبية والبيولوجية	13
2.2.1 أهمية الأحماض الأمينية كمتمّمات غذائية	16
3.1 لمحة عن المستحضرات المدروسة	17
1.3.1 المتمّمات الغذائية الحاوية على البروتين والكرياتين	17
1.1.3.1. مأمونية استخدام الكرياتين	18
2.1.3.1 طرائق تحليل البروتينات	18
3.1.3.1 طرائق تحليل الكرياتين	18
2.3.1 الأرجينين	18
1.2.3.1 الصفات الفيزيائية للأرجينين	19
2.2.3.1 أهمية الأرجينين	19
3.2.3.1 مأمونية استخدام الأرجينين	20
4.2.3.1 طرائق تحليل الأرجينين	20
الفصل الثاني: مراقبة جودة المستحضرات التجارية الحاوية على الأحماض الأمينية	21
1.2 التشريعات والقوانين الناظمة	21
2.2 التحديد الكمي للأحماض الأمينية	22
1.2.2 اختبار كلدال	23
2.2.2 الكشف في مجال الأشعة المرئية	24
3.2.2 الطرائق الكروماتوغرافية	25

الدراسة العملية

الفصل الثالث: المواد والأجهزة والطرائق المستخدمة.....29
1.3 المواد والأجهزة المستخدمة.....29
1.1.3 الأجهزة والأدوات.....29
2.1.3 المواد.....30
2.3 الاختبارات المجراة.....31
1.2.3 فحص التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم.....31
2.2.3 اختبار المظهر الخارجي.....32
3.2.3 اختبار تجانس الوزن.....32
4.2.3 اختبار تحديد المحتوى من المادة الفعّالة.....32
3.3 التحليل الإحصائي.....34
الفصل الرابع: دراسة المستحضرات التجارية الحاوية على الكرياتين والبروتين والحاوية على الحمض الأميني الأرجينين.....35
1.4 الاعتيان.....35
2.4 مراقبة جودة المستحضرات المتوفرة.....36
1.2.4 دراسة المستحضرات الحاوية على الكرياتين والبروتين.....36
2.2.4 دراسة المستحضرات الحاوية على الأرجينين.....37
1.2.2.4 مراقبة التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم.....37
2.2.2.4 اختبار المظهر الخارجي.....38
3.2.2.4 اختبار تجانس الوزن.....38
4.2.2.4 اختبار تحديد المحتوى من المادة الفعّالة (الأرجينين).....38
3.4 التحليل الإحصائي.....47
1.3.4 تأثير الطريقة المستخدمة في محتوى الأرجينين.....47
2.3.4 تأثير عامل الوجبة في الشركة الواحدة في محتوى الأرجينين.....48
3.3.4 تأثير عامل اختلاف الشركة المصنعة في محتوى الأرجينين.....48
5. الاستنتاجات.....50
6. التوصيات.....52
7. المراجع.....53
ملحق (1).....57
ملحق (2).....58
ملحق (3).....59

ملحق (4).....61
ملحق (5).....62
ملخص باللغة الانكليزية.....63

جدول الرموز

الرمز	الاسم الكامل	الاسم الكامل باللغة الانكليزية
مل	ميلي لتر	Milliliter
ل	لتر	Liter
غ	غرام	Gram
ملغ	ميلي غرام	Milligram
د	دقيقة	Minute
A CO-A	استيل كو أنزيم A	Acetyl co enzyme A
µM	ميكرومول	Micromole
mm	ميلي متر	Millimeter
HPLC	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء	High-Performance Liquid Chromatography
UV	الأشعة فوق البنفسجية	Ultra Violet
IR	الأشعة تحت الحمراء	Infrared
VIS	الأشعة المرئية	Visible
EP	دستور الأدوية الأوربي	European Pharmacopoeia
USP	دستور الأدوية الأمريكي	United States Pharmacopeia
BP	دستور الأدوية البريطاني	British Pharmacopoeia
CV%	معامل الاختلاف	Coefficient Of Variation
OPA	أورتو فتال الدهيد	*o*-phthalaldehyde
2-ME	2- ميركابتو ايتانول	2-mercaptoethanol
N_t%	الآزوت العام	Total Nitrogen
P_t	البروتين العام	Total Protein
N	النظامية	Normality
M	المولارية	Molarity
pH	درجة حموضة الوسط	

جدول الأشكال

الشكل	الصفحة
شكل (1): الصيغة العامة للأحماض الأمينية.....	12
شكل (2): الصيغة العامة للكرياتين.....	17
شكل (3): الصيغة العامة للأرجينين.....	18
شكل (4): الأحماض الأمينية التي تمتصّ UV.....	22
شكل (5): آلية تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية.....	25
شكل (6): تفاعل حمض أميني –OPA.....	26
شكل (7): كروماتوغرام الأحماض الأمينية العيارية بعد اشتقاقها باستخدام OPA واستخدام تقنية HPLC (كاشف UV/VIS، معدّل تدفق 2 مل/ د، حجم الحقنة 2.5 ميكرولتر).....	27
شكل (8): النسبة المئوية لمحتوى بعض العيّنات التجارية المباعة على نحو غير قانوني في النوادي الرياضية من البروتين أو الكرياتين باستخدام اختبار كلدال.....	37
شكل (9): النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام اختبار كلدال.....	39
شكل (10): السلسة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق بالنينهيدرين وقياس الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي (طول موجة 570 نانومتر).....	40
شكل (11): متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي (طول موجة 570 نانومتر).....	41
شكل (12): كروماتوغرامات الأرجينين العياري عند استخدام نسب مختلفة من الطور المتحرك (اسيتونتريل: وقاء السيترات) باستخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....	42
شكل (13): مقارنة كروماتوغرامات الأرجينين العياري عند تغيير طبيعة الطور العضوي في الطور المتحرك باستخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....	43
شكل (14): كروماتوغرمات OPA، الأرجينين العياري والأرجينين في الكبسولات G_1 باستخدام تقنية HPLC (الطور المتحرك: وقاء السيترات: اسيتونتريل، بنسبة 80: 20، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....	45
شكل (15): السلسة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق بالـOPA واستخدام تقنية HPLC (الطور	

المتحرك: وقاء السيترات: اسيتونتريل، بنسبة 80: 20، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....46
شكل (16): متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام تقنية HPLC (الطور المتحرك: وقاء السيترات: اسيتونتريل، بنسبة 80: 20، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....46

جدول الجداول

العنوان	الصفحة
جدول (1): بعض الأحماض الأمينية النادرة غير البروتينية وتطبيقاتها العلاجية.....	14
جدول (2): بعض الأمثلة عن مشتقات الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيب بعض الأدوية.	15
جدول (3): وزن العيّنات اعتماداً على محتواها من البروتين في اختبار كلدال.....	23
جدول (4): الأجهزة المستخدمة في الدراسة.....	29
جدول (5): المواد المستخدمة في الدراسة.....	30
جدول (6): العيّنات التجارية المدروسة: الاستخدام، التركيب، الشكل الصيدلي والمصدر.....	35
جدول (7): نتائج فحص تجانس الوزن للعيّنات المدروسة من كبسولات الأرجينين.....	38
جدول (8): النسب المختلفة من (وقاء السيترات: اسيتونتريل) المدروسة وزمن احتباس الأرجينين العياري الموافق لها عند استخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....	43
جدول (9): اختلاف زمن احتباس الأرجينين عند تغيير طبيعة الطور العضوي في الطور المتحرك باستخدام تقنيةالـHPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر).....	44
جدول (10): نتائج دراسة تأثير الطريقة المستخدمة في المحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة.....	47
جدول (11): نتائج دراسة تأثير عامل الوجبة في الشركة الواحدة في المحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة.....	48
جدول (12): نتائج دراسة تأثير عامل اختلاف الشركة المصنعة في المحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام تقنية HPLC أو الكشف بمقياس الطيف الضوئي المرئي.....	49

الملخص

تستخدم الأدوية والمتممات الغذائية المهربة على نحو شائع وواسع في العديد من بلدان العالم، يعدّ ذلك من المشاكل الاقتصادية والصحية التي تواجهها هذه البلدان ومنها سورية؛ لذلك تمّ إجراء هذه البحث كخطوة للتأكد من مدى مطابقة المستحضرات المدروسة دوائية كانت أو متمّمات غذائية للمواصفات الدستورية وللمعلومات الموجودة على العبوة، ومعرفة مدى مأمونية المتمّمات الغذائية المباعة على نحو مرخص في الصيدليات أو على نحو غير مرخص في النوادي الرياضية.

في بداية البحث، تمّ دراسة مجموعة من المتمّمات الغذائية التي تمّ الحصول عليها من النوادي الرياضية والحاوية في تركيبها على **الكرياتين والبروتين**، وفي الجزء الثاني من البحث تمّ التركيز على دراسة الحمض الأميني **ل- أرجينين** المتوفر بأشكالٍ عدة صيدلية في الصيدليات (على نحو قانوني) وفي النوادي الرياضية (غير قانوني).

شملت الدراسة بعض الاختبارات المتبعة في إجراءات مراقبة الجودة كفحوص الشكل الخارجي، التغليف، لصاقة التوسيم، فحوص تجانس الوزن، فحوص الذاتية واختبار تحديد المحتوى. وقد تمّ اتباع ثلاث طرائق للتحديد الكمي للأرجينين في مستحضراته وهي اختبار كلدال، تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ومقياس الطيف الضوئي المرئي.

بيّنت النتائج مطابقة المستحضرات الحاوية على الكرياتين والبروتين والمستخدمة كمتمّمات غذائية، لما يتطلبه دستور الأدوية الأوربي من حيث التحديد الكمي لها، وكذلك الأمر بالنسبة للمستحضرات الدوائية الحاوية على الأرجينين والمصنعة محلياً، أما المتمّمات الغذائية المهربة الحاوية على الأرجينين فقد خالفت متطلبات الدستور بما يتعلق بالتحديد الكمي لها ووجود النشرة الداخلية.

بيّنت الدراسة أيضاً عدم وجود اختلافات ذات دلالة إحصائية بين طريقتي HPLC والكشف في مجال الأشعة المرئية المستخدمتين في التحديد الكمي للأرجينين باستثناء عيّنات شركة واحدة وبالتالي إمكانية الاكتفاء باستخدام طريقة تحليلية واحدة، كذلك لم يلحظ وجود اختلافات بين الوجبات المختارة للدراسة. وجدت اختلافات بين الشركات المصنعة لكبسولات الأرجينين سواء دوائية أو كمتمّمات غذائية عند استخدام الكشف في مجال الأشعة المرئية للتحديد الكمي للأرجينين. ظهرت هذه الاختلافات بين الشركات المصنعة للكبسولات المستخدمة دوائياً مقارنة مع المستخدمة غذائياً عند استخدام HPLC ولم تظهر عند المقارنة بين الشركات المصنعة للكبسولات المستخدمة دوائياً مما يدلّ على جودة الانتاج المحلي.

مقدّمة

يعالج هذا البحث مشكلة مهمة وهي مدى جودة المستحضرات الصيدلية المهربة والمستخدمة على نحو شائع بين المواطنين، فقد تمّت دراسة مراقبة جودة بعض هذه المستحضرات الحاوية على أحماض أمينية ومقارنتها مع مثيلاتها المصنعة محلياً.

إن هذه المستحضرات المهربة سواء كانت تستخدم لأغراض علاجية أو كمتمّمات غذائية لا تخضع لرقابة دوائية، مما يسبب مشاكل اقتصادية وصحية على المواطن والبلد على حد سواء.

تمّ إجراء هذه الدراسة على المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً الحاوية على الحمض الأميني الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو كمتمّمات غذائية إضافة إلى بعض المستحضرات الحاوية على الكرياتين والبروتين والمستخدمة كمتمّمات غذائية على نحو شائع من دون وصفة طبية إضافة لتوفرها على نحو غير قانوني في النوادي الرياضية.

نظراً لصعوبة الحصول على العيّنات المهربة بسبب منع تداولها ولوجود قوانين خاصة تنظم استيرادها وتصنيعها، اقتصرت هذه العيّنات على عيّنة واحدة مهربة حاوية على ل–أرجينين (كبسولات)، أربع عيّنات حاوية على الكرياتين (مسحوق) وعيّنة حاوية على بروتين (مضغوطات)، إضافة إلى مستحضرات دوائية حاوية على الأرجينين مصنعة محلياً (حبابات شرب، شراب، كبسولات).

شملت الدراسة بعض الاختبارات الفيزيائية والكيميائية المتبعة في إجراءات مراقبة الجودة كفحوص الشكل الخارجي، التغليف ولصاقة التوسيم، فحوص تجانس الوزن، فحص الذاتية واختبار تحديد المحتوى من المادة الفعّالة باستخدام طرائق تحليلية معتمدة وفقاً لدساتير الأدوية وبعض المرجعيات العالمية.

تتأتى أهمية البحث مما يأتي:

- للبحث أهمية صحية من خلال التحقق من مدى مطابقة المستحضرات المدروسة دوائية كانت أو متمّمات غذائية للمواصفات الدستورية وللمعلومات الموجودة على العبوة، ومعرفة مدى مأمونية المتمّمات الغذائية المباعة على نحو مرخص في الصيدليات أو غير مرخص في النوادي الرياضية .
- أهمية اقتصادية من خلال التأكيد على جودة الأشكال الصيدلية المصنعة محلياً.

ويهدف البحث إلى:

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

- دراسة وجود الحمض الأميني فيها.
- تحديد كمية الحمض الأميني فيها.
- تحديد كمية البروتين.

تمّ التركيز على الأشكال الحاوية على الأرجينين نظراً لأهميته وتوفره محلياً.

الدراسة النظرية

Theoretical Study

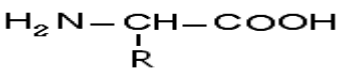
الفصل الأول
أهمية الأحماض الأمينية

1.1. مقدّمة عن الأحماض الأمينية:

الأحماض الأمينية هي أحماض كربوكسيلية حاوية على مجموعة أمينية (Rao, 2006)، اكتشف أول حمض أميني (الأسبارجين Asp, Asparagine) عام 1806 من قبل العالمين Louis Nicolas و Vauquelin (Beltiz *et al*, 2009). وكان الثريونين (Thr, Threonine) هو آخر حمض أميني مُكتشف من الأحماض الأمينية البروتينية العشرين لكن لم يتمّ تحديده حتى عام 1938 (Beltiz *et al*, 2009).

تمّ تسمية بعض الأحماض اعتماداً على مصدرها الأول الذي عزلت منه مثل الأسبارجين (Asp, Asparagine) من فطر asparagus، التيروزين (Tyr, Tyrosine) الذي تمّ إيجاده في نوع من أنواع الجبنة (بالإغريقية Tyros)، أو اعتماداً على أحد خصائصها مثل الغليسين (Gly, Glycine) من كلمة glykos التي تعني بالإغريقية الطعم الحلو (Beltiz *et al*, 2009).

تمتلك الأحماض الأمينية الصيغة العامة الموضّحة في الشكل (1). يتبيّن من هذه الصيغة أن هذه الأحماض تحوي على الأقل ذرة كربون غير متناظرة وبالتالي يكون لها متناظرات ضوئية (L, D)[1] ما عدا الغليسين فهو غير متناظر ضوئياً ويعود الاختلاف البنيوي للأحماض الأمينية للسلسلة الجانبية (R).



الشكل (1): الصيغة العامة للأحماض الأمينية

يوجد حوالي 200 حمض أميني في الطبيعة لكن 20 منها فقط من نوع L-α-amino acid[2] يدخل في تركيب البروتينات وتسمى الأحماض الأمينية البروتينية (Murray *et al*, 2009) وهي تختلف عن الأحماض غير البروتينية[3]. يوضّح الملحق (1) بنية الأحماض الأمينية البروتينية (Beltiz *et al*, 2009). يمكن أن تتمّ بعض التعديلات بعد الترجمة على الأحماض الأمينية لتقوم بوظائف معيّنة. يحدث التعديل غالباً على المجموعات القطبية منها مثل الأستلة، الفسفرة، ارتباط النهاية الأمينية ببقية أسيل أو إضافة مجموعة كربوكسيل، هيدروكسيل أو سكر. على سبيل المثال يتمّ إضافة مجموعة كربوكسيل إلى

---

[1] يقال عن الحمض الأميني أنه من الشكل L عندما تكون المجموعة الامينية على اليسار، بينما يكون من الشكل D عندما تكون المجموعة الأمينية على اليمين (Rao, 2006).

[2] يكون الحمض الأميني من نمط α عندما يرتبط جذر الأمين بالكربون رقم 2 بعد كربون جذر الهيدروكسيل.

[3] **الأحماض الأمينية غير البروتينية Non- Protein amino acids**

هي أحماض أمينية غير مرمزة وراثياً، تتواجد بشكل طبيعي أو تصنع كيميائياً، ولا تتدخل في اصطناع البروتينات لكن لها دوراً مهماً في العمليات الاستقلابية إضافة إلى أهميتها في تركيب الأدوية، منها البانتوتينيك أسيد Pantothenic acid وهو فيتامين منحل بالماء وغاما أمينوبوتريك أسيد δ-aminobutyric وهو ناقل عصبي (James, 2003).

الغلوتامات لتشكيل غاما كربوكسيل غلوتامات المتواجد في عوامل التخثر والضروري لتخثر الدم. يتمّ كذلك إضافة مجموعة هيدروكسيل إلى البرولين والليزين التي لها دور في تشكيل البنية الحلزونية للكولاجين. من التعديلات أيضاً ارتباط السلسة الجانبية للسيرين والأسبارجين بمركب قليل السكاريد (Koolman *et al*, 2005).

تمتلك الأحماض الأمينية خواص فيزيائية وكيميائية مختلفة ويمكن تصنيفيها بطرائقٍ عدّة منها:

i. بحسب المجموعة الجانبية R تكون هذه المجموعة أليفاتية (ألانين، غليسين، فالين، لوسين، ايزولوسين)، حاوية مجموعة هيدروكسيلية (السيرين، الثريونين)، ذرة كبريت (السيستيئين، الميثيونين)، مجموعة كربوكسيلية (الغلوتاميك، الأسبارتيك) أو أميدية (الغلوتامين، الاسبارجين)، أو تكون حلقة عطرية (التريبتوفان، التيروزين، الفينيل ألانين) أو مجموعة إيمينو (البرولين) (Rao, 2006).

ii. بحسب تفاعلات محاليلها وشحنتها: فقد تكون حامضية (حمض الأسبارتيك، الغلوتاميك)، قاعدية (الأرجينين، الليزين، الهيستيدين) أو متعادلة (الليوسين، فينيل ألانين) (Rao, 2006).

يعرض الملحق (2) بعض الخواص الفيزيائية والكيميائية للأحماض الأمينية مثل: pK_a المجموعات الكربوكسيلية للأحماض الأمينية (pK_a1)، pKa للمجموعات الأمينية (pK_a2) بالإضافة إلى pKa المجموعات الحمضية والأمينية الموجودة في السلاسل الجانبية (pk_a R)، نقطة التعادل الكهربائي (p*I*)، الخواص اللاقطبية للسلاسل الجانبية (LogP)، بالإضافة إلى إمكانية التحري عنها باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أو عن طريق الفلورة.

استخدمت الأحماض الأمينية في معالجة بعض الأمراض، كما أنها استخدمت كمتمّمات غذائية نظراً لأهميتها الغذائية، في القسم الآتي سوف نتناول أهميتها البيولوجية والطبية بالإضافة إلى استخدامها كمتمّمات غذائية.

2.1 . أهمية الأحماض الأمينية:

1.2.1. الأهمية الطبية والبيولوجية:

تمتلك الأحماض الأمينية أهمية بيولوجية كبيرة للأسباب الآتية:

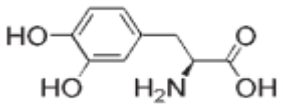
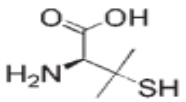
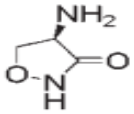
- تعدّ الأحماض الأمينية من نوع L-α وحدة البناء الأساس للببتيدات والبروتينات.
- تعدّ طلائع لاصطناع البورفيرين، البورينات، البريميدينات واليوريا.
- يعدّ بعضها نواقل عصبية وتعدّ مشتقاتها طلائع لاصطناع بعض النواقل والوسائط العصبية والهرمونات مثل الغلوتامات ناقل عصبي في الجملة العصبية المركزية (Koolman *et al*, 2005).
- لها دور ناقل للمجموعات الوظيفية (ناقل لمجموعة الامين).

- تعدّ من مكونات الفوسفوليبيدات مثل السيرين أو تدخل في تركيب الأملاح الصفراوية مثل الغليسين.
- تتدخل بعض الببتيدات المكونة من عدد من الأحماض الأمينية في تنظيم الدورة الخلوية والموت الخلوي المبرمج.

نظراً للأهمية البيولوجية للأحماض الأمينية فقد استعمل قسم منها في معالجة بعض الأمراض؛ إذ تستخدم الأحماض الأمينية وحيدة أو متعدّدة الحمض في بعض الحالات المرضية مثلاً يتمّ استخدام السيستئين لتقوية الشعر (Kuzuhara, 2005)، كذلك يستخدم الأرجينين في معالجة ارتفاع الكولسترول وتحسين الاستجابة المناعية ضد الجراثيم والفيروسات والخلايا السرطانية، كما أنه يحرض على إفراز هرمون النمو (Hes, 2004)، كذلك تبيّن أن للأحماض الأمينية متفرعة السلسلة دور تغذوي علاجي في حالات الأمراض الكبدية المزمنة (Kawaguchi *et al*, 2011).

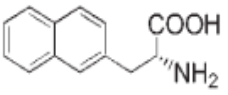
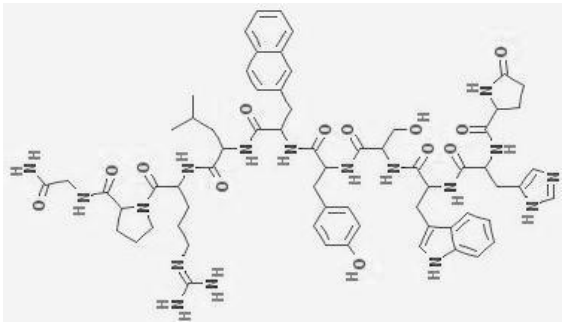
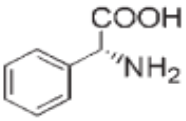
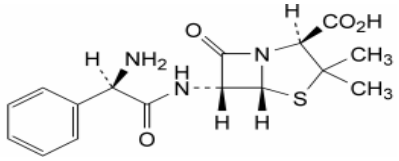
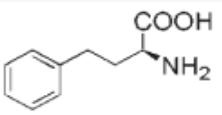
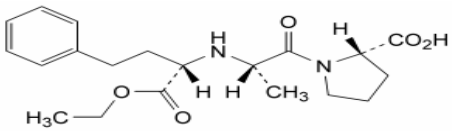
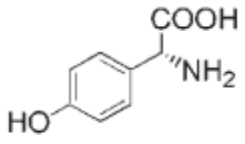
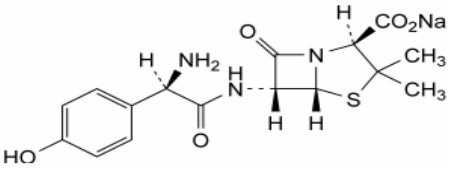
إضافة للأحماض البروتينية الشائعة يوجد أحماض أمينية غير بروتينية نادرة لها أهمية كبيرة في اصطناع بعض الأدوية الحديثة، ولها دور مهم في العمليات الاستقلابية منها β ألانين كجزء من الكوأنزيم (A CO-A) وغاما أمينو بوتيريك أسيد كناقل عصبي، كما أن لبعضها أهمية علاجية كصادات حيوية مثل الباسيتراسين Bacitracine، الغراميسيدين Gramicidine A أوكمضادات سرطان مثل Bleomycine. يوضّح الجدول (1) بعض هذه الأحماض الأمينية النادرة المستخدمة علاجياً (James, 2003).

الجدول (1): بعض الأحماض الأمينية النادرة غير البروتينية وتطبيقاتها العلاجية:

الحمض الأميني النادر	التطبيق العلاجي
 L-Dopa	يستخدم لتخفيف بعض أعراض داء باركنسون وبشكل خاص درجة الارتعاش (Antiparkinsonian)
 D-Penicillamine	يستخدم في المعالجة العرضية لحالات التهاب المفاصل (مضاد للرثية) (Anttirheumatic)
 D-Cycloserine	مضاد جرثومي (Antibacterial)

يمكن أن تدخل مثل هذه الأحماض النادرة أو مشتقاتها كجزء مهم في بنية بعض المواد الدوائية الفعّالة منها D- فينيل غليسين الذي يدخل في بنية الأمبيسيللين المستخدم كمضاد جرثومي. يوضّح الجدول (2) بعض هذه المشتقات (James, 2003).

الجدول (2): بعض الأمثلة عن مشتقات الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيب بعض الأدوية:

الحمض الأميني النادر/مشتقه	الدواء	التطبيق العلاجي
 D-2-Naphthylalanine	 نافاريلين Nafarelin	معالجة الانتباذ البطاني الرحمي[4] Endometriosis
 D-Phenylglycine	 الامبيسيللين Ampicillin	مضاد جرثومي
 L-Homophenylalanine	 اينالابريل Enalapril	خافض لضغط الدم
 D-4-Hydroxyphenylglycine	 أموكسيسلين Amoxicillin	مضاد جرثومي

[4] الانتباذ البطاني الرحمي: وجود أنسجة من بطانة الرحم خارجه مما قد يؤدي إلى العديد من الأعراض المؤلمة. (Al Kadri, *et al*, 2009- Vinatier *et al*, 2001)

2.2.1. أهمية الأحماض الأمينية كمتمّمات غذائية:[5]

تمتلك الأحماض الأمينية أهمية غذائية، يكون الجسم قادراً على تصنيع بعضها وغير قادر على تصنيع بعضها الآخر، وبالتالي لا بدّ من الحصول على هذه الأحماض من مصدر خارجي كالطعام مثلاً للحفاظ على مستويات مناسبة منها في الجسم، وعليه تصنف الأحماض الأمينية بحسب أهميتها الغذائية إلى:(Schulz *et al*, 1979; Belitz *et al*, 2009)

I. أحماض أمينية أساس Essential amino acid: وهي الأحماض التي لا تصنع في الجسم، ويجب الحصول عليها مع الطعام، عددها عشرة أحماض أمينية وهي الفالين، ايزولوسين، لوسين، فينيل ألانين، تريبتوفان، ميتيونين، تريونين، هيستيدين (أساسي عند الرضع)، الليزين والأرجينين (شبه أساس).
II. أحماض أمينية غير أساس Nonessential amino acid: متوفرة في الجسم السليم بكميات كافية وهي الغليسين، الألانين، البرولين، السيرين، السيستين، الأسبارجين، الغلوتامين، حمض الأسبارتيك وحمض الغلوتاميك.

تستخدم الأحماض الأمينية غذائياً بحالات عديدة منها: عوز الأحماض الأمينية. تعطى المتمّمات الغذائية الحاوية على أرجينين في حالات عوز الأرجينين الذي يسبب خللاً في أداء الخلايا التائية والبطانية (Morris, 2012). تعطى أيضاً في العديد من الحالات المرضية. مثلاً، وجد أن للمتمّمات الحاوية على اللوسين تأثيراً علاجياً في العضلات الهيكلية في حالات الضمور العضلي (Nicastro, 2011). كذلك أجريت دراسة من قبل الباحث Ammann وزملائه بيّنت أن إعطاء المتمّمات الحاوية على أحماض أمينية أساس تسهم في زيادة الكثافة المعدنية للعظم وقوته عند الفئران المعرضة لحمية بروتينية منخفضة الحريرات (Ammann *et al*, 2002). تساعد المتمّمات الغذائية الحاوية على الأرجينين على شفاء تقرحات القدم السكرية (Arana *et al*, 2004)، وتعطى عند الرياضيين لزيادة الكتلة العضلية (Williams, 2005).

في بداية البحث، تمّ دراسة مجموعة من المتمّمات الغذائية التي تمّ الحصول عليها من النوادي الرياضية والحاوية في تركيبها على **الكرياتين والبروتين**، وفي الجزء الثاني من البحث تمّ التركيز على الحمض الأميني **ل_ أرجينين** المستخدم دوائياً أو كمتمّمات غذائية والمتوفر بعدّة أشكال صيدلية في الصيدليات (على نحو قانوني) وفي النوادي الرياضية (غير قانوني).

[5] تعرف المتممات الغذائية بحسب وزارة الصحة السورية بأنها مستحضرات معدة للاستخدام عن طريق الفم، تحتوي على جرعات محددة من الفيتامينات، المعادن، الأحماض الأمينية والدسمة بتراكيز أخفض من التراكيز الدوائية (وزارة الصحة، 2005). وتوجد هذه المتممات بعدة أشكال صيدلية (مضغوطات، كبسولات، مساحيق، سوائل..) (www.fda.gov).

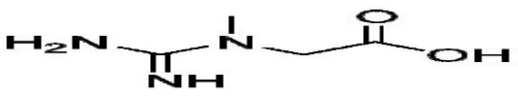
3.1. لمحة عن المستحضرات المدروسة:

1.3.1. المتمّمات الغذائية الحاوية على البروتين والكرياتين:

- تعدّ البروتينات والأحماض الأمينية بنوعيها البروتينية وغير البروتينية من أكثر المتمّمات الغذائية استخداماً خصوصاً من قبل الرياضيين (Williams, 2005). تقدر أصناف المتمّمات الغذائية المستخدمة عند الرياضيين بنسبة 40- 88 % من المتمّمات التجارية. تستخدم هذه المتمّمات لزيادة الكتلة العضلية ومنع تقويض البروتينات عند ممارسة التمارين الرياضية لفترة طويلة، إضافة إلى تحسين إعادة تصنيع الغليكوجين في العضلات بعد التمرين، كما تحسن من تصنيع الهيموغلوبين والميوغلوبين وبعض الأنزيمات المؤكسدة. تستخدم عادة قبل إجراء التمرين أو بعده بمدة 1-3 ساعات (Williams, 2005). تزود البروتينات الجسم أيضاً بالأحماض الأمينية الأساس والأحماض الأمينية التي تستعمل للاصطناع الداخلي للبروتينات، وتقدر الحاجة اليومية من البروتين بـ 37 g للرجال و29 g للنساء وتزداد الحاجة إليه في حالات الولادة والإرضاع عند النساء (Koolman *et al*, 2005).

يعدّ الكرياتين ($C_4H_9N_3O_2$) وهو حمض أميني غير بروتيني، أكثر المتمّمات الغذائية استخداماً لتحسين الأداء الرياضي وزيادة القوة العضلية (Bemben, 2005). قد تبيّن أن 50% من الرياضيين (رجال، نساء) المشاركين في الألعاب الأولمبية كانوا يستخدمون الكرياتين (Williams *et al*, 1999)، كذلك تمّ إجراء دراسة على 806 رياضيين في الولايات المتحدة الأمريكية، تبيّن أن 28% منهم يتناولون الكرياتين (Labotz *et al*, 1999).

يصنع الكرياتين (α-methyl guandino-acetic acid) في الجسم في الكبد والكلية والبنكرياس اعتباراً من الأحماض الأمينية (ل–أرجينين L-Arg، غليسين Gly ول– ميتيونين L-Met) (Persky *et al*, 2001). يمتلك الكرياتين الصيغة الموضّحة في الشكل (2) ويبلغ وزنه الجزيئي 131.13 g.



$C_4H_9N_3O_2$

الشكل (2): الصيغة العامة للكرياتين

يتوفر الكرياتين تجارياً كمتمّم غذائي مستخدم من قبل الرياضيين بشكل مونو هيدرات أو دي هيدرات، لكن غالباً يستخدم بشكل مونوهيدرات (Bemben *et al*, 2005; Cooper *et al*, 2012)، يمكن أن يؤخذ فموياً بشكل محلول أو صلب، يمتصّ عبر الجهاز الهضمي بعدّة آليات (النقل الفعّال، الانتشار البسيط) ويتمّ إطراحه كلوياً (Persky *et al*, 2001). يرفع تناول المتمّمات الغذائية الحاوية على الكرياتين مستوى الكرياتين والفوسفوكرياتين في العضلات بنسبة 15-40 % تقريباً كذلك يُزيد القدرة على تحمل

التمرين لمدة أطول (Jäger *et al*., 2011)، كما يزيد الكتلة العضلية والأداء الرياضي (Kreider, 2003; Sundell *et al*, 2011). يسبب الكرياتين زيادة الوزن أيضاً من خلال زيادة محتوى الماء داخل الخلايا مما يزيد من حجم الخلايا (Lawler *et al*., 2002).

1.1.3.1. مأمونية استخدام الكرياتين:

بيّنت الدراسات أن إعطاء الكرياتين بجرعة 20 غ / يومياً ترفع نسبة ميتيل أمين والفورم ألدهيد في البولة لكن تبقى ضمن المجال الطبيعي لها، وترفع من نسبة الكرياتينين في المصل لكن لا تؤثر في تصفيته وبالتالي لا تؤثر في الوظائف الكلوية (Cooper *et al*, 2012).

2.1.3.1. طرائق تحليل البروتينات:

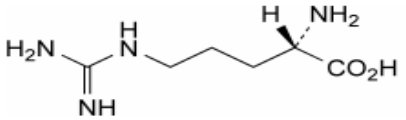
توجد العديد من الطرائق المستخدمة في تحليل البروتينات. يعدّ اختبار كلدال من الطرائق القديمة المرجعية المستخدمة اعتماداً على تحديد نسبة الآزوت العام في العيّنة (Lynch *et al*, 1999) لذلك فهو غير نوعي. توجد طرائق أخرى أكثر نوعية تعتمد على حلمهة البروتين لتعطي أحماض أمينية يتمّ الكشف عنها بعد إجراء عملية الاشتقاق لها، منها الطرائق الكروماتوغرافية مثل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC؛ إذ يتمّ إجراء حلمهة حمضية للبروتين والكشف عن الأحماض الأمينية الناتجة بالفلورة، بالأشعة فوق البنفسجية، أو ضمن المجال المرئي بعد استخدام عوامل اشتقاق مختلفة مثل أورتو فتال ألدهيد OPA والنينهيدرين (Starcher, 2001; Friedman, 2004; Bartolomeo, 2006).

3.1.3.1. طرائق تحليل الكرياتين:

كما ذكر سابقاً يعدّ الكرياتين حمض أميني غير بروتيني وبالتالي يمكن تحليله بطرائق تحليل الأحماض الأمينية مثل اختبار كلدال الذي يعتمد على نسبة الآزوت العام (Lynch *et al*, 1999) أو بالاعتماد على الطرائق الكروماتوغرافية مثل HPLC (Sellevold *et al*, 1986; Dash *et al*,2002)، كما يمكن تحليل الكرياتين بالاعتماد على الرحلان الكهربائي الشعري (Burke *et al*, 1999).

2.3.1. الأرجينين:

يمتلك الأرجينين (2-amino-5-guanidinovaleric acid) (Böger, 2001) الصيغة العامة الموضّحة في الشكل (3) ويبلغ وزنه الجزيئي: 174غ.



$C_6H_{14}N_4O_2$

الشكل (3): الصيغة العامة للأرجينين

عزل الأرجينين من شجيرات الترمس عام 1866 من قبل Schulze و Steiger، يتواجد في جميع البروتينات بمعدّل وسطي 6-3% (Belitz, *et al*, 2009).

يتمّ الاصطناع الداخلي للأرجينين في الكلية من السيترولين الذي يفرز على نحو أساس من الأمعاء الدقيقة كما يسهم الكبد في اصطناع كميات مهمة من الأرجينين التي تستخدم في حلقة البولة (Gad, 2010). عندما يؤخذ الأرجينين فموياً يمتصّ عن طريق الصائم واللفائفي في الأمعاء الدقيقة، يستقلب 60% منه بالطريق المعدي المعوي بينما يصل 40% منه إلى الدوران الدموي (Gad, 2010).

1.2.3.1. الصفات الفيزيائية للأرجينين:

إن الأرجينين مسحوق أبيض بلوري، ذواب بسهولة بالماء وقليل الذوبان في الكحول (EP, 2005).

1.2.3.1 .2. أهمية الأرجينين:

يعدّ ل- أرجينين طليعة اصطناع أوكسيد الآزوت، اليوريا، عديدات الأمين، البرولين، الغلوتامين، الكرياتين والأغماتين[6] (Wu *et al*, 1998). يستخدم ل-أرجينين في معالجة ارتفاع الكولسترول، تحسين الاستجابة المناعية ضد الجراثيم والفيروسات والخلايا السرطانية، يحرض على إفراز هرمون النمو ويساعد في الحفاظ على التوازن الآزوتي ضمن الجسم (Hess *et al*, 2004)، كما وجد أنه يخفف من حدوث الالتهاب المعوي القولوني الناخر عند الخدج (Amin *et al*, 2002).

يمتلك ل- أرجينين أهمية في الوقاية وتحسين أمراض نقص التروية القلبية، في تحسين وظائف الانتصاب، زيادة مستويات مضادات الأكسدة وزيادة تحرر الأدرينالين والنورأدرينالين، تعزيز حركة الحيوانات المنوية وبقائها حيّة، كما له دور في علاج التهاب المثانة الخلالي (Gad, 2010).

أجريت العديد من الدراسات التي أوضحت أهمية ل- أرجينين الفيزيولوجية منها الدراسة التي أجريت عام 2002 من قبل الباحث Preli وزملائه؛ إذ تمّ إعطاء ل- أرجينين فموياً بكميات تزيد عن الكمية الموجودة (5.4g) في المتمّمات الغذائية المباعة في الولايات المتحدة الأمريكية بـ4 إلى 5 أضعاف وكان هدف الدراسة تقييم تأثير الايتاء الفموي للأرجينين على الدلالات الدموية والمعايير الوظيفية للصحة الوعائية. تمّت الدراسة على موديل حيواني وعلى الإنسان (Preli *et al*, 2002).

أظهرت النتائج على الموديل الحيواني تأثيرات مهمة لـ ل- أرجينين الفموي عند الحيوانات المصابة بفرط كولسترول الدم وتبيّن أن ل- أرجينين يثبط اصطناع لويحات التصلب العصيدي ويحافظ على الوظيفة البطانية للأوعية، كما يؤثر في الوسائط الاخرى في التصلب العصيدي التي تتضمن الخلايا الالتهابية والصفيحات الدموية.

كما أجريت الدراسة على مجموعة متنوعة من الأشخاص (مرضى قصور قلب احتقاني، مصابون بأمراض وعائية محيطية أو بارتفاع كولسترول الدم، مرضى الشريان التاجي، مدخنون، نساء بعد سن اليأس وأشخاص أصحاء). أظهرت النتائج أنه ليس لـ ل- أرجينين فائدة على الأصحاء إن لم يترافق بخلل

---

[6] الأغماتين: أمين موجب الشحنة، يصنع من الأرجينين بعملية نزع كربوكسيل منه، ويعدّ ربيطة داخلية لمستقبلات الايميدازولين (Boger, 2007; Molderings, 2012)

وظيفي بطاني، كما أوضحت وجود علاقة مع إنقاص تجمع الصفيحات والتصاقها، وإنقاص التصاق وحيدات الخلية، كما بيّنت الدراسة تحسن التوسع الوعائي المعتمد على البطانة ولكن هذه الدراسات لم تترجم بدراسات سريرية واقعية. ما زال هناك حاجة إلى دراسات سريرية عشوائية أكبر ولمدة أطول تهدف إلى التفسير الكامل لتأثير ل–أرجينين كمتمّم غذائي على الصحة الوعائية (Preli *et al*, 2002).

في عام 2009 أجريت دراسة من قبل I.B.J.G. Debats وزملائه بيّنت أن للأرجينين أهمية في شفاء الجروح المحيطية بآلية غير معروفة. لكن الدراسات على الحيوانات بيّنت أن هذا الدور يتمّ على الأقل عبر تواسط اصطناع أوكسيد الآزوت الذي يتواسط إصلاح النسج بما فيها تكون الأوعية وتصنيع الكولاجين (Debats *et al*, 2009).

في عام 2011 بيّن Clemmencen وزملاؤه أن المتمّم الغذائي الحاوي على أرجينين يؤثر فعلياً في متغيرات عدّة مترافقة مع الاستقلاب مثل إنقاص الأنسجة الدهنية البيضاء، زيادة الحساسية على الأنسولين وزيادة استهلاك الطاقة عند الفئران الموضوعة على حمية غذائية منخفضة البروتين (Clemmensen *et al*, 2011).

3.2.3.1. مأمونية استخدام الأرجينين:

أوضح عدد قليل من الدراسات المتاحة والمجراة على ل– أرجينين المعطى فموياً وجود آثار سلبية بعد العلاج الحاد والمزمن به. معظم هذه الآثار كانت غثيان وقياء وفي حالات نادرة إسهال.

تبيّن أن جرعات تصل إلى 30 غ يومياً جيدة التحمل وأن الجرعات بين 30-15 غ لم تظهر أية تغيّرات في وظائف الكبد أو سكر الدم أو الشوارد البلاسمية. يجب أخذ الحذر عند إعطائه للحوامل والمرضعات، والمصابين بالتهابات فيروسية ولمرضى الكبد والكلية (Gad, 2010).

4.2.3.1. طرائق تحليل الأرجينين:

يوجد العديد من الطرائق المستخدمة في تحليل الأحماض الأمينية، منها اختبار كلدال باعتباره يعتمد على نسبة الآزوت العام في العيّنة، يعدّ طريقة غير نوعية (Lynch *et al*, 1999).

توجد طرائق أخرى أكثر نوعية، فالأرجينين من الأحماض الأمينية التي لا تمتصّ الأشعة فوق البنفسجية، لذلك لا بد من إجراء عملية اشتقاق له حتى يتمّ الكشف عنه. يمكن الكشف عن الأرجينين في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي بعد إجراء عملية الاشتقاق بمركبات مثل النينهيدرين (Friedman, 2004). تعدّ الطرائق الكروماتوغرافية الطرائق المرجعية الأكثر استخداماً لتحليل الأحماض الأمينية ومنها الأرجينين مثل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، كروماتوغرافيا التبادل الشاردي، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء (Hess *et al*. 2004).

الفصل الثاني

مراقبة جودة المستحضرات التجارية الحاوية على الأحماض الأمينية

تتوفر المستحضرات الحاوية على أحماض أمينية بأشكال صيدلية مختلفة وبالتالي يجب أن تخضع لاختبارات الجودة التي تفرضها دساتير الأدوية والتشريعات التي تضعها المؤسسات الحكومية والمنظمات العالمية التي تعنى بهذه الأشكال والمستحضرات، ويُذكر آنفاً بعض هذه التشريعات.

1.2. التشريعات والقوانين الناظمة:

كما تبيّن سابقاً فإن للأحماض الأمينية أهمية علاجية وغذائية، فلكي يتمّ استخدامها كأدوية يجب تقديمها كمثيلاتها من المواد الفعّالة بشكل مستحضرات صيدلية، لذلك تخضع هذه المستحضرات كغيرها من الأدوية لمجموعة من التشريعات التي تضمن جودتها وبالتالي فعاليتها وصلاحيتها لهذا الاستخدام؛ إذ يجب أن تتطابق مع المتطلبات الدستورية فيما يخصّ أشكالها الصيدلية المتنوعة من حيث الفحوص والاختبارات التي تضعها دساتير الأدوية ومنها تجانس الوزن، تجانس المحتوى، اختبارات التفتت والذوبان، وكذلك أن يتمّ تصنيعها وفقاً لقواعد التصنيع الجيد GMP good manufacturing practices.

تتواجد الأحماض الأمينية المستخدمة كمتمّمات غذائية بشكل مستحضرات صيدلية كمثيلاتها المستخدمة دوائياً، أو يمكن أن تتواجد بشكل مساحيق أو سائل. على الرغم من تواجدها على شكل مستحضرات صيدلية فإن منظمة الدواء والغذاء الأمريكية لا تفرض على المصنع تسجيل المستحضر لديها أو أخذ الموافقة على إنتاجه، إنما تكون مسؤولة عن أمان المنتج بعد تسويقه وتتطلب وجود بعض المعلومات التوصيفية على العبوة: اسم توصيفي للمنتج يوضّح أنه متمّم، مكان التصنيع، قائمة بجميع مكوناته، المحتوى الصافي من المكونات (FDA, 2005).

إضافة لذلك فإن دساتير الأدوية ومنها دستور الأدوية الأمريكي يضع برامج طوعية لجعل المصنع يضمن جودة هذا المنتج ويضمن هذا البرنامج جودة المنتج النهائي. توضع لصاقة توثيق من دستور الأدوية الأمريكي للدلالة على ذلك في حالة اتباع المصنع لهذا البرنامج.

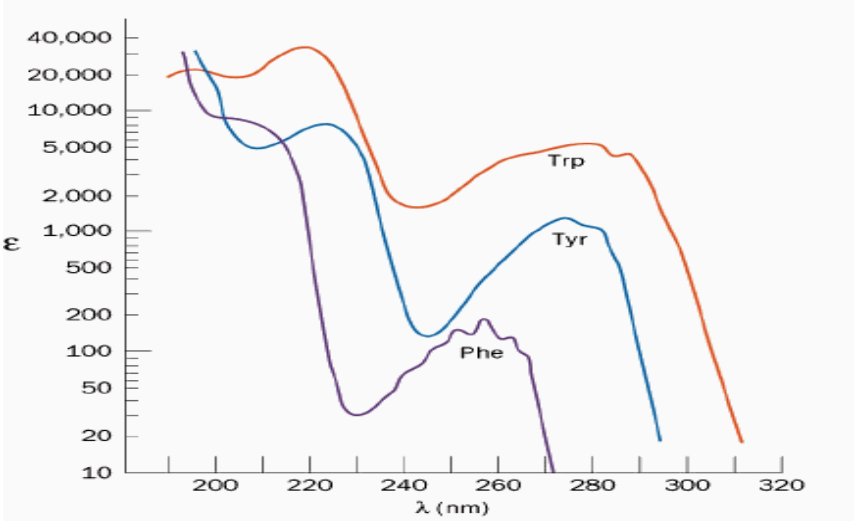
في سورية وضعت وزارة الصحة السورية أسساً لتسجيل مثل هذه المستحضرات (المتمّمات الغذائية). فقد أصدرت الوزارة القرار رقم 24/ت لعام 2010 لتنظيم المستحضرات والمستلزمات الصحية غير الدوائية؛ إذ لايمكن استيراد هذه المستحضرات إلا من قبل مستودع مرخص أصولاً. كما نصّ القرار على أنه في حالة المواد المستوردة أو المصنعة محلياً بامتياز يجب استخدام الاسم نفسه في بلد المنشأ وفي حال تبديله يجب تقديم المبررات لاختلاف الاسم التجاري، إضافة إلى معاقبة من يخالف أحكام هذا القانون). كذلك نصّ القرار على أن يتمّ بيع هذه المستحضرات في الصيدليات حصراً وتراقب من قبل مديرية الرقابة الدوائية في وزارة الصحة أومن قبل دوائر الرقابة الدوائية في مديريات الصحة (وزارة الصحة، سورية، القرار رقم 24/ت لعام 2010).

كما ذكر سابقاً فإن المتمّمات الغذائية الحاوية على الأحماض الأمينية تستخدم بكثرة خاصة من قبل الرياضيين لبناء الكتلة العضلية، وعلى الرغم من أن وزارة الصحة السورية تفرض بيعها حصراً في الصيدليات، فإن بعض النوادي الرياضية تقوم ببيعها لمرتاديها. تحصل هذه النوادي عليها من مصادر غير قانونية وبالتالي لا يمكن التأكد من جودتها مما قد ينتج عنه نتائج سلبية على صحة الرياضيين. تقود هذه الممارسات إلى ضرورة مراقبة جودة هذه المستحضرات للتأكد من مأمونيتها وفعاليتها.

في دراستنا تمّ إجراء بعض الاختبارات التي تطلبها دساتير الأدوية وتفرض وجودها قواعد التصنيع الجيد وتمّ التركيز على التحديد الكمي للحمض الأميني الأرجينين في أشكاله الصيدلية المتوفرة.

2.2. التحديد الكمي للأحماض الأمينية:

توجد العديد من التقنيات المستخدمة في تحليل الأحماض الأمينية، يعتمد اختيار التقنية المتبعة على الحساسية المطلوبة من التحدي الكمي (EP, 2005). لا تمتصّ معظم الأحماض الأمينية الأشعة فوق البنفسجية UV، باستثناء تلك الحاوية في بنيتها على حلقة عطرية وهي (الفينيل ألانين، التربتوفان، التيروزين) الشكل (4).



الشكل (4): الأحماض الأمينية التي تمتصّ UV

أما فيما يخصّ الأحماض التي لا تمتصّ الأشعة فوق البنفسجية لابدّ من إجراء عملية اشتقاق لها، يتمّ ذلك باستخدام مواد عدّة منها: (النينهيدرين ninhydrin، أورتو فتال ألدهيد OPA) (Molnar- Perl., 2001) وفينيل ايزوثيوسيانات (phenylisothiocyante) (Sánchez-Machado *et al*, 2003).؛ إذ إن الغاية من الاشتقاق هو الحصول على مركب قابل للتفلور أو يمكن الكشف عنه في مجال الأشعة فوق بنفسجية أو المرئية.

تعدّ الطرائق الكروماتوغرافية أكثر الطرائق استخداماً في تحليل الأحماض الأمينية وفصلها مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Hess *et al*. 2004)، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) (Bartolomeo, 2006)، كروماتوغرافيا التبادل الشاردي (EP, 2005). كذلك يمكن استخدام طرائق أقل نوعية مثل الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer) (Gaitonde, 1967- Khramov, 2002) واختبار كلدال.

في دراستنا تمّ اعتماد الطرائق الثلاث لتحديد المحتوى من الأحماض الأمينية في المستحضرات التجارية المدروسة: اختبار كلدال، الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي وتقنية HPLC.

1.2.2. اختبار كلدال:

طور الكيميائي الدانماركي Johan Kjeldahl طريقة لتحليل الآزوت في المركبات العضوية وسميت اختبار كلدال ، يعدّ هذا الاختبار من الطرائق القديمة المرجعية المستخدمة لتحليل البروتينات والأحماض الأمينية اعتماداً على تحديد نسبة الآزوت العام في العيّنة (Lynch *et al*, 1999) لذلك تعدّ من الطرائق المستخدمة غير النوعية.

يتمّ إجراء هذا الاختبار على مراحل عدّة وهي:

i. **تحضير العيّنات ووزنها:** يجب أن تكون العيّنات متجانسة ما أمكن، يعتمد وزن العيّنة على نسبة البروتين فيها كما هو موضّح في الجدول (3).

الجدول (3): وزن العيّنات اعتماداً على محتواها من البروتين في اختبار كلدال:

المحتوى من البروتين %	وزن العيّنة (mg)
5%>	1000-5000
5-30%	500-1500
>30%	200-1000

ii. **التهضيم:** تهدف هذه الخطوة إلى تحطيم الروابط الآزوتية؛ إذ يتحول الكربون في المركب إلى ثاني أوكسيد الكربون ويتحول الآزوت إلى شوارد الأمونيوم، يستخدم لهذا الغرض حمض الكبريت وتكون بذلك درجة حرارة التهضيم مساوية لدرجة حرارة غليان الحمض (338 مْ)، لكن يمكن إضافة بعض الأملاح (كبريتات الصوديوم، كبريتات البوتاسيوم) لرفع درجة حرارة التفاعل، وكذلك تستخدم بعض

المحفزات لدعم عمليات الأكسدة والتي قد تكون عبارة عن معادن (زئبق، نحاس)، أكاسيد معادن (أكسيد النحاس، أكسيد الزئبق، خامس أكسيد الفوسفور) أو فوق أكاسيد (بيروكسيد الهيدروجين).

iii. **التقطير والمعايرة:** تتمّ عملية التقطير بإضافة هيدروكسيد الصوديوم لرفع درجة pH الوسط فتتحول شوارد الأمونيوم إلى أمونيا يتمّ استقبالها في حوجلة تحوي كمية محددة من حمض كلور الماء فتعدّل جزءاً منه ويعاير الباقي بمحلول عياري من هيدروكسيد الصوديوم، أو يتمّ استقبال الأمونيا في حوجلة تحوي حمض البور والكاشف (أحمر الفينيل وأخضر البروموكريزول). تتشكل بورات الأمونيوم في هذه المرحلة التي تتمّ معايرتها باستخدام محلول معلوم التركيز من حمض كلور الماء. بعد ذلك يتمّ إجراء الحسابات اللازمة لمعرفة النسبة المئوية للآزوت ثم للحمض الأميني أو البروتين في العيّنة كما سيوضّح لاحقاً.

2.2.2. الكشف في مجال الأشعة المرئية:

كما ذكر سابقاً، فإن معظم الأحماض الأمينية لا تمتصّ الأشعة فوق البنفسجية لذلك كان لا بد من إجراء عملية اشتقاق باستخدام مواد مختلفة مثل أورتو فتال الدهيد، النينهيدرين.

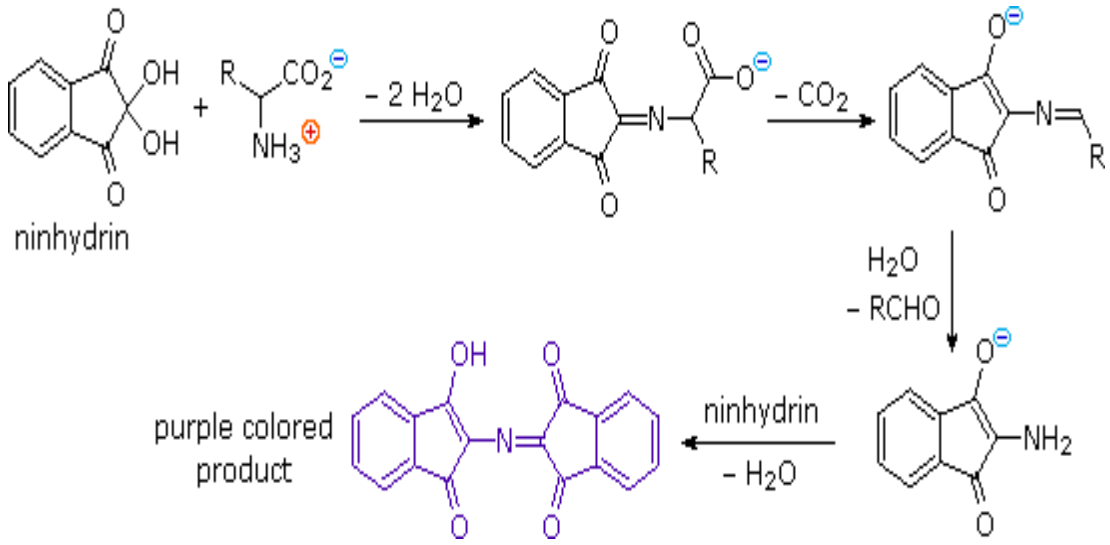
في دراستنا تمّ الكشف في مجال الأشعة المرئية بعد إجراء عملية الاشتقاق باستخدام كاشف النينهيدرين، استخدم النينهيدرين منذ عام 1940 كطريقة لتحديد كمية الأحماض الأمينية، وقد طرأ على هذه الطريقة العديد من التعديلات خلال العقود الماضية من حيث مدة التسخين، درجة الحرارة، الوقاءات ودرجة الحموضة وتمّ تطويرها لتحديد المجموعة الأمينية في الأغذية.

تستخدم حالياً في تقييم الشيتوزان[7] والمركبات الأمينية في المنتجات الصيدلية (Frutos *et al,* 2000). استخدمت أيضاً في التحديد الكمي للكولاجين كبوليمير في الخلايا الميكروبية المتحللة (Yin *et al*, 2002 Amin *et al*., 2000). لا تزال هذه الطريقة مستخدمة في التحديد الكمي للأحماض الأمينية على الرغم من وجود طرائق أخرى كالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وذلك كونها طريقة بسيطة، معدّاتها غير مكلفة، ملائمة للتحليل الروتيني في حال وجود عدد كبير من العيّنات.

يعدّ تفاعل النينهيدرين حالة خاصة من تفاعلات تحطم ستريكر Strecker degradation (شكل 5)؛ إذ يعطي مركباً ذا لون أزرق بنفسجي مع الأحماض الأمينية له امتصاصية أعظمية عند طول موجة 570 نانو متر (Lamothe, 1973) باستثناء البرولين الذي يعطي نتيجة التفاعل مركباً ذا لون أصفر له امتصاصية عند طول موجة 440 نانومتر. يستخدم هذا التفاعل لتحديد كمية الأحماض الأمينية باستخدام المطياف الضوئي؛ إذ يتراوح حدّ الكشف بين 1-0.5 نانومول.

---

[7] هو بولمير β-1.4, D- glucoseamine ، يستخدم كمتمم غذائي، تبيّن أن له دور في خفض نسبة الكولسترول والغليسيريدات الثلاثية في الدم نظراً لقدرته على الارتباط باللبيدات من مصدر تغذوي وبالتالي يقلل من الامتصاص المعوي لها، وله دور في التئام الجروح (Koide *et al*, 2004).



الشكل (5): آلية تفاعل النينهيدرين مع الأحماض الأمينية

قام الباحث Shih-Wen Sun وزملاؤه في عام 2005 بتطوير طريقة النينهيدرين للتحديد الكمي للأحماض الأمينية؛ إذ شملت الدراسة إجراء مجموعة من التعديلات على نوع الوقاء والمحلات المستخدمة والزمن ودرجة حرارة التسخين جعلت الطريقة أكثر ملاءمة وأقل تكلفة وتحتاج زمناً أقل.

تمّ استبدال المذيبات القابلة للاشتعال كخلات السيللوز بمذيبات أخرى تكون غير قابلة للاشتعال مثل دي ميتيل سلفوكسيد DMSO، الماء، الاسيتون، الكحول المطلق، الايتلين غليكول والميتانول. كذلك تمّ استبدال وقاء هيدروكسيد الليثيوم– حمض الخل بهيدروكسيد الصوديوم– حمض الخل كونه أقل تكلفة وأكثر توافراً في المخابر. كما تمّ في هذه الدراسة تحديد الشروط المناسبة للتحديد الكمي للأحماض الأمينية وهي درجة pH تعادل 5.2-5.3، والتسخين لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 100 درجة مئوية (Sun *et al*, 2005). لكن تبقى هذه الطريقة غير نوعية للأحماض الأمينية على الرغم من بساطتها لذلك نحن بحاجة لطريقة أكثر نوعية كتقنية الـ HPLC التي تعدّ طريقة فصل وتحديد كمي.

3.2.2. الطرائق الكروماتوغرافية:

تعدّ هذه الطرائق الأكثر استخداماً في عمليات الفصل والتحديد الكمي والكيفي للأحماض الأمينية؛ إذ تستخدم أنواع مختلفة من الكروماتوغرافيا مثل: كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Nabi *et al*, 2003; Hess, 2004) ، والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (Sherwood, 1990; Helrich, 1990)، كروماتوغرافيا التبادل الشاردي (Hess, 2004).

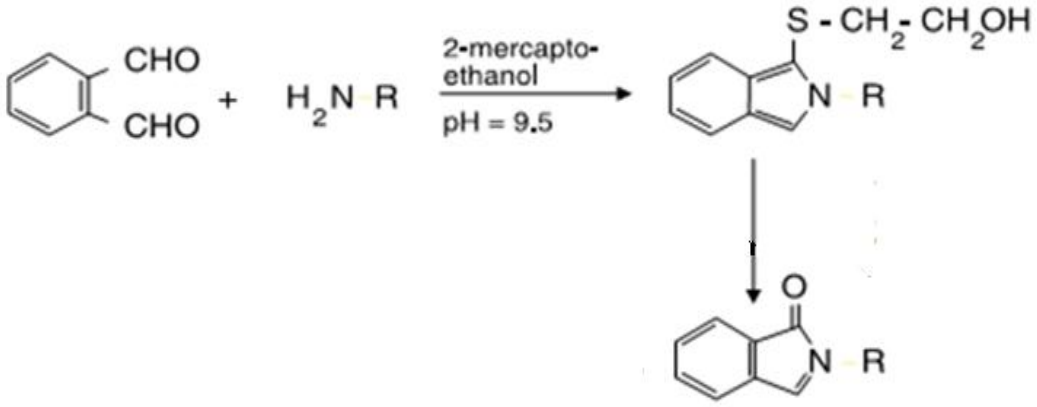
في دراستنا تمّ استخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ذات التفريق المتساير والطور العكوس، وهي من الطرائق ذات الحساسية والتكرارية العاليتين (Tcherkas *et al*, 2001). ولكن كما ذكر سابقاً، كي يتمّ الكشف عن الأحماض الأمينية لا بد من إجراء عملية اشتقاق لها(Blau *et al*, 1993)، تتمّ عملية الاشتقاق إما قبل العمود pre-column derivatization باستخدام كواشف مثل أورتو فتال ألدهيد (Mou, 1997; *Babu et al*, 2002; Gatti *et al*, 2004)، فينيل ايزوثيوسيانات (Heinrikson *et al*, 1984;

Sherwood, 1990) أو بعد العمود post-column derivatization باستخدام كاشف مثل النينهيدرين (Friedman, 2004).

يستخدم عادة في التحليل طور متحرك قادر على فصل الأحماض الأمينية على العمود، ويتمّ اختيار الكاشف المستخدم (أشعة فوق البنفسجية، مرئية، فلورة) بحسب طريقة الاشتقاق المستخدمة (EP, 2005).

يعدّ الـOPA الأكثر استخداماً في الاشتقاق قبل العمود، يتفاعل فقط مع مجموعات الأمين الأولية بوجود مركب سلفهدريل مثل 2- ميركابتو ايتانول 2-mercaptoethanol (2-ME) أو Na_2SO_3 كبريتيت الصوديوم (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 بينما تبقى مشتقات حمض أميني –$OPA–Na_2SO_3$ ثابتة لمدة ثلاث ساعات (Tcherkas *et al*, 2001).

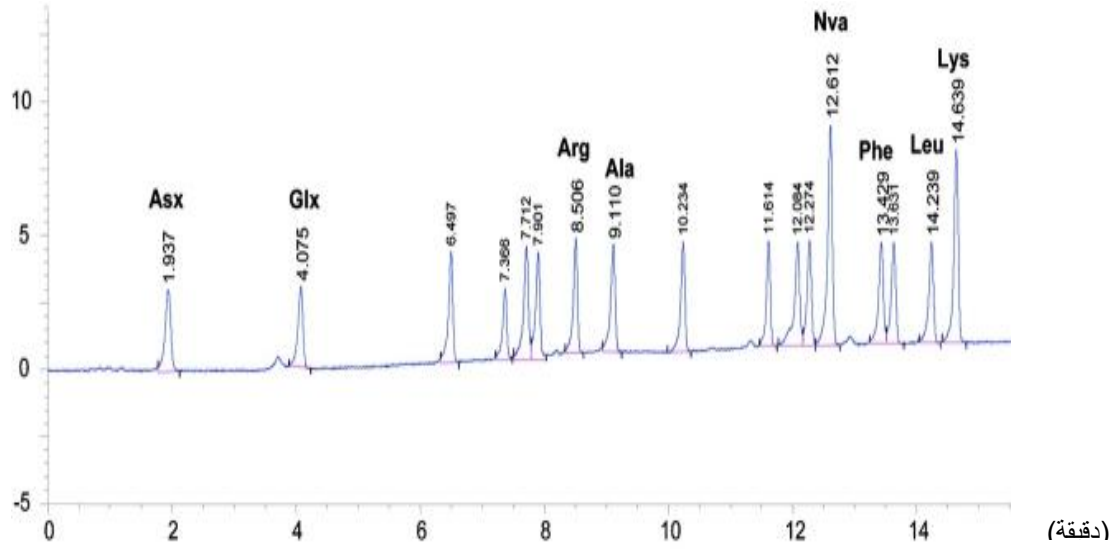
يتمّ التفاعل حمض أميني–OPA كما هو موضّح في الشكل (6) وبدرجة حموضة 9.5 ليعطي مشتقاً يمكن الكشف عنه بالأشعة فوق البنفسجية وبالفلورة.



الشكل (6): تفاعل حمض أميني -OPA

يوضّح الشكل (7) كروماتوغرام لعدد من الأحماض الأمينية العيارية بتركيز 250 pmol/µl تمّ اشتقاقها من قبل العالم Bartolomeo وزملائه في عام 2006 باستخدام OPA وحقنها بجهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، حجم الحقنة 2.5 ميكرولتر، الطور المتحرك من النمط المتدرج ويتكون من مكونين هما A: وقاء فوسفات الصوديوم يعطي درجة pH تعادل 7.8 وB: اسيتونتريل/ ميتانول/ ماء بنسبة 10/45/45، بتدفق 2 مل/ د ودرجة الحرارة 40 درجة مئوية، تمّ الكشف بمجال الأشعة المرئية detection (UV-VIS) عند طول موجة 338 نانو متر (Bartolomeo *et al*, 2006).

مساحة القمة



الشكل (7): كروماتوغرام الأحماض الأمينية العيارية بعد اشتقاقها باستخدام OPA واستخدام تقنية الـ HPLC (كاشف UV/VIS، معدّل تدفق 2مل/ د، حجم الحقنة 2.5 ميكرولتر)

الدراسة العملية

Practical Study

الفصل الثالث

المواد والأجهزة والطرائق المستخدمة

1.3. المواد والأجهزة المستخدمة:

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من المواد، كذلك تمّ استخدام مجموعة من الأجهزة والأدوات المتوفرة في مخابر الكلية.

1.1.3. الأجهزة والأدوات Equipments & Materials:

استخدمت مجموعة من الأجهزة المتوفرة في مخابر الكلية موضّحة في الجدول (4) وكذلك مجموعة من الأدوات المخبرية المتوفرة وهي:

- بيشر Beaker سعة 50، 100 و250 مل.
- دورق حجمي Volumetric flask سعة 50، 100، 250 و500 مل.
- أرلنماير Erlenmeyer.
- أسطوانة مدرجة Graduated cylinder سعة 25، 50 و100 مل.
- قمع ترشيح Filtration funnel .
- ممصات معيارية Pipette 10، 25، 50 و100 مل.

الجدول (4): الأجهزة المستخدمة في الدراسة:

الجهاز	الطراز
ميزان حساس ذو حساسية 0.0001غ	Precisa XB 220 A
مقياس الطيف الضوئي	Jasco v-530 UV
جهاز كلدال	وحدة التهضيم Buchi, Digest system K-437
	وحدة التقطير Distillation unit B-324
HPLC	مضخة نوع Jasco Pu-2089 Plus
	الكاشف Jasco Fp-2020 Plus
	العمود من نوع BDS Hypersil C18، 250*4.6 mm أبعاد الجزيئات 5 µm الكاشف: الفلورة
	Software: Borwin

2.1.3. المواد:

استخدمت في الدراسة مجموعة من المواد المذكورة في الجدول (5):

الجدول (5): المواد المستخدمة في الدراسة:

المادة	الشركة	المادة	الشركة
ل- أرجينين عياري	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
أسيتونتريل	SDS	ماء مقطر حديثاً	

كذلك تمّ تحضير المحاليل التالية المستخدمة في الدراسة:

- وقاء خلات الصوديوم 4N: تمّ أخذ 0.108 غ من خلات الصوديوم وأضيف لها 20 مل من حمض الخل الثلجي وتمّ ضبط pH المحلول باستخدام ماءات الصوديوم 2M للوصول لدرجة pH مساوية 5.5 ثم إكمال الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.
- محلول حمض الأسكوربيك تمّ أخذ 0.095 غ من الحمض وحلت في 1 مل ماء.
- محلول كاشف النينهيدرين: تمّ أخذ 0.2 غ من النينهيدرين في مزيج من 7.5 مل ميتانول و2.5 مل من وقاء الخلات 4N ثم أضيف 250 ميكرولتر من محلول فيتامين C ليعطي لوناً أحمر شاحب.
- وقاء بورات الصوديوم: تمّ إضافة 2.47 غ من حمض البور إلى 90 مل من الماء المقطر وتمّ ضبط pH المحلول باستخدام ماءات الصوديوم 1M للوصول لدرجة pH مساوية 9.3، ثم إكمال الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.
- وقاء سيترات الصوديوم: تمّ إضافة 18.44 مل من حمض السيتريك (1 µM) إلى 900 مل من الماء المقطر وتمّ ضبط pH المحلول باستخدام ماءات الصوديوم 2 M للوصول لدرجة pH مساوية 6.5 ثم إكمال الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر.

- محلول كاشف OPA: تمّ تحضيره بأخذ 27 ملغ من OPA وأضيف إليها 500 ميكرولتر من الايتانول 99% و20 ميكرولتر من 2-ME و4.5 مل من وقاء بورات الصوديوم 0.4 M وترك لمدة 24 ساعة قبل الاستعمال في جو بارد ومظلم.
- السلسلة العيارية الأولى للأرجينين (UV/Visible) Standard Curve: تمّ تحضير خمسة تراكيز للأرجينين (0.28 -0.22 -0.20 -0.14 -0.11 ميكرومول/ مل)؛ إذ تمّ تحضير كلّ تركيز ثلاث مرات ومن ثم تمّ اشتقاقه بالنينهيدرين.
- السلسلة العيارية الثانية للأرجينين (HPLC): تمّ تحضير خمسة تراكيز للأرجينين (18, 24, 36, 48, 72 ميكرومول/ مل)؛ إذ تمّ تحضير كلّ تركيز ثلاث مرات ومن ثم تمّ اشتقاق قبل العمود للمحاليل المحضرة باستخدام OPA.

2.3. الاختبارات المجراة:

تؤدي دساتير الأدوية دوراً مهماً فيما يتعلق بمراقبة جودة الأدوية والأشكال الصيدلية، فقد وضعت هذه الدساتير مجموعة من الاختبارات التي يجب إجراؤها على الأشكال الصيدلية للتأكد من جودتها كي تحقق الغاية المرجوة منها، في هذه الدراسة تمّ تطبيق بعض هذه الاختبارات على الأشكال المدروسة (كبسولات، حبابات شرب، شرابات، مساحيق) وهي:

1.2.3. فحص التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم Labeling:

تمّ إجراء هذا الفحص على جميع العيّنات المدروسة؛ إذ إن دساتير الأدوية تطلب وجود لصاقة توسيم على العبوة مع نشرة تعليمات داخلية وذلك وفقاً لمتطلبات قواعد التصنيع الجيد GMP. يجب أن تحوي اللصاقة التي توضع على العبوة مباشرة المعلومات الآتية:

- اسم المنتج الصيدلاني.
- اسم (أو أسماء) المكونات الفعّالة.
- كمية المادة الفعّالة في كلّ قرص وعدد الأقراص في العبوة.
- تاريخ الإنتاج وانتهاء الفعالية ورقم الطبخة.
- شروط التخزين أو أية تنبيهات تتعلق بتخزين الشكل الصيدلاني.
- توجيهات الاستعمال والتحذيرات والتنبيهات.
- اسم وعنوان الصانع أو الشخص المسؤول عن طرح المنتج في السوق.

كذلك يتطلب الدستور وجود نشرة تعليمات داخلية تحوي المعلومات التالية:

- اسم الشكل الصيدلاني ونوعه.
- المادة الفعّالة مع تركيبها وكميتها في القرص الواحد ومعلومات عن المادة الفعّالة.
- معلومات عن دواعي الاستعمال وطريقة الاستعمال.

- مضادات الاستطباب وتحذيرات الاستعمال.
- التأثيرات الجانبية.
- تاريخ الإنتاج والانتهاء مع اسم المصنع ورقم الطبخة.

2.2.3. اختبار المظهر الخارجي:

تمّ إجراء هذا الاختبار على كبسولات الأرجينين؛ إذ يجب أن تكون كبسولات الوجبة الواحدة متماثلة باللون والأبعاد، لماعة، ملساء، غير مخرشة، لا تحوي خدوشاً ولا التصاقات، ليس لها طعم غير مستحب أو رائحة غريبة أو لون متغير، الكبسولات المملوءة يجب أن تكون غير مغبرة (الماريني، 2008).

3.2.3. اختبار تجانس الوزن:

تمّ إجراء هذا الاختبار على كبسولات الأرجينين بأخذ 20 كبسولة، توزن بشكل إفرادي ويحدد الوزن الوسطي لها ثم يحدد الفرق بين الوزن الوسطي ووزن كلّ كبسولة ومن ثم تحسب النسبة المئوية للفرق بينهما CV%؛ إذ يسمح بنسبة اختلاف في الوزن 7.5-10 % وذلك بحسب وزن الكبسولات. يسمح لكبسولتين فقط بتجاوز هذه النسبة على ألا تتجاوز نسبة الضعف (USP, 2007).

4.2.3. اختبار تحديد المحتوى من المادة الفعّالة:

يجرى هذا الاختبار للتأكد من مطابقة كمية المادة الفعّالة الموجودة في العيّنات المدروسة مع الكمية الموسومة على الغلاف الخارجي وذلك وفقاً لما تتطلبه دساتير الأدوية.

بالنسبة للأرجينين، يتطلب دستور الأدوية البريطاني بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الأشكال الفموية السائلة (95-105%)، (BP, 2012). بينما يتطلب الدستور الأميركي بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الكبسولات (90-110%) (USP, 2007)، أما بالنسبة للمساحيق والمضغوطات يتطلب الدستور الأوربي بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى (85-115%)،.(EP, 2005).

وقد تمّ إجراء هذا الاختبار بثلاث طرائق مختلفة وهي:

i. **تحديد المحتوى باستخدام اختبار كلدال:**

تمّ إجراء هذا الاختبار على جميع العيّنات المدروسة الحاوية على البروتين، الكرياتين والأرجينين، تمّ وزن العيّنة مباشرة بعد مجانستها، ثم تهضيمها بإضافة 20 مل من حمض الكبريت المركز ومحفز مكون من أكاسيد معدنية مختلفة، ثم التسخين لدرجة حرارة مرتفعة 510 درجة مئوية لمدة 5 ساعات حتى الحصول على محلول رائق شفاف. يتشكل في هذه المرحلة كبريتات الأمونيوم، ثم يتمّ 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؛ إذ يتشكل في هذه المرحلة بورات الأمونيوم التي تتمّ معايرتها حجمياً باستخدام حمض كلور الماء 0.1N (AOAC, 2000).

ii. تحديد المحتوى باستخدام الكشف في مجال الأشعة المرئية:

تمّ إجراء هذا الفحص للتحديد الكمي للأرجينين في الأدوية والمتمّمات الغذائية؛ إذ يتمّ اشتقاقها بمحلول النينهيدرين ثم إجراء القياس باستخدام مقياس الطيف الضوئي UV/VIS.

a) **تحضير العيّنات التجارية المدروسة:** بالنسبة للأشكال الصلبة (الكبسولات) تمّ استخلاص الأرجينين بالحل بالماء المقطر والتحريك ثم الترشيح أما الأشكال الفموية السائلة (حبابات شرب، شراب) فقد تمّ التحضير بالتمديد المباشر.

b) **طريقة إجراء التفاعل:** تمّ أخذ 1 مل من كلّ عيّنة وإضافة 2 مل من كاشف النينهيدرين و التسخين لمدة 10 دقائق في الماء المغلي ثم تركها 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة بعدها إضافة 5 مل من الايزوبوتانول وتركها لمدة 15 دقيقة؛ إذ يظهر لون أزرق بنفسجي ثم تقاس الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 570 نانو متر.

c) **التأكد من تكرارية الطريقة:** تمّ تحضير محلول من الأرجينين العياري تركيزه (0.2 ميكرومول/ مل) واشتقاقه بالنينهيدرين كما ذكر سابقاً وتكرار التجربة ست مرات وحساب متوسط الامتصاصيات ثم حساب الانحراف المعياري للامتصاصيات الذي يجب أن يكون أقل من 1% .

d) **تحضير السلسة العيارية للأرجينين:** تمّ تحضير خمسة محاليل من المادة العيارية للأرجينين في الماء المقطر بتراكيز بين (0.1– 0.3 ميكرومول/ مل)؛ إذ تمّ تحضير كل تركيز ثلاث مرات ثم قيست امتصاصية هذه المحاليل بعد اشتقاقها بالنينهيدرين وحسبت القيمة المتوسطة للامتصاصية عند طول موجة 570 نانومتر، مثلت العلاقة بين متوسط الامتصاصيات والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً.

iii. تحديد المحتوى باستخدام تقنية HPLC:

تمّ استخدام تفاعل الاشتقاق قبل العمود؛ إذ تمّ إجراء التحديد الكمي للأرجينين في الأدوية والمتمّمات الغذائية بتفاعله مع الـOPA بوجود مركب 2-ME. تمّ الكشف بمقياس الفلورة عند طول موجة إثارة (Excitaion) 340 نانو متر وطول موجة إصدار (Emission) 470 نانو متر. تكون الطور المتحرك من استيونتريل ووقاء سيترات الصوديوم pH 9.5. أما الشروط الكروماتوغرافية الباقية فهي: حجم الحقنة

20 ميكرولتر، تدفق الطور المتحرك 1 مل/دقيقة، العمود من نوع BDS Hypersil C18 أبعاده 4.6*250 mm.

a) **طريقة إجراء التفاعل:** تمّ إجراء تفاعل الاشتقاق بأخذ 1 مل من كلّ عيّنة وإضافة 1 مل من محلول OPA و تركها لمدة دقيقة واحدة ثم حقن 20 ميكرولتر منها يدوياً بجهاز HPLC.

b) **تحديد نسبة الطور المتحرك:** تمّ استخدام ثلاث نسب مختلفة من مكوني الطور المتحرك (وقاء سيترات: اسيتونتريل) وهي على الترتيب (25:75)، (20:80) و (15:85) % وذلك لتحديد النسبة الأفضل التي سيتمّ استخدامها في هذه الدراسة اعتماداً على زمن احتباس الأرجينين الذي سيتمّ الحصول عليه. كذلك تمّ دراسة تأثير تغيير طبيعة الطور العضوي على زمن الاحتباس من خلال استبدال الاسيتونتريل بالميتانول.

c) **التأكد من تكرارية الطريقة:** تمّ تحضير محلول من الأرجينين العياري تركيزه (72 ميكرومول/ مل) واشتقاقه بالـ OPA ثم حقنه بجهاز HPLC وقياس مساحة القمة الناتجة بعد الكشف بالفلورة كما ذكر سابقاً وتكرار التجربة خمس مرات وحسبت القيمة المتوسطة لمساحات القمم الناتجة.

d) **تحضير السلسة العيارية للأرجينين:** تمّ تحضير خمسة محاليل من المادة العيارية للأرجينين في الماء المقطر بتراكيز بين (18 - 72 ميكرومول/ مل). تمّ تحضير كلّ 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.

3.3. التحليل الإحصائي:

تمّ الاعتماد على اختبار T- student الإحصائي لدراسة الفروق بين متوسّطي مجموعتين من البيانات، واختبار أنوفا (ANOVA) لاختبار الفروق بين عدّة متوسّطات؛ إذ تمّ إجراء الاختبارين المذكورين على متوسطات المحتوى من الأرجينين في العيّنات المدروسة وذلك عند مستوى دلالة 5%، يكون للفرق أهمية ذات دلالة إحصائية عندما تكون قيمة P أصغر من 0.05 (P<0.05).

الفصل الرابع

نتائج دراسة المستحضرات التجارية الحاوية على الكرياتين والبروتين والحاوية على الحمض الأميني الأرجينين

تمّت دراسة العيّنات المتوفرة وفق الاختبارات الدستورية وما تطلبه قواعد التصنيع الجيد؛ إذ تمّ أولاً اختيار العيّنات التي سيتمّ دراستها ثم إجراء الاختبارات والحصول على النتائج ومناقشتها.

1.4. الاعتيان:

تمّ الحصول على مجموعة من المتمّمات الغذائية الحاوية على بروتين وكرياتين الموجودة على نحو غير قانوني في النوادي الرياضية، وكذلك بعض المستحضرات الصيدلية الحاوية فقط على الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو كمتمّمات غذائية من شركات ووجبات مختلفة ومصدرها من الصيدليات (قانوني) والنوادي الرياضية (غير قانوني) الجدول (6).

الجدول (6): العيّنات التجارية المدروسة: الاستخدام، التركيب، الشكل الصيدلي والمصدر:

الاستخدام	التركيب	الشركة	الشكل الصيدلي	المصدر	تاريخ الانتاج/تاريخ انتهاء الصلاحية
متمّم غذائي	كرياتين	A	مسحوق	نادي رياضي	معلومات غير متوفرة
		B			
		C			
		D			
	بروتين	E	مضغوطات		
	أرجينين	F	كبسولات		2010/2013
دوائي	أرجينين	G G_1	كبسولات	صيدلية	2010/2014
		G G_2			2012/2016
		H	كبسولات		2011/2014
		I I_1	حبابات شرب		2011/2014
		I I_2			2012/2015
		I I_3			2102/2015
		J	شراب		2011/2014

2.4. مراقبة جودة المستحضرات المتوفرة:

في الجزء الأول من الدراسة تمّ مراقبة الجودة لمجموعة من المتمّمات الغذائية الحاوية على بروتين أو كرياتين المباعة على نحو غير قانوني في النوادي الرياضية. اقتصرت مراقبة جودة هذه العيّنات على تحديد المحتوى باستخدام اختبار كلدال.

في الجزء الثاني تمّ التركيز على مجموعة من المستحضرات الصيدلية الحاوية فقط على الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو بشكل متمّمات غذائية قد بيعت في الصيدليات أو في النوادي الرياضية.

1.2.4. دراسة المستحضرات الحاوية على الكرياتين والبروتين:

تمّ الحصول على هذه المستحضرات المستخدمة كمتمّمات غذائية والمتوفرة على نحو غير قانوني من النوادي الرياضية مباشرة، أو عن طريق أشخاص مستخدمين لها؛ إذ لوحظ أنها تباع بشكل عبوات كاملة أو توزع بكميات معيّنة ضمن أكياس وعبوات أصغر من قبل النوادي، وكانت العبوات الكاملة غير حاوية على نشرة داخلية أو معلومات عن تاريخ الإنتاج وانتهاء الصلاحية إنما فقط عليها لصاقة توضح اسم المادة الفعّالة وكميتها، كما أن الأشخاص المستخدمين لها لم تتوفر لديهم أية معلومات عن ذلك.

اقتصرت دراستنا على التحديد الكمي في العيّنات المتوفرة والحاوية على الكرياتين بشكل مسحوق، وبروتين بشكل مضغوطات وذلك بتطبيق اختبار كلدال عليها؛ إذ إنه:

بالنسبة لمسحوق الكرياتين تمّ أخذ وزنة معيّنة من كلّ عيّنة متوفرة بشكل عشوائي، أما العبوة الحاوية على مضغوطات البروتين فقد تمّ أخذ 10 مضغوطات ثم سحقها وأخذ منها وزنة معيّنة، ثم تمّ إجراء الاختبار وحساب نسبة الآزوت العام في العيّنات المدروسة بعد إجراء الاختبار بالطريقة الحسابية الآتية (AOAC, 2000)

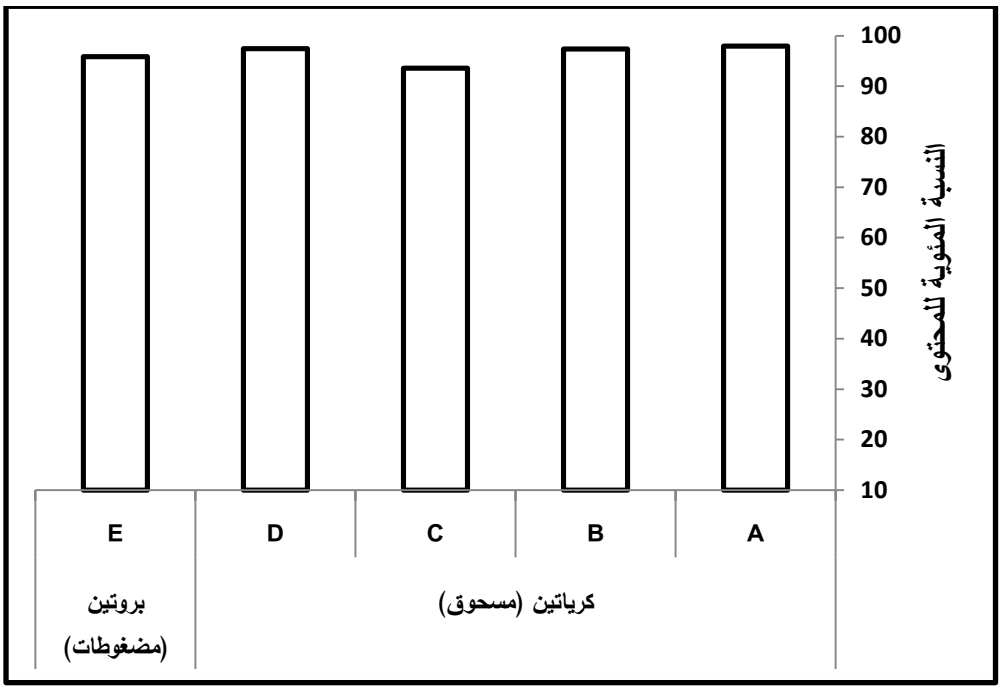
$$N_t\% = (0.0014 * V * 100) / W$$

$N_t\%$ هي النسبة المئوية للآزوت العام في العيّنة، V هي الحجم المستهلك من Hcl (0.1N) في المعايرة. و W هي وزن العيّنة مقدراً بالغرام.

وعموماً تمّ تحديد نسبة الآزوت في البروتين بأنها 16% وهذا يكافئ أن كلّ 6.25غ من البروتين حاوية على 1 غ آزوت، وبالتالي يمكن حساب نسبة البروتين المئوية في العيّنة الحاوية عليه بالطريقة الآتية:

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

أما الكرياتين يمكن حساب نسبة الآزوت فيه اعتماداً على وزنه الجزيئي؛ إذ إنها تعادل 32.01% كذلك تمّ تطبيق اختبار كلدال على العيّنات الحاوية على الكرياتين وحساب النسبة المئوية للمحتوى في العيّنات ومقارنة النتيجة التي تمّ الحصول عليها مع ما هو مصرّح على العبوة، الشكل (8).



الشكل (8): النسبة المئوية لمحتوى بعض العيّنات التجارية المباعة على نحو غير قانوني في النوادي الرياضية من البروتين أو الكرياتين باستخدام اختبار كلدال

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

2.2.4. دراسة المستحضرات الحاوية على الأرجينين:

تمّ اختيار الحمض الأميني الأرجينين نظراً لأهمية استخدامه وتوفره بعدّة أشكال صيدلية (كبسولات، شراب، حبابات شرب)، من وجبات متنوعة وشركات متعدّدة إضافة إلى إمكانية الحصول عليه على نحو قانوني (الصيدليات) وغير قانوني (نادي رياضي) الجدول (6). أجريت مراقبة الأشكال الصيدلية المستخدمة دوائياً أو غذائياً والمتوفرة على نحو قانوني أو غير قانوني للحمض الأميني الأرجينين وفق ما تنصّ عليه دساتير الأدوية العالمية وتمّ إجراء بعض الاختبارات عليها وهي: مراقبة التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم، تجانس الوزن، تحديد الذاتية ومعايرة محتوى المادة الفعّالة.

1.2.2.4. مراقبة التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم:

تمّت الدراسة على الأشكال الصيدلية المختلفة الحاوية على الأرجينين والمتوفرة في الصيدليات والنوادي الرياضية على نحو قانوني وغير قانوني فكانت جميع الأشكال الصيدلية المستخدمة دوائياً مطابقة للمواصفات التي تتطلبها دساتير الأدوية والـ GMP بالنسبة للغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم والنشرة الداخلية، أما الشكل الصيدلي F المتوفر في النوادي الرياضية على نحو غير قانوني والمستخدم

كمتمّم غذائي فقد طابق مواصفات الدستور من حيث وجود الغلاف الخارجي ولصاقة التوسيم لكن خالفها من حيث وجود النشرة الداخلية لذلك فهو غير مطابق لمتطلبات الدستور فيما يتعلق بهذا الاختبار.

2.2.2.4. اختبار المظهر الخارجي:

تمّ تطبيق هذا الاختبار على الكبسولات المتوفرة على نحو قانوني أو غير قانوني والحاوية على الأرجينين والمستخدمة دوائياً وغذائياً فكانت جميعها مطابقة للمواصفات التي يتطلبها دستور الأدوية فيما يخصّ هذا الاختبار (الماريني، 2008).

3.2.2.4. اختبار تجانس الوزن:

تمّ تطبيق هذا الفحص على كبسولات الأرجينين فقط في العيّنات F المستخدمة كمتمّم غذائي والعيّنات G ,H المستخدمة دوائياً. تمّ أخذ 20 كبسولة ووزنها وتحديد الوزن الوسطي لها ثم تحديد الفرق بين الوزن الوسطي ووزن كلّ كبسولة ومن ثم النسبة المئوية للفرق بينهما CV% كما هو موضّح في الجدول (7):

الجدول (7): نتائج فحص تجانس الوزن للعيّنات المدروسة من كبسولات الأرجينين:

العيّنة	النسبة المئوية للفرق CV%									
F	3.37	0.37	2.16	1.45	2.77	0.84	1.74	3.10	2.25	3.81
	1.87	0.69	4.16	1.72	2.18	0.07	1.52	1.75	2.17	1.87
G_1	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0	0.05	0.01	0.03	0.01
	0	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0	0	0.02
G_2	0	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0	0.02
	0	0.01	0.01	0	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0
H	2.3	2.3	1.6	4.4	1.6	3	1.8	0.3	3.1	2.7
	1.7	0.5	2.3	4	1.3	3	2.7	2.7	0.4	1.8

وفق هذا الاختبار فإن جميع العيّنات المدروسة بشكل كبسولات المستخدمة دوائياً أو غذائياً، والمتوفرة على نحو قانوني أو غير قانوني مطابقة لمتطلبات دساتير الأدوية؛ إذ إن النسبة المئوية لأكبر فرق بين الوزن الوسطي والوزن الإفرادي لم تتجاوز (5%±) وهي أكبر نسبة مسموحة دستورياً عندما وزن الكبسولات أكبر من 250 ملغ وبالتالي فهي متجانسة وزنياً.

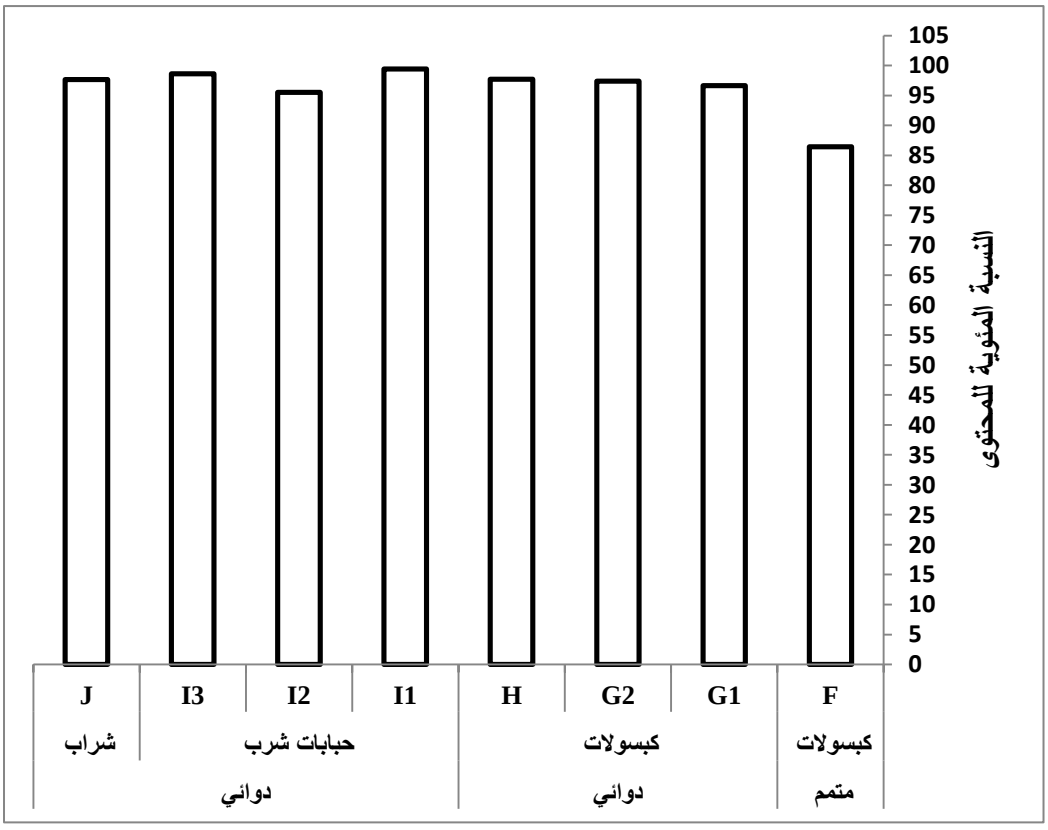
4.2.2.4. اختبار تحديد المحتوى من المادة الفعّالة (الأرجينين):

تمّ التحديد الكمي في العيّنات الحاوية في تركيبها على الأرجينين والمستخدمة دوائياً أو كمتمّمات غذائية بأشكال صيدلية متعدّدة (حبابات شرب، شراب، كبسولات)، ثم مقارنة الأدوية بين شركات مختلفة

ومن وجبات مختلفة؛ إذ تمّ استخدام ثلاث طرائق للتحديد الكمي للأرجينين وهي اختبار كلدال، الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي بعد الاشتقاق بالنينهيدرين وتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، ثم تمّت مقارنة النتائج مع المتطلبات الدستورية.

a) **اختبار كلدال:**

تمّ إجراء الاختبار على العيّنات الحاوية على الأرجينين كما ذكر سابقاً، ثم تمّ حساب نسبة الآزوت العام في العيّنات المدروسة بعد إجراء الاختبار بالاعتماد على نسبة الآزوت في الأرجينين 32.18% وتمّت مقارنة النتيجة التي تمّ الحصول عليها مع ما هو مصرّح على العبوة، فكانت النسبة المئوية الوسطية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات المدروسة موضّحة في الشكل (9):

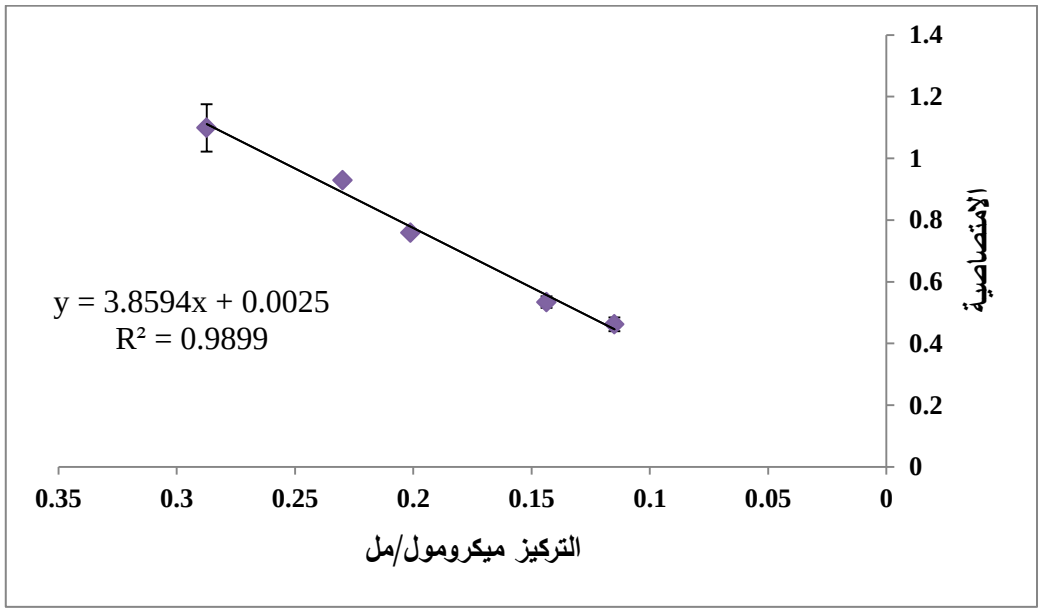


الشكل (9): النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام اختبار كلدال

نلحظ 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 بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الأشكال الفموية السائلة (95-105%) وفي الكبسولات (90-110%) أما فيما يتعلق بالمتمّم الغذائي الذي هو على شكل كبسولات كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى أقل من 90% وبالتالي فهي غير متوافقة مع المتطلبات الدستورية التي تتطلب أن تكون النسبة المئوية للمحتوى (90-110%).

b) **الكشف في مجال الأشعة المرئية بعد الاشتقاق بالنينهيدرين:**

في البداية تمّ التأكد من تكرارية الطريقة من خلال تحضير محلول من الأرجينين العياري تركيزه (0.2 ميكرومول/ مل) واشتقاقه بالنينهيدرين كما ذكر سابقاً، ثم قياس امتصاصيته، تمّ تكرار التجربة ست مرات وحساب متوسط الامتصاصيات. كانت قيمة الانحراف المعياري النسبي للامتصاصية مساوية 0.49% مما يدلّ على تكرارية الطريقة. تمّ بعد ذلك تحضير سلسلة عيارية للأرجينين بتراكيز (0.11- 0.14- 0.20- 0.22- 0.28 ميكرومول/ مل)؛ إذ تمّ تحضير كلّ تركيز ثلاث مرات واشتقاق المحاليل المحضرة بالنينهيدرين، ثم قيست امتصاصية هذه المحاليل، وحسبت القيمة المتوسطة لهذه الامتصاصيات ومثلت العلاقة بين متوسط الامتصاصيات والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً كما هو موضّح في الشكل (10).



الشكل (10): السلسة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق بالنينهيدرين وقياس الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي (طول موجة 570 نانومتر)

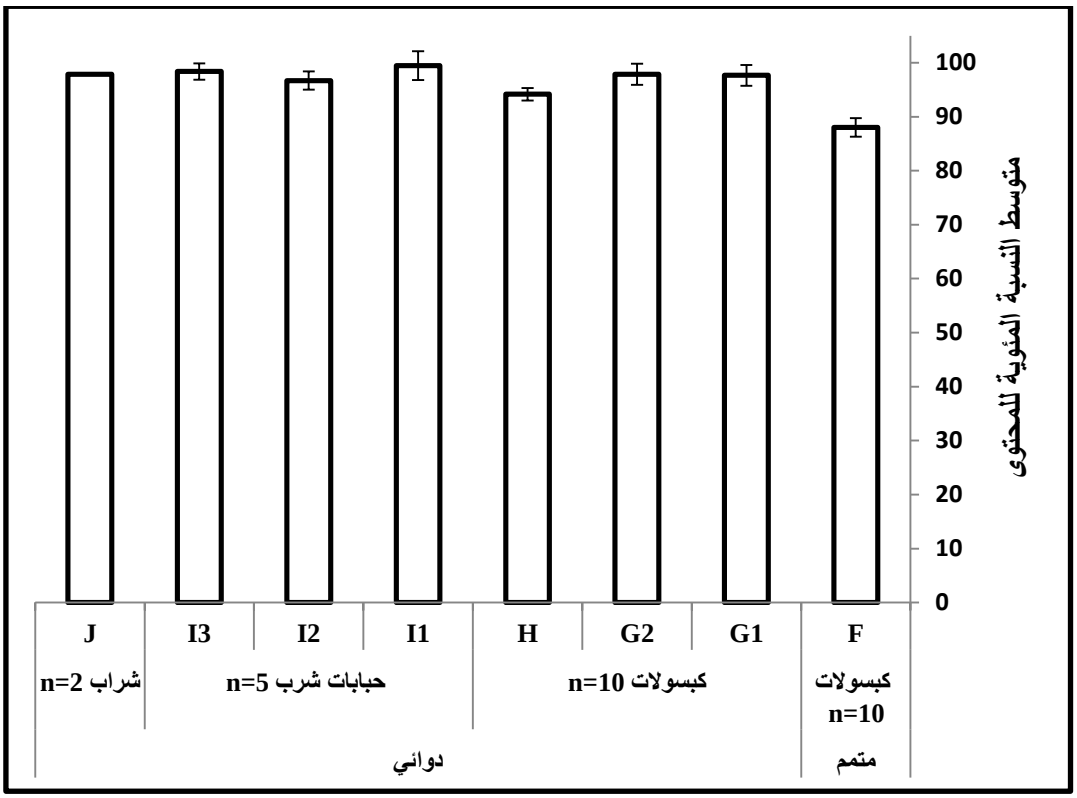
استناداً إلى الخط المستقيم الذي تمّ الحصول عليه في الشكل (10) كانت معادلة المستقيم :

$$Y=3.8594X + 0.0025$$

إذ: Y تعبّر عن الامتصاصية، X تعبّر عن التراكيز بالميكرومول /مل.

أما R^2 فقد بلغت قيمتها (0.9899)، مما يدل على أن الخطية محققة ضمن المجال المدروس.

تمّ إجراء الاختبار وحساب متوسط النسبة المئوية للأرجينين في العيّنات المدروسة، ثم تمّت مقارنة النتيجة التي تمّ الحصول عليها مع ما هو مصرّح على العبوة، فكانت النسبة المئوية الوسطية للمحتوى في العيّنات المدروسة كما هي موضّحة في الشكل (11).



الشكل (11): متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي (طول موجة 570 نانومتر) (n يمثل حجم العيّنة)

نلحظ أن النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في المستحضرات الدوائية المدروسة أكبر من 92% بالنسبة للأشكال الفموية السائلة وأكبر من95% بالنسبة للكبسولات وبالتالي فهي متوافقة مع المتطلبات الدستورية بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الأشكال الفموية السائلة (95-105%) وفي الكبسولات (90-110%). أما فيما يتعلق بالمتمّم الغذائي الذي هو على شكل كبسولات فقد كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى أقل من 90% وبالتالي فهي غير متوافقة مع المتطلبات الدستورية التي تتطلب أن تكون النسبة المئوية للمحتوى (90-110%).

c) تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء:

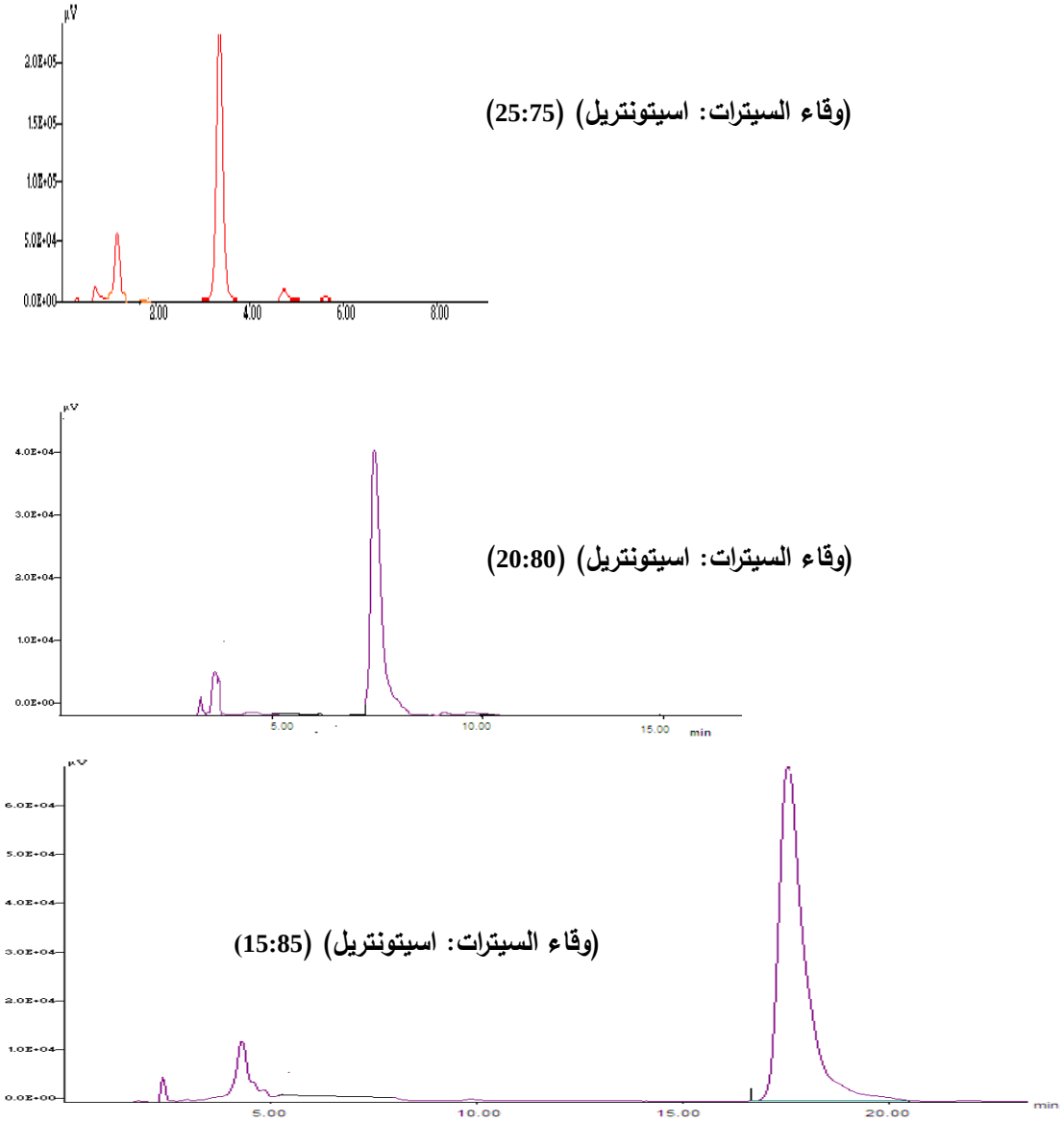
تمّ استخدام تقنية الـHPLC باستخدام كاشف الفلورة بعد الاشتقاق بـOPA في التحديد الكيفي والكمي للأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة. تعدّ هذه الطريقة أكثر نوعية من الطريقتين السابقتين باعتبارها طريقة للفصل والتحديد الكمي. بداية تمّ إيجاد الشروط المناسبة لتحليل الأرجينين ومن ثم تمّ تطبيق الطريقة على العيّنات التجارية.

1.c. تحديد الطور المتحرك:

تمّ استخدام طور متحرك مكون من وقاء السيترات والاسيتونتريل؛ إذ تمّ اختبار نسب مختلفة من اسيتونتريل وتحديد زمن احتباس الأرجينين الموافق لها لاختيار الزمن الأفضل، كذلك تمّ تغيير طبيعة الطور العضوي باستبدال الاسيتونتريل بالميتانول.

1.1.c. اختبار نسب مختلفة من الاسيتونتريل:

تمّ استخدام ثلاث نسب مختلفة من مكوني الطور المتحرك (وقاء سيترات: اسيتونتريل) وهي على الترتيب (25:75)، (20:80) و (15:85) %، وذلك لاختيار النسبة الأفضل التي سيتمّ استخدامها وفقاً لزمن الاحتباس الذي سيتمّ الحصول عليه. ظهرت قمة الأرجينين العياري عند أزمنة احتباس مختلفة الشكل (12)، وتمّت مقارنة زمن الاحتباس الموافق لكلّ نسبةٍ كما في الجدول (8).



الشكل (12): كروماتوغرامات الأرجينين العياري عند استخدام نسب مختلفة من الطور المتحرك: (اسيتونتريل: وقاء السيترات) باستخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

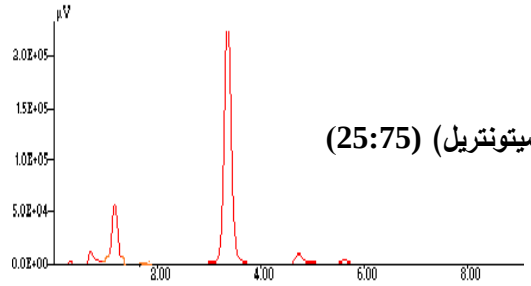
الجدول (8): النسب المختلفة من (وقاء السيترات: اسيتونتريل) المدروسة وزمن احتباس الأرجينين العياري الموافق لها عند استخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر):

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

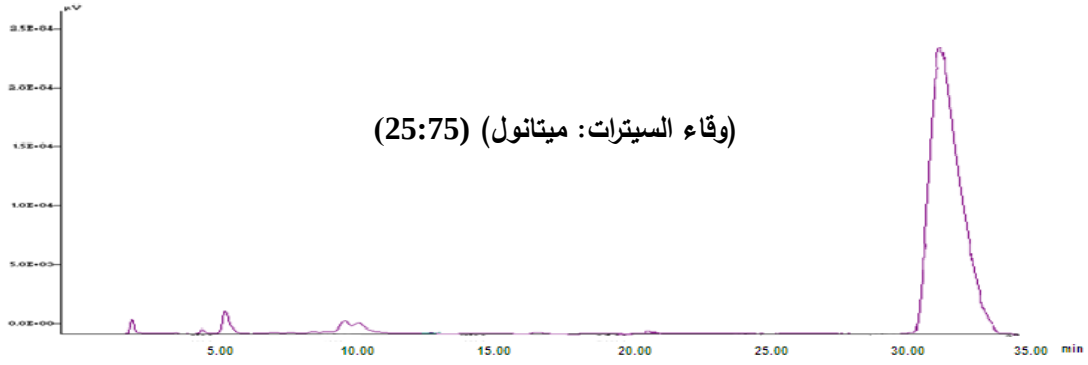
نلحظ من الجدول (8) اختلاف زمن احتباس الأرجينين على العمود عند استخدام نسب مختلفة من الاسيتونتريل؛ إذ قلّ زمن الاحتباس عند زيادة نسبة الطور العضوي (الاسيتونتريل)، نتيجة زيادة قوة الطور المتحرك وبالتالي أصبحت عملية شطف الأرجينين من العمود أسرع.

2.1.c. تغيير طبيعة الطور العضوي:

تمّ تغيير طبيعة الطور العضوي من خلال استبدال الاسيتونتريل بالميتانول ليصبح الطور المتحرك (وقاء سيترات: ميتانول) بنسبة (25:75). ظهرت قمة الأرجينين العياري عند زمن مختلف عنه عند استخدام (وقاء السيترات: اسيتونتريل) الشكل (13)، وتمّت مقارنة زمني الاحتباس الناتجين عن استخدام الاسيتونتريل والميتانول مع وقاء السيترات وعند النسبة السابقة نفسها، كما هو موضّح في الجدول (9).



(وقاء السيترات: اسيتونتريل) (25:75)



(وقاء السيترات: ميتانول) (25:75)

الشكل (13): مقارنة كروماتوغرامات الأرجينين العياري عند تغيير طبيعة الطور العضوي في الطور المتحرك باستخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

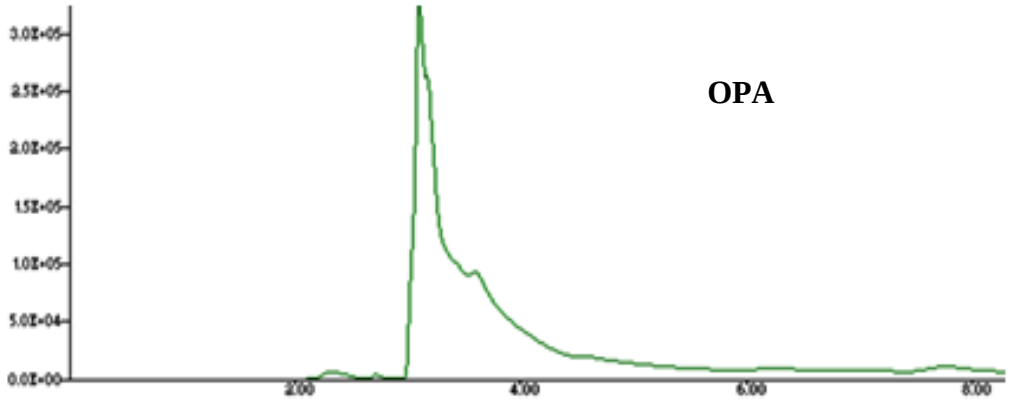
الجدول (9): اختلاف زمن احتباس الأرجينين عند تغيير طبيعة الطور العضوي في الطور المتحرك باستخدام تقنية HPLC (كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر):

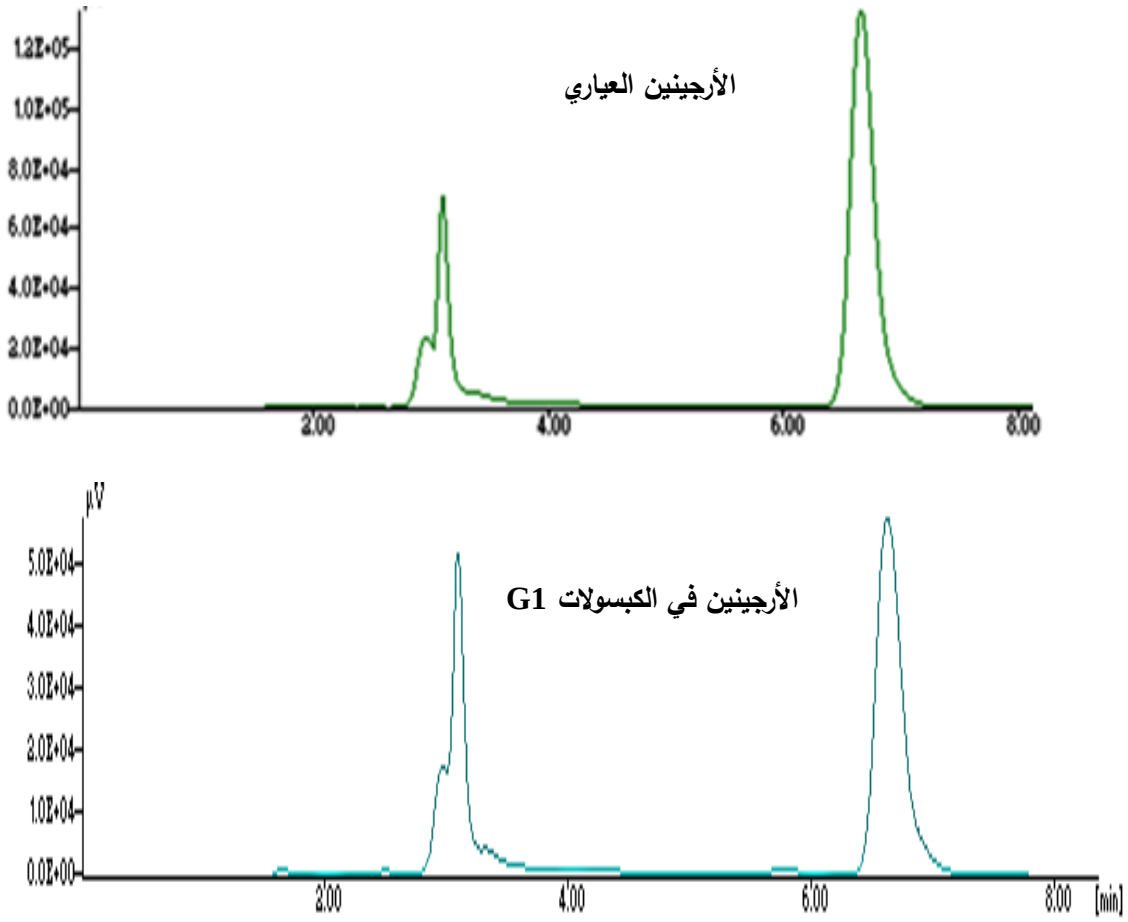
الطور المتحرك	زمن الاحتباس (د)
(وقاء السيترات: ميتانول) بنسبة (25:75)	33.3
(وقاء السيترات: اسيتونتريل) بنسبة (25:75)	3

نلحظ ازدياد زمن الاحتباس عند استخدام النسبة نفسها من الميتانول بدلاً من الاسيتونتريل يمكن تفسير ذلك بسبب زيادة قطبية الطور المتحرك على اعتبار الميتانول أكثر قطبية من الاسيتونتريل بالتالي قلت قوة الطور المتحرك عند استخدام الميتانول وضعُفت قدرته على شطف الأرجينين من الطور الثابت. بالنتيجة تمّ اختيار الطور المتحرك المكون من (وقاء السيترات: أسيتونتريل) بنسبة (20:80) الذي أعطى زمن احتباس أفضل (7.2 دقيقة).

2.c. اختبار الذاتية:

لإجراء هذا الاختبار تمّ حقن محلول عياري من الحمض الأميني الأرجينين في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، وتمّ أيضاً حقن محاليل المستحضرات التجارية فكانت النتيجة مطابقة كروماتوغرامات المستحضرات التجارية للكروماتوغرام العياري، مما يدلّ على وجود الأرجينين في العيّنات المدروسة. يوضّح الشكل (14) الكروماتوغرامات الناتجة عن حقن العياري وإحدى العيّنات، ويوضّح الملحق (3) الكروماتوغرامات الموافقة لجميع العيّنات المدروسة.

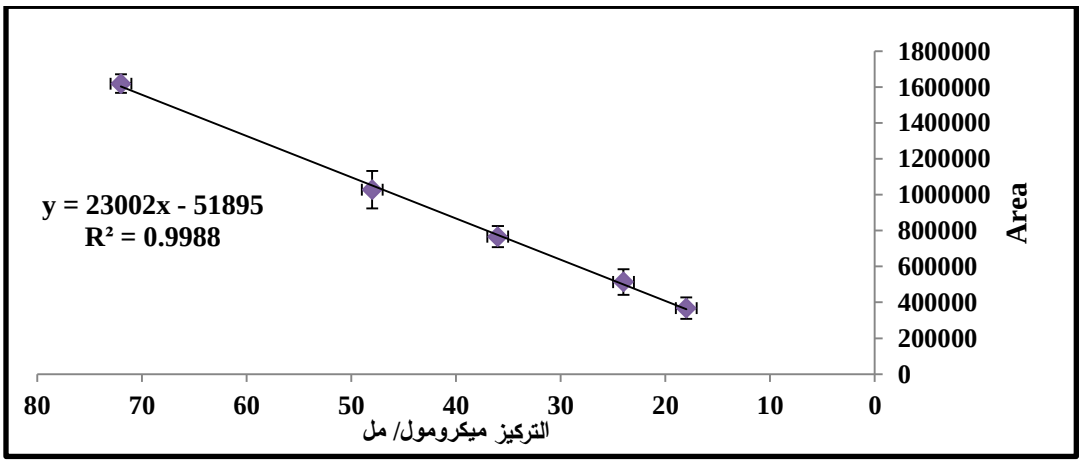




الشكل (14): كروماتوغرمات OPA، الأرجينين العياري والأرجينين في الكبسولات G_1 باستخدام تقنية HPLC (الطور المتحرك: وقاء السيترات: اسيتونتريل، بنسبة 80: 20، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

3.c. اختبار تحديد المحتوى:

بدايةً تمّ التأكد من تكرارية الطريقة من خلال تحضير محلول أرجينين عياري تركيزه (72 ميكرومول/ مل) واشتقاقه باستخدام OPA ثم حقنه بجهاز HPLC وقياس مساحة القمة الناتجة بعد الكشف بالفلورة كما ذكر سابقاً. ثم تمّ تكرار التجربة خمس مرات وحسبت القيمة المتوسطة لمساحات القمم الناتجة فكانت قيمة الانحراف المعياري النسبي للمساحة مساوية 0.55% مما يدلّ على تكرارية الطريقة. تمّ تحضير سلسلة عيارية للأرجينين وبتراكيز (72 -60 -48 -36 -24 -18 ميكرومول/ مل)؛ إذ تمّ تحضير كلّ تركيز ثلاث مرات وإجراء اشتقاق قبل العمود للمحاليل المحضرة باستخدام OPA. تمّ قياس مساحات سطوح القمم الناتجة عن المحاليل بعد اشتقاقها والكشف عنها بمقياس الفلورة عند طول موجة إثارة (Excitation) 340 نانو متر وطول موجة إصدار (Emission) 470 نانومتر. حسبت القيمة المتوسطة لهذه المساحات ثم مثلت العلاقة بين متوسط المساحات والتراكيز المستخدمة الموافقة بيانياً كما هو موضّح في الشكل (15):



الشكل (15): السلسة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق بالـOPA واستخدام تقنية HPLC (الطور المتحرك: وقاء السيترات: اسيتونتريل، بنسبة 80: 20، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

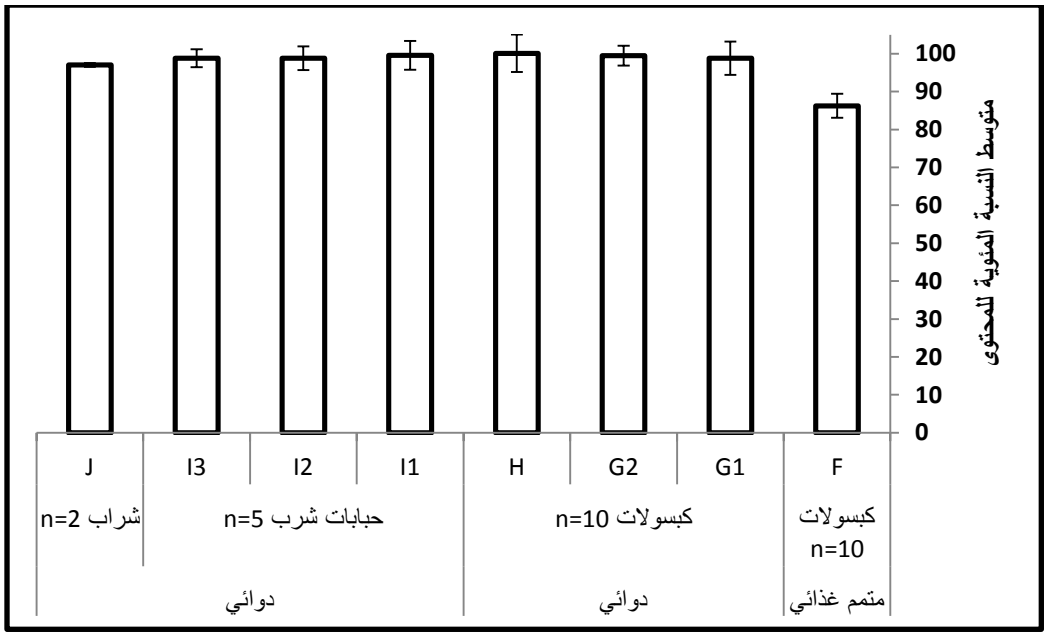
استناداً إلى الخط المستقيم الذي تمّ الحصول عليه في الشكل(15) كانت معادلة المستقيم :

$$Y=23002X- 51895$$

إذ: Y تعبّر عن مساحة القمة، X تعبّر عن التراكيز بالـ ميكرومول/ مل.

أما R^2 فقد بلغت قيمتها (0.9988)، مما يدلّ على أن الخطية محققة ضمن المجال المدروس.

تمّ إجراء الاختبار وحساب النسبة المئوية للأرجينين في العيّنات المدروسة، ثم تمّت مقارنة النتيجة التي تمّ الحصول عليها مع ما هو مصرّح على العبوة، فكانت النسبة المئوية الوسطية للمحتوى في العيّنات المدروسة كما هي موضّحة في الشكل (16).



الشكل (16): متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام تقنية HPLC (الطور المتحرك: وقاء السيترات: اسيتونتريل، بنسبة 80: 20، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/ د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

نلحظ أن متوسط النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في المستحضرات الدوائية المدروسة أكبر من 95% بالنسبة للأشكال الفموية السائلة وأكبر من 92% بالنسبة للكبسولات وبالتالي فهي متوافقة مع المتطلبات الدستورية بأن تكون النسبة المئوية للمحتوى في الأشكال الفموية السائلة (95-105%) وفي الكبسولات (90-110%) أما فيما يتعلق بالمتمّم الغذائي والموجود في السوق المحلية بطريقة غير قانونية كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى أقل من 90% وبالتالي فهي غير متوافقة مع المتطلبات الدستورية التي تتطلب أن تكون النسبة المئوية للمحتوى (90-110%).

3.4. التحليل الإحصائي:

كما ذكر سابقاً تمّ الاعتماد على اختبار T- student لدراسة الفروق بين متوسّطي مجموعتين من البيانات، واختبار أنوفا (ANOVA) لاختبار الفروق بين عدّة متوسّطات وذلك من حيث محتوى الأرجينين في العيّنات المدروسة.

1.3.4. تأثير الطريقة المستخدمة في محتوى الأرجينين:

تمّت دراسة تأثير طريقة التحديد الكمي (HPLC، الكشف في مجال الأشعة المرئية) في محتوى الأرجينين في العيّنات المدروسة من خلال إجراء اختبار ستيودنت عند مستوى دلالة 5%. مثلاً كانت قيمة *P*. Value المحسوبة عند المقارنة بين الطريقتين بالنسبة للشركة F تساوي 0.138 وهي أكبر من 0.05، وبالتالي لا يوجد فروق ذات دلالة إحصائية بين الطريقتين بالنسبة للشركة المذكورة، وكانت نتائج الدراسة موضّحة في الجدول (10).

الجدول (10): نتائج دراسة تأثير الطريقة المستخدمة في المحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة (N: حجم العيّنة):

الشركة	N	متوسط المحتوى HPLC	الانحراف المعياري HPLC	متوسط المحتوى VIS./ Ninhydrin	الانحراف المعياري VIS./ Ninhydrin	*P*. Value المحسوبة
F	10	86.2170	3.16973	87.9870	1.71806	0.138
G_1	10	98.8240	4.38326	97.6540	1.93949	0.450
G_2	10	99.4700	2.57540	97.8720	1.95574	0.136
H	10	100.0970	4.97195	94.1660	1.14523	**0.004**
I_1	5	99.5780	3.78506	99.4340	2.66943	0.946
I_2	5	98.8000	3.13805	96.6980	1.68455	0.223
I_3	5	98.7800	2.38305	98.3760	1.51077	0.757
J	2	97.0050	0.51619	97.8550	0.02121	0.258

نلحظ من الجدول السابق عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين الطريقتين (HPLC والكشف في مجال الأشعة المرئية) لتحديد محتوى الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة (قيمة *P*. value المحسوبة >0.05) باستثناء عيّنات الشركة H (*P*. Value المحسوبة <0.05).

2.3.4. تأثير عامل الوجبة في الشركة الواحدة في محتوى الأرجينين:

تمّت دراسة تأثير عامل الوجبة في الشركة الواحدة في محتوى الأرجينين في العيّنات المدروسة، وذلك من خلال تطبيق اختبار ستيودنت لدراسة الفرق بين الوجبتين G_1 و G_2 في الشركة G و تطبيق اختبار أنوفا لدراسة الفروق بين الوجبات I_1، I_2، I_3 في الشركة I وكانت نتائج الدراسة موضّحة في الجدول 11.

الجدول (11): نتائج دراسة تأثير عامل الوجبة في الشركة الواحدة في المحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة:

الشركة	الطريقة	الوجبة	P.Value المحسوبة
G	HPLC	G_1	0.693
		G_2	
	VIS./ Ninhydrin	G_1	0.805
		G_2	
I	HPLC	I_1	0.902
		I_2	
		I_3	
	VIS./ Ninhydrin	I_1	0.139
		I_2	
		I_3	

نلحظ من الجدول (11) نتيجة المقارنة بين الوجبتين للشركة G والوجبات الثلاث للشركة I أن قيمة *P*. Value المحسوبة كانت أكبر من 0.05، سواء كان بطريقة HPLC أو بالكشف في مجال الأشعة المرئية، وبالتالي لا يوجد فروق ذات دلالة إحصائية بين الوجبات للشركة الواحدة.

3.3.4. تأثير عامل اختلاف الشركة المصنعة في محتوى الأرجينين:

تمّت دراسة تأثير اختلاف الشركة في محتوى الأرجينين من خلال تطبيق اختبار أنوفا للمقارنة بين متوسطات محتوى الكبسولات باختلاف الشركات F، G، H؛ إذ إن الشكل من الشركة F هو متمّم غذائي تمّ

الحصول عليه من نادي رياضي (على نحو غير قانوني)، بينما باقي الأشكال مستخدمة دوائياً تمّ الحصول عليها من الصيدليات، نتائج الدراسة موضّحة في الجدول (12):

الجدول (12): نتائج دراسة تأثير عامل اختلاف الشركة المصنعة على المحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة باستخدام HPLC أو الكشف بمقياس الطيف الضوئي المرئي:

الشركة	الشركة المقارن بها	*P.* Value المحسوبة	
		VIS./ Ninhydrin	HPLC
F	G_1	0.000	0.000
	G_2	0.000	0.000
	H	0.000	0.000
G_1	H	0.000	0.443
G_2	H	0.000	0.705

نلحظ من الجدول (12) وجود فروق ذات دلالة إحصائية للمحتوى من الأرجينين بين الشركات المصنعة للكبسولات سواء دوائية أو متمّمات عذائية (*P.* Value المحسوبة <0.05) وذلك عند استخدام طريقة الكشف بمقياس الطيف الضوئي المرئي للتحديد الكمي للأرجينين، بينما لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين الشركات المصنعة للكبسولات المستخدمة دوائياً فيما بينها (قيمة *P.* value المحسوبة >0.05). في حين كانت هناك فروق ذات دلالة إحصائية أيضاً بين الشركة المصنعة للكبسولات كمتمّمات غذائية مقارنة مع الشركة المصنعة للكبسولات المستخدمة دوائياً (*P.* Value المحسوبة <0.05) عند استخدام تقنية الـHPLC.

5. الاستنتاجات

Conclusion

- تمّ في هذا البحث مراقبة جودة بعض المستحضرات التجارية المتوفرة محلياً والحاوية على ل-أرجينين، وكذلك لبعض العيّنات المتوفرة الحاوية على كرياتين وبروتين.
- تمّ الاعتماد على المرجعيات العالمية ومتطلبات دساتير الأدوية العالمية لدراسة جودة هذه المستحضرات من حيث:
  - التحديد الكمي للكرياتين والبروتين.
  - التأكد من وجود الأرجينين.
  - التحديد الكمي للأرجينين.
  - إجراء بعض الاختبارات مثل اختبار التغليف الخارجي ولصاقة التوسيم، اختبار المظهر الخارجي وتجانس الوزن للكبسولات الحاوية على الأرجينين.
- تمّ تطبيق اختبار كلدال على المستحضرات الحاوية على الكرياتين والبروتين فكانت النسبة المئوية للمحتوى (93-98%) وهي مطابقة لما يتطلبه الدستور الأوربي بالنسبة للمساحيق والمضغوطات.
- تمّ تطبيق ثلاث طرائق للتحديد الكمي للأرجينين في مستحضراته المتوفرة وهي طريقة كلدال، الكشف في مجال الأشعة المرئية باستخدام مقياس الطيف الضوئي بعد الاشتقاق بالنينهيدرين، وكذلك باستخدام تقنية الـHPLC بعد الاشتقاق قبل العمود باستخدام أورتوفتال دي الدهيد والكشف بمقياس الفلورة، كان متوسط النسبة المئوية للمحتوى في المستحضرات الحاوية على الأرجينين المستخدمة دوائياً والمصنعة محلياً تتراوح بين:
  - بطريقة كلدال: (95-100%) في الأشكال الصيدلية السائلة، (96-98%) في الكبسولات.
  - بالكشف في مجال الأشعة المرئية: (96-100%) في الأشكال الصيدلية السائلة، (98-94) في الكبسولات .
  - باستخدام تقنية الـHPLC: (97-100%) في الأشكال الصيدلية السائلة، (98-101%) في الكبسولات.
- أما بالنسبة للكبسولات المهربة الحاوية على الأرجينين والمستخدمة كمتمّم غذائي فكان متوسط النسبة المئوية للمحتوى:
  - طريقة كلدال: 86%.
  - الكشف في مجال الأشعة المرئية: 88% .
  - باستخدام HPLC: 86%.

كانت جميع النتائج بما يخصّ المستحضرات المستخدمة دوائياً متوافقة مع متطلبات 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)؛ إذ وجد أن النسبة المئوية للمحتوى تتراوح بين 90-110% من الكمية المصرّح عنها وهي تتوافق مع متطلبات دستور الأدوية الأمريكي.
أما الكبسولات المهربة الحاوية على الأرجينين والمستخدمة كمتمّم غذائي فقد خالفت متطلبات الدستور فيما يتعلق بالتحديد الكمي لها كذلك خالفت دستور الأدوية من حيث وجود النشرة الداخلية.

– تمّ دراسة تأثير طريقة التحليل الكمي في المحتوى من الأرجينين، لوحظ عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين الطريقتين (HPLC والكشف في مجال الأشعة المرئية) لتحديد محتوى الأرجينين في العيّنات التجارية باستثناء عيّنات الشركة H. بالتالي يمكن الاكتفاء باستخدام إحدى الطريقتين في التحديد الكمي للأرجينين.

– تمّ دراسة تأثير عامل الوجبة في الشركة الواحدة في محتوى الأرجينين، لوحظ عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين الوجبات للشركة الواحدة مما يدلّ على جودة الانتاج ضمن الشركة الواحدة.

–تمّ دراسة تأثير اختلاف الشركة في محتوى الأرجينين، لوحظ وجود فروق ذات دلالة إحصائية للمحتوى من الأرجينين بين الشركات المصنعة للكبسولات سواء دوائية أو متمّمات عذائية وذلك عند استخدام طريقة الكشف في مجال الأشعة المرئية للتحديد الكمي للأرجينين، ووجود فروق ذات دلالة إحصائية بين الشركة المصنعة للكبسولات كمتمّمات غذائية مقارنة مع الشركة المصنعة للكبسولات المستخدمة دوائياً عند استخدام تقنية HPLC، بينما لم توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين الشركات المصنعة للكبسولات المستخدمة دوائياً فيما بينها مما يدلّ على جودة الإنتاج المحلي.

6. التوصيات

Recommendations

خلص هذا البحث إلى مجموعة من التوصيات والمقترحات هي:

- يوصى بضرورة إجراء فحوص مراقبة الجودة وذلك وفقاً لما تتطلبه دساتير الأدوية والمراجع العالمية للمستحضرات المستخدمة دوائياً أو كمتمّمات غذائية والمتوفرة في السوق المحلية للتأكد من مدى تحقيقها للفائدة المرجوة منها.
- متابعة الدراسة للتأكد من أن المستحضرات المدروسة تحوي الأرجينين بشكله الفعّال من النمط ل- أرجينين.
- متابعة الدراسة على المستحضرات الأخرى المتوفرة محلياً والحاوية في تركيبها أحماض أمينية مختلفة.
- دراسة التوافر الحيوي لهذه المستحضرات في الأوساط الحيوية.
- التأكد من تطبيق التشريعات والقرارات الناظمة لوجود الدواء والمتمّمات الغذائية في السوق المحلية ومكافحة عمليات التهريب.
- ضرورة توعية المواطن للمخاطر الصحية التي تنجم عن المستحضرات المهربة؛ إذ إنها مجهولة المصدر فقد تكون متخربة أو مزورة.
- التأكيد على جودة الدواء الوطني المصنع محلياً وزيادة الثقة به.

- المراجع -

References

1. Al Kadri. H., Hassan. S., Al-Fozan. HM., Hajeer. A. *Hormone therapy for endometriosis and surgical menopause.* Cochrane Database of Systematic Reviews, 2009, volume 21 (1).
2. Amin, A.S., Zaky, M., El-Beshbeshy, A.M. *Colorimetric estimation of melatonin in pharmaceutical formulations*. Microchimica Acta, 2000, volume 135 (1-2), 81–85.
3. Amin, H. J., Zamora, S. A., McMillan, D. D., Fick, H. D., Butzner, J. D., Parsons,H. J., Scott, R. B. *Arginine supplementation prevents necrotizing. enterocolitis in the premature infant.* The Journal of Pediatrics, 2002, volume 140 (4), 425-431.
4. Ammann, P., Laib, A., Bonjour, J.-P., Meyer, J. M., Rüegsegger, P. and Rizzoli, R. *Dietary Essential Amino Acid Supplements Increase Bone Strength by Influencing Bone Mass and Bone Microarchitecture in Ovariectomized Adult Rats Fed an Isocaloric Low-Protein Diet*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002, volume 17 (7), 1264-1272.
5. AOAC International, *Official Methods of Analysis*, 17th edition, AOAC International, Arlington,VA, 2000.
6. Arana, VOLUME , Paz, Y., González, A., Méndez, V., Méndez, JD. *Healing of diabetic foot ulcers in L-arginine-treated patients.* Biomedicine & pharmacotherapy, 2004, volume 58 (10), 588-597.
7. Babu S.V. S; Shareef,M. M.; Shetty, A .P. K., Shetty, A. K. *HPLC Method for amino acids profile in biological fluids and inborn metabolic disorders of aminoacidopathies*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2002, volume 17 (2), 7-26.
8. Bartolomeo, M. P. and Maisano, F. *Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis*. Journal of biomolecular techniques, 2006, volume 17 (2), 131–137.
9. Beltiz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. Food Chemistry. 4th revised and extended . Springer, Germany, 2009, 8-89.
10. Bemben, MG and Lamont HS. *Creatine supplementation and exercise performance: recent findings.* Sports Medicine, 2005, volume 35 (2), 107-125.
11. Blau, K. and Halket, J.M., Handbook of Derivatives for Chromatography, Wiley, New York, 1993.
12. Böger, RH and Bode-Bögerm *SM. The clinical pharmacology of L-arginine*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2001, volume 41, 79-99.
13. Böger, RH. *The Pharmacodynamics of L-Arginine*. The Journal of Nutrition, 2007, volume 137, 1650-1655.
14. British Pharmacopoeia Volume III , 2012.
15. Clemmensen, C., Madsen, A. N., Smajilovic, S., Holst, B., Bräuner-Osborne, H. *L: -Arginine improves multiple physiological parameters in mice exposed to diet-induced metabolic disturbances.* Amino Acids, 2011, volume 43 (3), 1265-1275.
16. Cooper, R., Naclerio, F., Allgrove, J., Jimenez A. *Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update,* Journal of the international society of sports nutrition, 2012, volume 9 (1), 33.
17. Dash AK and Sawhney A. *A simple LC method with UV detection for the analysis of creatine and creatinine and its application to several creatine formulations*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002, volume 29 (5), 939-945.

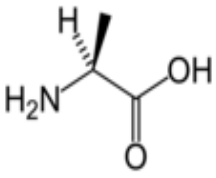
18. David L. Nelson and Michael M. Cox , Lehninger Principles of Biochemistry, 4 th Edition, W. H. Freeman & Company, 2004.
19. Debats, I.B.J.G., Wolfs, T.G.A.M., Gotoh, T., Cleutjens, J.P.M., Peutz-Kootstra, C.J., van der Hulst, R.R.W.J. *Role of arginine in superficial wound healing in man.* Nitric Oxide, 2009, volume 21 (3-4), 175-183.
20. European pharmacopoeia, the Council of Europe, 2005.
21. 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, 2004, volume 52, 385−406.
22. Gad, M. Z. *Anti-aging effects of l-arginine*. Journal of Advanced Research, 2010, volume 1 (3), 169- 177.
23. Gaitonde, k, M. *A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids.* Journal of Biochemistry, 1967, volume 104, 627–633.
24. 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, 2004, volume 35, 339-348.
25. Heinrikson, L, R; Meredith, C, S. *Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate.* Analytical Biochemistry, 1984, volume 136 (1), 65-74.
26. Helrich, K. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edition, 1990, 1100–1101.
27. Hess, B. and 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 , 2004, volume 14, 60-69.
28. *http://www.fda.gov*
29. Jabs, C., Nëglen, P., Eklöf, B., Thomas, E. *Plasma creatine determination using a luminescence method.* Biochemical medicine and metabolic biology, 1988, volume 39 (3), 267-272.
30. Jäger, R., Purpura. M., Shao. A., Inoue. T., Kreider RB. *Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine.* Amino Acids. 2011, volume 40 (5), 1369-1383.
31. James, S. MA .*Unnatural amino acids in drug discovery.* CHIMICA OGGI,. 2003, volume 21 (6), 65- 68.
32. 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, 2013, volume 6 (1), 29-34.
33. Kawaguchi, T., Izumi, N., Charlton, MR., Sata, M. *Branched-chain amino acids as pharmacological nutrients in chronic liver disease*. Hepatology, 2011, volume 54 (3), 1063- 1070.
34. Khramov, V. A.; Prigoda, E. V. *Levels of amino group nitrogenand imidazole compounds in human oral fluids (in Russian).* Stomatologia (Bucur), 2002, volume 81 (6), 10-11.
35. Koide, S.S., *Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks*. Nutrition Research , 1998, volume 18 (6), 1091–1101.
36. Koolman, J., Roehm. K. H. Color Atlas of Biochemistry, 2nd edition, Thieme , Stuttgart . New York, 2005, 58-66.
37. Kreider, R.B., *Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations.* Molecular and Cellular Biochem, 2003, volume 244 (1-2), 89–94.

38. Kuzuhara, *A. and Hori, T., Reduction mechanism of L-cysteine on keratin fibers using microspectrophotometry and Raman spectroscopy*. Biopolymers, 2005, volume 79 (6), 324-334.
39. Labotz, M. and Smith, B.W. *Creatine supplement use in an NCAA division I athletic program*. Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine, 1999, volume 9 (3), 167- 169.
40. Lamothe, P. J.; McCormick, P. G. *Role of hydrindantin in thedetermination of amino acids using ninhydrin*. Analytical Chemistry, 1973, volume 45 (11), 1906-1911.
41. Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W., Demaree, S. *Direct antioxidant properties of creatine*. Biochemistry and Biophysics Research Communications, 2002, volume 290 (1), 47–52.
42. Lynch, J., Barbano, D. *Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products.* Journal of AOAC international, 1999, volume 82 (6), 1389-1398.
43. Molderings, G. J. and Haenisch, B. *Agmatine (decarboxylated l-arginine): Physiological role and therapeutic potential*. Pharmacology & Therapeutics, 2012, volume 133 (3), 351-365.
44. 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, 2001, volume 913 (1-2), 283-302.
45. Morris, S. J. *Arginases and arginine deficiency syndromes.* Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2012, volume 15 (1), 64-70.
46. Mou, D. *Determination of amino acids by precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde (OPA) and reversed-phase high performance liquid chromatography*, Chinese journal of chromatography, 1997, volume 15 (4), 319-321.
47. Murray, R.K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., Weil, P. A. Harper's Illustrated Biochemistry, 28 Edition, The McGraw-Hill Companies, China, 2009.
48. Nabi. S. A. and Khan, M. A . *Selective TLC Separation of Lysine and Threonine in pharmaceutical preparartions.* Acta Chromatographica, 2003, volume 13, 161-171.
49. Nicastro, H., Artioli, G., Costa, A. S., Solis, M., da, L. C., Blachier, F., Lancha, A. J. *An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011, volume 40 (2), 287-300.
50. Otles, S. *Methods of Analysis of Food Components and Additives*, Taylor & Francis Group, Turkey, 2005.
51. Persky. A. M. and Brazeau. G. A. *Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate.* The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharmacological Review, 2001, volume 53 (2), 161-176.
52. Persson, J. A., Handbook for Kjeldahl Digestion, 4th edition, FOSS, Hilleroed, Denmark., 2008.
53. Preli, R. B., Klein, k. P., Herrington, D. M. *Vascular effects of dietary L-arginine supplementation.* Atherosclerosis , 2002, volume 162 (1), 1–15.
54. Rao, M. N., *medical Biochemistry*. revised second edition, New Age International Publishers . New Delhi, 2006, 13-20.
55. Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., Simal-Lozano, J. *High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in Edible Seaweeds after Derivatization with Phenyl Isothiocyanate*. Journal of Chromatographia, 2003, volume 58 (3-4), 159-163.

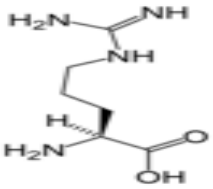
56. Schulz, G.E., Schirmer, R.H., *Principles of Protein Structure*, Springer, New York, 1979.
57. Sellevold, O.F.M., Jynge, P., Aarstad**,** K. *High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue***.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1986, volume 18 (5), 517-527.
58. Sherwood, R. A. *Amino acid measurement by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection.* Journal of Neuroscience Methods, 1990, volume 34 (1-3), 17-22.
59. Starcher, B. *A Ninhydrin-Based Assay to Quantitate the Total Protein Content of Tissue Samples*. Analytical Biochemistry, 2001, volume 292, 125–129.
60. 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, 2005, volume 19 (2-3), 112–117.
61. Sundell, J.; Hulmi, J.; Rossi, J. *Whey protein and creatine as nutritional supplements.* Duodecim, 2011,volume 127 (7), 700-705.
62. Tcherkas, Y. V., Kartsova, L. A., Krasnova, I. N. *Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.* Journal of Chromatography A, 2001, volume 912, 303–308.
63. The United States Pharmacopeia: National Formulary, 2007.
64. Vinatier, D., Orazi,G., Cosson, M., Dufour, P. *Theories of endometriosis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001, volume 96 (1), 21-34.
65. Williams, M. *Dietary Supplements and Sports Performance: Amino Acids.* Journal of the International Society of Sports Nutrition, volume 2 (2), 2005, 63-67.
66. Williams, M.H., Kreider, R.B., Branch, J.D.. *Creatine - the power supplement: what it is, how it works, when it helps.* Human Kinetics Publishers, Champain,1999.
67. WU, G. and Meininger, CJ. *Analysis of citrulline, arginine, and methylarginines using high-performance liquid chromatography*. Methods in Enzymology, 2008, volume 440, 177-189.
68. WU, G. and Morris, SM. JR. *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond*. Journal of Biochemistry, 1998, volume 336 (1), 1-17.
69. Yin, J., Tomycz, L., Bonner, G., Wang, D.I.C., *A simple and rapid assay of collagen-like polymer in crude lysate from Escherichia coli*. Journal of Microbiological Methods, 2002, volume 49 (3), 321–323.
70. Burkea, D. G., MacLeanb, P. G., Walkerb, R. A., Dewarb, P. J., Smith-Palmerb, T. *Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999, volume 732 (2), 479-485.
71. قوانين وزارة الصحة ومديرية الرقابة الدوائية السورية، قانون رقم 24 /ت عام 2010، .
72. المارديني م. عامر، كتاب مراقبة الأدوية، منشورات جامعة دمشق،2008-2007.

الملحق (1)

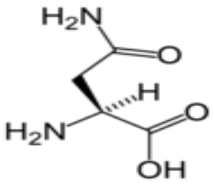
الصيغ العامة للأحماض الأمينية البروتينية.



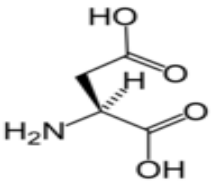
L-Alanine (Ala / A)



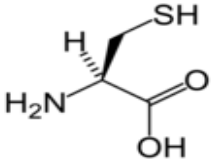
L-Arginine (Arg / R)



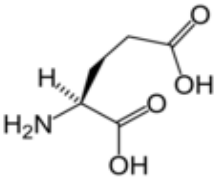
L-Aspargine (Asn / N)



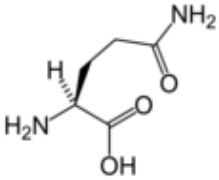
L-Aspartic acid (Asp / D)



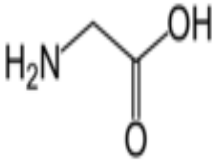
L-Cysteine (Cys / C)



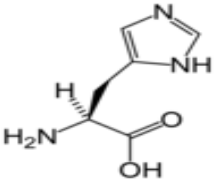
L-Glutamic Acid (Glu / E)



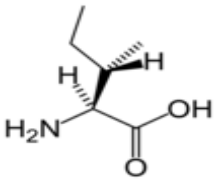
L-Glutamine (Gln / Q)



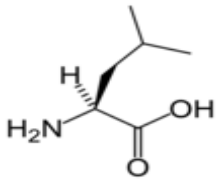
Glycine (Gly / G)



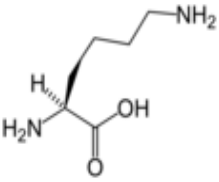
L-Histidine (His / H)



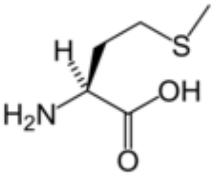
L-Isoleucine (Ile / I)



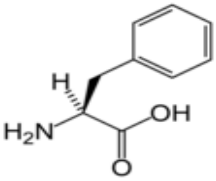
L-Leucine (Leu / L)



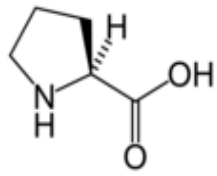
L-Lysine (Lys / K)



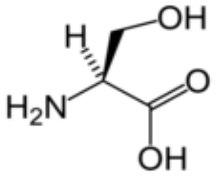
L-Methionine (Met / M)



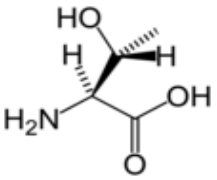
L-Phenylalanine (Phe / F)



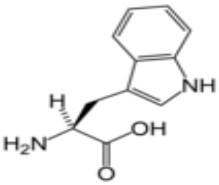
L-Proline (Pro / P)



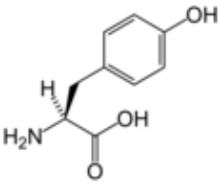
L-Serine (Ser / S)



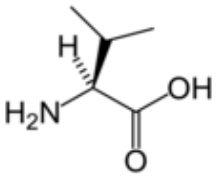
L-Threonine (Thr / T)



L-Tryptophane (Trp / W)



L-Tyrosine (Tyr / Y)



L-Valine (Val / V)

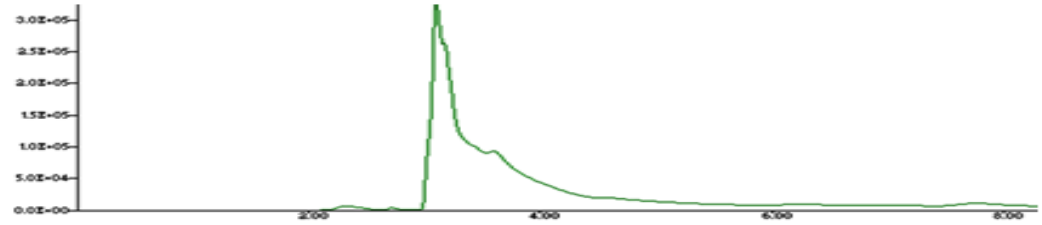
الملحق (2)

الخصائص الفيزيوكيميائية للأحماض الأمينية

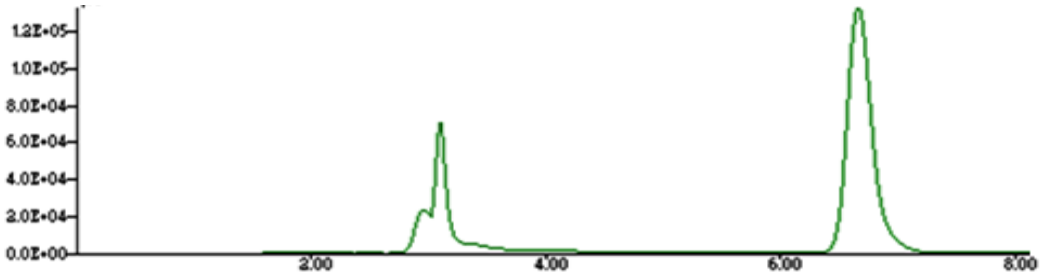
A	الحمض الاميني	الوزن الجزيئي	توافر ضمن البروتين%	لاقطبية السلسلة الجانبية (R)	pK_a1	pK_a2	pK_aR	PI	UV *	FLU **
Ala	Alanine	71,08	9	0,53	2,3	9,8		6,05		
Arg	Arginine	156,2	4,7	-0,85	2,2	9,05	12,5	10,775		
Asn	Asparagine	114,11	4,4	-1,05	2	8,8		5,4		
Asp	Acid aspartique	115,09	5,5	-0,02	2,1	9,8	3,9	3		
Cys	Cystéine	103,14	2,8	0,93	1,7	10,8	8,3	5		
Gln	Glutamine	128,14	3,9	-1,09	2,2	9,1		5,65		
Glu	Acid glutamique	129,12	6,2	-0,07	2,2	9,7	4,3	3,25		
Gly	Glycine	57,06	7,5	0	2,3	9,8		6,05		
His	Histidine	137,15	2,1	--0,23	1,8	9,2	6,0	7,6		
Ile	Isoleucine	113,17	4,6	1,99	2,3	9,8		6,05		
Leu	Leucine	113,17	7,5	1,99	2,3	9,8		6,05		
Lys	Lysine	128,18	7	-0,52	2,2	8,95	10,5	9,725		
Met	Methionine	131,21	1,7	1,08	2,3	9,2		5,75		
Phe	Phenylalanine	147,18	3,5	2,24	2,6	9,2		5,9	*	**
Pro	Proline	97,12	4,6	1,01	2	10,6		6,3		
Ser	Serine	87,08	7,1	-0,56	2,2	9,2		5,7		
Thr	Threonine	101,11	6	-0,26	2,6	10,4		6,5		
Trp	Tryptophane	186,21	1,1	2,31	2,4	9,4		5,9	*	**
Tyr	Tyrosine	163,18	3,5	1,7	2,2	9,1	10,1	5,65	*	**
Val	Valine	99,14	6,9	1,46	2,3	9,8		6,05		

الملحق (3)

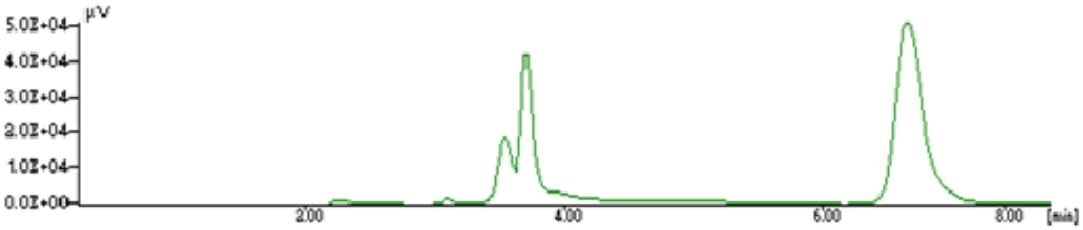
كروماتوغرامات OPA، الأرجينين العياري والعيّنات بعد اشتقاقها بالـOPA واستخدام تقنية HPLC (الطور المتحرك (وقاء السيترات: اسيتونتريل) بنسبة (80: 20)، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)



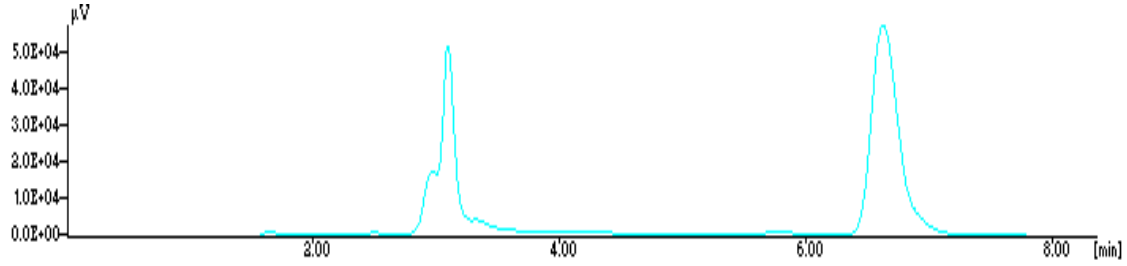
a كروماتوغرام OPA



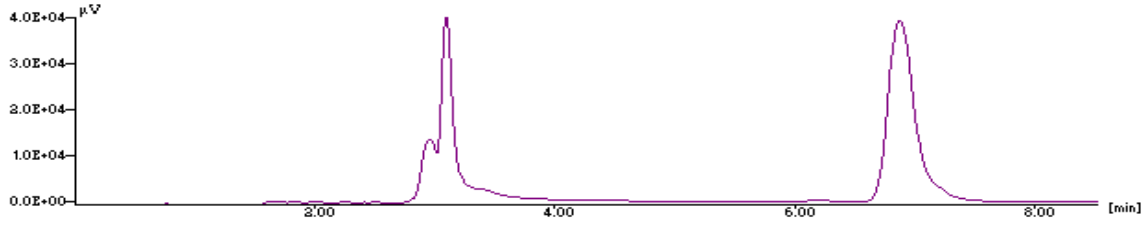
b كروماتوغرام الأرجينين العياري



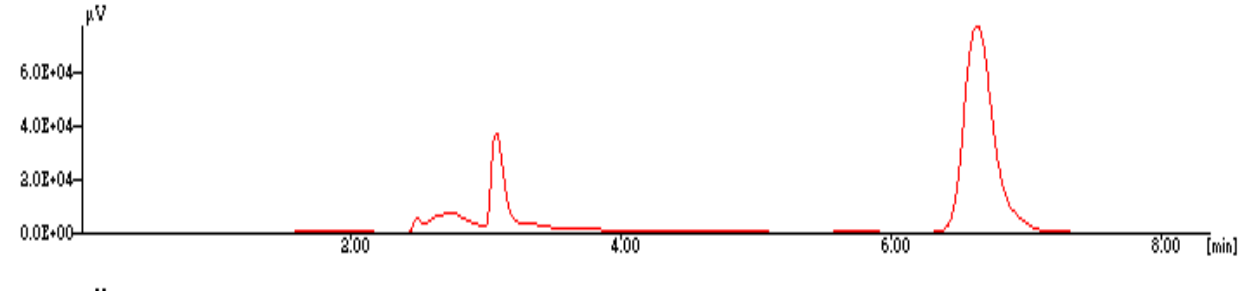
c كروماتوغرام للأرجينين في الكبسولات F



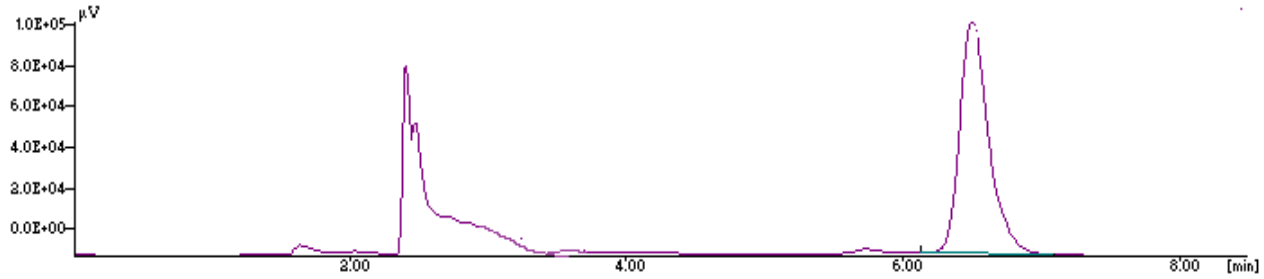
d كروماتوغرام للأرجينين في الكبسولات G_1



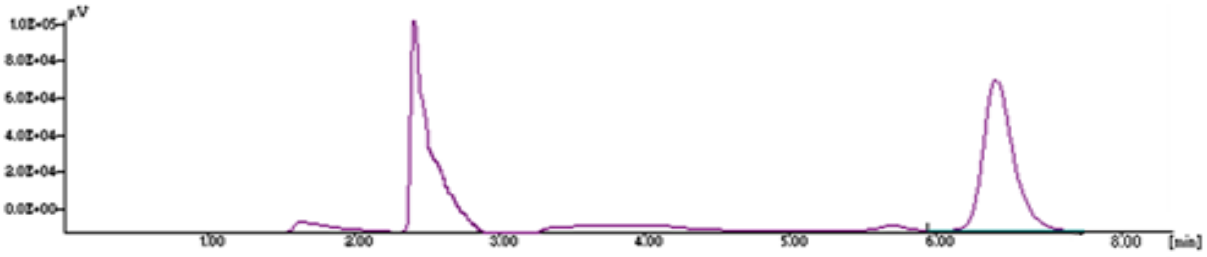
e كروماتوغرام للأرجينين في الكبسولات G_2



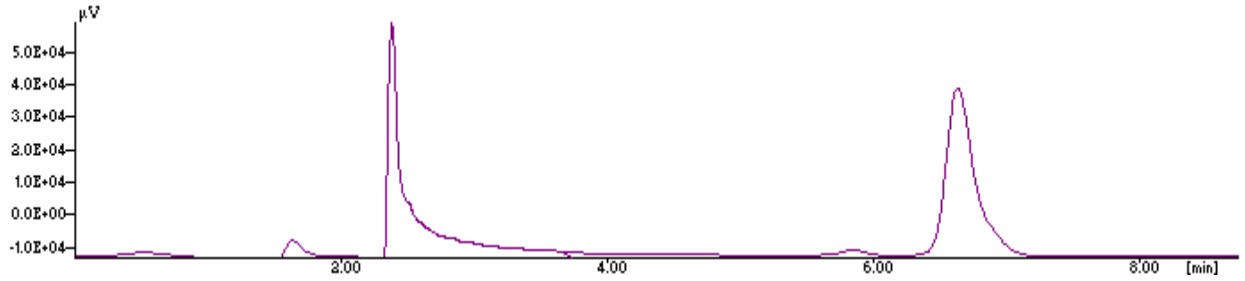
f كروماتوغرام للأرجينين في الكبسولات H



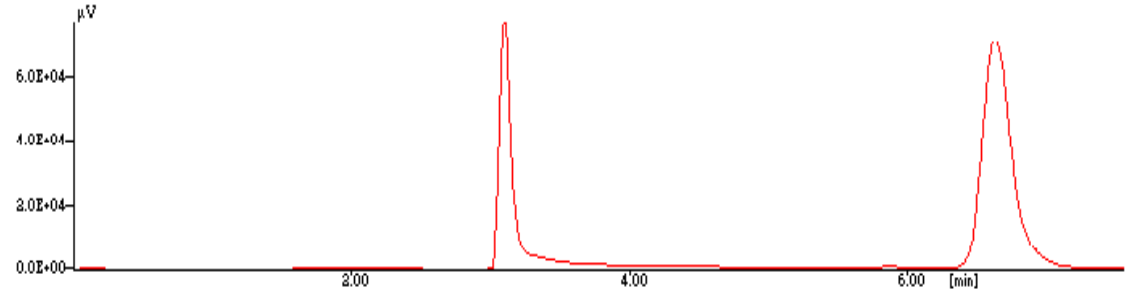
g كروماتوغرام للأرجينين في حبابات الشرب I1



h كروماتوغرام للأرجينين في حبابات الشرب I2



i كروماتوغرام للأرجينين في حبابات الشرب I_3



J كروماتوغرام للأرجينين في الشراب J

الملحق (4)

الجدول (1): تكرارية طريقة الكشف باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي عند التركيز 0.2 ميكرومول/ مل

الانحراف المعياري النسبي	الانحراف المعياري	الوسطي	الامتصاصيات					
0.493555	0.003764	0.758933	0.759	0.7581	0.7579	0.7594	0.7538	0.7654

الجدول (2): امتصاصية السلسلة العيارية للأرجينين بعد الاشتقاق بالنينهيدرين والكشف بمقياس الطيف الضوئي المرئي (طول موجة 570 نانو متر)

التركيز ميكرومول/ مل	متوسط الامتصاصية	الانحراف المعياري
0.11	0.462	0.022553
0.14	0.534	0.019012
0.20	0.759	0.005801
0.22	0.929	0.009842
0.28	1.099	0.076687

الجدول (3) النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة والانحراف المعياري النسبي في كلّ عيّنة باستخدام مقياس الطيف الضوئي المرئي

	متمّم غذائي	دوائـــــــي						
	كبسولات	كبسولات			حبابات شرب			شراب
N	F	G1	G2	H	I1	I2	I3	J
1	90.14	100.54	98.38	95.09	100.02	96.93	96.93	97.87
2	86.38	98.74	96.21	94.45	101.50	95.13	100.54	97.84
3	88.13	96.93	100.18	95.85	102.34	99.19	96.93	
4	85.81	100.54	94.59	92.66	96.68	97.11	98.74	
5	89.50	96.93	98.20	95.35	96.63	95.13	98.74	
6	87.29	96.93	96.21	93.51				
7	89.92	98.74	98.92	94.55				
8	85.57	95.13	96.57	92.68				
9	89.45	95.13	100.90	94.55				
10	87.68	96.93	98.56	92.97				
الوسطي	87.99	97.65	97.87	94.17	99.43	96.70	98.38	97.85
الانحراف المعياري النسبي	1.95	1.99	2	1.22	2.68	1.74	1.53	0.03

الملحق (5)

الجدول (1): التأكد من تكرارية تقنية HPLC عندالتركيز 72 ميكرومول/ مل

(الطور المتحرك (وقاء السيترات: اسيتونتريل) بنسبة (80: 20)، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

الانحراف المعياري النسبي	الانحراف المعياري	الوسطي	مساحات القمم				
0.547555	8542.319	1560084	1556317	1568146	1552141	1553453	1570362

الجدول (2): مساحات قمم السلسلة العيارية بعد الاشتقاق بالـ OPA وحقنها بجهاز HPLC

(الطور المتحرك (وقاء السيترات: اسيتونتريل) بنسبة (80: 20)، كاشف الفلورة، معدّل التدفق 1 مل/د، حجم الحقنة 20 ميكرولتر)

التركيز ميكرومول/ مل	متوسط المساحة	الانحراف المعياري
18	367564.667	60354.50877
24	513546	70951.40106
36	766363.33	59007.40976
48	1027962	104283.6415
72	1619516.57	51455.74872

الجدول (3) النسبة المئوية للمحتوى من الأرجينين في العيّنات التجارية المدروسة والانحراف المعياري النسبي في كلّ عيّنة باستخدام تقنية HPLC (الشروط نفسها في الجدول السابق)

	متمّم غذائي	دوائـــــــي						
	كبسولات	كبسولات			حبابات الشرب			شراب
N	F	G1	G2	H	I1	I2	I3	J
1	87.34	97.07	102.35	92.66	95.09	96.67	100.65	96.64
2	87.11	106.80	100.40	107.06	104.69	95.23	101.12	97.37
3	84.11	97.84	98.80	97.84	102.03	99.42	96.52	
4	86.02	91.19	95.08	95.66	97.66	99.24	95.97	
5	88.89	104.49	101.99	97.33	98.42	103.44	99.64	
6	80.96	97.89	101.80	97.19				
7	81.62	100.71	99.38	105.12				
8	89.05	97.84	97.47	107.20				
9	90.68	95.75	96.08	99.49				
10	86.39	98.66	101.35	101.42				
الوسطي	86.22	98.82	99.47	100.1	99.58	98.80	98.78	97.01
الانحراف المعياري النسبي	3.68	4.43	2.59	4.97	3.80	3.17	2.41	0.53

Abstract

Illegal drugs and dietary supplements are commonly and widely used in many countries, and this consists one of economic and healthy problems in the world, including Syria. This research has been performed as a step to ensure the compatibility of studied products, used as drugs or dietary supplements, to pharmacopeia specifications and labeling information. Furthermore this research may permit to ensure the safety of dietary supplements purchased from pharmacies (legally) or from sports clubs (illegally).

In the first part of the research, we studied some dietary supplements containing creatine and protein obtained from sports clubs. Then the research focused on the amino acid "l-arginine" which is available in several pharmaceutical forms obtained from pharmacies (legally) or from sports clubs (illegally).

The performed tests included exterior label and labeling, weight uniformity, identification and content verification of active substance. Three methods were used for quantitative determination of arginine in its products; Kjeldahl test, HPLC and visible spectrophotometer.

Concerning the content of active substance, the results revealed that dietary supplements containing creatine and protein were conform to the European pharmacopoeia specifications. Products containing arginine, used as medication and locally manufactured, were conform to pharmacopoeia specifications while its illegal dietary supplements were not.

No statistically significant differences were found between the two used methods for quantitative determination of arginine (HPLC/visible spectrophotometer) except for one product. In addition, no differences between studied batches for the same company were observed.

By comparing the studied companies, the method of visible spectrophotometer revealed the presence of statistically significant differences between arginine capsules used as drugs from different companies, and between those capsules used as dietary supplements. However, using HPLC, these differences were observed only between capsules used as drugs and capsules used as dietary supplements.

Syrian Arab Republic

Tishreen University

Faculty of Pharmacy

Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology Department

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

Thesis is Prepared to obtain Master Degree in Drug Design and Control

Prepared by

Afraa Adib Mtaweg

Supervised by

Dr .Ayat Abboud

Faculty of Pharmacy

Lattakia 2013- 2014