

УДК 543.545

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ В ОБЪЕКТАХ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ КОСВЕННОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

© 2024 г. Е. А. Колобова^{a, b}, А. В. Малюшевская^{a, *}, Л. А. Карцова^a

^a Санкт-Петербургский государственный университет

Университетский просп., 26, Петродворец, Санкт-Петербург, 198504, Россия

^b Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России

ул. Академика Лебедева, 4/2, Санкт-Петербург, 194044, Россия

* E-mail: malushevskaa@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2023 г.

После доработки 26.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Предложены варианты электрофоретического определения нейтральных углеводов методом косвенного детектирования с использованием в качестве поглощающих добавок (ПД) акридонуксусной и фолиевой кислот. Изучено влияние природы и концентрации ПД, щелочи, а также различных модификаторов (цетилтриметиламмоний бромида, ЦТАБ) и ионных жидкостей (1-додецил-3-метилимидазолий хлорида и 1-гексадецил-3-метилимидазолий хлорида) на электрофоретические параметры миграции аналитов. Наименьшие значения пределов обнаружения углеводов достигнуты в фоновом электролите, содержащем 2.5 мМ акридонуксусной кислоты, 75 мМ КОН, 0.5 мМ ЦТАБ, 5 об. % MeOH, и составили 4–10 мкг/мл при эффективности до 350 тыс. т.т. В найденных условиях проведен анализ образцов гречишного меда и плазмы крови человека. Установлено, что при анализе продуктов питания предпочтительнее использовать в качестве ПД фолиевую кислоту, поскольку она обеспечивает наибольшую селективность разделения углеводов: для пары сукралоза–сахароза фактор разрешения составляет 7.6.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, углеводы, косвенное детектирование, поглощающие добавки.

DOI: 10.31857/S0044450224020064, **EDN:** vyuysy

Углеводы – класс биомолекул, играющий важную роль в жизнедеятельности живых организмов. Определение углеводов в биологических объектах может иметь как медико-диагностическое значение [1], так и быть этапом контроля качества в случае анализа продуктов питания [2]. Среди методов исследования углеводного состава наиболее востребованы хроматографические [3, 4] и электрофоретические [4]. Последние отличаются высокой эффективностью и широкими возможностями управления селективностью разделения аналитов за счет изменения состава фонового электролита. Однако высокие значения рН, необходимые для ионизации и обеспечения электрофоретической подвижности углеводов, а также отсутствие в их молекулах хромофорных групп представляют серьезные проблемы при электрофоретическом определении этих аналитов.

Существуют различные подходы к определению нейтральных углеводов методом капиллярного электрофореза: прямое детектирование ионизированных углеводов [5], определение их комплексов с ионами металлов [6], использование различных видов пред- [7] или внутрикапиллярной дериватизации [8]. Наряду с прямым востребовано косвенное детектирование, при котором в фоновый электролит (ФЭ) вводятся поглощающие добавки, раствор щелочи, обеспечивающий ионизацию сахаров, и в ряде случаев поверхностно-активное вещество (ПАВ) для обращения и изменения электроосмотического потока (ЭОП). С этой целью используют как традиционные катионные ПАВ, например цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) [9], так и имидазолиевые ионные жидкости (ИЖ), способные выполнять роль поглощающей добавки и модификатора ЭОП [10].

Определение углеводов в режиме косвенного детектирования применяли в анализе биологических объектов [9] и различных пищевых продуктов [11, 12] с варьированием природы поглощающей добавки: бензойная [13, 14], дипиколиновая [9] сорбиновая кислоты [15], триптофан [16], глицил-глицин [17]. Тем не менее поиск новых агентов для реализации косвенного детектирования и условий селективного электрофоретического разделения определяемых углеводов с их участием по-прежнему актуален.

Данная работа посвящена выявлению аналитических возможностей новых поглощающих добавок для обнаружения углеводов и изучению влияния состава фонового электролита на электрофоретические параметры миграции аналитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование. Прибор для капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ®-105М (Люмэкс®, Россия) со спектрофотометрическим детектированием (дейтериевая лампа; спектральный диапазон от 190 до 380 нм) с возможностью гидродинамического и электрокинетического ввода пробы. Кварцевый капилляр общей длиной 60 см и эффективной 50 см внутренним диаметром 50 мкм и внешним полиимидным покрытием. Результаты электрофоретических экспериментов обрабатывали с использованием программного обеспечения “Эльфوران” (Люмэкс, Россия).

Дополнительное оборудование. Аналитические весы Shimadzu AUW (Shimadzu, Япония), деионизатор АКВИЛОН Д 301 (Аквилон, Россия). рН-метр HI 2210–2216 (Hanna, Италия), ультразвуковая ванна Branson 1510 (Branson Ultrasonics Corporation, США). Автоматические дозаторы емк. 20, 200, 1 000 мкл.

Реагенты. Гидроксид натрия ч. д. а. (Реахим, Россия), гидроксид калия ч. д. а. (Реахим, Россия), соляная кислота ч., борная кислота ос. ч. (Реахим, Россия), цетилтриметиламмоний бромид х. ч. (Sigma-Aldrich, США) 1-додецил-3-метилимидазолий хлорид ($C_{12}MImCl$) х. ч. (ABCR, Германия), 1-гексадецил-3-метилимидазолий хлорид ($C_{16}MImCl$) х. ч. (Arcos, США), метанол (Fluka, США), ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США), акридонуксусная кислота (АУК) х. ч. (Sigma-Aldrich, США), фолиевая кислота х. ч. (J&K, США), никотиновая кислота х. ч. (J&K, США), аминсалициловая кислота х. ч. (Sigma-Aldrich, США), бензойная кислота х. ч. (Sigma-Aldrich, США), микофеноловая кислота х. ч. (Sigma-Aldrich, США), глюкоза х. ч. (PanReac,

Испания), фруктоза х. ч. (PanReac, Испания), сахароза х. ч. (PanReac, Испания), мальтоза х. ч. (Sigma-Aldrich, США), лактоза х. ч. (Sigma-Aldrich, США), лактулоза х. ч. (Sigma-Aldrich, США), сукралоза х.ч. (Sigma-Aldrich, США), маннитол х. ч. (Sigma-Aldrich, США).

Во всех экспериментах использовали деионизованную воду, которую получали из дистиллированной воды с использованием деионизатора АКВИЛОН Д 301 (Аквилон, Россия).

Объекты анализа. Образцы гречишного меда, нектар апельсиновый, образцы детского питания различных производителей. Образцы плазмы крови, предоставленные ФГБУ “Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова” МЧС России.

Приготовление растворов. Растворы поглощающих добавок (20 мМ акридонуксусная, никотиновая, бензойная, фолиевая, микофеноловая, 4-аминосалициловая кислоты) готовили следующим образом: точные навески кислот вносили в пластиковые пробирки типа Эппендорф емк. 4 мл, добавляли 0.4 мл раствора щелочи (1 М раствор КОН или NaOH), тщательно перемешивали до полного растворения кислоты и доводили объем раствора водой до метки. Концентрированные растворы углеводов (глюкоза, фруктоза, сахароза, лактоза, мальтоза, лактулоза, сукралоза и маннитол) с концентрацией 10 мг/мл готовили следующим образом: точные навески аналитов вносили в пробирку типа Эппендорф емк. 1.5 мл, добавляли 0.5 мл воды, тщательно перемешивали до полного растворения и доводили объем раствора водой до 1 мл. Подготовленные растворы хранили в морозильной камере при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рабочие и градуировочные растворы углеводов заданной концентрации готовили путем разбавления концентрированных растворов в требуемое количество раз водой. Рабочие растворы хранили в холодильнике при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение недели.

Приготовление фоновых электролитов. При определении электрофоретической подвижности поглощающих добавок использовали 10 мМ боратный буферный раствор (рН 9.3), приготовленный следующим образом: в мерную колбу емк. 100 мл вносили 3 мл 0.3 М боратного буферного раствора, добавляли 90 мл воды, тщательно перемешивали и доводили до метки водой. Электрофоретическую подвижность поглощающих добавок определяли по формуле:

$$\mu_{\text{аналита}} = \mu_{\text{набл}} - \mu_{\text{ЭОП}} = \frac{L_{\text{эфф}} L_{\text{общ}}}{U t_{\text{мигр}}} - \frac{L_{\text{эфф}} L_{\text{общ}}}{U t_{\text{ЭОП}}},$$

где $\mu_{\text{аналита}}$ — электрофоретическая подвижность аналита, $\text{см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$; $\mu_{\text{набл}}$ — наблюдаемая электрофоретическая подвижность, $\text{см}^2/\text{В}$; $\mu_{\text{эоп}}$ — электрофоретическая подвижность ЭОП (маркер — диметилсульфоксид), $\text{см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$; $L_{\text{общ}}$ — общая длина капилляра от входного до выходного конца, см ; $L_{\text{эфф}}$ — эффективная длина капилляра от входного конца до зоны детектирования, см ; U — величина рабочего напряжения, В ; $t_{\text{мигр}}$ — время миграции компонента, с .

При исследовании влияния состава фонового электролита на параметры миграции углеводов концентрацию поглощающих добавок варьировали в диапазоне 0.5–10 мМ, щелочи (NaOH или KOH) 50–150 мМ; ЦТАБ и ИЖ $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ — в диапазоне 0–5 мМ, а ИЖ $\text{C}_{12}\text{MImCl}$ — 0–15 мМ. Для изучения влияния органических растворителей на гидрофобно-гидрофильный баланс использовали ацетонитрил или метанол в концентрациях 0–5 об. %.

Молярные коэффициенты поглощения применяемых добавок при наблюдаемых длинах волн определяли с использованием спектрофотометра UV 1800 (Shimadzu, Япония). Регистрировали абсорбцию 20 мкМ растворов поглощающих добавок в кювете толщиной 1 см.

Молярный коэффициент поглощения рассчитывали по известной формуле $\epsilon = A/(lc)$, где ϵ — молярный коэффициент поглощения вещества, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; A — светопоглощение раствора вещества; l — длина оптического пути, см ; c — концентрация вещества, М .

Пробоподготовка. Образцы мёда. В мерную колбу емк. 10 мл вносили навеску ($m = 0.1 \text{ г}$) образца меда, добавляли 8 мл воды. Раствор тщательно перемешивали до полного растворения образца, доводили раствор до метки водой и снова тщательно перемешивали. Затем в пробирку типа Эппендорф емк. 1.5 мл отбирали 1.0 мл полученного раствора, центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 об/мин (6 800g), отбирали 0.8 мл и переносили в пробирку типа Эппендорф.

Образцы сока. Апельсиновый сок с мякотью тщательно перемешивали в упаковке. В пробирку типа Эппендорф емк. 1.5 мл отбирали около 1 мл сока, центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 об/мин (6 800 g). Затем с помощью дозатора отбирали 1 мл надосадочного слоя и переносили в мерную колбу емк. 100 мл, добавляли 95 мл воды, тщательно перемешивали и доводили раствор до метки.

Образцы плазмы крови размораживали при комнатной температуре, затем тщательно перемешивали. Далее в пробирку типа Эппендорф емк. 1.5 мл

отбирали 0.2 мл плазмы, добавляли 0.2 мл метанола. Содержимое пробирок тщательно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа Vortex в течение 5 мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 10 000 об/мин (6800g); 0.2 мл надосадочного слоя переносили в чистую пробирку, центрифугировали 5 мин со скоростью 10 000 об/мин (6 800 g). Затем 0.175 мл надосадочного слоя переносили в чистую пробирку.

Образцы детского питания. Навески образцов массой примерно 40 мг вносили в пробирки типа Эппендорф емк. 1.5 мл. Затем добавляли по 1 мл воды и центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 об/мин (6 800 g). Надосадочную жидкость отбирали автоматической пипеткой и разбавляли водой в требуемое количество раз.

Условия электрофоретических экспериментов. Подготовка капилляра к работе. Новый кварцевый капилляр последовательно промывали ацетонитрилом (10 мин), водой (10 мин), 0.1 М HCl (10 мин), водой (5 мин), 0.5 М раствором NaOH (30 мин) и снова водой (10 мин). Перед началом работы каждый день капилляр промывали ацетонитрилом (1 мин), водой (3 мин), 0.1 М HCl (1 мин), водой (3 мин), 0.1 М раствором NaOH (1 мин), водой (3 мин). Между анализами осуществляли последовательную промывку ацетонитрилом (1 мин), водой (3 мин) и фоновым электролитом (5 мин).

Анализ объектов. Анализ образцов мёда и плазмы крови человека проводили с использованием фонового электролита следующего состава: 2.5 мМ акридонуксусная кислота (поглощающая добавка), 75 мМ КОН, 0.5 мМ ЦТАБ, 5 об. % метанола. Напряжение —20 кВ; температура термостатирования 20 °С; длина волны детектирования 240 нм; время гидродинамического ввода пробы 5 с; давление ввода пробы 30 мбар.

Для анализа образцов детского питания применяли фоновый электролит, включающий 2.5 мМ фолиевой кислоты (поглощающая добавка), 75 мМ КОН, 0.5 мМ ЦТАБ, 5 об. % метанола. Напряжение —20 кВ; температура термостатирования 20 °С; длина волны детектирования 238 нм; время гидродинамического ввода пробы 5 с; давление ввода пробы 30 мбар.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка способа электрофоретического определения углеводов в условиях косвенного детектирования включала: 1) выбор поглощающей добавки; 2) изучение влияния состава фонового

электролита на параметры миграции нейтральных углеводов; 3) апробацию выбранных условий на модельных системах углеводов при анализе объектов природного происхождения.

Выбор поглощающей добавки. Анализ литературы показал, что поглощающая добавка должна обладать высоким коэффициентом поглощения и стабильностью, растворяться в фоновом электролите; ее электрофоретическая подвижность (ЭФП) должна быть сопоставима с подвижностью аналитов [18, 19]. Основываясь на этих данных, для тестовых экспериментов выбрали акридонуксусную, никотиновую, бензойную, фолиевую, микофеноловую, 4-аминосалициловую кислоты.

В серии предварительных электрофоретических экспериментов определили ЭФП каждой поглощающей добавки и изучили влияние ее природы на электрофоретические параметры миграции углеводов при постоянном составе ФЭ.

Электрофореграммы модельной смеси углеводов, полученные с различными поглощающими добавками в составе ФЭ, представлены на рис. 1, а соответствующие результаты обобщены в табл. 1. Как видно, наименьшим значением ЭФП обладает акридонуксусная кислота. Предположили, что в фоновом электролите, содержащем эту добавку,

эффективность для углеводов будет максимальной. Однако электрофоретические эксперименты показали, что наибольшая эффективность достигается для бензойной кислоты (160–410 тыс. т.т.), что может быть обусловлено зависимостью интенсивности сигналов аналитов от коэффициента поглощения поглощающей добавки при используемой длине волны. В случае АУК интенсивность аналитического сигнала значительно выше, чем для других поглощающих добавок, что является причиной размывания электрофоретических сигналов. При этом рассчитанные пределы обнаружения по сравнению с другими ПД минимальны. При разбавлении пробы в пять раз (концентрация аналитов 50 мкг/мл) достигнутое значение эффективности для углеводов лежит в диапазоне 150–450 тыс. т.т. Таким образом, акридонуксусную кислоту выбрали в качестве поглощающей добавки в дальнейших экспериментах.

Влияние состава фонового электролита. Изучали влияние концентрации и природы компонентов фонового электролита на параметры миграции углеводов. Фоновый электролит включал поглощающую добавку (АУК), модификатор ЭОПа для контроля его скорости и направления, а также щелочь для ионизации нейтральных углеводов.

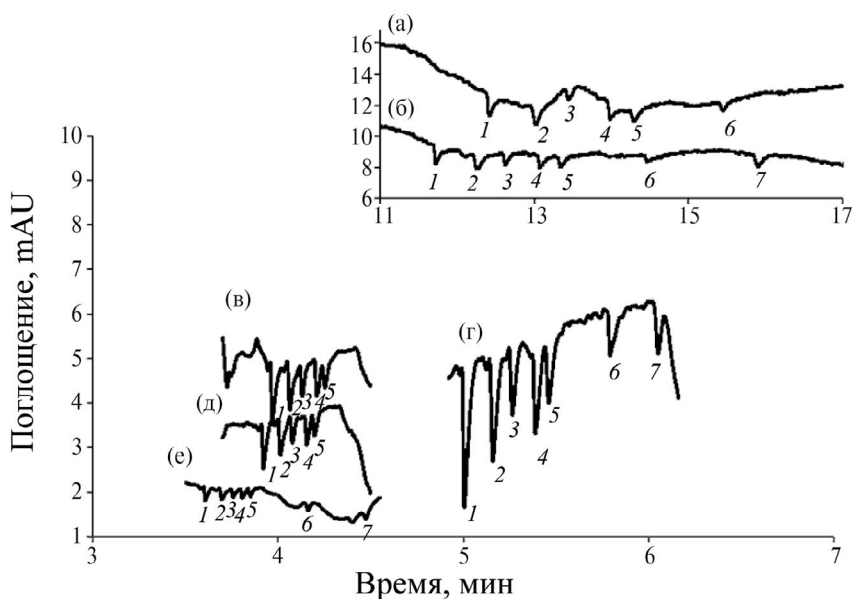
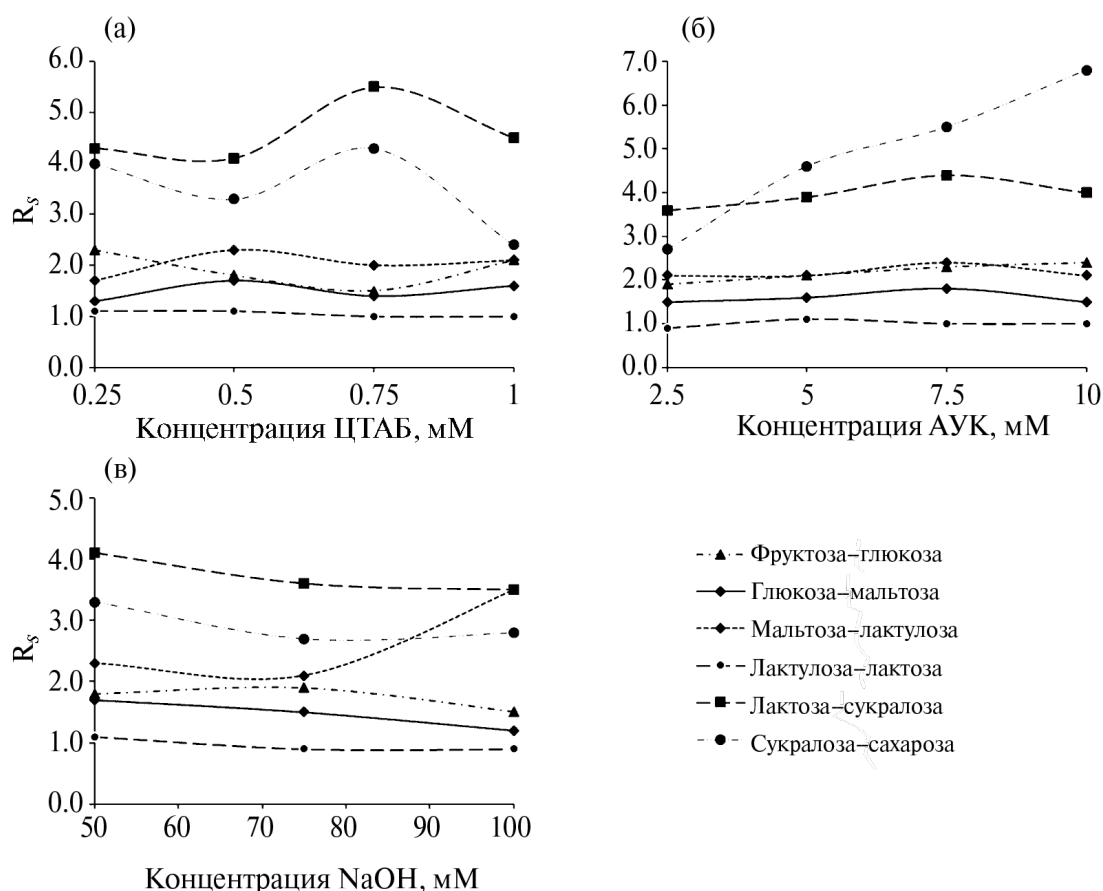


Рис. 1. Электрофореграммы модельной смеси нейтральных углеводов. Условия: система капиллярного электрофоре́за Капель-105М; капилляр 60×50 см, 50 мкм; фоновый электролит: 75 мМ NaOH, 0.5 мМ цетилтриметиламмоний бромид, 2.5 мМ поглощающая добавка: (а) микофеноловая кислота; (б) фолиевая кислота; (в) 4-аминосалициловая кислота; (г) акридонуксусная кислота; (д) бензойная кислота; (е) никотиновая кислота. $U = -20$ кВ, 20 °С. Длина волны при максимальном поглощении (см. табл. 1), ввод пробы: 2с × 30 мбар. Аналиты: модельный раствор углеводов (250 мкг/мл) 1 – фруктоза, 2 – глюкоза, 3 – мальтоза, 4 – лактулоза, 5 – лактоза, 6 – сукралоза, 7 – сахароза.

Таблица 1. Эффективность и пределы обнаружения углеводов, полученные в фоновом электролите с различными поглощающими добавками

Поглощающая добавка ($\mu \times 10^5$, $\text{м}^2/\text{В} \cdot \text{с}$; ϵ_{max} , $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$)	N, тыс. т.т.	Предел обнаружения, мкг/мл
Акридонуксусная кислота (2.41; $\epsilon_{240} = 18\,700$)	110–285	10–40
Аминосалициловая кислота (3.11; $\epsilon_{241} = 8\,800$)	150–340	35–150
Никотиновая кислота (3.16; $\epsilon_{242} = 2\,400$)	120–345	80–190
Бензойная кислота (3.16; $\epsilon_{240} = 3\,125$)	160–410	30–160
Микофеноловая кислота (3.28; $\epsilon_{230} = 31\,400$)	75–165	50–115
Фолиевая кислота (3.77; $\epsilon_{238} = 14\,300$)	60–110	35–100

**Рис. 2.** Зависимости факторов разрешения от состава фонового электролита. Условия: ФЭ: а) 2.5 мМ АУК, 75 мМ NaOH, 0.25–1.0 мМ ЦТАБ; б) 0–10 мМ АУК, 75 мМ NaOH, 0.5 мМ ЦТАБ; в) 2.5 мМ АУК, 50–100 мМ NaOH, 0.5 мМ ЦТАБ; $\lambda=240$ нм, ввод пробы: 2с×30 мбар, $U = -20$ кВ, $T = 20$ °С.

Влияние концентрации поглощающей добавки на эффективность и селективность разделения анализов изучали в диапазоне 1–10 мМ. На рис. 2а представлена зависимость фактора разрешения (R_s) от концентрации акридонуксусной кислоты в ФЭ. При концентрации ниже 1.5 мМ обнаружение анализов затруднено. Кроме того, АУК может

образовывать с ЦТАБ ионную пару, что влияет на скорость ЭОП: при увеличении концентрации АУК снижается скорость ЭОПа, и увеличиваются времена миграции анализов. При этом наблюдается рост селективности разделения нейтральных углеводов без потери эффективности. В наибольшей степени это проявилось для пары сукралоза–сахароза,

и значение фактора разрешения при концентрации АУК 10 мМ оказалось в два раза выше, чем при концентрации 2.5 мМ. Однако наименьшие значения пределов обнаружения (10–40 нг/мл) достигались именно при концентрации АУК 2.5 мМ; при ее повышении увеличивается и шум базовой линии.

Влияние концентрации щелочи. Для ионизации нейтральных углеводов необходимы высокие значения pH фонового электролита. Факторы разрешения углеводов незначительно снижаются при повышении концентрации щелочи в фоновом электролите в диапазоне 50–150 мМ (рис. 2б), а величина тока при этом и дрейф базовой линии возрастают. При концентрации NaOH 50 мМ пределы обнаружения анализов составили 20–65 мкг/мл, что оказалось выше, чем в случае 75 мМ раствора NaOH. Замена NaOH на КОН в той же концентрации позволила повысить эффективность до 350 тыс. т. т. и снизить пределы обнаружения до 5–20 мкг/мл, в том числе и за счет уменьшения дрейфа базовой линии.

Влияние цетилтриметиламмоний бромида. Катионное ПАВ ЦТАБ при концентрации в растворе выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) образует мицеллы с формированием псевдостационарной фазы. Влияние ЦТАБ на параметры миграции углеводов исследовали в диапазоне концентраций 0.25–5.0 мМ (рис. 2в). При различной концентрации ЦТАБ в составе фонового электролита могут реализоваться два режима разделения анализов: зонный – до достижения ККМ и мицеллярный – выше ККМ (0.9 мМ)

[20]. При концентрации ЦТАБ выше 1 мМ ЭОП замедляется, происходит резкое снижение интенсивности сигналов, что объясняется, скорее всего, конкуренцией углеводов и АУК за полость мицелл. В результате увеличивается селективность разделения, но возрастают пределы обнаружения: при 5 мМ ЦТАБ они составляют 50–140 мкг/мл. В режиме капиллярного зонного электрофореза наибольшие значения факторов разрешения с наименьшими пределами обнаружения достигнуты в фоновом электролите, содержащем 0.5 мМ ЦТАБ.

Влияние ионных жидкостей $C_{12}MImCl$ и $C_{16}MImCl$ на факторы разрешения углеводов. В качестве модификаторов ЭОП могут выступать ИЖ на основе имидазолия с длинным углеводородным радикалом [21]. Для исследования выбрали $C_{12}MImCl$ (ККМ = 7–15 мМ [22]) и $C_{16}MImCl$ (ККМ = 1.1 мМ [23]). Наибольшие значения факторов разрешения нейтральных углеводов наблюдаются при использовании ФЭ, содержащего $C_{12}MImCl$ (1 мМ) (рис. 3). Это объясняется тем, что $C_{12}MImCl$ слабее модифицирует стенки кварцевого капилляра, поэтому ЭОП в данном случае медленный, что приводит к росту селективности разделения анализов. Пределы обнаружения составили 20–90 мкг/мл. В случае модификаторов с близкими значениями ККМ – ЦТАБ и $C_{16}MImCl$ – получили аналогичные результаты, однако пределы обнаружения анализов для ЦТАБ оказались ниже (табл. 2).

Имидазолиевые ИЖ за счет наличия хромофорного фрагмента могут выступать и в качестве поглощающих добавок. Поскольку $C_{16}MImCl$ обладает достаточно низкими значениями ККМ,

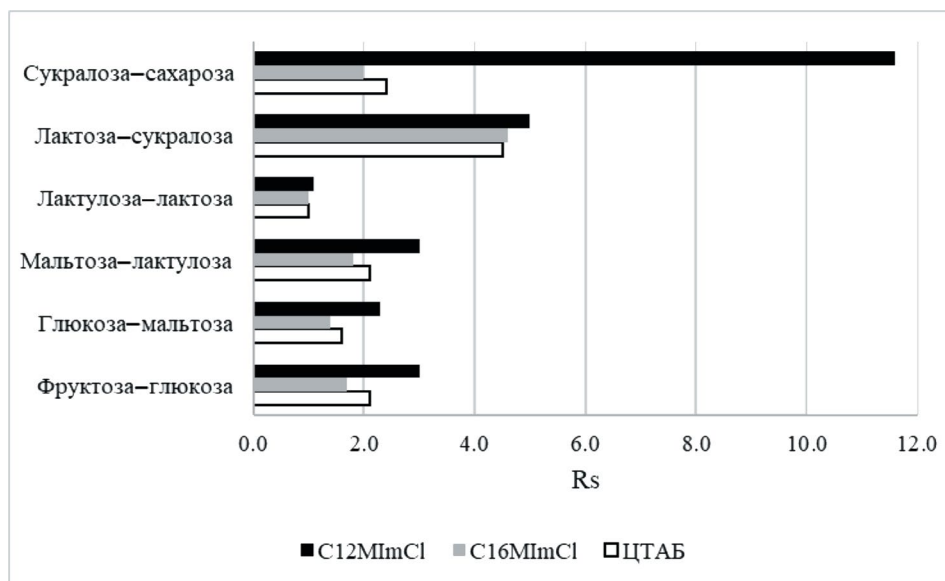


Рис. 3. Факторы разрешения (R_s) углеводов при использовании фоновых электролитов с различными модификаторами электроосмотического потока. Условия: фоновый электролит: 2.5 мМ акридонуксусная кислота, 75 мМ NaOH, 1 мМ модификатор. $\lambda = 240$ нм, ввод пробы: $2\text{с} \times 30$ мбар, $U = -20$ кВ, 20°C .

Таблица 2. Эффективность, факторы разрешения и пределы обнаружения (ПО) нейтральных углеводов при использовании цетилтриметиламмоний бромид и $C_{16}MImCl$ в качестве модификаторов электроосмотического потока

с, мМ	ЦТАБ			$C_{16}MImCl$		
	N, тыс т.т.	R_s	ПО, мкг/мл	N, тыс т.т.	R_s	ПО, мкг/мл
0.25	160–205	1.1–4.3	15–55	30–80	0.8–3.2	45–150
0.50	160–390	1.1–5.5	10–40	20–80	0.9–3.5	50–170
1.00	110–270	1.0–4.5	5–25	165–335	1.1–4.8	10–45

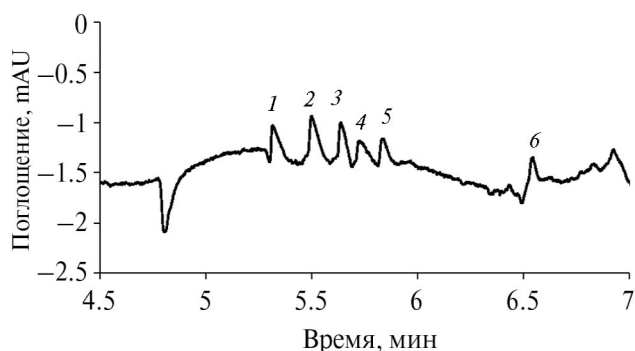


Рис. 4. Электрофореграммы смеси нейтральных углеводов с использованием в качестве поглощающей добавки $C_{12}MImCl$. Условия: Капель-105М; капилляр 60×50 см, 50 мкм; фоновый электролит: 75 мМ NaOH, 10 мМ $C_{12}MImCl$. $U = -20$ кВ, $20^\circ C$; $\lambda = 220$ нм, ввод пробы 5×30 мбар. Аналиты: 1 – фруктоза, 2 – глюкоза, 3 – мальтоза, 4 – лактулоза, 5 – лактоза, 6 – сукралоза.

а в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии происходит размывание пиков аналитов, то для этой цели использовали $C_{12}MImCl$. Установили, что $C_{12}MImCl$ не только обращает ЭОП, но и обеспечивает обнаружение углеводов в условиях косвенного детектирования (рис. 4). Эффективность составила 110–270 тыс.т.т., а пределы обнаружения – 60–115 мкг/мл.

Влияние гидрофобно-гидрофильного баланса на эффективность и пределы обнаружения углеводов. Электрофоретические параметры миграции аналитов в большой степени зависят от гидрофобно-гидрофильного баланса фонового электролита. Для изучения его влияния в состав ФЭ вводили метанол или ацетонитрил в концентрациях 0–10 об. %. Максимальную эффективность наблюдали при введении метанола в ФЭ (5 об. %), она составила 150–330 тыс. т.т., а достигнутые пределы обнаружения – 4–10 мкг/мл.

Таким образом, выбрали оптимальный состав фонового электролита при определении нейтральных углеводов в условиях косвенного

детектирования: 2.5 мМ акридонуксусной кислоты, 75 мМ КОН, 0.5 мМ ЦТАБ, 5 об. % метанола.

Анализ объектов природного происхождения.

Для определения сахаров в объектах природного происхождения использовали метод абсолютной градуировки. Для построения градуировочных кривых в случае ФЭ с акридонуксусной кислотой в качестве поглощающей добавки применяли тестовые растворы углеводов с концентрацией 250, 175, 100, 50, 25 мкг/мл (рис. 5).

Одним из наиболее подходящих объектов анализа для адаптации найденных на модельных системах условий определения моносахаридов в режиме косвенного детектирования является мед, основные компоненты которого – фруктоза и глюкоза. Пробоподготовка заключалась в растворении точной навески в воде с последующим центрифугированием и отбором верхнего слоя. Содержание фруктозы и глюкозы составило 46.6 и 34.2 мас. % соответственно.

Предложенный подход апробировали и при анализе образцов плазмы крови (рис. 6). Определение уровня глюкозы используют для диагностики и контроля сахарного диабета и других заболеваний, связанных с нарушением обмена углеводов. На стадии пробоподготовки необходимо избавиться от мешающего влияния белков,

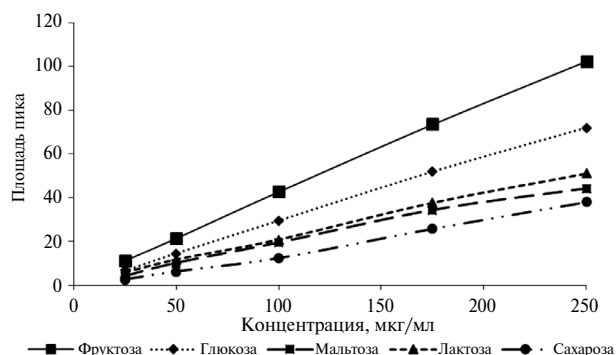


Рис. 5. Градуировочные кривые для определения углеводов в диапазоне концентраций 25–250 мкг/мл.

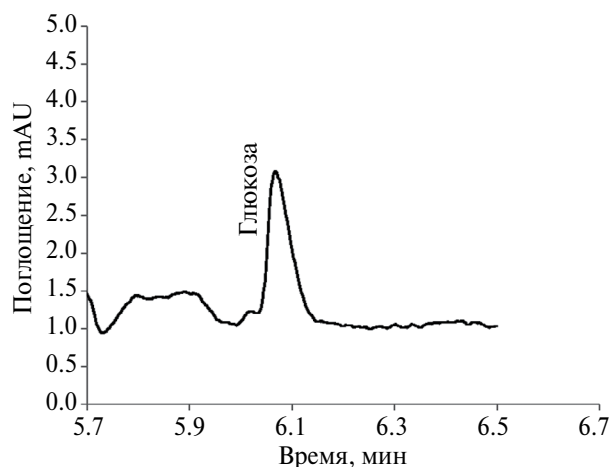


Рис. 6. Электрофореграмма плазмы крови человека. Условия: Капель-105М; капилляр 60×50 см, 50 мкм; фоновый электролит: 2.5 мМ акридонуксусная кислота, 75 мМ КОН, 0.5 мМ цетилтриметиламмоний бромид, 5 об.% МеОН. $U = -20$ кВ, 20°C ; $\lambda = 240$ нм, ввод пробы 5 с×30 мбар.

осаждение которых проводили метанолом. Общее время анализа с учетом пробоподготовки составило не более 12 мин.

Использование акридонуксусной кислоты в качестве поглощающей добавки в составе ФЭ при анализе продуктов питания (соки, детское питание) ограничено, поскольку приводит к слишком быстрой миграции аналитов и неполному разделению пиков, что затрудняет идентификацию и количественную оценку. В связи с этим в качестве альтернативной поглощающей добавки выбрали фолиевую кислоту. В предварительных экспериментах установили, что она обеспечивает высокую селективность разделения нейтральных углеводов и достаточно низкие значения пределов обнаружения (рис. 1, табл. 1). Аналогично исследовали зависимость факторов разрешения и ределов

обнаружения аналитов от концентрации фолиевой кислоты, щелочи и ЦТАБ. Лучшие результаты достигнуты при следующем составе фонового электролита: 2.5 мМ фолиевой кислоты, 75 мМ КОН, 0.5 мМ ЦТАБ, 5 об. % метанола. Пределы обнаружения углеводов составили 25–85 мкг/мл.

Для определения углеводов в пюре различного состава для детского питания (табл. 3) построили градуировочные зависимости для определения фруктозы, глюкозы, мальтозы, лактозы и сахарозы в диапазоне концентраций 100–500 мкг/мл.

В случае образцов сока пробоподготовка заключалась в осаждении мякоти и разбавлении надосадочной жидкости в 100 раз. Полученный раствор подвергали электрофоретическому анализу (рис. 7а). Для образцов детского питания (табл. 3) отбирали навески и растворяли в воде. Разбавление проб выбирали в зависимости от предполагаемого содержания углеводов, исходя из данных о пищевой ценности каждого образца. Во всех образцах обнаружили фруктозу и глюкозу. Лактозу идентифицировали в образцах, содержащих молочные продукты. В некоторых образцах выявили сахарозу (табл. 3, рис. 7б).

* * *

Таким образом, предложены варианты электрофоретического определения углеводов в условиях косвенного детектирования с использованием в качестве поглощающих добавок акридонуксусной и фолиевой кислот. Природа поглощающей добавки в наибольшей степени влияет на эффективность и селективность разделения углеводов в условиях косвенного детектирования. Применение акридонуксусной кислоты в составе фонового электролита позволило добиться высокой эффективности, низких значений пределов

Таблица 3. Содержание углеводов в образцах детского питания (мг/г) ($n = 5$, $p = 0.05$).

Углевод	Состав пюре				
	яблоко, банан, творог	яблоко, банан, черника, йогурт	овсянка, яблоко, банан, малина	банан	рис, морковь, курица
Фруктоза	149.3 ± 7.8	92.2 ± 5.9	91.5 ± 5.1	130.3 ± 6.9	5.2 ± 0.4
Глюкоза	52.0 ± 3.6	49.6 ± 4.1	41.0 ± 4.0	105.9 ± 6.2	2.6 ± 0.3
Мальтоза	—	26.6 ± 1.6	—	—	—
Лактоза	—	24.5 ± 1.4	—	—	1.3 ± 0.1
Сахароза	28.5 ± 2.2	29.1 ± 2.0	—	9.6 ± 0.8	2.5 ± 0.2

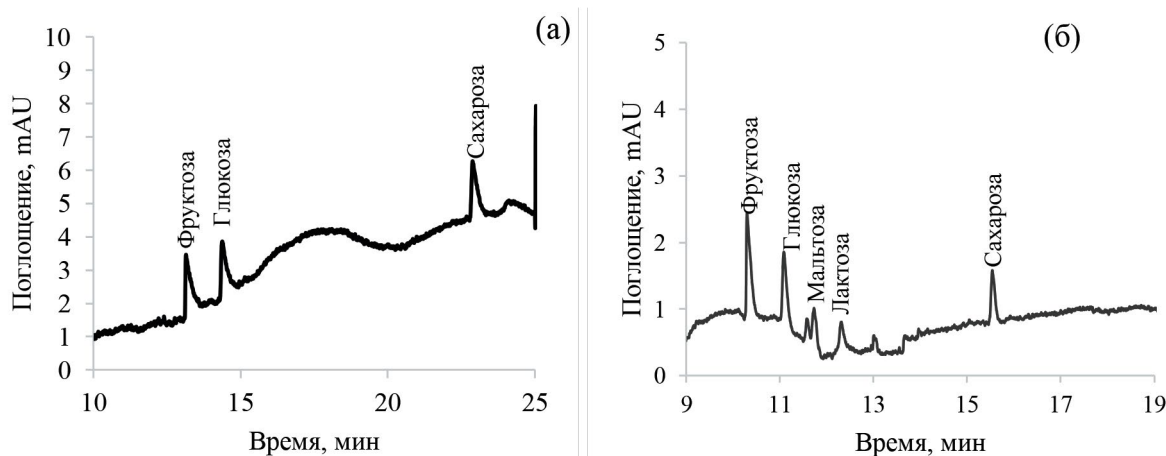


Рис. 7. Электрофореграммы образцов апельсинового сока (а) и детского питания, содержащего яблоко, банан, чернику и йогурт (б). Условия: Капель-105М; капилляр 60×50 см, 50 мкм; фоновый электролит: 2.5 мМ фолиевая кислота, 75 мМ КОН, 0.5 мМ цетилтриметиламмоний бромид, 5 об.% MeOH, $U = -20$ кВ, 20°C ; $\lambda = 238$ нм, ввод пробы 5×30 мбар.

обнаружения, сокращения продолжительности анализа, что важно при определении глюкозы в образцах плазмы крови человека для диагностики нарушения обмена веществ. Однако для анализа продуктов питания предпочтительнее применять фолиевую кислоту, обеспечивающую высокую селективность разделения.

Авторы выражают благодарность Научному парку СПбГУ, Ресурсному центру “Методы анализа состава вещества”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер гранта 19-13-00370).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen Y.F., Li M.Y., Wang S.R., Peng, H.J., Reid S., Ni N.T., Fang H., Xu W.F. Carbohydrate biomarkers for future disease detection and treatment // *Sci. China Chem.* 2010. V. 53. № 1. P. 3. doi: 10.1007/s11426-010-0021-3
2. Kiely L.J., Hickey R.M. Characterization and analysis of food-sourced carbohydrates / *Glycosylation* / Ed. Davey G.P. New York: Humana New York, 2022. P. 67. doi: 10.1007/978-1-0716-1685-7-4
3. Nagy G., Peng T., Pohl N.L.B. Recent liquid chromatographic approaches and developments for the separation and purification of carbohydrates // *Anal. Methods.* 2017. V. 9. № 24. P. 3579. doi: 10.1039/c7ay01094j
4. Карцова Л.А., Малюшевская А.В., Колобова Е.А. Аналитические возможности определения углеводов хроматографическими и электрофоретическими методами // *Журн. аналит. химии.* 2023. Т. 78. № 2. С. 108. doi: 10.31857/S0044450223020044 (Kartsova L.A., Maliushevskaya A.V., Kolobova E.A. Analytical capabilities of the determination of carbohydrates by chromatographic and electrophoretic methods // *J. Anal. Chem.* 2023. V. 78. № 2. P. 156. doi: 10.1134/S1061934823020041)
5. Rovio S., Yli-Kauhaluoma J., Sirén H. Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection // *Electrophoresis.* 2007. V. 28. № 17. P. 3129. doi: 10.1002/elps.200600783
6. Алексеева А.В., Карцова Л.А., Казачищева Н.В. Определение сахаров методом лигандообменного капиллярного электрофореза // *Журн. аналит. химии.* 2010. Т. 65. № 2. P. 205. (Alekseeva A.V., Kartsova L.A., Kazachishcheva N.V. Determination of sugars using ligand-exchange capillary electrophoresis // *J. Anal. Chem.* 2010. V. 65. № 2. P. 202. doi: 10.1134/S1061934810020176)
7. Schwaiger H., Oefne P.J., Huber C., Grill E., Bonn G.K. Capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography of 4-aminobenzonitrile carbohydrate derivatives // *Electrophoresis.* 1994. V. 15. № 7. P. 941. doi: 10.1002/ELPS.11501501138
8. Taga A., Suzuki S., Honda S. Capillary electrophoretic analysis of carbohydrates derivatized by in-capillary condensation with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 911. № 2. P. 259. doi: 10.1016/S0021-9673(01)00516-7
9. Soga T., Ross G.A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 837. № 1–2. P. 231. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00092-8
10. Vaher M., Koel M., Kazarjan J., Kaljurand M. Capillary electrophoretic analysis of neutral carbohydrates using ionic liquids as background electrolytes // *Electrophoresis.* 2011. V. 32. № 9. P. 1068. doi: 10.1002/elps.201000575

11. Jiang T.F., Chong L., Yue M.E., Wang Y.H., Lv Z.H. Separation and determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis using dynamically coating the capillary with indirect UV detection // *Food Anal. Methods*. 2015. V. 8. № 10. P. 2588. doi: 10.1007/s12161-015-0157-z
12. Jager A.V., Tonin F.G., Tavares M.F.M. Comparative evaluation of extraction procedures and method validation for determination of carbohydrates in cereals and dairy products by capillary electrophoresis // *J. Sep. Sci.* 2007. V. 30. P. 586. doi: 10.1002/jssc.200600370
13. Domínguez M.A., Jacksén J., Emmer A., Centurión M.E. Capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of carbohydrates and proline in honey samples // *Microchem. J.* 2016. V. 129. P. 1. doi: 10.1016/j.microc.2016.05.017
14. Warren C.R., Adams M.A. Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: Application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. № 347. P. 1147. doi: 10.1093/JEXBOT/51.347.1147
15. Xu X., Kok W.T., Poppe H. Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions // *J. Chromatogr. A*. 1995. V. 716. № 1–2. P. 231. doi: 10.1016/0021-9673(95)00552-X
16. Lu B., Westerlund D. Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis by using tryptophan as a marker // *Electrophoresis*. 1996. V. 17. № 2. P. 325. doi: 10.1002/ELPS.1150170207
17. Gürel A., Hızal J., Öztekin N., Erim F.B. CE determination of carbohydrates using a dipeptide as separation electrolyte // *Chromatographia*. 2006. V. 64. № 5–6. P. 321. doi: 10.1365/s10337-006-0032-6
18. Mikkers F.E.P., Everaerts F.M., Verheggen T.P.E.M. Concentration distribution in zone electrophoresis // *J. Chromatogr. A*. 1979. V. 169. P. 1. doi: 10.1016/0021-9673(75)85028-X
19. Shamsi Sh.A. Indirect detection methods in capillary electrophoresis / *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation Electronic. Absorption and Luminescence* / Ed. Meyers R.A. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. P. 1. doi: 10.1002/9780470027318.a5404
20. Li W., Zhang M., Zhang J., Han Y. Self-assembly of cetyl trimethylammonium bromide in ethanol-water mixtures // *Front. Chem. China*. 2006. V. 1. P. 438. doi: 10.1007/s11458-006-0069-y
21. Kolobova E., Kartsova L., Kravchenko A., Bessonova E. Imidazolium ionic liquids as dynamic and covalent modifiers of electrophoretic systems for determination of catecholamines // *Talanta*. 2018. V. 188. P. 183. doi: 10.1016/j.talanta.2018.05.057
22. Blesic M., Marques M.H., Plechkova N.V., Seddon K.R., Rebelo L.P.N., Lopes A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution // *Green Chem.* 2007. V. 9. P. 481. doi: 10.1039/b615406a
23. Kaper H., Smarsly B. Templating and phase behaviour of the long chain ionic liquid C₁₆MImCl // *Z. Phys. Chem.* 2006. V. 220. P. 1455. doi: 10.1524/zpch.2006.220.10.1455