شروط تحليلّية كروماتوغرافيّة جديدة لفصل وتحديد مزيج عياري من الستيرولات النباتيّة

جمال الحليب، د. أحمد أبو حجر
*الكيمياء التحليليّة، كلية العلوم، جامعة إدلب

الملخص:

يهدف هذا البحث إلى تطوير طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء ذات الطور المعكوس (RP-HPLC) والتحقق من صلاحيتها لفصل وتحديد مزيج من الستيرولات النباتيّة، التي تُعد مكونات أساسية في المنتجات الغذائيّة والعشبية، وهي معروفة بتأثيراتها المفيدة في معالجة فرط شحميات الدم. أجريَ التحليل الكروماتوغرافي بواسطة عمود Thermo Hypersil™ RP C8 HPLC أبعاده 4.6 mm × 250) (I.D. بحجم جسيمات 5 µm. مزيج من (الأسيتونتريل:الماء) بنسبة حجمية (20:80)% استعملَ طوراً متحركاً في وضع الفصل متساوي الضغط Isocratic Eluent وبمعدل تدفق 1.8 mL/min عند درجة حرارة 45°C و20 µL كحجم محقون. سُجلت الكروماتوغرامات عند طول موجة 195 nm بواسطة كاشف مصفوفة الصمام الثنائي (DAD). قُيّمت مصدوقية الطريقة اعتماداً على مقاييس الخطية والنوعية وحد الكشف (LOD) وحد القياس الكمي (LOQ) وفقاً لتوصيات المجلس الدولي للمواءمة (ICH). تضمن هذه الطريقة الموثوقة دقةً عالية، وإجراء سريع لتحضير العينات من أجل التحديد الدقيق لمحتوى الستيرولات في المنتجات الغذائيّة والعشبيّة والزيوت النباتيّة لمراقبة جودة وسلامة وفعاليّة المنتجات المدروسة والتأكد منها وذلك خلال زمن تحليل لا يتجاوز 23 دقيقة.

الكلمات المفتاحية: الستيرولات النباتيّة، تطوير طريقة تحليليّة، مراقبة الجودة، كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء ذات الطور المعكوس، المصدوقية، كاشف DAD

"New Chromatographic Analytical Conditions for the Separation and Determination of a Standard Mixture of Phytosterols"

Jamal. Al-haleb *, Ahmed. Abo Hjer **

*Analytical Chemistry, Faculty of Science, University of Idlib

Abstract:

This research aims to develop a reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method and validate its suitability for the separation and identification of a mixture of phytosterols, which are key components of food and herbal products known for their beneficial effects in managing hyperlipidemia. Chromatographic analysis was performed using a Thermo Hypersil™ RP C8 HPLC column (250 × 4.6 mm I.D.) and 5 μm particle size. A mixture of (Acetonitrile:Water) in a ratio of (80:20)% was used as the mobile phase under isocratic elution conditions, with a flow rate of 1.8 mL/min at a temperature of 45°C and 20 μL as an injection volume. The chromatograms were recorded at 195 nm using Diode Array Detector (DAD). Validation of the method was evaluated based on linearity, specificity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ), according to the guidelines of the International conference on Harmonization (ICH). This reliable method ensures high accuracy and a rapid sample preparation process for the precise determination of sterol content in food products, herbal formulations, and vegetable oil, facilitating quality, safety, and efficacy monitoring, all within an analysis time of no more than 23 minutes.

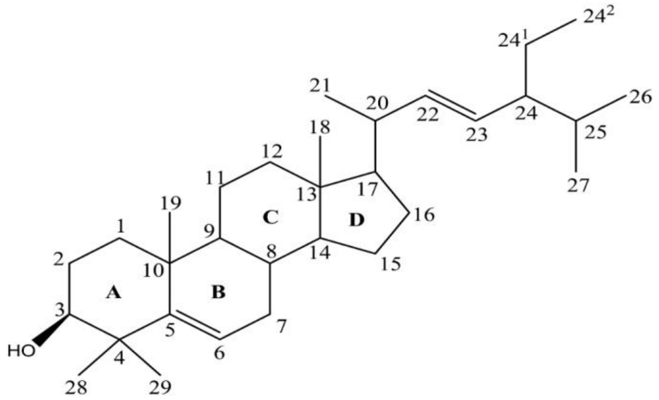
Keywords: Phytosterols, Analytical method development, Quality control, RP-HPLC, Validation, Detector (DAD)

1- المقدمة:

Introduction

تُعّرف الستيرولات النباتيّة على أنها مجموعة من المركبات موجودة بشكل طبيعي في النباتات مثل الخضراوات والمكسرات والبذور والبقوليات وزيت الزيتون والزيوت النباتيّة، وتوجد في عدة أشكال وأكثرها شيوعاً في النظام الغذائي البشري هي بيتا-سيتوستيرول β-Sitosterol وكامبيستيرول Campesterol وستغماستيرول Stigmasterol (Weihrauch & Grander, 1978)، وهذه الستيرولات الموجودة في النباتات شبيهة بالكوليستيرول ومماثلة له من ناحية التركيب الكيميائي والوظيفة(Ogbe *et al*., 2015)، وبذلك تكون قادرة على تخفيض امتصاصه واستقلابه في الجسم(Smet et al., 2012). تُعد الأنظمة الغذائية الغنية بالستيرولات فعّالة في خفض الكوليستيرول الكلي عند الأطفال الذين يعانون من فرط شحميات الدم دون آثار سلبية كبيرة (Garoufi *et al*., 2014). وقد وُجد أن استهلاك المكملات الستيرولية النباتيّة بنسبة gr (1.6-2.5) يومياً يمكن أن يؤدي إلى انخفاض الغليسيريدات الثلاثية بنسبة 6% (Demonty *et al*., 2013)، كما أن الاستهلاك اليومي للستيرول النباتي gr (2-3) ممكن أن يُخفض مستويات الكوليستيرول الضار LDL-C بنسبة (5-15)%، وقد تكون زيادة كمية الستيرولات المُستهلكة في مجموعة متنوعة من الأطعمة طريقة مهمة لخفض مستويات الكوليستيرول والوقاية من أمراض القلب التاجية (Rawal *et al*., 2015). إذ تؤدي الستيرولات النباتيّة وظيفة مهمة هاماً في تنظيم الأكسدة والدهون في الدم وتظهر خصائص مضادة للسرطان(Raju *et al*., 2013)، كما تؤدي الستيرولات وظيفة مهمة هاماً في الصناعات الغذائيّة والدوائيّة حالياً لكونها تُعّد البادئات لبعض الجزيئات الحيوية مثل الإرغوستيرول (مولد فيتامين D)، كذلك تستعمل في تصنيع الكورتيزون وهرمون الفلافون(Hartmann, 1998). لم يسجل تناول الستيرولات أي آثار جانبية عند استهلاكها إلا في حالات استثنائية لدى المرضى المصابين بفرط فيتوستيروليميا Phytosterolemia (Calandra *et al*., 2011). لذا فقد صرحت الهيئة الأمريكية للغذاء والدواء (FDA) بسلامته واوصت بتوسيع إجراء الدراسات للتعرف على الآثار الصحية وفوائد الستيرولات وبعض الأطعمة التقليدية

الغنية بها عن طريق تعديل المدخول الغذائي اليومي للمادة المحددة حسب الضرورة للمنفعة المطالب بها(FDA, 2010). وفقاً لتوصيات IUPAC (1989) الستيرولات عبارة عن مركبات أليفاتية عالية الوزن الجزيئي، مشتقة حيوياً من السكوالين Squalene، تحتوي على نواة الستيرول المميزة بأربع حلقات متصلة Tetracyclic Perhydro-Cyclopentano-Phenanthrene مُرقمة بـ (A, B, C, D) مع ترقيم الكربون القياسي وتحمل مجموعة هيدروكسيل عند ذرة الكربون C-3 ثلاث حلقات فيها سداسية (A, B, C) والحلقة الرابعة خماسية (D) كما في الشكل (1)، ولكنها تختلف في السلسلة الجانبية عند ذرة C-24 وموقع وتركيب الروابط الثنائية غير المشبعة والتدوير البصري حول ذرة الكربون غير المتناظرة (Azadmard-Damirchi & Dutta, 2010).



الشكل (1): البنية الكيميائيّة العامة للستيرولات النباتيّة وفقاً لنظام IUPAC

طُوِّرت مجموعة من الطرائق التحليليّة لفصل وتحديد الستيرولات في المُستخلصات العشبيّة بواسطة تقانات كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC و-^{13}C NMR و^{1}H-NMR والتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء IR (Potawale *et al.*, 2014) (Mishra *et al.*, 2016) (Chakraborty *et al.*, 2023) (Suhartati & Yandri, 2021) (Ahmed *et al.*, 2021) (Sangwan, 2019) (Okoro *et al.*, 2017). كما طُوّرت العديد من طرائق HPLC بالاقتران مع كاشف UV في المُستخلصات النباتيّة والمكملات الغذائيّة (Solich *et al.*, 2017) (Vemuri *et al.*, 2018) (Hryniewicka *et al.*, 2020) (Khonsa *et al.*, 2022) (Lee *et al.*, 2015)، وفي الزيوت النباتيّة(Saleh, 2021) (Qi *et al.*, 2019)، وكذلك في البذور

والمكسرات(Delgado-Zamarreno *et al.*, 2009) (Kornsteiner-krenn *et al.*, 2013). كما حُدِدَت الستيرولات في الزيوت النباتيّة بواسطة تقانة HPLC بالاقتران مع كاشف الفلورة FLD (Ito *et al.*, 2017). استعمل (Mo *et al.*, 2013) تقانة HPLC-MS مع كاشف التأين الكيميائي APCI لتحديد ستة ستيرولات في 14 زيتاً غذائياً، وأيضاً كاشف HPLC-ELSD (Warner & Mounts, 1990). كذلك حُددت الستيرولات من زيوت بذور اللفت(Pop *et al.*, 2012)، وأيضاً في البذور والمكسرات والحبوب بواسطة كاشف HPLC-MS (Vecka *et al.*, 2019). استعملت تقانة GC-MS لتحديد الستيرولات في الزيوت النباتيّة والمكسرات والمكملات الغذائية (Deme *et al.*, 2021) (Li *et al.*, 2023) (Matthäus & Özcan, 2020)، وأيضاً استعمل كاشف GC-FID (Hossain & Jayadeep, 2020) (Islam *et al.*, 2017) (Silva *et al.*, 2020).

1-1 الأجهزة والمواد المستخدمة: Apparatus and Chemical Materials Used

1.1-1 الأجهزة والأدوات: Apparatus and Tools

– جهاز الكروماتوغرافية السائلة عالية الأداء $UHPLC^+$ المُزود بكاشف DAD-3000 nm (190 - 800) من إنتاج شركة Thermo Scientific نموذج Dionex UltiMate 3000 $UHPLC^+$ (RS). مُزوّد بمضخة تحليليّة وحاقن آلي وأعمدة فصل كروماتوغرافيّة مُطعمة كيميائيّاً على سيليكا مسامية وذات حجم مسامات 120 Å وفق الآتي: C8 (150×4.6 mm, 5 µm)، C8 (250×4.6 mm, 5 µm).

– حمام مائي يعمل على الأمواج فوق الصوتيّة Ultra Sonic من إنتاج شركة Wincom الصينية نموذج WT-615HTD.

– ميزان تحليلي حساس بدقة 0.1 mg وسعة قياس قصوى 220 gr من إنتاج شركة Sartorius الألمانية نموذج QUINTIX224-1S.

– ماصات حجميّة دقيقة آلية Micropiptte متغيرة الحجم ذات سعات مختلفة إنتاج شركة JOANLAB الصينية، وهذه الماصات يمكن التحكم بحجمها عن طريق معدلة الحجم.

– مرشحات ميكرونية ذات أبعاد 0.45 μm من إنتاج شركة ISOLAB الألمانية.

2.1-1 المواد الكيميائية المُستخدمة: Chemical Materials

استعملت في هذا البحث مواداً كيميائيّة عالية النقاوة من درجة GR، والماء المُستخدم ثنائي التقطير في جميع مراحل التحضير.

استعمل مزيج ستيرولي عياري ذي النقاوة 95% ≤ والمكوّن من (بيتا- سيتوستيرول (β-SS) 70.69%، ستغماستيرول (STS) 9.12%، كامبيستيرول (CAS) 14.55%، براسيكاستيرول (BRS) 0.82%) من إنتاج شركة Salus.

كذلك استعملت مواد عيارية إفرادية لكل من مكونات المزيج السابق بنقاوة 98 ≤ من إنتاج شركة Solarbio.

2-1 تحضير المحاليل: Preparation of Solutions

1.2-1 المحاليل العيارية الأم للستيرولات النباتيّة:

حُضّرت أربعة محاليل عيارية أم من الستيرولات النباتيّة العيارية بتركيز 3 $mg.mL^{-1}$ بإذابة الوزن اللازم من كل مادة عيارية (حُسب على أساس الوزن الجاف) في الميتانول للحصول على التركيز المطلوب. ثم حُفظت المحاليل المُحضّرة في عبوات محكمة الإغلاق لحين الاستعمال.

2.2-1 محلول المزيج الستيرولي العياري:

وُزنَت كمية 70.73 mg من المزيج العياري، ثم وُضعت في دورق حجمي سعة 50 mL، وأُضيف إليها 20 mL من الميتانول وحُركت جيداً حتى تمام الانحلال، ثم أُكمِل الحجم بالميتانول حتى الدائرة العيارية، ثم وُضِع المحلول في جهاز الأمواج فوق الصوتيّة لمدة 15 min حتى تمام الانحلال، وبذلك نحصل على التراكيز: (11.6, 205, 129, 1000) $\mu g.mL^{-1}$ لـ β-SS وSTS وCAS وBRS على الترتيب، ويُحفظ المحلول في عبوة محكمة الإغلاق لحين الاستعمال.

2- النتائج والمناقشة: Results and Discussion

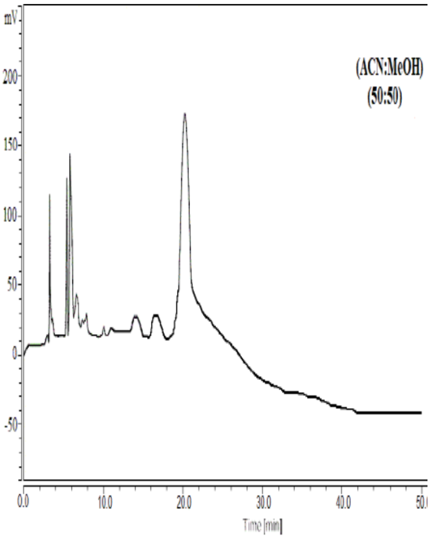
1-2 تطوير الطريقة الكروماتوغرافية لفصل الستيرولات النباتيّة:

Development of the Chromatographic Method for Separating Sterols

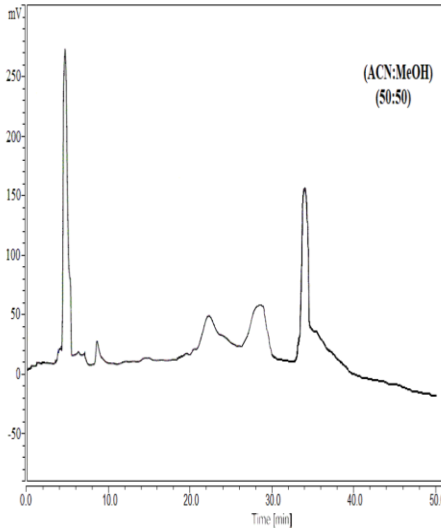
دُرِسَت في هذا البحث إمكانية فصل مزيج من الستيرولات النباتيّة بغية الكشف عنها وتحديدها بواسطة تقانة HPLC، وذلك بعد وضع بعض الشروط الكروماتوغرافيّة التي اعتمدت في اختيارها على الدراسات المرجعيّة الخاصة بدراسة الخواص الفيزيائيّة والكيميائيّة لكل من الستيرولات المدروسة(Abidi, 2001)، وذلك على كفاءة عملية الفصل Reslution (Rs) وعلى مساحة القمة الكروماتوغرافيّة Area وزمن الاحتفاظ Retention time (Rt) ومعامل التذييل للقمة Tailing Factor (T_f) تسمح بتحقيق هذه الدراسة.

1.2-2 اختيار طول العمود ونسبة مزج الطور المتحرك الأمثل:

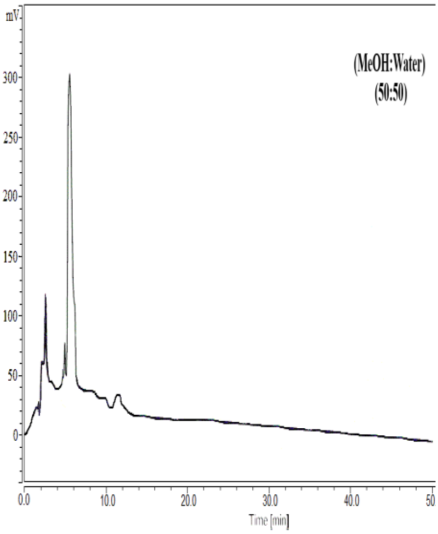
تم العمل على تحديد مكونات الطور المتحرك ونسبة المزج بعد مراجعة (Abidi, 2001) إذ حُقن 20 µL من المزيح الستيرولي العياري المُحضّر في الفقرة **(2.2-1)** بمعدل تدفق 1.8 mL/min وطول موجة الكاشف 195 nm عند درجة الحرارة 40°C كشروط أولية. فيما يلي الكروماتوغرامات الموافقة لفصل مزيج الستيرولات العياري بواسطة تراكيب مختلفة للطور المتحرك بنسب مزج ثابتة مع الأعمدة المدروسة:



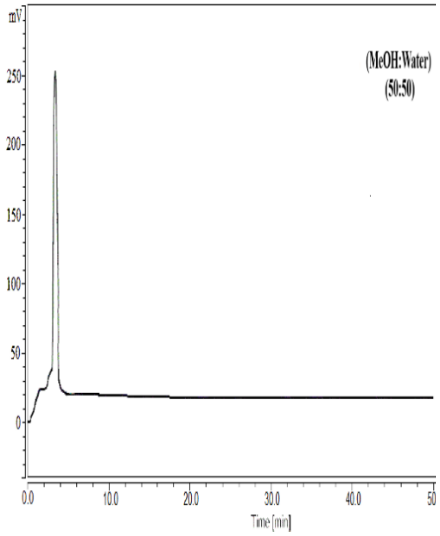
الشكل (2): الكروماتوغرام الموافق لفصل المزيج العياري بواسطة (أسيتونتريل:ميتانول) بنسبة مزج (50:50) مع العمود (C8 (150 mm



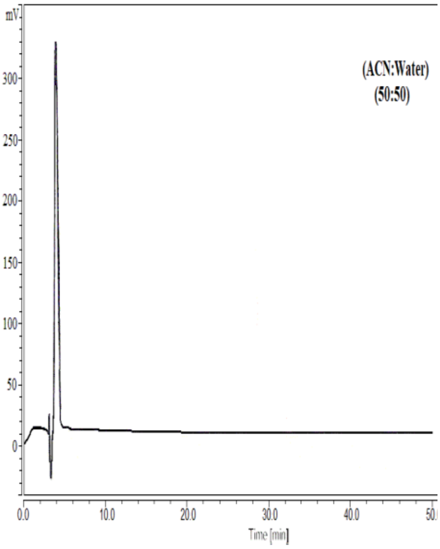
الشكل (3): الكروماتوغرام الموافق لفصل المزيج العياري بواسطة (أسيتونتريل:ميتانول) بنسبة مزج (50:50) مع العمود (C8 (250 mm



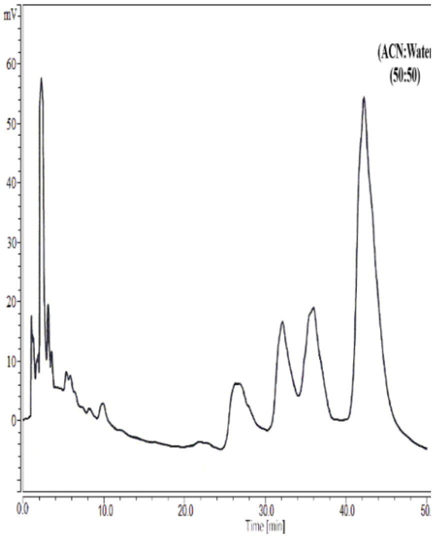
الشكل (4): الكروماتوغرام الموافق لفصل المزيج العياري بواسطة (ميتانول:ماء) بنسبة مزج (50:50) مع العمود (C8 (150 mm



الشكل (5): الكروماتوغرام الموافق لفصل المزيج العياري بواسطة (ميتانول:ماء) بنسبة مزج (50:50) مع العمود (C8 (250 mm



الشكل (6): الكروماتوغرام الموافق لفصل المزيج العياري بواسطة (أسيتونتريل:ماء) بنسبة مزج (50:50) مع العمود C8 (150 mm)



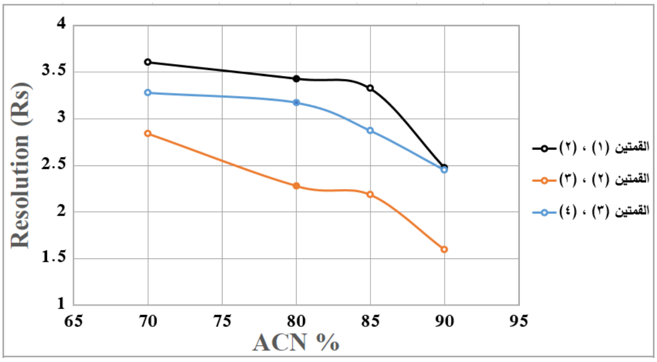
الشكل (7): الكروماتوغرام الموافق لفصل المزيج العياري بواسطة (أسيتونتريل:ماء) بنسبة مزج (50:50) مع العمود C8 (250 mm)

تبيّن النتائج أن أفضل مزيج للطور المتحرك هو(أسيتونتريل:ماء) عند استعمال العمود C8 (250×4.6 mm, 5 µm) كون نتائج الفصل والتباين وزمن الاحتفاظ كانت أفضل مقارنةً مع العمود C8 (150×4.6 mm, 5 µm) لذا تم العمل على دراسة نسبة المزج المُثلى له بما يحقق أفضل الشروط. بعد سلسلة من التجارب العملية ودراسة الكروماتوغرامات ومع زيادة النسبة المئوية للأسيتونتريل في جملة الطور المتحرك نستنتج:

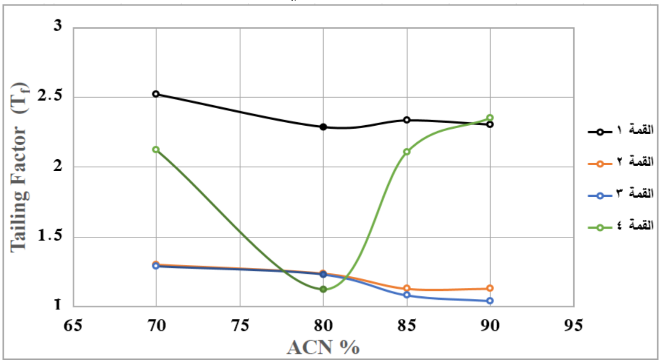
1 - تناقص زمن الاحتفاظ للقمم الأربع الموافقة لمكونات المزيج العياري.

2 - تناقص في تباين القمم 4, 3 ,2 الموافقة لمكونات المزيج العياري.

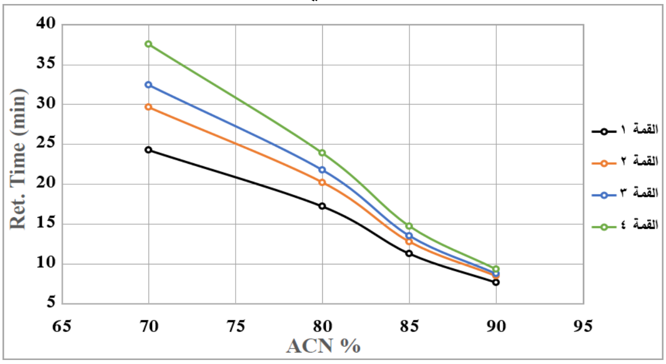
إذ تعمل الزيادة المائيّة في مزيج الطور المتحرك على تحسين فصل بعض القمم ولكنها تزيد أيضاً من زمن الاحتفاظ بها. قد حصلنا على فصل تام تقريباً ابتداءً من نسبة الأسيتونتريل 70%، وكما هو موضّح في الأشكال (10-8) لدراسة تأثير تغير تركيب الطور المتحرك (أسيتونتريل:ماء) على كلٍ من زمن الاحتفاظ للستيرولات المدروسة ومدى تناظر القمم وتأثيرها على القدرة على الفصل.



الشكل (8): المنحني البياني الممثل لتغير تباين القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة نسبة %ACN في الطور المتحرك



الشكل (9): المنحني البياني الممثل لتغير معامل تذييل القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة نسبة %ACN في الطور المتحرك



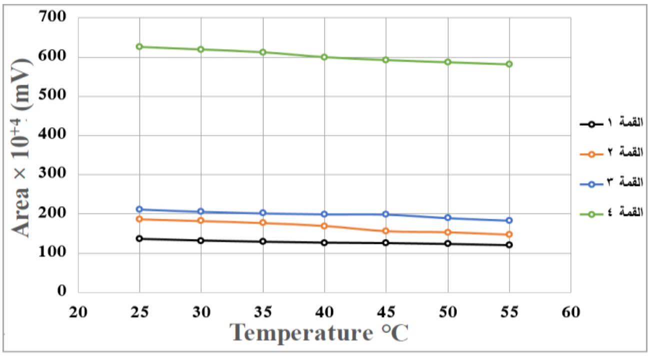
الشكل (10): المنحني البياني الممثل لتغير زمن الاحتفاظ للقمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة نسبة %ACN في الطور المتحرك

نلاحظ من نتائج الشكل (8) أن زيادة نسبة الأسيتونتريل ضمن مزيج الطور المتحرك يقود لتناقص التباين تدريجياً، كما أدى إلى تناقص معامل التذييل عموماً مع بعض الاستثناءات (القمة 4) الموضّح في الشكل (9)، وبالرغم من أن انخفاض زمن

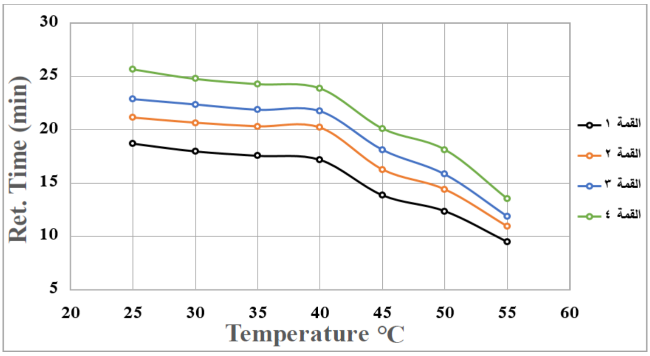
الاحتفاظ بزيادة نسبة الأسيتونتريل كان ملحوظاً في الشكل (10) وأن مزيج الستيرولات يمكن فصله خلال زمن لا يتجاوز 25 min وهي ميزة تحليليّة فائقة القيمة لأنها تخفض زمن التحليل كثيراً، إلا أنه اختيرت نسبة المزج للطور المتحرك (أسيتونتريل:ماء) %(20:80) إذ يكون زمن الاحتفاظ مقبول نوعاً ما مع إشارة تحليلية واضحة المعالم بالرغم من ارتفاع قيمة التباين مع معامل تذييل كبير للقمة (1). اعتمدنا استعمال هذه النسبة في التجارب اللاحقة على أن نعمل لاحقاً على إنقاص التباين والتذييل.

3.2-2 دراسة تأثير درجة الحرارة على عملية الفصل الكروماتوغرافي:

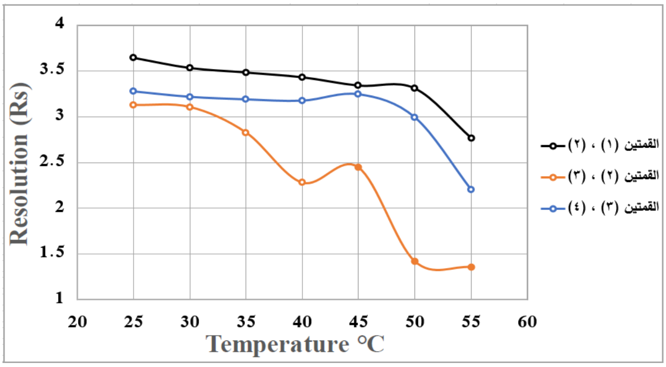
دُرِسَت تأثير درجة الحرارة على كفاءة عملية الفصل الكروماتوغرافي للمواد المدروسة وعلى مساحة القمم وتناظرها وأزمنة الاحتفاظ الخاصة بها، بحيث تُثبت الشروط الكروماتوغرافية (نوع عمود الفصل ونسب مكونات مزيج الطور المتحرك). رفعت درجة حرارة العمود تدريجياً ضمن المجال الحراري °C(25-55) بفاصل حراري 5°C وسجلنا الكروماتوغرام الناتج في كل مرة. رُسمت العلاقة بين تغيرات Area, Rt, T_f, Rs بدلالة تغير درجة حرارة العمود كما هو مُبيّن بالأشكال (11-14):



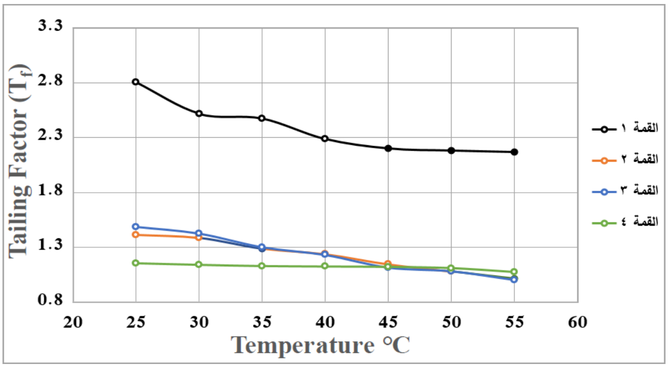
الشكل (11): المنحني البياني الممثل لمساحة القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات درجة حرارة العمود



الشكل (12): المنحني البياني الممثل لتغير زمن الاحتفاظ للقمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات درجة حرارة العمود



الشكل (13): المنحني البياني الممثل لتغير تباين القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات درجة حرارة العمود



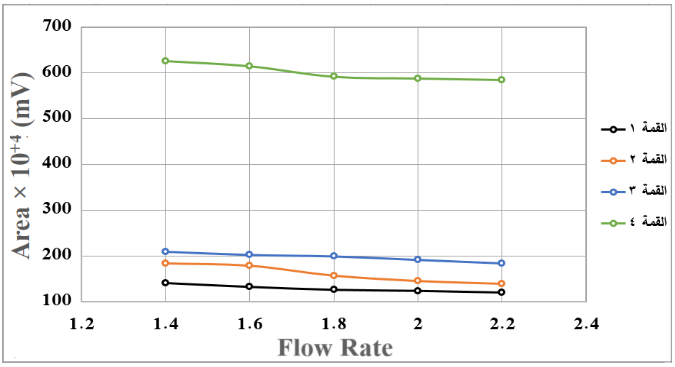
الشكل (14): المنحني البياني الممثل لتغير معامل تذييل القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات درجة حرارة العمود

نلاحظ من النتائج السابقة أن زيادة درجة الحرارة تُقلّل بشكل طفيف من مساحة القمة الكروماتوغرافيّة العائدة للمواد المدروسة، كما أنه بارتفاع درجة الحرارة تتناقص قيم أزمنة الاحتفاظ للقمم الكروماتوغرافيّة، وبالتالي تتقارب القمم الكروماتوغرافيّة من

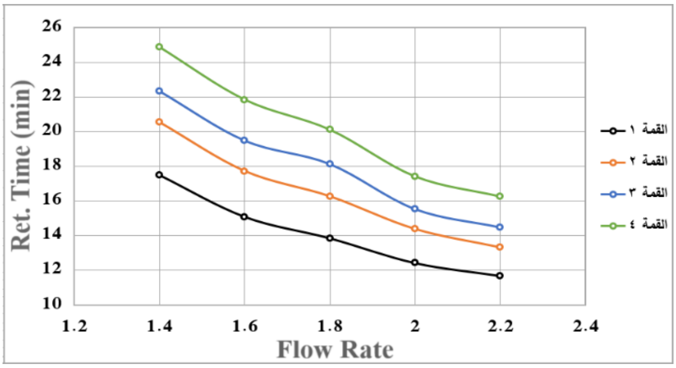
بعضها، ويحدث تداخل ما يؤثر سلباً على جودة الفصل، وقد يُعزى سبب تناقص أزمنة الاحتفاظ لانخفاض لزوجة الطور المتحرك بارتفاع درجة حرارة العمود وزيادة انتشار المادة المُحلَّلة، كما يمكن أن يُضعف من ارتباط المادة المفصولة مع الطور الساكن ويسّرع بفصلها إذ إن مفعول التوزيع للمركبات على الطور الساكن تتناقص قيمته. ومن دراسة الأشكال (13-14) لدراسة العلاقة البيانية بين تغير درجة الحرارة بدلالة معاملات التباين والتذييل، وجدنا أن معامل التذييل للقمة (1) $(T_f \geq 2)$ ولكن تباين القمتين (2) و(3) عند درجتي الحرارة 50°C و55°C كانت (1.423) و(1.360) على الترتيب $(Rs \leq 2)$، ومن ثم اختيرت درجة الحرارة المُثلى عند القيمة 45°C لموافقتها لمعامل تباين مناسب (2.447) مع زمن احتفاظ منخفض بالمقارنة مع درجات الحرارة الأدنى، وتصبح قدرة العمود على الفصل أفضل إضافةً لازدياد تناظر القمم.

4.2-2 دراسة تأثير معدل تدفق الطور المتحرك:

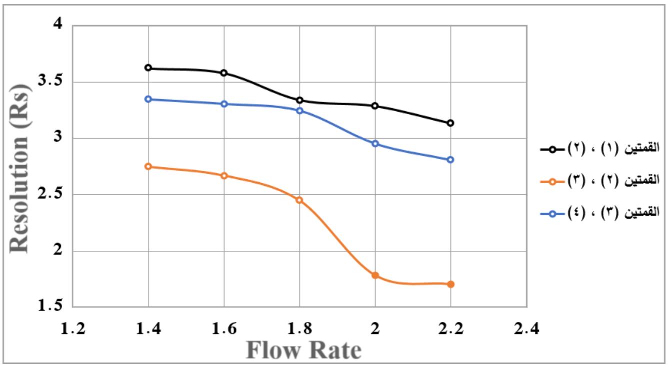
مُرر الطور المتحرك خلال عمود الفصل بتدفقات (1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2) mL/min من أجل دراسة تغيرات تدفق الطور المتحرك، ثم مراقبة عملية الفصل الكروماتوغرافي للمواد المدروسة بتثبيت الشروط الكروماتوغرافيّة المدروسة الأخرى عند كل تدفق. ولدراسة تأثير تغير تدفق الطور المتحرك على أهم المقادير الكروماتوغرافيّة رُسمت العلاقة بين تغيرات $Area, Rt, T_f, Rs$ بدلالة تغير تدفق الطور المتحرك كما هو مُبيّن بالأشكال (15-18):



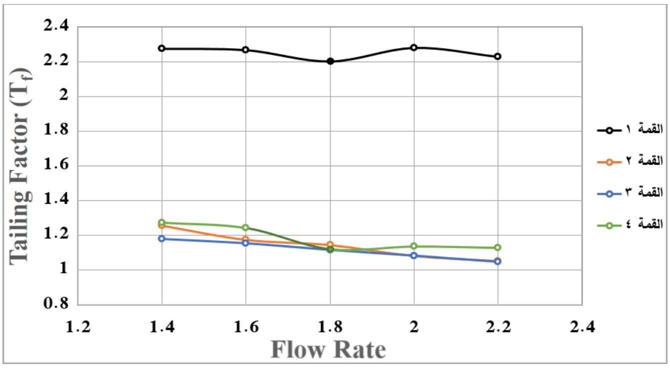
الشكل (15): المنحني البياني الممثل لمساحة القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات معدل التدفق



الشكل (16): المنحني البياني الممثل لتغير زمن الاحتفاظ للقمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات معدل التدفق



الشكل (17): المنحني البياني الممثل لتغير تباين القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات معدل التدفق



الشكل (18): المنحني البياني الممثل لتغير معامل تذييل القمم الكروماتوغرافيّة المفصولة بدلالة تغيرات معدل التدفق

من خلال النتائج السابقة نجد أن إنقاص معدل تدفق الطور المتحرك يوافق زيادة في مساحة القمم الكروماتوغرافيّة العائدة للمواد المدروسة كما هو مُوضّح في الشكل

(15)، كذلك أنه بازدياد تدفق الطور المتحرك تنقص أزمنة الاحتفاظ للقمم المفصولة جمعيها ما يؤدي لخروجها من العمود بشكل مبكر والذي يزيد من سرعة التحليل، أيضاً نجد التباين من أجل تدفق mL/min (2.0, 2.2) للقمتين (2) و(3) كانت (1.706) و(1.783) على الترتيب، كذلك وجدنا أنه عند تدفق 1.8 mL/min كان معامل التذييل للقمة (1) أصغر ما يمكن وفق الأشكال (18-17)، ومن ثم فإنها تتحسن قدرة العمود على الفصل إضافةً إلى أن القمم المفصولة تصبح أكثر تناظراً وحدة. تبيّن النتائج أن قيمة تدفق الطور المتحرك التي أعطت أفضل قيم لبارامترات الفصل كانت 1.8 mL/min، إذ حقق فصلاً جيداً كما أدى أيضاً إلى تناقص التباين والذي ترافق مع تناقص زمن التحليل الكلي، ومن ثم فإنها تسمح الضغوط المنخفضة للعمود عند قيم التدفقات العالية للطور المتحرك للوصول إلى كفاءة أعلى ونتائج أسرع.

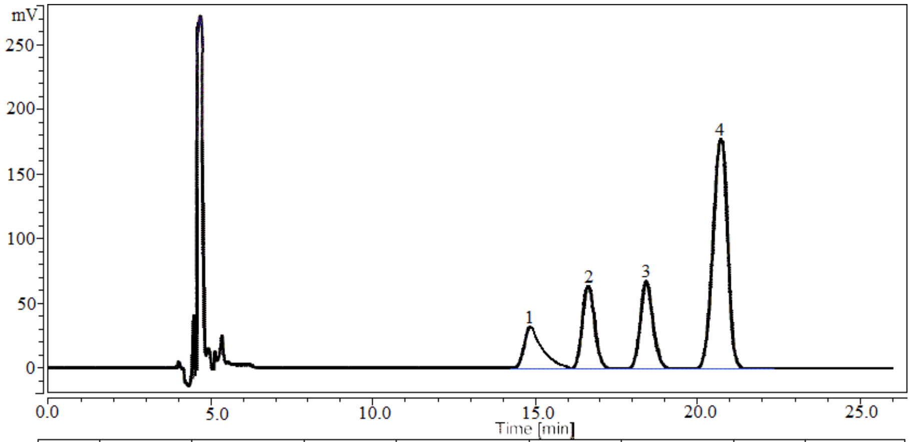
الشروط الكروماتوغرافية المثلى للطريقة المُطوَّرة:

بعد دراسة أهم الشروط الكروماتوغرافيّة المؤثرة على عملية الفصل من خلال تحديد تأثيرها على بعض المقادير الكروماتوغرافيّة، يعرض الجدول (1) الشروط الكروماتوغرافيّة والتي تُعطي فصلاً مثاليّاً لمكونات المزيج الستيرولي.

الجدول (1): الشروط الكروماتوغرافيّة المُثلى لفصل مكونات المزيج الستيرولي بتقانة HPLC

العمود المُستعمل	C8 (250×4.6 mm, 5 µm)
نسبة مزج الطور المتحرك	(ACN:Water) (80:20)
درجة حرارة العمود (°C)	45
معدل تدفق الطور المتحرك mL/min	1.8
طول موجة الكاشف nm	195
حجم الحقنة µL	20

ويُوضّح الشكل (19) الكروماتوغرام الأمثل الموافق لفصل مكونات المزيج الستيرولي بعد تطبيق الشروط الكروماتوغرافيّة المُثلى التي اختيرت في هذا البحث، حتى حصلنا على كروماتوغرام تكون فيه القمم مفصولة عن بعضها البعض ومثاليّة.



Name	Ret. Time	Area	Height	Theoretical Plate	Resolution	Tailing Factor	K´	Separation
1	14.880	1218182	31809	7898	0.000	1.745	2.090	0.000
2	16.569	1646400	63408	10594	3.465	1.129	2.441	1.167
3	18.495	1945077	67976	11397	2.315	1.117	2.841	1.163
4	20.835	5629910	178074	10159	3.076	1.019	3.327	1.171

الشكل (19): الكروماتوغرام الأمثل الموافق لفصل مكونات المزيج الستيرولي بتقانة HPLC بعد تطبيق الشروط المدروسة المُثلى

وبالتالي سيتم اعتماد الشروط الكروماتوغرافيّة الجديدة المُطوَّرة في هذا البحث، لفصل وتحديد الستيرولات النباتيّة وذلك بعد إجراء خطوات المصدوقية التحليليّة للطريقة المُطوَّرة.

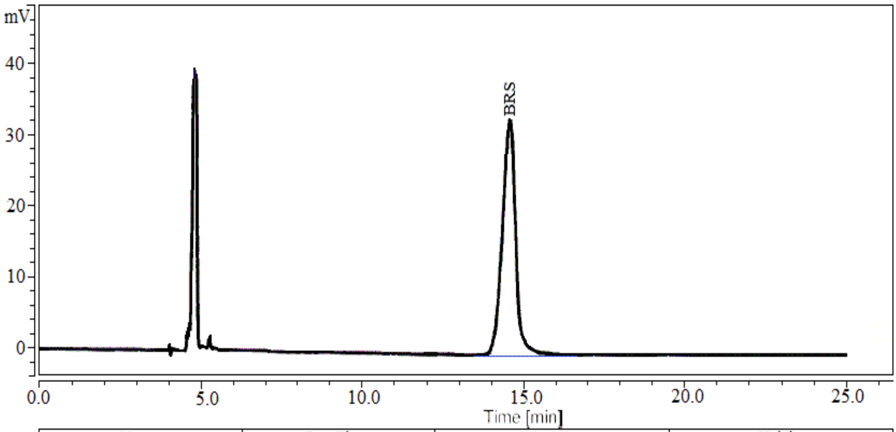
3-2 التحقق من مصدوقية الطريقة التحليليّة:

Validation of the analytical method

تتطلّب الطرائق التحليليّة المبتكرة إجراء دراسة التحقق من صلاحيتها، وقد وُضعت قواعد ومتطلبات دراسة التحقق من صلاحية الطرق التحليليّة من قبل المجلس الدولي للمواءمة (ICH) الذي يتحدث عن معايير التحقق التالية:

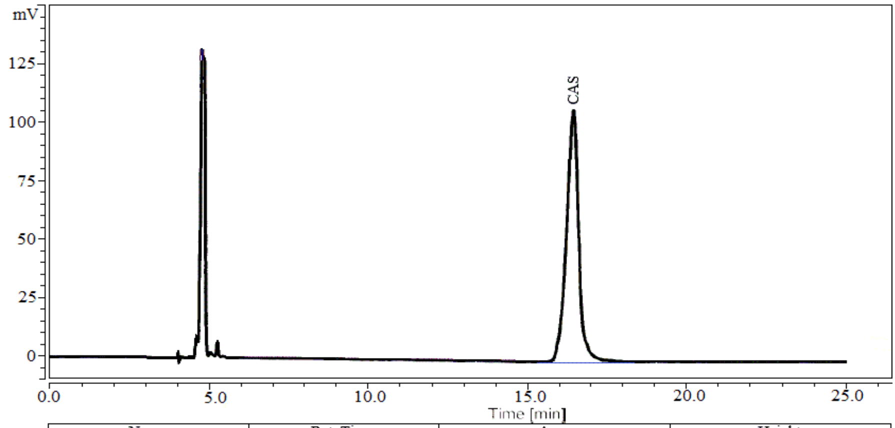
1.3-2 الانتقائيّة/النوعيّة: Selectivity/ Specificity

بغية التأكد من انتقائيّة/نوعيّة الطريقة التحليليّة المطوَّرة في تحديد مزيج من الستيرولات النباتيّة وفصلها عن بعضها البعض، تم حقن محلول عياري من كل ستيرول إفرادياً بتركيز مطابق لتركيزه في المزيج الستيرولي وذلك بتطبيق الشروط الكروماتوغرافيّة المُثلى ليتم الحصول على الكروماتوغرامات الموضحة أدناه:



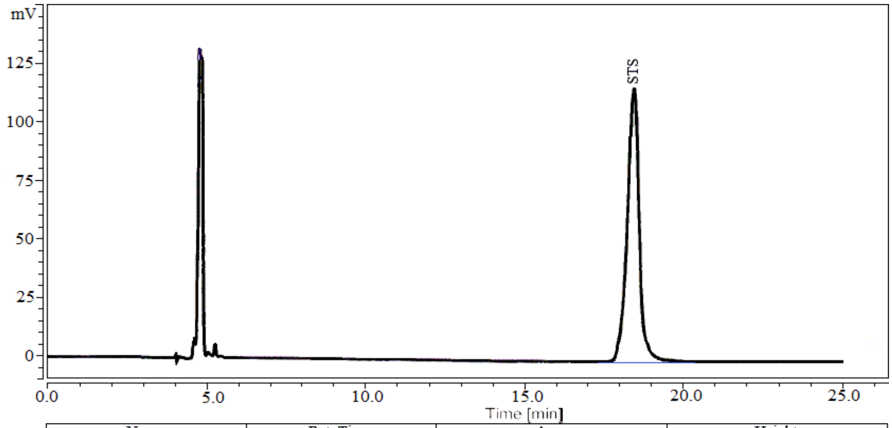
Name	Ret. Time	Area	Height
BRS	14.688	1248371	32115

الشكل (20): الكروماتوغرام الموافق لتحديد BRS العياري بتركيز $11.6\ \mu g.mL^{-1}$



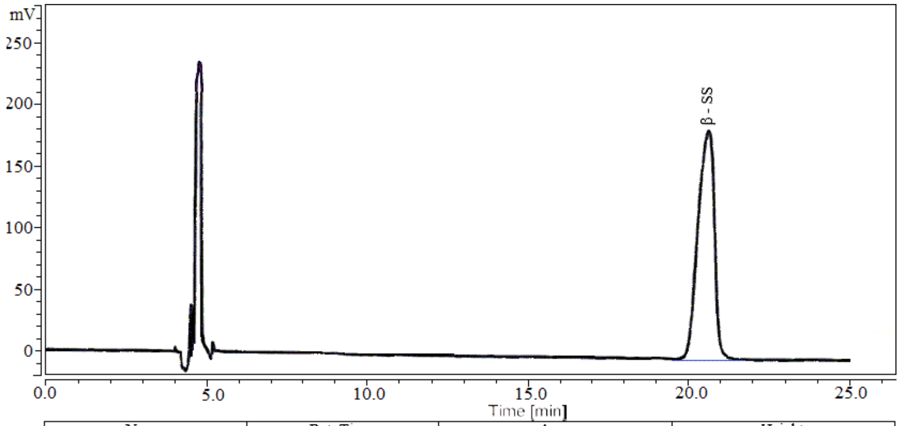
Name	Ret. Time	Area	Height
CAS	16.462	2346183	105995

الشكل (21): الكروماتوغرام الموافق لتحديد CAS العياري بتركيز $205\ \mu g.mL^{-1}$



Name	Ret. Time	Area	Height
STS	18.375	1293857	114071

الشكل (22): الكروماتوغرام الموافق لتحديد STS العياري بتركيز $129\ \mu g.mL^{-1}$

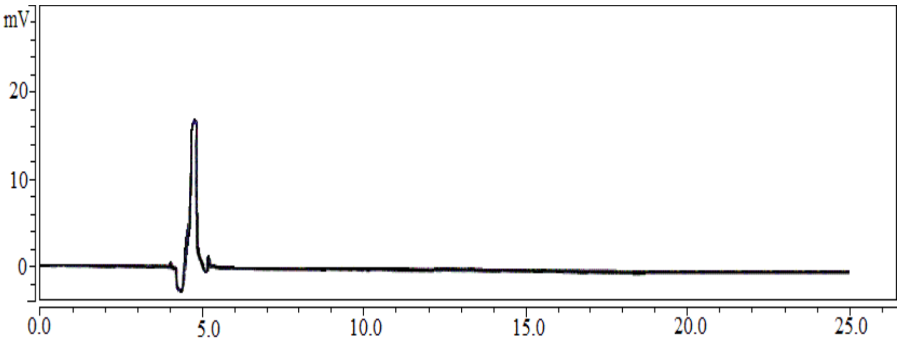


Name	Ret. Time	Area	Height
β - SS	20.776	5667381	178481

الشكل (23): الكروماتوغرام الموافق لتحديد β-SS العياري بتركيز $1000\ \mu g.mL^{-1}$

ويُوضح الشكل (19) الكروماتوغرام الموافق للمزيج العياري المحقون حيث نلاحظ أنه أعطى أربع قمم مفصولة تماماً الأولى عند Rt_1=14.880 min وهي توافق قمة BRS العيارية الشكل (20)، والثانية عند Rt_2=16.569 min وهي قمة CAS العيارية الشكل (21)، أما القمة الثالثة عندRt_3=18.494 min وهي توافق قمة STS العيارية الشكل (22)، وأخيراً القمة الرابعة عند Rt_4=20.835 min وهي قمة β-SS العيارية الشكل (23)، وبالتالي كانت الستيرولات الأربعة في المزيج العياري تملك أزمنة احتفاظ متطابقة مع أزمنة الاحتفاظ للكروماتوغرامات الإفرادية، ومن خلال قيم جدول

المعاملات الكروماتوغرافيّة تم تأكيد أنها تفي بمعايير القبول لملاءمة النظام (USP47-NF42, 2024) (Dadhich *et al*., 2020) حيث أن عدد الصفائح النظرية للقمم الأربعة $N > 2000$، وكذلك التباين $Rs \geq 1.5$، أما معامل التذييل $T_f \leq 2$ مع التأكيد على مثالية القمة (4) العائدة لـ β-SS، كما لوحظ أنه لا يوجد أي تداخل بين أي قمة من قمم الستيرولات الأربعة مع بعضها أو مع أي قمة من القمم الأخرى، في حين نلاحظ أن جميع الكروماتوغرامات السابقة تُبدي قمة كروماتوغرافيّة مفصولة تماماً عن القمة الرئيسية للمادة، وهي قد تعود لمركبات مرافقة أو شوائب ضمن المُحل، وللتأكد من ذلك تم حقن مُحل التمديد المُستخدم (الميتانول) فقط ضمن الشروط الكروماتوغرافيّة سابقة الذكر والمؤضّح بالشكل (24).



الشكل (24): كروماتوغرام مُحل التمديد بتطبيق الشروط الكروماتوغرافيّة المُثلى المدروسة

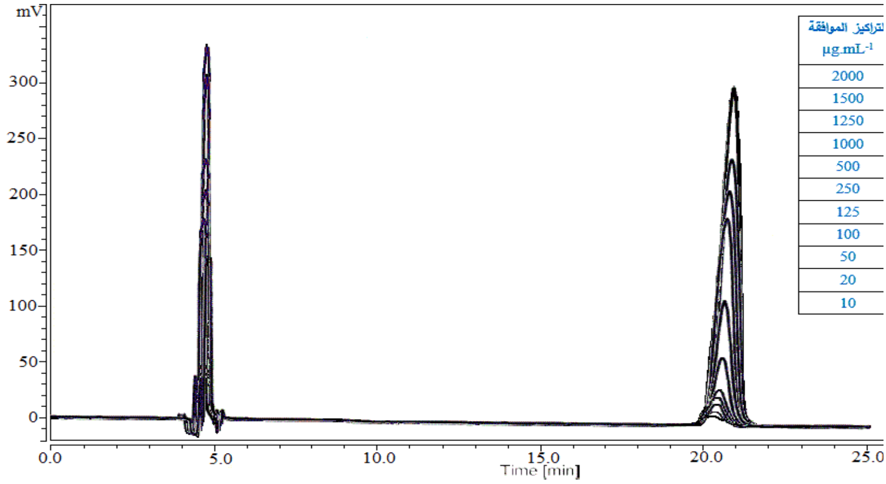
أظهر الكروماتوغرام الموافق لمُحل التمديد أنه يمتلك قمة كروماتوغرافيّة عند Rt=4.815 min، وهي لا تؤثر على عملية الفصل.

2.3-2 منحني المعايرة ومدى الخطية:

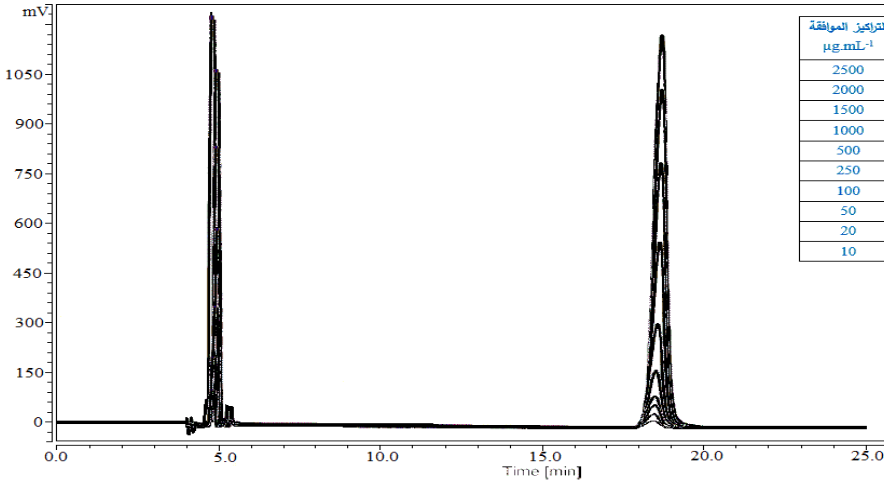
Linearity and Calibration Curve Range

لدراسة خطية الطريقة رُسم المجال الخطي لتغيرات إشارة الكاشف (مساحة القمة الكروماتوغرافيّة) بدلالة تركيز الستيرولات العيارية الأربعة. حُضّرت أربعة سلاسل من المحاليل العيارية لكل ستيرول (BRS, CAS, β-SS, STS) بتراكيز متزايدة مُقدّرة بالـ $\mu g.mL^{-1}$ وذلك انطلاقاً من المحاليل العيارية الأم المُحضّرة في الفقرة **(1.2-1)**. حُضّرت خمس مُكررات من كل تركيز، ثم حُقنت ضمن جهاز HPLC بتطبيق الشروط المطوّرة ومن ثم أُخذ المتوسط الحسابي لمساحة القمم لكل منها. تعرض

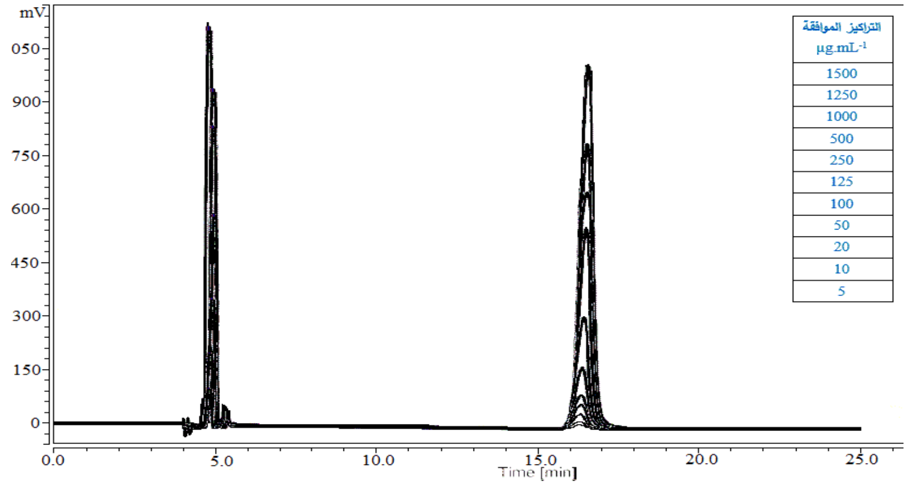
الأشكال (25-28) الكروماتوغرامات المتراكبة الموافقة للسلاسل العيارية للتراكيز المختلفة للستيرولات العيارية.



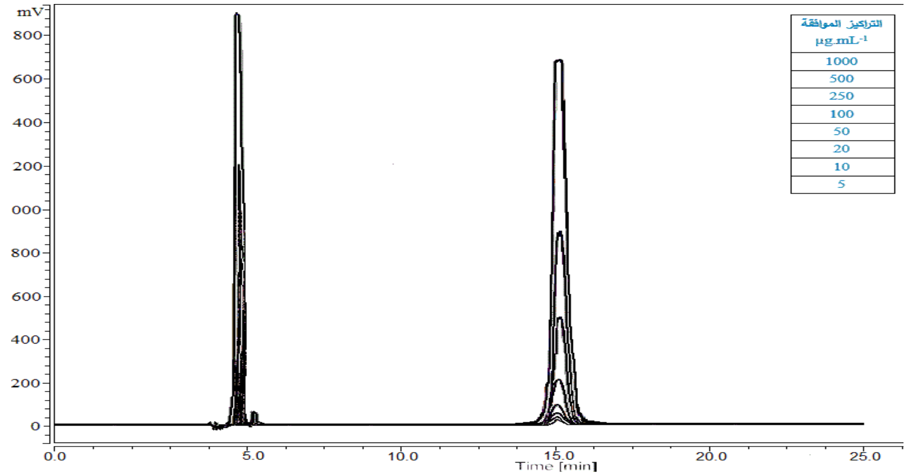
الشكل (25): الكروماتوغرام المُعبّر عن المجال الخطي لتراكيز β-SS بعد تطبيق الشروط المُثلى



الشكل (26): الكروماتوغرام المُعبّر عن المجال الخطي لتراكيز STS بعد تطبيق الشروط المُثلى

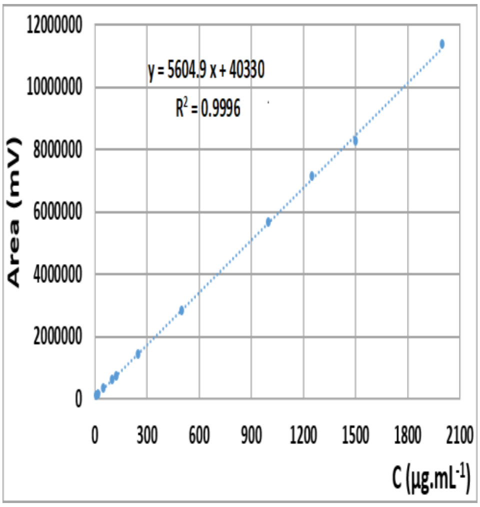


الشكل (27): الكروماتوغرام المُعبّر عن المجال الخطي لتراكيز CAS بعد تطبيق الشروط المُثلى

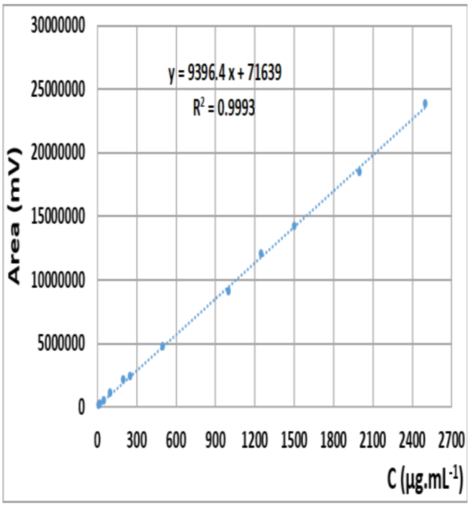


الشكل (28): الكروماتوغرام المُعبّر عن المجال الخطي لتراكيز BRS بعد تطبيق الشروط المُثلى

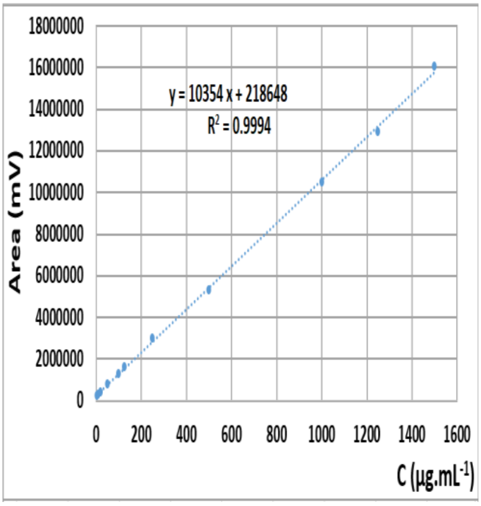
وبرسم المنحنيات العيارية التي تُمثّل العلاقة بين تغيرات مساحة القمة الكروماتوغرافيّة الموافقة لمتوسط كل تركيز بدلالة تغير التراكيز لكل منها وذلك لتحديد المجال التحليلي الأفضل بالنسبة لكل ستيرول كما تُبيّن الأشكال (29-32):



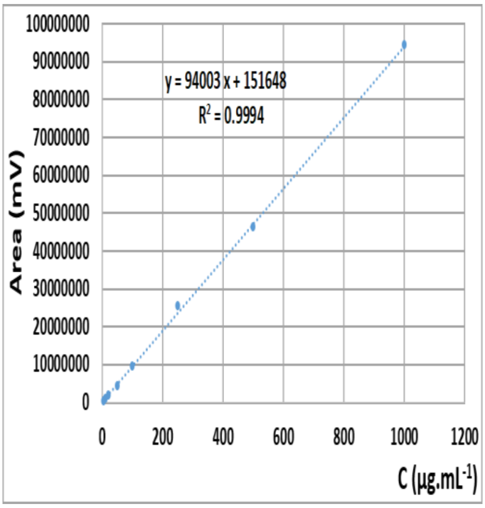
الشكل (29): المنحني الخطي لتحديد β-SS



الشكل (30): المنحني الخطي لتحديد STS



الشكل (31): المنحني الخطي لتحديد CAS



الشكل (32): المنحني الخطي لتحديد BRS

نلاحظ من معادلة المنحني الخطي ومن قيمة معامل الارتباط لنقاط المستقيم وجود علاقة ارتباط قوية بين التركيز ومساحة القمة مما يثبت خطية الطريقة.

3.3-2 التحقق من حدود المجال الأدنى: Validation of Lower Range Limits

تم حساب حد الكشف LOD وحد التحديد الكمي LOQ (Rajmane & Shinde, 2023)، حيث حسبنا قيمة SD بعد تكرار المنحنيات العيارية لتراكيز تقع ضمن

المجال الخطي بعد قياس كل تركيز خمس مرات وتم تضمينها في الجدول (2) أدناه، حيث تم تحديد العوامل الكمية للستيرولات العيارية من معطيات الخط البياني العياري لخمس مكررات حيث تم تحديد الميل ومعامل الارتباط ونقطة التقاطع مع محور المساحة وكذلك الاسترجاعية.

الجدول (2): المعاملات التحليليّة لتحديد الستيرولات المدروسة بالطريقة الكروماتوغرافيّة المُطوَّرة

المعامل (Parameter)	β-SS	STS	CAS	BRS
المجال الخطي ($\mu g.mL^{-1}$)	10 - 2000	10 - 2500	5 - 1500	5 - 1000
معادلة المستقيم	Y = 5604.9X + 40330	Y = 9396.4X + 71639	Y = 10354X + 218648	Y = 94003X + 151648
معامل الارتباط (R^2)	0.9996	0.9993	0.9994	0.9994
حد الكشف LOD ($\mu g.mL^{-1}$)	0.295	0.316	0.177	0.144
حد التحديد الكمي LOQ ($\mu g.mL^{-1}$)	0.896	0.959	0.539	0.438
الاسترجاعية	101.3 %	100.6 %	99.4 %	98.9 %

3- الاستنتاجات:
Conclusion

عُنيت الدراسة بطريقة تحليل كروماتوغرافي باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ذات الطور المعكوس (RP-HPLC) بالاقتران مع كاشف DAD باستخدام وضع الفصل متساوي الضغط بالوصول إلى الشروط الكروماتوغرافيّة المُثلى لفصل وتحديد مزيج من الستيرولات النباتيّة، تميزت الطريقة التحليليّة بالدقة والحساسية العاليتين، وتكرارية ممتازة مع قيم منخفضة نسبياً لحدود الكشف والتحديد الكمي وفقاً لتوصيات المجلس الدولي للمواءمة (ICH). بالإضافة إلى ذلك، امتازت طريقة تحضير العينات بالسهولة والابتعاد عن تقانات ومحاليل التحضير وطرائق الاستخلاص المعقدة والمكلفة مما يعزز قابلية تطبيق الطريقة في بيئات مراقبة الجودة

المختلفة. وبالتالي من الممكن تطبيق هذه الطريقة التحليلية لتحديد محتوى الستيرولات النباتيّة في المنتجات الغذائيّة والعشبيّة والزيوت النباتيّة.

4- المراجع:

References

Abidi, S. L. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935(1-2), 173-201.

Ahmed, O. H., Kadhim, E. J., & Ahmed, O. H. (2021). Isolation of Beta-Sitosterol and Stimgasterol From Rumex Acetosella By Preparative High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Turkish Journal of Field Crops*, 26(1), 378-384.

Azadmard-Damirchi, S., & Dutta, P. (2010). Phytosterol classes in olive oils and their analysis by common chromatographic methods. In V. R. Preedy & R. R. Watson (Eds.), *Olives and olive oil in Health and disease prevention* (pp. 249-257). Academic Press.

Calandra, S., Tarugi, P., Speedy, H. E., Dean, A. F., Bertolini, S., & Shoulders, C. C. (2011). Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *Journal of Lipid Research*, 52(11), 1885-1926.

Chakraborty, A., Bhattacharjee, A., Mondal, B., & Chakraborty, M. (2023). HPTLC Method Development and Validation for Simultaneous Determination of Beta-Sitosterol and Oleanolic Acid in Eclipta alba. 15(5), 1344-1351.

Dadhich, B., Goyal, R., & Agarwal, D. (2020). A review on: Development and validation of HPLC in pharmaceutical dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, 8(4),* 110-121.

Delgado-Zamarreno, M. M., Bustamante-Rangel, M., Martinez-Pelarda, D., & Carabias-Martinez, R. (2009). Analysis of β-sitosterol in seeds and nuts using pressurized liquid extraction and liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 25(6), 765-768.

Deme, T., Haki, G. D., Retta, N., Woldegiorgis, A., Geleta, M., Mateos, H., & Lewandowski, P. A. (2021). Sterols as a biomarker in tracing niger and sesame seeds oils adulterated with palm oil. *Heliyon*, 7(8), e06797. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06797

Demonty, I., Ras, R. T., Knaap, H. C. M. Van Der, Meijer, L., Zock, P. L., Geleijnse, J. M., & Trautwein, E. A. (2013). The effect of plant sterols on serum triglyceride concentrations is dependent on baseline concentrations : a pooled analysis of 12 randomised controlled trials. 153-160. https://doi.org/10.1007/s00394-011-0297-x

FDA. (2010). Department of Health and Human Services, Food labeling; health claim; phytosterols and risk of coronary heart disease. *Federal Register*, 75(235), 76536–76571.

Garoufi, A., Vorre, S., Soldatou, A., Tsentidis, C., Kossiva, L., Drakatos, A., Marmarinos, A., & Gourgiotis, D. (2014). Plant sterols enriched diet decreases small, dense LDL-cholesterol levels in children with hypercholesterolemia: a prospective study. *Italian Journal of Pediatrics*, 40, 1-6.

Hartmann, M.-A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5), 170-175.

Hossain, A., & Jayadeep, A. (2020). Analysis of bioaccessibility of campesterol , stigmasterol , and β -sitosterol in maize by in vitro digestion method. *Journal of Cereal Science*, 93(March), 102957. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102957

Hryniewicka, M., Starczewska, B., & Tkaczuk, N. (2020). Simple Approach Based On Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction For Determination Of β-Sitosterol In Dietary Supplements And Selected Food Products. *Microchemical Journal*, *155*(October 2019), 104775. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104775

Islam, M. A., Jeong, B.-G., Jung, J., Shin, E.-C., Choi, S.-G., & Chun, J. (2017). Phytosterol determination and method validation for selected nuts and seeds. *Food Analytical Methods*, 10(11), 3680-3687. https://doi.org/10.1007/s12161-017-0918-6

Ito, M., Ishimaru, M., Shibata, T., Hatate, H., & Tanaka, R. (2017). High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Simultaneous Analysis of Phytosterols (Stigmasterol, β-Sitosterol, Campesterol, Ergosterol, and Fucosterol) and Cholesterol in Plant Foods. *Food Analytical Methods,* 10(7), https://doi.org/10.1007/s12161-017-0841-2

Khonsa, K., Setyaningrum, D. L., Saputro, A. H., Amelia, T., Ibrahim, S., & Damayanti, S. (2022). Analysis of β-sitosterol in supplements using high-performance liquid chromatography: Development and validation. *RASAYAN Journal of Chemistry*,

15(3), 1997-2003.

Kornsteiner-krenn, M., Wagner, K., & Elmadfa, I. (2013). Phytosterol Content and Fatty Acid Pattern of Ten Different Nut Types. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 83(5), 263–270. https://doi.org/10.1024/0300

Lee, J., Weon, J. B., Yun, B.-R., Eom, M. R., & Ma, C. J. (2015). Simultaneous determination three phytosterol compounds, campesterol, stigmasterol and daucosterol in Artemisia apiacea by high performance liquid chromatography-diode array ultraviolet/visible detector. *Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 297-304.

Li, Y., Wu, M., Zhai, L., Zhang, H., & Shen, L. (2023). Qualitative and quantitative analysis of β-sitosterol marker in virgin camellia oil and virgin olive oil. *Food Quality and Safety*, 7(1), 1-9. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyad005

Mishra, A., Mishra, A., & Gupta, R. (2016). Determination of Gallic acid and β - sitosterol in poly-herbal formulation by HPTLC. 4(4), 373-379. https://doi.org/10.15406/ppij.2016.04.00081

Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., & Breemen, R. B. Van. (2013). Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. 949-956. https://doi.org/10.1007/s11745-013-3813-3

Matthäus, B., & Özcan, M. M. (2020). Quantification of sterol contents in almond (*Prunus amygdalus* L.) oils. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 39(2), 203-206.

Ogbe, R. J., Ochalefu, D. O., Mafulul, S. G., & Olaniru, O. B. (2015). A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. *Asian J. Plant Sci. Res*, *5*(4), 10–21.

Okoro, I. S., Tor-anyiin, T. A., Igoli, J. O., Noundou, X. S., & Krause, R. W. M. (2017). Isolation and Characterisation of Stigmasterol and β - Sitosterol from *Anthocleista djalonensis A. Chev . Asian Journal of Chemical Sciences (AJOCS)*, 3(4), 1-5. https://doi.org/10.9734/AJOCS/2017/37147

Pop, G., Galuscan, A., Peev, C., Militaru, A., Vlase, L., Ardelean, L., & Rusu, L. C. (2012). HPLC-MS Identification of Sterol Fractios from Vegetable Oil. 10, 1-5.

Potawale, S. E., Gabhe, S. Y., & Mahadik, K. R. (2014). Quantification of Gymnemagenin and β-Sitosterol in Marketed Herbal Formulation by Validated Normal Phase HPTLC Method. *Chromatography Research International*, 2014(1), 626801.

Qi, N., Liu, Y., Liao, L., Gong, X., & Yang, C. (2019). A new method

for determination of campesterol, stigmasterol and β-sitosterol in edible oils by supercritical fluid chromatography. *Journal of Food & Nutrition Research*, 58(4), 363-369.

Rajmane, A. D., & Shinde, K. P. (2023). A Review of HPLC Method Development and Validation as per ICH Guidelines. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(2), 143-151.

Raju, M. P., Babu, D. G. A., Kumar, B. R., & Rajashekar, C. H. (2013). The role of phytosterols enriched foods-A review. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, *7(6)*, 40-47.

Rawal, G., Yadav, S., Nagayach, S., & Rawal, G. (2015). Phytosterols and the health. *Medical Research Chronicles*, 2(3), 441-444.

Saleh, T. A.-K. (2021). Isolation and identification of campesterol, stigmasterol and beta-sitosterol in Iraqi date palm pollen. *Journal of Education and Scientific Studies Chemistry (JESCS)*, 17(5).

Sangwan, S. (2019). Isolation and Analytic Characterization of β-Sitosterol and GC-MS Analysis of Methanolic Leaves Extract of Pongamia pinnata (L.) pierre. *Natural Products Chemistry & Research*, 6(6). https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000348

Silva, S. A. da, Sampaio, G. R., & Torres, E. A. F. da S. (2020). Phytosterols content in vegetable oils of Brazil: Coconut, safflower, linseed and evening primrose. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63, 1-8.

Smet, E. De, Mensink, R. P., & Plat, J. (2012). Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(7), 1058-1072.

Solich, P., Fibigr, J., & Satínsk, D. (2017). A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV / Charged aerosol detection - A comparison of both detection techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 140, 274-280. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.057

Suhartati, T., & Yandri, Y. (2021). Potential Antibacterial Activity of Bioactive ß-sitosterol from Root Bark of Rhizophora apiculata from Lampung Coastal. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 24(4), 114-119.

United States Pharmacopeia (USP 47-National Formulary (NF 42). (2024). Chapter 621: Chromatography. *U.S. Pharmacopeial Convention*.

Vecka, M., Staňková, B., Kutová, S., Tomášová, P., Tvrzická, E., &

Žák, A. (2019). Comprehensive sterol and fatty acid analysis in nineteen nuts ,seeds ,and kernel. *SN Applied Sciences*, 1(12), 1-12. https://doi.org/10.1007/s42452-019-1576-z

Vemuri, S., Ramasamy, M. K., Rajakanu, P., Chandra, R., Kumar, S., & Kalliappan, I. (2018). Application of Chemometrics for the simultaneous estimation of stigmasterol and β -sitosterol in Manasamitra Vatakam-an ayurvedic herbomineral formulation using HPLC-PDA method. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(07), 1-9. https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8701

Warner, K., & Mounts, T. L. (1990). Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 67(11), 827-831.

Weihrauch, J. L., & Grander, J. M. (1978). Sterol content of foods of plant origin. *Journal of American Dietetic Association*, 73, 39-47.