

УДК 577

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТНОГО ПРОФИЛЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В. А. Седакова, Р. В. Орлов

(Учреждение образования «Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова»,
кафедра естествознания)

В работе рассматривается возможность определения компонентов метаболитного профиля микроорганизмов на примере биологической смеси препарата бифидобактерий и глюкозы с помощью газохроматографических индексов удерживания. Проведено определение хроматографических параметров n-алканов (C5-C12) для определения индексов удерживания графическим и расчетным способом. Определены индексы удерживания компонентов биологического образца.

Бифидобактерии (БФ) – грамположительные палочки, строгие анаэробы. В толстой кишке детей бифидобактерии являются основной группой сахаролитических бактерий и составляют до 95% от общей популяции микробов. Доминирующее положение бифидобактерий в кишечнике обеспечивает защиту организма от патогенной микрофлоры, особенно у детей на протяжении первого года жизни [2].

Газовая хроматография является одним из наиболее успешно применяемых методов исследования многокомпонентных смесей органических соединений, характеризующийся высокой специфичностью и чувствительностью, а также хорошей воспроизводимостью результатов. Одним из вариантов данного анализа является использование хромато-масс-спектрологии при идентификации соединений в экстрактах, что предусматривает наличие специального дорогостоящего оборудования. Другим способом идентификации неизвестных компонентов многокомпонентных смесей органических соединений может быть использование газохроматографических индексов удерживания. Индекс удерживания Ковача соединения является его важнейшей характеристикой.

Объектами исследования были смесь алканов неразветвленного строения: C_5H_{12} – $C_{10}H_{22}$, $C_{12}H_{26}$; препарат бифидобактерий, смешанный с глюкозой. Готовую систему бифидобактерий с глюкозой помещали в термостат (температура воздуха в термостате 38°C) на 28 часов.

Определение индивидуальных веществ и их смесей, а также анализ смеси алканов проводили методом газовой хроматографии на хроматографе Хроматэк Кристалл-5000 с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой CR FFAP длиной 50 м, внутренним диаметром 0,32 мм, с неподвижной фазой – плёнка сополимер полиэтиленгликоля с 2-нитротерефталевой кислотой; толщина пленки – 0,5 мкм (производитель «Хроматек», Россия). Хроматографирование проводили в изотермическом режиме при следующих параметрах: температура термостата – 110°C; температура испарителя и детектора – 230°C; расход газа-носителя составлял, см³/мин: 30, водорода – 20, воздуха – 200. Ввод пробы осуществлялся с делением потока газа-носителя (коэффициент деления 1:40). Объем вводимой пробы составлял 1 мкл.

Обработка результата проводилась с использованием программного обеспечения «Хроматэк – Аналитик 3.0». Базы данных с результатами исследования формировались с использованием MS Excel и проводились расчеты индексов удерживания, предложенные в работах [3; 4].

Для расчета индексов удерживания (RI) необходимо знать приведенное время удерживания, которое рассчитывается с помощью нахождения значения мертвого времени, которое было посчитано с помощью анализа смеси алканов (C5 – C10, C12). Хроматографические характеристики разделения смеси n-алканов позволили рассчитать необходимые данные для дальнейших расчетов индексов удерживания такие как: мертвое время, которое составило 4,079 мин, и приведенные времена удерживания алканов.

Для определения индексов удерживания использовали графический [5] и расчетный [3] способы. Графический способ вычисления индексов удерживания основывается на построении графической зависимости в координатах десятичный логарифм приведенного времени удерживания – количество атомов углерода в n-алкане. Для использования расчетного способа определения индекса удерживания необходимо знание приведенных времен удерживания двух ближайших алканов с меньшим и большим приведенным временем удерживания по сравнению с определяемым компонентом.

Хроматографические параметры полученных пиков в биологическом препарате были использованы для расчета приведенных времен удерживания и идентификации по индексам удерживания. Полученные данные представлены в таблице.

Индексы удерживания компонентов биологической смеси, определенные расчетным и графическим методами

№ п/п	Экспериментально определенное время удерживания, мин (t)	Приведенное время удерживания, мин, (t')	Индекс удерживания, определенный расчетным методом (RI) [3]	Индекс удерживания, определенный графическим методом (RI) [4]	Предполагаемый компонент [1]
1	4,282	0,203	705	705	Ацетальдегид
2	4,427	0,348	801	801	Этилформиат
3	4,675	0,596	896	897	Метилпропионат
4	4,882	0,803	949	949	Изопропилпропионат
5	5,095	1,016	990	990	Втор-бутилэтилформальдегид
6	5,287	1,208	1021	1021	бут-3-ен-2-ол

Окончание таблицы

№ п/п	Экспериментально определенное время удерживания, мин (t)	Приведенное время удерживания, мин, (t')	Индекс удерживания, определенный расчетным методом (RI) [3]	Индекс удерживания, определенный графическим методом (RI) [4]	Предполагаемый компонент [1]
7	5,795	1,716	1084	1086	изобутилипивалат
8	7,069	2,99	1188	1188	метилгиллат
9	10,921	6,842	1337	1335	2-этил-гексан-2-аль
10	15,576	11,497	1430	1428	гептанол
11	18,060	13,981	1465	1464	α-кубобен
12	24,377	20,298	1532	1530	диэтилоксалат
13	27,015	22,936	1554	1552	2,3-пентандиол
14	36,211	32,132	1615	1613	гептивалерат

Расчет индексов удерживания некоторых компонентов биологической смеси был проведен с использованием экстраполированных времен выхода алканов, полученных расчетным способом с целью компенсировать недостаток имеющихся алканов.

Как видно из данных представленных в таблице, на основании индексов удерживания определены 14 компонентов исследуемого объекта. Показано, что индексы удерживания, определенные расчетным способом и графическим, дают идентичные результаты.

Таким образом, определен качественный состав продуктов метаболизма бифидобактерий на глюкозной среде и установлено, что основу метаболитного профиля составляют спирто-альдегидные компоненты.

Литература

1. Индексы удерживания компонентов эфирных масел [электронный ресурс] – Режим доступа: http://viness.narod.ru/ret_ind.htm. – Дата доступа: 29.10.2021.
2. Курилович, С. А. Микробиоценоз кишечника. Современные представления о норме и патологии. Принципы коррекции нарушений : методические рекомендации для врачей / С. А. Курилович. – Новосибирск, 1998. – 26 с.
3. Царев, Н. И. Практическая газовая хроматография : учебно-методическое пособие для студентов химического факультета по спецкурсу «Газохроматографические методы анализа» / Н. И. Царев, В. И. Царев, И. Б. Катраков. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2000. – 156 с.
4. Шаповалова, Е. Н. Хроматографические методы анализа : методическое пособие для специального курса / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов. – М. : МГУ, 2007. – 109 с.
5. Эттре, Л. С. Система индексов удерживания Ковача – наиболее удобный способ выражения данных по удерживанию в газовой хроматографии / Л. С. Эттре // Усп. Хим. – 1996. – Т. 35. – С. 1883–1895.