



Аналитические возможности жидкостного хроматографа Маэстро ВЭЖХ с детектором на диодной матрице на примере определения качества дигидрокверцетина в соответствии с ГОСТ 33504-2015 «Добавки пищевые. Дигидрокверцетин. Технические условия»

Яшин А. Я. к. х. н., ведущий инженер отдела исследований и разработок, ООО Интерлаб, Россия, Москва

Ключевые слова

Жидкостная хроматография, дигидрокверцетин, оптические изомеры, добавка пищевая, детектор на диодной матрице

Резюме

Показаны аналитические возможности МаэстроВЭЖХ на примере определения качества дигидрокверцетина. Определена массовая доля дигидрокверцетина и примесей, а также массовая доля транс-(+)-(2R3R) – дигидрокверцетина в анализируемом образце.

Введение

Дигидрокверцетин (ДГК) по химическому строению относится к полифенольным соединениям. Это биофлавоноид натурального происхождения, он входит в группу флаванонов. Как вещество, обладающее высокой степенью биологической активности, дигидрокверцетин оказывает целую гамму положительных эффектов на обменные реакции и динамику различных патологических процессов человека:

Тормозит процессы перекисного окисления липидов клеточных мембран, препятствует повреждающему действию свободных радикалов, тормозит преждевременное старение клеток и развитие различных заболеваний, препятствует разрушению клеточных мембран, оказывает капилляропротективное действие, укрепляет стенки сосудов (в т.ч. капилляров), улучшает микроциркуляцию, нормализует уровень холестерина и триглицеридов в крови, препятствует развитию атеросклероза, уменьшает риск возникновения инсульта и инфаркта и т.д.

Таким образом, присутствие даже небольшого количества дигидрокверцетина в ежедневном рационе обеспечивает профилактику нескольких классов заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, опухолевые, обменные, оказывает омолаживающий и лечебный эффект.

Молекула дигидрокверцетина содержит в своем составе два асимметрических атома углерода – С-2 и С-3, следовательно, может существовать в виде 4 энантиомеров. Основным природным изомером является транс-(+)-(2R3R) – дигидрокверцетин, он же обладает наибольшей биологической активностью.

Поэтому антиоксидантная активность дигидрокверцетина зависит не только от чистоты получаемого продукта, но и от способа и/или технологии его получения, напрямую влияющей на состав энантиомеров дигидрокверцетина.

Применение дигидрокверцетина регламентируется нормативным документом: «Методические рекомендации Государственного санитарно-эпидемиологического нормирования РФ № 2.3.1.1915-04 от 2004 г. «Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ». В нем установлен адекватный и верхний допустимый уровни потребления дигидрокверцетина в количествах 25 и 100 мг в сутки.

С 1 января 2017 года официально введен в действие ГОСТ 33504-2015 «Добавки пищевые. Дигидрокверцетин. Технические условия», в котором определены методы контроля качества дигидрокверцетина (п.7.4 и п.7.5) с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором.

Экспериментальная часть

Для анализа использовали чистые вещества фирмы Fluka:

Дигидрокверцетин (стандарт, не менее 99%);

Ацетонитрил для ВЭЖХ;

Инструменты:

Жидкостный хроматограф «МаэстроВЭЖХ» с детектором на диодной матрице

Колонка Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм 150 x 4.6 мм

Скорость потока 1 мл/мин

Длина волны 290 нм

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – 0,5%, H₃PO₄, А:В (30:70)

Колонка Chiralcel OJ-RH 5 мкм 150 x 4.6 мм для разделения оптических изомеров

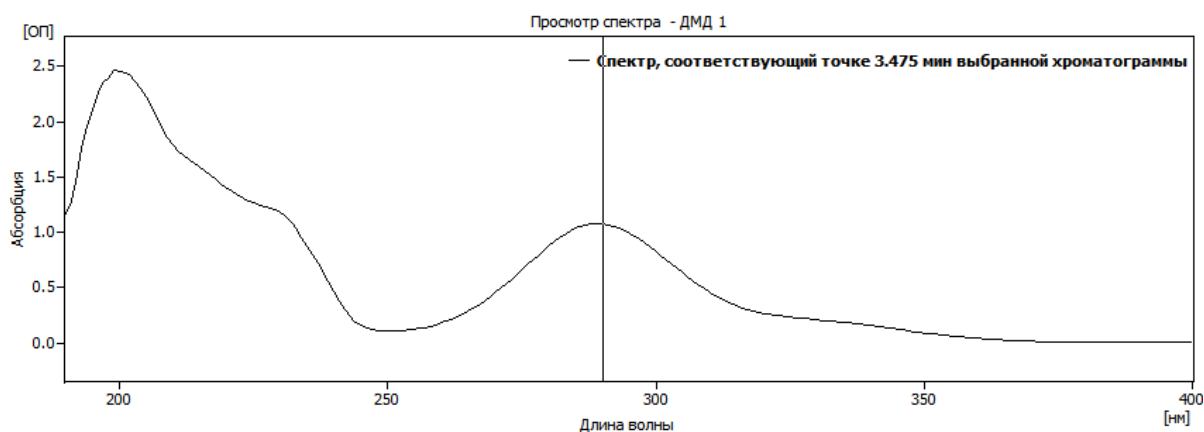
Скорость потока 0,6 мл/мин

Подвижная фаза: А – Ацетонитрил : В – 0,5%, H₃PO₄, А:В (20:80)

Длина волны 290 нм

Результаты и обсуждения

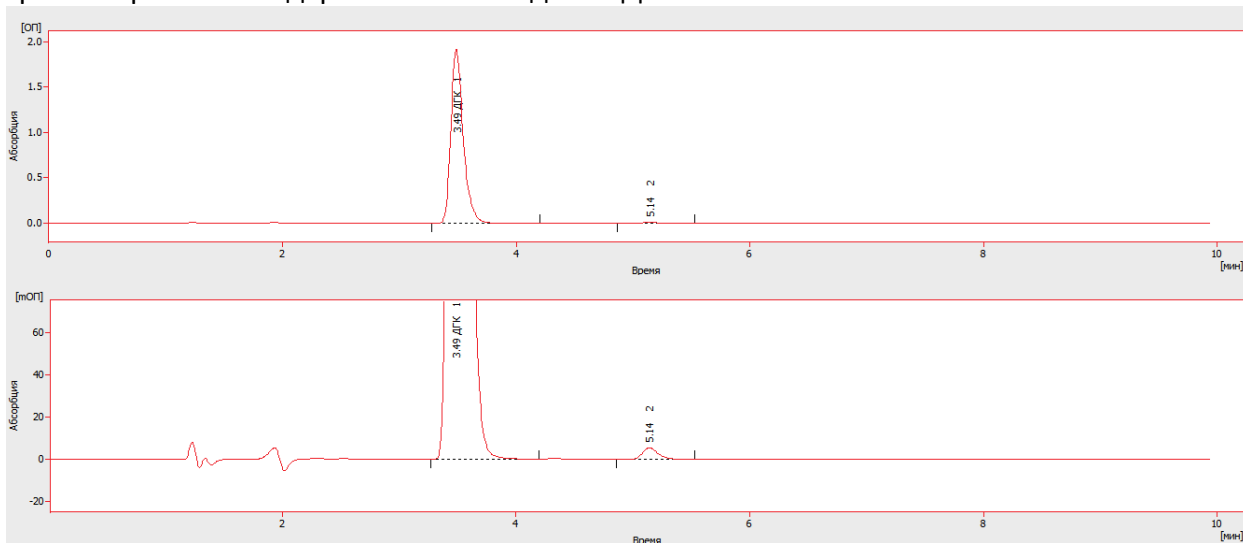
С использованием детектора на диодной матрице был снят спектр дигидрокверцетина (ДГК) для выбора оптимальной длины волны в диапазоне 190 – 400 нм



Для определения ДГК выбрана длина волны 290 нм. Аналогичные рекомендации по выбору длины волны приведены в ГОСТ 33504-2015.

Согласно п.7.4 «Определение массовой доли дигидрокверцетина и родственных биофлавоноидных соединений в сухом веществе» ГОСТ 33504-2015 получены хроматограммы стандартного образца ДГК и ДГК сырья.

Хроматограмма стандарта с массовой долей ДГК 98%

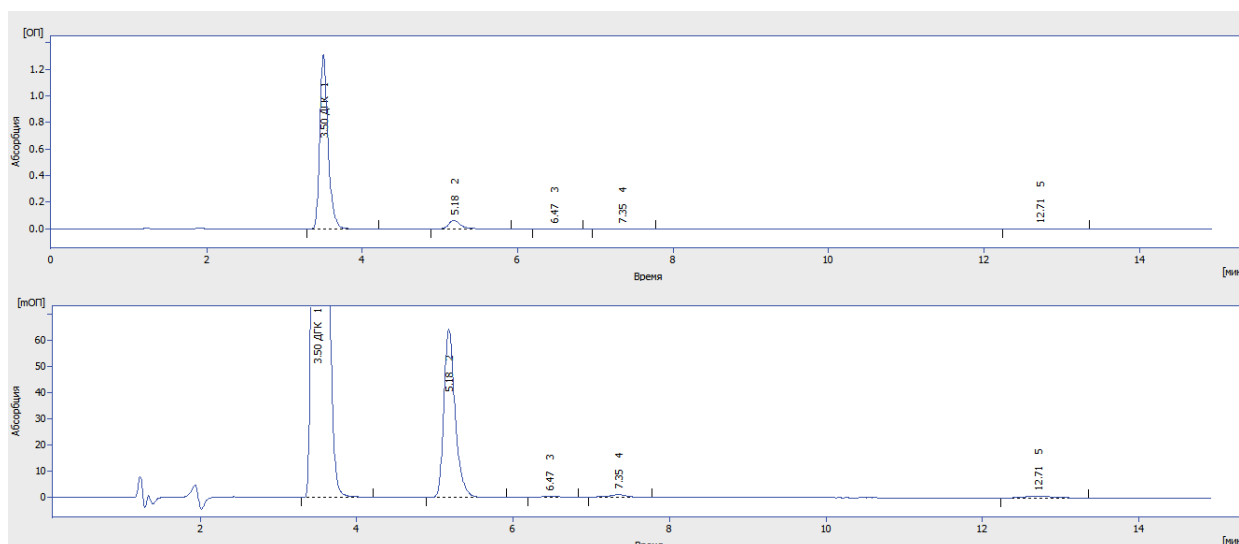


	Время уд. [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]	Название вещества
1	3.487	14100.48	1920.944	ДГК
2	5.14	53.071	5.546	

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – ДГК)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	3.496	14147.545	1920.585
СКО %	0.32	0.26	0.21
1	3.513	14200.613	1914.599
2	3.5	14149.292	1919.047
3	3.493	14159.315	1925.358
4	3.487	14125.324	1922.955
5	3.487	14103.182	1920.967

Хроматограмма ДГК сырца



	Время уд. [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]	Название вещества
1	3.5	9588.44	1312.968	ДГК
2	5.18	639.111	64.057	
3	6.467	7.851	0.549	
4	7.347	18.671	1.077	
5	12.713	16.328	0.748	

Таблица параметров для проверки стабильности системы (для компонента – ДГК)

Хроматограмма	Время удерживания [мин]	Площадь [мОП.сек]	Высота [мОП]
Среднее значение	3.507	9584.028	1307.067
СКО %	0.19	0.11	0.4
1	3.5	9588.44	1312.968
2	3.507	9572.508	1305.037
3	3.513	9591.136	1303.196

Согласно п. 7.4.6 ГОСТ 33504-2015 на хроматограмме анализируемого образца (ДГК сырец), кроме пика дигидрокверцетина, допускается присутствие пиков сопутствующих биофлавоноидов: аромандрина (пик 2), эриодиктиола (пик 3), кверцетина (пик 4), нарингенина, кемпферола и пиноцембрина, а также пиков неидентифицированных соединений.

Массовую долю дигидрокверцетина $X_{\text{ДГК}}$, %, вычисляют по формуле (4), согласно п. 7.4.7.1 ГОСТ 33504-2015:

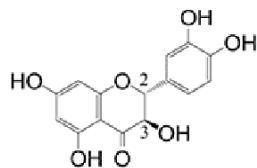
$$X_{\text{ДГК}} = 66,81 \pm 0,07 \%$$

Массовую долю сопутствующих родственных биофлавоноидных соединений в сухом веществе А, %, вычисляют по формуле (5), согласно п. 7.4.7.1 ГОСТ 33504-2015:

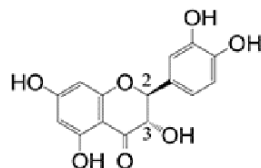
$$A = 6,62 \pm 0,02 \%$$

Молекула дигидрокверцетина содержит в своем составе два асимметрических атома углерода – С-2 и С-3, следовательно, может существовать в виде 4 энантиомеров. Основным природным изомером является транс-(+)-(2R3R) – дигидрокверцетин, он же обладает наибольшей биологической

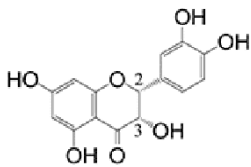
активностью. Поэтому необходимо определять транс-(+)-(2R3R) – дигидрокверцетин. Согласно п. 7.5 ГОСТ 33504-2015 «Определение массовой доли 2R3R изомера дигидрокверцетина в сухом дигидрокверцетине» разделение оптических изомеров ДГК осуществляется с помощью специальной колонки Chiralcel OJ-RH



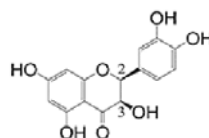
(+)-дигидрокверцетин (2R,3R)



(-)-дигидрокверцетин (2S,3S)

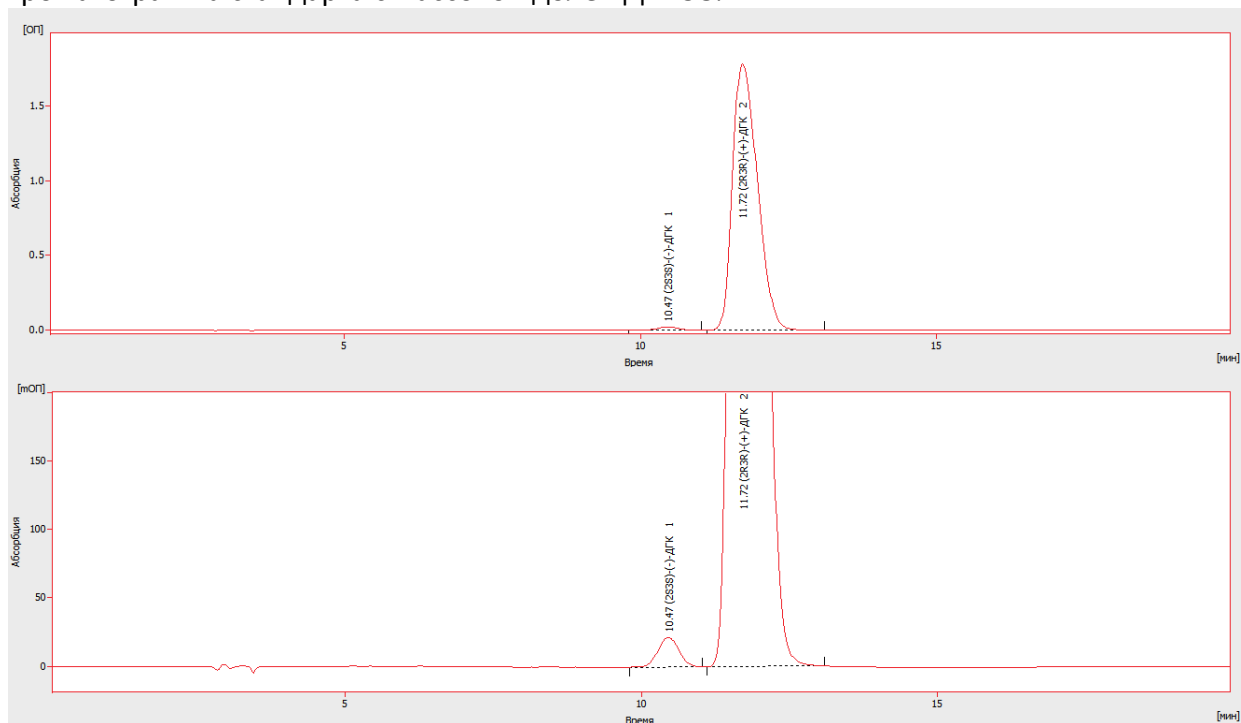


(-)-дигидрокверцетин (2R,3S)



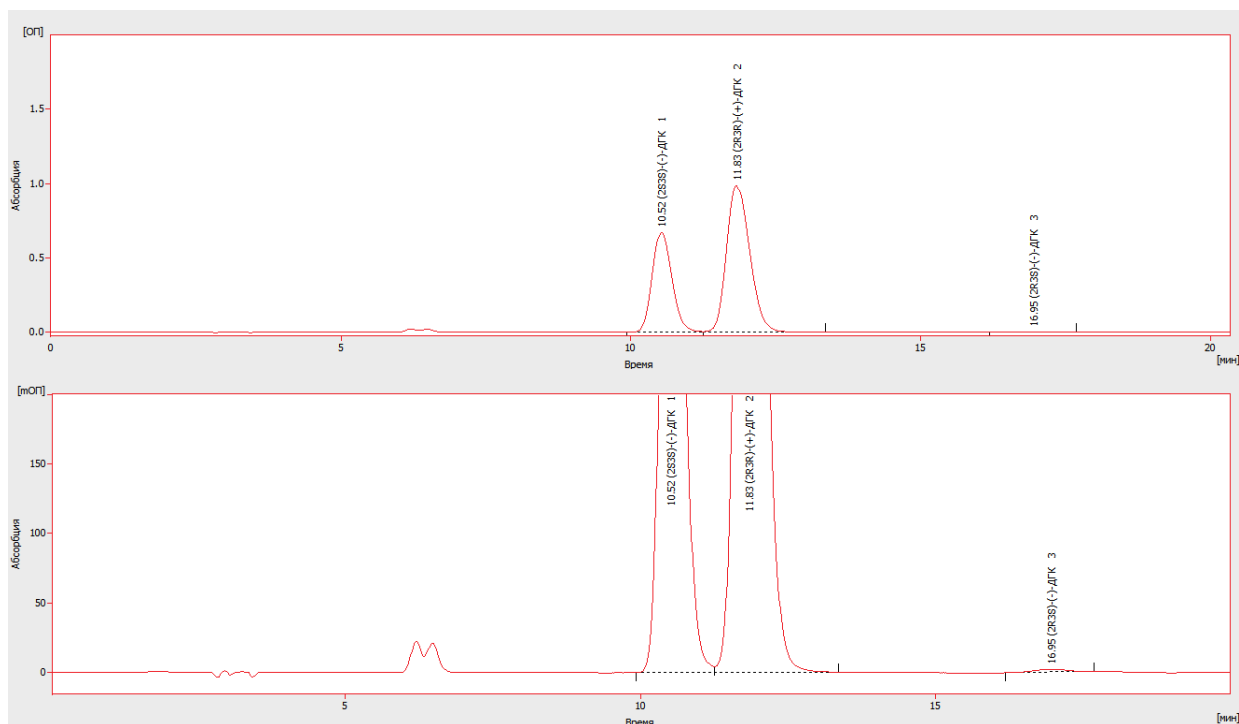
(+)-дигидрокверцетин (2S,3R)

Хроматограмма стандарта с массовой долей ДГК 98%



	Время уд. [мин]	Площадь [mOP.сек]	Высота [mOP]	Название вещества
1	10.467	531.382	21.771	(2S3S)-(-)-ДГК
2	11.717	51852.545	1777.668	(2R3R)-(+)-ДГК

Хроматограмма ДГК сырца



	Время уд. [мин]	Площадь [mОП.сек]	Высота [mОП]	Название вещества
1	10.517	15899.607	669.583	(2S3S)-(-)-ДГК
2	11.833	27487.282	982.258	(2R3R)-(+)-ДГК
3	16.95	82.706	2.057	(2R3S)-(-)-ДГК

Согласно п.7.5.7 ГОСТ 33504-2015 массовую долю 2R3R изомера дигидрокверцетина в сухом дигидрокверцетине $X_{2R3R},\%$ вычисляют по формуле (6).

$X_{2R3R},\% = 59,39 \pm 0,04$

Выводы

Жидкостный хроматограф Маэстро ВЭЖХ с диодноматричным детектором пригоден для определения качества дигидрокверцетина в соответствии с ГОСТ 33504-2015 «Добавки пищевые. Дигидрокверцетин. Технические условия».

Прибор можно рекомендовать лабораториям Роспотребнадзора и другим организациям для контроля качества дигидрокверцетина.