

УДК 661

*В.А. Седакова, А.В. Клебанов, Е.С. Барашикова.
О.Н. Королева, Н.А. Клебанова, Е.В. Седаков (Могилев, Беларусь)*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Введение. В последние годы сформировались целые области новых исследований, получившие названия «нутрициологии» и «валеологии». В рамках этих исследе-

ваний микрофлора кишечника признана самостоятельным органом, выполняющим определенные функции в организме. Установлено, что микрофлора играет немаловажную роль в иммунном ответе организма при воздействии различных неблагоприятных факторов окружающей среды. В связи с этим, первостепенное значение приобретает вопрос поддержания здоровья микрофлоры. С этой целью в пищевые рационы вводят различные пищевые волокна, в том числе и пектин, из которого под действием кишечной микрофлоры получают различные короткоцепочечные жирные кислоты. Существуют несколько гипотез о роли короткоцепочечных жирных кислот в организме человека: во-первых КЦЖК могут непосредственно влиять на моторную активность кишечника посредством кальцийзависимого механизма стимуляции мышечной стенки кишечника; во-вторых – КЦЖК могут оказывать опосредованное влияние через нейроэндокринный механизм (хотя этот эффект не доказан у человека); в-третьих – КЦЖК способствуют понижению рН в кишечнике и возрастанию осмотического давления (этот эффект зависит непосредственно от концентрации и от природы образующихся в кишечнике кислот) [1] (А.И. Хавкин, 2009).

С другой стороны ряд исследований [2...4], посвященный изучению зависимости состава КЦЖК в крови человека от различных патологий желудочно-кишечного тракта (язвенного колита, неспецифического воспаления кишечника, цирроза печени), свидетельствует об статически достоверных изменениях в спектре КЦЖК.

В связи с этим определение качественного и количественного состава короткоцепочечных жирных кислот в организме человека является актуальной задачей.

Основная часть. В качестве объектов исследования использовали: стандарты уксусной (CH_3COOH), ($t_{\text{кип}} = 118,1^\circ\text{C}$) масляной ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) ($t_{\text{кип}} = 163,5^\circ\text{C}$), изомасляной ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH}$) ($t_{\text{кип}} = 152 - 155^\circ\text{C}$), валериановой ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) ($t_{\text{кип}} = 185,4^\circ\text{C}$), изовалериановой ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{COOH}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$) ($t_{\text{кип}} = 176,5^\circ\text{C}$) и капроновой ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) ($t_{\text{кип}} = 202 - 203^\circ\text{C}$) кислот маркировки ч. и х.ч.; модельные смеси исследуемых кислот; сыворотку крови практически здоровых людей, полученную в лаборатории УЗ «Могилевский областной онкологический диспансер» (договор о сотрудничестве № 11755).

Стандартные растворы готовили следующим образом: навеску вещества около 0,3 г (с точностью 0,0001 г) помещали в мерную колбу на 50 см³ и доводили до метки дистиллированной водой (рабочий раствор 1), полученная концентрация кислот составляла около 6 мг/см³. Точную концентрацию рабочих растворов 1 устанавливали с помощью кислотно-основного титрования сильным основанием в присутствии индикатора фенолфталеина. На основе рабочего раствора 1 путем разбавления готовили рабочие растворы 2 необходимой концентрации от 0,01 до 0,05 мг/см³. Приготовленные стандартные растворы хранили при температуре 2–8°C в течение 10–15 дней. Стандартные растворы использовались для приготовления модельных смесей и калибровки хроматографа.

Пробы из сыворотки крови готовили следующим способом: в 2 пробирки отбирали по 2 см³ сыворотки и добавляли по 2 см³ физраствора, в одну из пробирок добавляли 0,5 см³ стандартного раствора изомасляной кислоты с концентрацией 0,5 мг/см³. После чего в каждую пробирку добавляли по 2 см³ бн. соляной кислоты

и 0,6 см³ бутилацетата. Время экстрагирования 15–20 мин с использованием лабораторного встряхивателя. Затем оставляли пробу на 5–10 минут до полного расслоения водной и органической фазы и отбирали шприцем 5 мкл верхнего эфирного слоя для анализа.

Качественное и количественное определение КЦЖК осуществляли при помощи метода капиллярной газожидкостной хроматографии. Измерения проводили на хроматографе ГАЛС-311 в изотермическом режиме с пламенно-ионизационным детектированием. Разделение смеси кислот осуществлялось в кварцевой капиллярной колонке ОПТИМА FFAP (производитель «Macherey–Nagel») длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, неподвижная фаза – пленка сополимера полиэтиленгликоля с 2–нитротерефталевой кислотой; толщина пленки – 0,25 мкм.

Хроматографический анализ проводили при следующих условиях: температура термостата 150°С, температура испарителя и детектора 190°С. Расход газа-носителя составлял 90 см³/мин, водорода – 30 см³/мин, воздуха – 300 см³/мин. Ввод пробы осуществлялся с делением потока газа-носителя (коэффициент деления 1:30).

Полученные хроматограммы обрабатывали с помощью компьютерной программы МультиХром 1.5. Идентификацию компонентов на хроматограммах (рисунок 1) осуществляли, сравнивая времена удерживания компонентов смеси со временами удерживания индивидуальных чистых веществ в стандартных растворах. Количественный анализ проводили методом стандартной добавки по площади пика определенного компонента с использованием формул 1 и 2.

$$C_i = \frac{m_{st}}{V_n \cdot \left(\frac{S_{st2}}{S_{st1}} - 1 \right)}, \text{ мг/см}^3 \quad (1)$$

где m_{st} – масса стандартной добавки, мг;

V_n – объем пробы, взятой для анализа, см³;

S_{st2} – площадь пика, принятого за стандарт, на хроматограмме после добавления стандарта;

S_{st1} – площадь пика, принятого за стандарт, на хроматограмме до добавления стандарта.

$$C_i = \frac{m_{st}}{V_n \cdot \left(\frac{S_{st2} \cdot K_{st}}{S_{i2} \cdot K_i} - \frac{S_{st1} \cdot K_{st}}{S_{i1} \cdot K_i} \right)}, \quad (2)$$

где S_{i2} – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме смеси, в которую был введен стандарт;

S_{i1} – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме исходной смеси;

K_i – абсолютный поправочный коэффициент для определяемого компонента;

K_{st} – абсолютный поправочный коэффициент для стандарта.

Условия калибровки и анализа смесей были идентичны.

Основные параметры разделения исследуемых кислот приведены в таблице 1.

Таблица 1

**Параметры разделения короткоцепочечных жирных кислот
в модельных смесях**

Кислота	Время удерживания (t), мин	Тангенс угла наклона зависимости $S = f(C)$ (tg)	Абсолютный поправочный коэффициент ($\frac{1}{I_g}$)	Величина достоверности аппроксимации (R^2)	Относительная погрешность определения, %
Уксусная	2,612	4,837	0,207	0,944	10,0
Изомасляная	3,323	28,191	0,036	0,971	4,0
Масляная	3,881	27,015	0,037	0,973	10,0
Изовалериановая	4,333	50,645	0,020	0,979	5,5
Валериановая	5,270	56,246	0,018	0,975	3,0
Капроновая	7,382	69,107	0,014	0,999	9,0

Как видно из данных таблицы 1, методика выполнения измерений с помощью предлагаемого способа обеспечивает получение результатов измерений с относительной погрешностью от 3,0 до 10 % в диапазоне концентраций: уксусной кислоты от 0,05 до 2,50 мг/мл, изомасляной, масляной, изовалериановой, валериановой, капроновой кислот – от 0,003 до 0,1 мг/мл.

Данные по количественному определению исследуемых кислот приведены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание КЦЖК в сыворотке крови практически здоровых людей

Наименование кислоты	Содержание кислоты, мг/мл				
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 4	Образец 5
Уксусная	4,840	4,810	4,310	3,890	3,080
Изомасляная	0,006	0,031	0,001	0,028	0,008
Масляная	0,041	0,010	0,014	0,054	0,036
Изовалериановая	0,019	0,005	0,024	0,031	0,020
Валериановая	0,001	–	0,006	0,040	0,001
Капроновая	0,002	0,011	0,006	–	–

Как видно из данных таблицы 2, в анализируемых образцах сыворотки крови содержание уксусной кислоты составляет порядка 3,08–4,84 мг/мл, масляной и изомасляной от 0,001 до 0,031 мг/мл, валериановой и изовалериановой от 0,001 до 0,031 мг/мл и капроновой от 0,002 до 0,011 мг/мл.

Заключение. В результате проведенных исследований разработана методика качественного и количественного определения короткоцепочечных жирных кислот методом капиллярной газожидкостной хроматографии; определены параметры разделения КЦЖК на модельных смесях и в сыворотке крови (коррелируют между собой). Содержание КЦЖК в сыворотке крови составило: для уксусной – 3–5 мг/см³, для изомасляной, масляной, изовалериановой – 1–31 мкг/см³, капроновой – 2,0–1,1 мкг/мл, что соответствует данным, приводимым в научной литературе для практически здоровых людей.

Список использованных источников

1. *Хавкин, А.И.* Нарушения микроэкологии кишечника и энтеросорбция / А.И. Хавкин : Вопросы современной педиатрии, 2009. – Том 8. – № 2. – С. 94–98
2. *Ардатская, М.Д.* Летучие жирные кислоты и их диагностическое и прогностическое значение в гастроэнтерологической клинике / М.Д. Ардатская, О.Н. Минушкин, Н.И. Прихно [и др.] : Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – № 5. – С. 63–70.
3. *Ерофеев, Н.П.* Клиническая физиология толстой кишки. Механизмы действия коротко-цепочечных жирных кислот в норме и при патологии / Н.П. Ерофеев, В.Г. Радченко, П.В. Селиверстов. – СПб. : Форте Принт, 2012. – 56 с.
4. *Ардатская, М.Д.* Клиническое применение пищевых волокон : метод.пособие / М.Д. Ардатская. – М. : 4TE Art, 2010. – 48 с.