

## Электрофоретическое определение карбоновых кислот в сыворотке крови с внутрикапиллярным концентрированием

**\*Д.В. Макеева, К.С. Антипова, Л.А. Карцова**

*Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии  
г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., 26, 198504,  
Российская Федерация*

*\*Адрес для переписки: Макеева Дарья Валерьевна, e-mail: dasha.dzema@gmail.com*

Поступила в редакцию 7 сентября 2021 г., после доработки – 22 сентября 2021 г.

Данное исследование посвящено разработке электрофоретических подходов к разделению и on-line концентрированию короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в сыворотке крови больных с воспалительными заболеваниями кишечника. Короткоцепочечные жирные кислоты – конечные продукты ферментации углеводов, не перевариваемые в кишечнике. Наиболее высокие концентрации КЦЖК обнаруживаются в проксимальном отделе толстой кишки, где они абсорбируются колоноцитами (эпителиальными клетками толстой кишки) и далее поступают в ткани и кровь. Изменение их содержания в сыворотке крови может свидетельствовать о нарушениях метаболизма и наличии воспалительных заболеваний кишечника. Недостаточная чувствительность метода капиллярного электрофореза (КЭ) требует применения он-лайн концентрирования для обеспечения возможности детектирования минорных концентраций КЦЖК в биологических жидкостях. При этом наличие высокосолевого матрицы существенно ограничивает использование классических методов внутрикапиллярного концентрирования, основанных на различии в проводимости фонового электролита (ФЭ) и матрицы пробы. В связи с этим актуальным является поиск экспрессного и высокочувствительного электрофоретического определения КЦЖК в сыворотке крови. Предлагаемый нами вариант стэкинга с усилением поля с водной пробкой, вводимой непосредственно перед дозированием анализируемой пробы, позволяет создавать зону низкой проводимости, попадая в которую аналиты ускоряются и концентрируются на границе с фоновым электролитом, обеспечивая заметное снижение пределов обнаружения (ПО). Достигнутые значения ПО составили ~ 50 - 70 нг/мл за счет концентрирования аналитов в 30 раз. Предложенный подход характеризуется минимальной пробоподготовкой и обеспечивает экспрессное определение КЦЖК в течение 15 мин.

**Ключевые слова:** карбоновые кислоты, он-лайн концентрирование, стэкинг с усилением поля с водной пробкой, высокосолевого матрица, капиллярный зонный электрофорез.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2022, vol. 26, no. 1, pp. 13-20

DOI: 10.15826/analitika.2022.26.1.001

## Electrophoretic determination of carboxylic acids in blood serum with intracapillary concentration

**\*D.V. Makeeva, K.S. Antipova, L.A. Kartsova**

*Saint-Petersburg State University, Institute of Chemistry  
7/9 Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation*

*\*Corresponding author: Dar'ya V. Dzheva, e-mail: dasha.dzema@gmail.com*

Submitted 07 September 2021, received in revised form 22 September 2021

Electrophoretic separation and on-line concentration of short-chain fatty acids (SCFAs) in human blood serum of the patients with the inflammatory bowel disease is described in the current investigation. SCFAs are end products of carbohydrate fermentation, which are indigestible in the intestine. The highest concentrations of SCFAs are in the proximal colon, where they are absorbed by the epithelial cells of the

colon (colonocytes) and then enter the tissues and blood. The changes in their serum content can indicate the metabolism disorders and inflammatory bowel diseases. The low sensitivity of capillary electrophoresis requires application of on-line concentration in order to implement this method for the detection of low concentrations of SCFAs in biological fluids. Moreover, for the salt-matrix samples, an application of common concentration techniques based on the differences in conductivity of sample matrix and background electrolyte is limited. Therefore, the development of fast, efficient and highly sensitive approaches for the determination of SCFAs in blood serum is an important task. In the current work, the improvement of the sensitivity of SCFAs has been achieved by the application of a water plug, which was proposed to be injected directly before the sample in order to form a low conductivity area for the acceleration and concentration of the analytes. The proposed preconcentration and electrophoretic separation scheme provided decreased detection limits of SCFAs (~ 50 - 70 ng/mL) due to 30 times concentration of analytes as well as fast analytes' determination (15 min).

**Keywords:** short chain fatty acids, on-line concentration, field amplified sample stacking, salt-matrix samples, capillary zone electrophoresis

## ВВЕДЕНИЕ

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) образуются в кишечнике из поли- и олигосахаридов, белков, пептидов и гликопротеинов под действием анаэробных микроорганизмов. Основными продуктами такой ферментации являются уксусная, пропионовая и масляная кислоты [1, 2]. Первые две – обеспечивают регуляцию кровотока в проксимальном отделе кишечника и синтез глюкозы в периферических тканях организма [3]. Масляная кислота выполняет ключевую функцию при поддержании метаболизма жирных кислот [3]. Колоноциты осуществляют абсорбцию кислот из кишечника в кровь, следовательно, изменение содержания КЦЖК в крови может свидетельствовать о нарушениях метаболизма и наличии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) [2, 3]. Таким образом, возникает необходимость в контроле за содержанием короткоцепочечных жирных кислот в биологических жидкостях. При этом интерес представляют не только перечисленные уксусная, пропионовая и масляная кислоты, но и другие кислоты, которые могут оказаться в процессе метаболизма их предшественниками. Именно поэтому в качестве определяемых соединений в данной работе выбраны 15 карбоновых кислот (*щавелевая, муравьиная, винная, яблочная, лимонная, кетоглутаровая, ацетоуксусная, молочная, янтарная, уксусная, β-гидроксимасляная, пропионовая, масляная, валериановая, изовалериановая*), содержание которых необходимо контролировать в реальных объектах. При  $pH \leq pK_a$  они заряжены отрицательно, в составе их молекул отсутствуют хромофорные группы.

Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ), основанный на разделении ионогенных компонентов смеси в кварцевом капилляре, заполненном буферным электролитом, при приложении к нему разности потенциалов и детектировании в потоке жидкости, характеризуется высокой экспрессностью и эффективностью, что делает его идеально подходящим для рутинного определения карбоновых кислот [4]. Однако из-за ограниченного объема вводимого образца (несколько нл) и короткой длины светового пути метод КЗЭ характеризуется недостаточной чувствительностью, что особенно

принципиально при анализе образцов со сложной матрицей. Решением может быть грамотная стратегия он-лайн концентрирования [5].

Наиболее широко используются методы он-лайн концентрирования, основанные на разности в электропроводности раствора пробы и фонового электролита (*стэкинг с усилением поля и электростэкинг*) [6, 7]. После приложенного напряжения аналиты ускоряются в зоне низкой проводимости (раствор пробы), тормозятся и концентрируются на границе раздела с фоновым электролитом (ФЭ). Для образцов с высокосолевым матрицей, какими являются биологические жидкости, они неприемлемы. Наличие высокосолевого матрицы нивелирует различия в электропроводности раствора пробы и фонового электролита. Другие электрофоретические варианты он-лайн концентрирования аналитов в подобных объектах – динамический рН скачок [8], изотахофорез [9] и рН-контролируемый стэкинг [10] – достаточно сложны и требуют тщательного подбора условий, которые в существенной степени зависят и от мешающего влияния сопутствующих компонентов матрицы пробы [11].

Подход, при котором зона низкой проводимости (водная пробка) вводится непосредственно перед зоной анализируемой пробы, активно востребован в сочетании с электрокинетическим способом ввода пробы [12]. При этом аналогичный подход можно было бы использовать и в сочетании со стэкингом с усилением поля. Водная пробка создает зону низкой проводимости, проникая в которую после приложенного напряжения аналиты будут ускоряться и концентрироваться на границе с ФЭ. Выявлению аналитических возможностей такого варианта внутрикапиллярного концентрирования при определении карбоновых кислот в образцах сыворотки крови и посвящена данная работа.

Для реализации поставленной задачи необходимо было найти условия селективного электрофоретического разделения 15 карбоновых кислот в режиме КЗЭ с косвенным спектрофотометрическим детектированием. С этой целью варьировали значение рН и концентрацию фонового электролита, а также природу добавок в его составе. Необходимо было выбрать оптимальную схему пробоподготовки образцов сыворотки крови (осаждение белков орга-

ническим растворителем или кислотой) и установить объемное соотношение органический растворитель/вода. И, наконец, с целью увеличения чувствительности электрофоретического определения КЦЖК в биологических жидкостях получить сравнительные аналитические характеристики таких вариантов он-лайн концентрирования как стэкинг с усилением поля и стэкинг с усилением поля с водной пробкой.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты и приготовление стандартных растворов

В работе использовали стандартные образцы карбоновых кислот (уксусная, муравьиная, молочная, щавелевая, янтарная, лимонная, яблочная, виноградная, пропионовая, масляная, валериановая, изовалериановая, кетоглутаровая, ацетоуксусная,  $\beta$ -гидроксимасляная) и органические растворители (метанол, ацетонитрил) фирмы «Реахим» («х.ч.»).

Стандартные растворы карбоновых кислот (1 мг/мл) готовили растворением соответствующих навесок в деионизованной воде. Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных до концентрации 25 мкг/мл. При изучении возможностей он-лайн концентрирования использовали рабочие растворы с концентрациями 2.5 мкг/мл; 0.25 мкг/мл; 0.05 мкг/мл и 0.025 мкг/мл.

Для приготовления фонового электролита, а также подготовки капилляра к анализу использовали: борную кислоту («х.ч.») («Реахим»); гидроксид натрия («ч.д.а.») («Химреактив»); диэтаноламин («х.ч.»), «Biochem chemopharma»); бензойную кислоту («ч.д.а.»), «Sigma»), ацетон («ч.д.а.») («Вектон») в качестве маркера электроосмотического потока (ЭОП), цетилтриметиламмоний бромид («ч.д.а.»), «Sigma»), этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) («х.ч.»), «Sigma»).

### Оборудование

Электрофоретические эксперименты по определению карбоновых кислот проводили с использованием системы КЭ «Капель-105М» со спектрофотометрическим детектором (НПО «Люмэкс», г. Санкт-Петербург). Источник света – дейтериевая лампа (190-380 нм). Охлаждение капилляра – жидкостное с заданием и контролем температуры теплоносителя (10-50 °С). Способ ввода пробы: гидродинамический или электрокинетический. В работе использовали капилляр из плавленого кварца с внешним полиимидным покрытием (внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см). Обработка результатов электрофоретических экспериментов проводилась с помощью программного обеспечения «Эльфوران» («Люмэкс», КЭ).

В процессе пробоподготовки образцов использовали центрифугу 5430 (Eppendorf) и мульти-вортекс систему V-32 (Biosan). Также в работе использовали:

лабораторный pH-метр pH 211, Hanna Instruments; аналитические весы «Sartorius» (d = 0.001 мг (0.5 г)); деионизатор Д-301 (Аквилон, Россия).

### Приготовление фоновых электролитов

Используемые в работе фоновые электролиты на основе бензойной кислоты (БК), диэтанолamina (ДЭА) и цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) готовили последовательным смешением:

1. 25 мл 20 мМ раствора бензойной кислоты (0.122 г растворяли в 100 мл деионизованной воды);
2. 5, 9, 10, 15 или 20 мл 100 мМ ДЭА (2.1 г ДЭА растворяли в 100 мл деионизованной воды);
3. 25, 50, 75 или 200 мкл 100 мМ раствора ДЭА (2.1 г растворяли в 100 мл деионизованной воды);
4. 5 мл 5 мМ ЦТАБ (18.3 г растворяли в 100 мл деионизованной воды).

Общий объем полученной смеси доводили до 50 мл деионизованной водой.

Все фоновые электролиты непосредственно перед проведением электрофоретических экспериментов отфильтровывали через бумажный фильтр и дегазировали на ультразвуковой бане.

### Пробоподготовка сыворотки крови к КЭ анализу

В целях нивелирования эффекта соосаждения карбоновых кислот в процессе пробоподготовки, опробованы различные варианты осаждения белков: осаждение органическими растворителями (метанол, ацетонитрил), осаждение кислотами (хлорная, трихлоуксусная). Варьировали природу осадителя и объемное соотношение «сыворотка - осадитель» (1 : 1; 1 : 2; 1 : 4; 1 : 5). Для последующих экспериментов выбрана схема осаждения метанолом, включающая добавку метанола к сыворотке крови (1 : 1, объемн); перемешивание на вортексе (5 минут); центрифугирование при 14 000 об. (10 минут); отбор пробы и разбавление супернатанта деионизованной водой (1 : 1, объемн.).

### Условия электрофоретического анализа карбоновых кислот

При выборе условий разделения карбоновых кислот за основу взят состав фонового электролита, описанный в [13]. Поскольку перечень аналитов в данном исследовании существенно расширен, проведена серия специальных электрофоретических экспериментов с варьированием концентраций добавок в составе фонового электролита: ДЭА (10, 20, 30 и 40 мМ, что обеспечивало pH ФЭ 7, 8, 9, и 10, соответственно) и бензойной кислоты (10, 15, 20, 25 мМ). После серии предварительных экспериментов выбран буферный раствор, содержащий 10 мМ

ДЭА, 10 мМ бензойной кислоты, 0.5 мМ ЦТАБ и 0.1 мМ ЭДТА (рН 7).

Ввод пробы гидродинамический (2 с × 30 мбар), косвенное УФ-детектирование (254 нм); напряжение -20кВ; термостатирование капилляра при 20 °С.

### On-line концентрирование карбоновых кислот

**Стэкинг с усилением поля.** Рабочие растворы аналитов 50, 5, 0.5, 0.25 мкг/мл гидродинамически вводили в капилляр (30 мбар × 2, 10, 15, 25, 40 с; 60 мбар × 35, 50, 60 с).

Для проверки данного метода концентрирования на реальных пробах модельный образец сыворотки крови человека со стандартной добавкой смеси карбоновых кислот (0.500; 0.250; 0.025 мкг/мл) и без нее после соответствующей пробоподготовки гидродинамически вводили в капилляр (30 мбар × 2, 10, 15, 25, 40 с; 60 мбар × 35, 50, 60 с).

**Стэкинг с усилением поля с водной пробкой.** Модельный образец сыворотки крови, усредненный из 5 сывороток, подвергали процедуре пробоподготовки, описанной выше. В капилляр гидродинамически последовательно вводили водную пробку и подготовленный образец сыворотки крови. При поиске условий варьировали объем водной пробки (ввод пробы – 0, 10, 30, 50, 70, 100, 120, 150 с × 30 мбар) и объем вводимой пробы (10, 30, 50, 70, 100 с × 30 мбар). Условия подбирались таким образом, чтобы объем вводимой пробы был максимален (для достижения наибольших факторов концентрирования и низких пределов обнаружения (ПО)).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание карбоновых кислот в сыворотке крови может свидетельствовать о наличии воспалительных процессов в кишечнике, а некоторые из этих аналитов являются диагностическими маркерами подобных заболеваний [3]. Необходимость в одновременном определении значительного количества низкомолекулярных карбоновых кислот ограничивает применение для этой цели спектрофотометрических и ферментативных методов. Спектрофотометрические методы требуют предварительной дериватизации и позволяют проводить только групповой анализ, в то время как высокая специфичность ферментативных методов, наоборот, обеспечивает определение лишь одного аналита в одном цикле анализа. Таким образом, методы хроматографии и капиллярного электрофореза наиболее подходящие для одновременного определения содержания нескольких карбоновых кислот в одном аналитическом цикле. При этом метод КЭ в отличие от хроматографических методов характеризуется сравнительно низкой стоимостью оборудования и экспрессностью при разделении ионогенных аналитов.

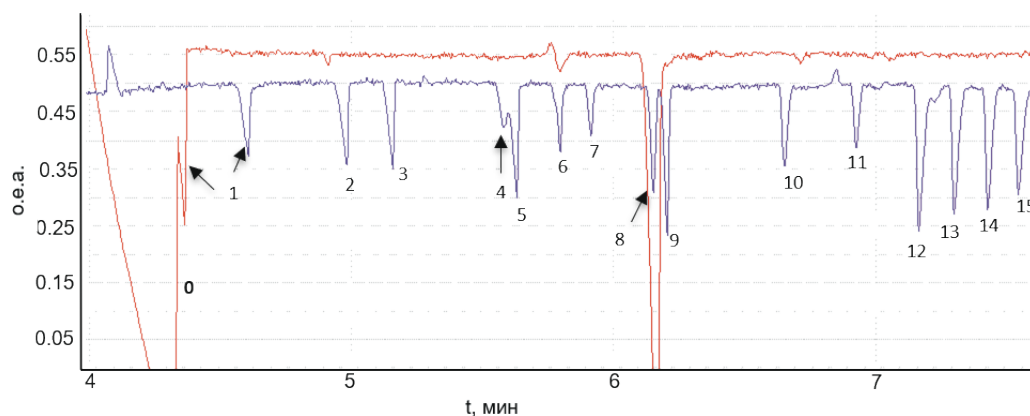
### Оптимизация пробоподготовки и условий электрофоретического разделения карбоновых кислот

Электрофоретическое определение карбоновых кислот требует генерации обращенного электроосмотического потока и введения в состав ФЭ поглощающей добавки для обеспечения условий косвенного детектирования, поскольку в молекулах определяемых кислот отсутствуют хромофорные группы. Традиционным модификатором стенок кварцевого капилляра для обращения ЭОП является цетилтриметиламмоний бромид. Особое внимание уделяется выбору поглощающей добавки, поскольку сильные отличия в электрофоретических подвижностях ионов аналита и ионов поглощающего компонента, введенного в ФЭ, приводит к асимметрии пиков и снижению эффективности [14]. В процессе поиска требуемых условий варьировали концентрации БК, ДЭА, ЦТАБ и ЭДТА. Добавка бензойной кислоты обеспечивает поглощение фонового электролита на длине волны 254 нм, что позволяет реализовать режим косвенного детектирования карбоновых кислот. Диэтаноламин и ЭДТА в составе фонового электролита использовали для поддержания требуемого значения рН и улучшения формы пиков, соответственно.

Наличие в составе матрицы пробы белков, сорбирующихся на поверхности кварцевого капилляра, требует проведения процедуры пробоподготовки, заключающейся в их осаждении. Природа осадителя могла повлиять на степень извлечения карбоновых кислот из сыворотки крови. Испытаны различные варианты: осаждение органическим растворителем (метанол, ацетонитрил) и кислотами (хлорная, трихлоуксусная). Кроме того, варьировали соотношение «сыворотка - осадитель» (объемн). Степени извлечения карбоновых кислот оценивали введением стандартной добавки аналитов в сыворотку с последующей оценкой площадей пиков аналитов после осаждения по сравнению с площадями пиков карбоновых кислот той же концентрации, растворенных в воде. Все это позволило выбрать схему осаждения белков, а именно: метанолом с последующим центрифугированием и отбором супернатанта для анализа (степени извлечения для данного метода варьировались в диапазоне 98 - 101 %).

На рис. 1 представлена электрофореграмма смеси стандартных образцов определяемых кислот (*фиолетовый*) и сыворотки крови (*красный*). Достигнуто практически полное разделение всех 15 определяемых кислот. В первой серии экспериментов по электрофоретическому анализу образцов сыворотки крови отмечена недостаточная чувствительность определения большинства КЦЖК: детектировались только щавелевая и молочная кислоты. Это потребовало внутрикапиллярного концентрирования анализируемых проб. Кроме того, регистрировался





**Рис. 1.** Электрофореграммы стандартной смеси карбоновых кислот (фиолетовый) и образца сыворотки крови (красный) после пробоподготовки. Условия: 9 мМ диэтаноламин, 10 мМ бензойная кислота, ЦТАБ 0.5 мМ, 0.1 мМ ЭДТА. Ввод пробы гидродинамический 2с x 30 мбар, -20 кВ, детектирование косвенное,  $\lambda = 254$  нм. 0 – хлорид-ион; 1 – щавелевая; 2 – муравьиная; 3 – винная; 4 – яблочная; 5 – лимонная; 6 – кетоглутаровая; 7 – ацетоуксусная; 8 – молочная; 9 – янтарная; 10 – уксусная; 11 –  $\beta$ -гидроксимасляная; 12 – пропионовая; 13 – масляная; 14 – валериановая; 15 – изовалериановая кислоты.

**Fig. 1.** Electrophoregrams of the mixture of carboxylic acids standards (purple line) and the blood serum sample (red line) after sample preparation. Conditions: 9 mM diethanolamine, 10 mM benzoic acid, 0.5 mM CTAB, 0.1 mM EDTA. Hydrodynamic sample injection 2 s x 30 mbar, -20 kV, indirect detection at  $\lambda = 254$  nm. 0 – chloride; 1 – oxalic; 2 – formic; 3 – tartaric; 4 – malic; 5 – citric; 6 – ketoglutaric; 7 – acetoacetic; 8 – lactic; 9 – succinic; 10 – acetic; 11 –  $\beta$ -hydroxybutiric; 12 – propionic; 13 – butiric; 14 – valeric; 15 – isovaleric acids.

большой пик хлорид-иона, содержание которого в пробе значительно повышало проводимость ее раствора и указывало на высокосолевую природу матрицы анализируемого образца. По этой причине достигнуть концентрирования карбоновых кислот за счет увеличения объема вводимой пробы не представлялось возможным. Стэкинг с усилением поля сопровождался дестэкингом: размыванием хроматографических зон аналитов.

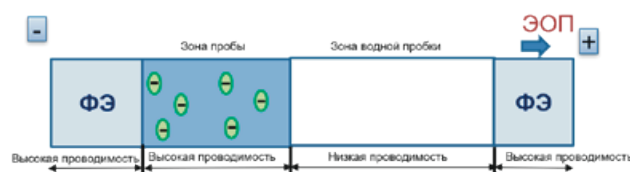
### Разработка схемы он-лайн концентрирования карбоновых кислот в сыворотке крови

Для устранения проблемы высокосолевой матрицы было принято решение модифицировать процедуру классического стэкинга, заключающуюся во введении водной пробки в кварцевый капилляр перед дозированием пробы (рис. 2). После приложении напряжения к концам капилляра отрицательно заряженные ионы карбоновых кислот начинали мигрировать в направлении анода. Аналиты покидали зону высокой проводимости пробы, проникая в область водной пробки и ускорялись за счет низкой проводимости этой зоны. На границе раздела «водная пробка - ФЭ» происходило их резкое торможение с последующим разделением сконцентрированных зон в условиях КЗЭ. Таким образом, высокая проводимость матрицы пробы не помешала селективному электрофоретическому определению аналитов.

На рис. 3 приведены электрофореграммы одного и того же образца сыворотки крови, полу-

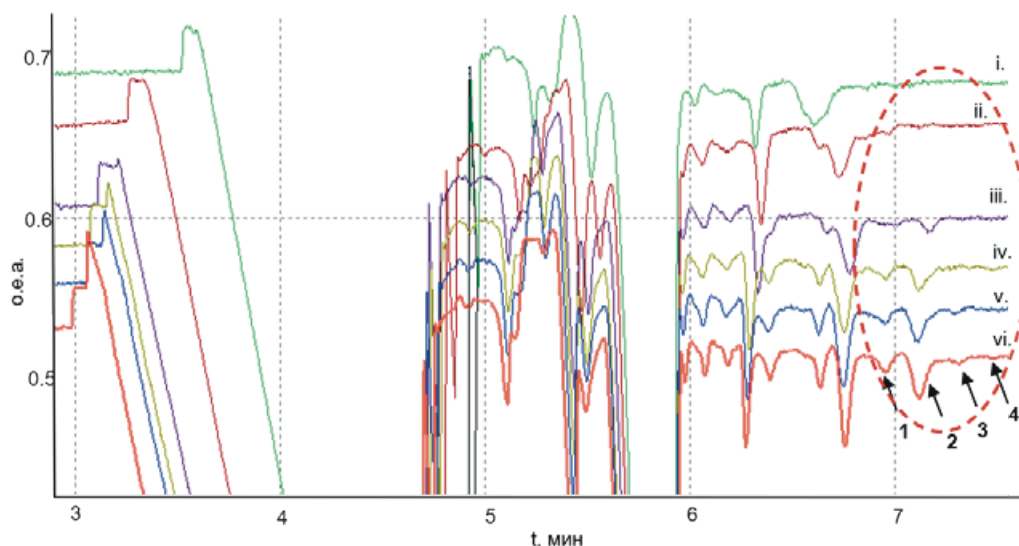
ченные при введении различных объемов водной пробки. Увеличение зоны низкой проводимости перед зоной матрицы пробы приводило к росту эффективности и селективности разделения аналитов. Концентрирование привело к увеличению общего количества зарегистрированных пиков карбоновых кислот на электрофореграмме, идентификацию которых проводили методом стандартной добавки. Поскольку определяемые аналиты содержатся в сыворотке крови в различных концентрациях, то наибольшее влияние объема водной пробки наблюдалось для кислот, содержание которых оказалось минимальным: масляная, пропионовая, валериановая и изовалериановая. Степени концентрирования составили 30 единиц; ПО снижены в 20 раз и достигли значений 30-50 нг/мл. Количественный анализ, определение пределов обнаружения аналитов и степени концентрирования проводились введением стандартной добавки карбоновых кислот в сыворотку крови.

В табл. 1 сопоставлены результаты определения карбоновых кислот в образцах сыворотки крови



**Рис. 2.** Схема стэкинга с усилением поля с водной пробкой для образцов с высокосолевой матрицей.

**Fig. 2.** Scheme of field-amplified sample stacking with water plug for the high-salt samples.



**Рис. 3.** Электрофореграммы сыворотки крови, демонстрирующие влияние длины водной пробки на эффективность и селективность разделения 1 – пропионовой, 2 – масляной, 3 – валериановой и 4 – изовалериановой кислот. Условия ввода пробы: 50 с × 30 мбар. Условия ввода водной пробки: (i) без водной пробки; (ii) 10 с × 30 мбар; (iii) 30 с × 30 мбар; (iv) 50 с × 30 мбар; (v) 70 с × 30 мбар; (vi) 100 с × 30 мбар. Условия анализа: 9 мМ ДЭА, 10 мМ БК, ЦТАБ 0.5 мМ, 0.1 мМ ЭДТА, -20 кВ, детектирование косвенное, 254 нм.

**Fig. 3.** Electrophoregrams of the blood serum sample. An effect of the water plug on the selectivity and efficiency of 1 – propionic, 2 – butyric, 3 – valeric, 4 – isovaleric acids. Sample injection conditions: 50 s × 30 mbar. Water plug injection conditions: (i) without sample plug, (ii) - 10 s × 30 mbar; (iii) 30 s × 30 mbar; (iv) 50 s × 30 mbar; (v) 70 s × 30 mbar; (vi) 100 s × 30 mbar. Conditions: 9 mM diethanolamine, 10 mM benzoic acid, 0.5 mM CTAB, 0.1 mM EDTA, -20 kV, indirect detection, λ = 254 nm.

**Таблица 1**

Сопоставление аналитических характеристик различных вариантов он-лайн концентрирования карбоновых кислот в сыворотке крови

**Table 1**

The main characteristics of on-line concentrations of carboxylic acids in blood samples

Он-лайн концентрирование	Ввод пробы	Характеристики	
		$SEF_h$	ПО, мкг /мл
–	2 с × 30 мбар	-	2.0-2.5
Стэкинг с усилением поля	30 с × 30 мбар проба	1.5	1.4-1.7
Стэкинг с усилением поля с водной пробкой	1.120 с × 30 мбар H <sub>2</sub> O 2. 50 с × 30 мбар проба	31-33	0.04-0.05

**Примечания:**  $SEF_h$  (фактор концентрирования) =  $(h_2/h_1) \times \Delta$ , где  $h_1$  – высота пика при стандартном вводе пробы,  $h_2$  – высота пика при концентрировании,  $\Delta$  – фактор разбавления.

**Таблица 2**

Количественный анализ карбоновых кислот в образцах сыворотки крови

**Table 2**

Quantitative analysis of carboxylic acids in the blood serum samples

Аналит (кислота)	Условия ввода пробы	Концентрация, мкг/мл		
		1	2	3
Пропионовая	1. 120 с × 30 мбар H <sub>2</sub> O, 2. 50 с × 30 мбар проба	1.43 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.700 ± 0.003
Масляная	1.120 с × 30 мбар H <sub>2</sub> O 2. 50 с × 30 мбар проба	1.60 ± 0.04	0.82 ± 0.02	0.690 ± 0.004
Молочная	2 с проба × 30 мбар проба	1370 ± 54	1600 ± 23	1290 ± 49
Щавелевая	2 с проба × 30 мбар проба	6.30 ± 0.08	1.43 ± 0.05	-

без концентрирования, с применением стэкинга с усилением поля и стэкинга с усилением поля и водной пробкой. Достигнутых в последнем случае ПО оказалось достаточно для определения данных кислот в реальных образцах (табл. 2).

Результаты количественного анализа КЦЖК в трех различных образцах сыворотки крови представлены в табл. 2. Определенное содержание карбоновых кислот в образцах сыворотки крови здоровых пациентов соответствует диапазону содержания карбоновых кислот, описанных в литературных данных [3].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предложены условия экспрессного он-лайн концентрирования КЦЖК для их высокочувствительного определения в сыворотке крови методом капиллярного зонного электрофореза. Найдены условия селективного электрофоретического разделения 15 карбоновых кислот и пробоподготовки к анализу образцов сыворотки крови. Оценены аналитические характеристики различных вариантов стэкинга с усилением поля для образцов с высокосолевым матрицей, наиболее эффективным из которых оказался стэкинг с усилением поля с водной пробкой, позволяющий существенно снизить пределы обнаружения карбоновых кислот (до 40–50 нг/мл). Разработанные условия применены при определении содержания КЦЖК в сыворотке крови.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-13-00370. Исследования проведены с использованием оборудования Ресурсного Центра «Методы анализа состава вещества» и Междисциплинарного ресурсного центра по направлению «Нанотехнологии», Научный парк СПбГУ.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Current work was supported by the Russian Science Foundation grant no. 19-13-00370. The authors gratefully acknowledge the assistance of the Interdisciplinary Resource Center for Nanotechnology of Saint Petersburg State University and Chemical Analysis and Materials Research Center.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Macfarlane S., Macfarlane G.T. Regulation of short-chain fatty acid production // *Proc. Nutr. Soc.* 2003. V. 62. P. 67-72.
2. Morrison D.J., Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism // *Gut Microbes.* 2016. V.3. P. 189-200.
3. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: дисс. д-ра мед. наук: 14.00.05. М., 2003. 299 с.
4. Макеева Д.В., Карцова Л.А., Поликарпова Д.А. Наноразмерные иониты – стационарные фазы для капиллярной электрохроматографии // *Аналитика и контроль.* 2018. Т. 22, № 3. С. 273-283.

5. Kitagawa F., Otsuka K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis // *J. Chrom. A.* 2014. V. 1335. P. 43-60.
6. Burgi D.S., Chien R.L. Application of sample stacking to gravity injection in capillary electrophoresis // *J. Microcol. Sep.* 1991. V. 3. P. 199-202.
7. Chien R.L., Burgi D.S. Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis // *J. Chrom. A.* 1991. V. 559. P. 141-152.
8. Ptolemy A.S., Britz-McKibbin P. New advances in on-line sample preconcentration by capillary electrophoresis using dynamic pH junction // *Analyst.* 2008. V. 133. P. 1643-1648.
9. Timerbaev A.R., Hirokawa T. Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices // *Electrophoresis.* 2006. V. 27. P. 323-340.
10. Arnett S.D., Lunte C.E. Investigation of the mechanism of pH-mediated stacking of anions for the analysis of physiological samples by capillary electrophoresis // *Electrophoresis.* 2003. V. 24. P. 1745-1752.
11. New Application of pH-Mediated Acid Stacking Technique for Amphoteric Compounds in Capillary Electrophoresis: Example Assay of Blood Glutathiones / Y. Kong [et al.] // *J. Chromatogr. Sci.* 2017. V. 55. P.477–483.
12. Leungor S.A., Mello A.J. Electrophoretic analysis of amines using reversed-phase, reversed-polarity, head-column field-amplified sample stacking and laser-induced fluorescence detection // *J. Chrom. A.* 2002. V. 979. P. 171-178.
13. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб.: ООО «Веда». 2006. 212 с.
14. Mato I., Suarez-Luque S., Huidobro J.F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines // *Food Research International.* 2005. V. 38. P. 1175–1188.

## REFERENCES

1. Macfarlane S., Macfarlane G.T. Regulation of short-chain fatty acid production, *Proc. Nutr. Soc.*, 2003, vol. 62, pp. 67-72. DOI: 10.1079/PNS2002207.
2. Morrison D.J., Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism, *Gut Microbes*, 2016, vol. 3, pp. 189-200. DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082
3. Ardatskaia M.D. *Klinicheskoe znachenie korotkotsepechnykh zhirnykh kislot pri patologii zheludochno-kishechnogo trakta. Diss. dokt. med. nauk [Clinical meaning of fatty acids for the pathology of gastrointestinal tract. Dr. med. sci. diss.]* Moscow, 2003. 299 p. (in Russian).
4. Makeeva D.V., Kartsova L.A., Polikarpova D.A. Nano-sized ion exchangers – stationary phases in capillary electrochromatography. *Analitika i kontrol' [Analytical and Control]*, 2018, vol. 22, no. 3, pp. 273-283. DOI: 10.15826/analitika.2018.22.3.006
5. Kitagawa F., Otsuka K. Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *J. Chrom. A.*, 2014. vol. 1335, pp. 43-60. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.066.
6. Burgi D.S., Chien R.L. Application of sample stacking to gravity injection in capillary electrophoresis. *J. Microcol. Sep.* 1991. vol. 3. pp. 199-202. DOI: 10.1002/mcs.1220030305.
7. Chien R.L., Burgi D.S. Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis, *J. Chrom. A.* 1991. vol. 559. pp. 141-152. DOI: 10.1016/0021-9673(91)80066-P.

8. Ptolemy A.S., Britz-McKibbin P. New advances in on-line sample preconcentration by capillary electrophoresis using dynamic pH junction, *Analyst*, 2008. vol. 133. pp. 1643-1648. DOI: 10.1039/B808236G.m
9. Timerbaev A.R., Hirokawa T. Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices, *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, pp. 323-340. DOI: 10.1002/elps.200500320.
10. Arnett S.D., Lunte C.E. Investigation of the mechanism of pH-mediated stacking of anions for the analysis of physiological samples by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, pp. 1745-1752, DOI: doi.org/10.1002/elps.200305399.
11. Kong Y., Yang G., Kong L., Hou Z., Yang G., Li H., Ji X., Gao M. New Application of pH-Mediated Acid Stacking Technique for Amphoteric Compounds in Capillary Electrophoresis: Example Assay of Blood Glutathiones, *J. Chromatogr. Sci.*, 2017, vol. 55, pp. 477–483, DOI: 10.1093/chromsci/bmw205.
12. Leungor S.A., Mello A.J. Electrophoretic analysis of amines using reversed-phase, reversed-polarity, head-column field-amplified sample stacking and laser-induced fluorescence detection, *J. Chrom. A.*, 2002. vol. 979, pp. 171-178. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01253-0.
13. Komarova N.V., Kamentsev I.S., *Prakticheskoe rukovodstvo po ispol'zovaniiu sistem kapilliarnogo elektroforeza «Kapel'» [Practical guide for using of capillary electrophoresis system «Capel'»]*. Saint-Petersburg, Veda, 2006. 212 p. (in Russian).
14. Mato I., Suarez-Luque S., Huidobro J.F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines, *Food Research International*, 2005, vol. 38, pp. 1175–1188. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.04.007.