

Сравнительная характеристика различных вариантов электрофоретического определения моно- и дисахаридов с применением дериватизации

***А. В. Малюшевская, Л. А. Карцова**

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Российская Федерация, 198504, Петродворец, Санкт-Петербург, Университетский просп., 26.

*Адрес для переписки: Малюшевская Анастасия Васильевна, E-mail: malushevskaa@gmail.com

Поступила в редакцию 08 мая 2024 г., после доработки 07 июня 2024 г.

В работе рассмотрены следующие варианты электрофоретического определения сахаров с предварительной дериватизацией: восстановительное аминирование этиловым эфиром *p*-аминобензойной кислоты (ЭАБ) и конденсация с 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном (ФМП). Разделение производных проводили как в мицеллярном, так и в зонном режимах (КЗЭ) капиллярного электрофореза (КЭ) с получением сравнительных оценочных характеристик. Лучшие значения эффективности (~ 650 тыс. теоретических тарелок), факторов разрешения (2.1 – 2.4) и пределов обнаружения (ПО) (0.8 – 2.9 мкг/мл) обнаружены для восстановительного аминирования с последующим определением в условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). Условия дериватизации восстановительным аминированием оптимизированы с использованием центрального композитного дизайна эксперимента. Выявлены дополнительные резервы снижения ПО за счет внутрикапиллярного концентрирования в режиме свипинга (факторы концентрирования 13 – 19). Показана принципиальная возможность внутрикапиллярного восстановительного аминирования с обеспечением электрофоретической подвижности реагента дериватизации за счет введения в раствор мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ). Оба подхода с применением дериватизации апробированы на образцах детского питания.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, углеводы, дериватизация, восстановительное аминирование, внутрикапиллярное концентрирование.

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2024, vol. 28, no. 2, pp. 98-107

DOI: 10.15826/analitika.2024.28.2.003

Comparative characteristics of different methods for electrophoretic determination of mono- and disaccharides using derivatization

***A. V. Malushevskaa, L.A. Kartsova**

Saint Petersburg State University

26 Universitetskiy Ave., Petrodvorets, Saint-Petersburg, 198504, Russian Federation

*Corresponding author: Anastasiya V. Malushevskaa, E-mail: malushevskaa@gmail.com

The following variants of electrophoretic determination of sugars with prior derivatization are considered in the article: reductive amination using *p*-aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE) and condensation with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP). Derivatization products were separated using capillary electrophoresis in both zone and micellar modes, and comparative estimate characteristics were obtained. The best efficiency (ca. 650 thousand theoretical plates), selectivity (2.1–2.4), and LOD (0.8–2.9 µg/mL) was observed for the separation of reductive amination products using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). Optimization of derivatization conditions was performed for the reductive amination using the central composite experiment design. Additionally, LOD was lowered by the sample intracapillary concentration in sweeping mode, and sample enhancement factors (SEF) of 13–19 were achieved. A proof-of-concept possibility of the intracapillary

reductive amination ensuring electrophoretic mobility of the derivatization reagent using detergent micelles as carrying agents was demonstrated. Both derivatization methods were applied for the analysis of baby food.

Keywords: capillary electrophoresis, carbohydrates, derivatization, reductive amination, intracapillary preconcentration.

ВВЕДЕНИЕ

Углеводы – класс биомолекул, выполняющих важную роль в метаболизме живых организмов. Информация и концентрации этих аналитов в различных объектах может оказаться значимой как для диагностических целей [1, 2], так и при контроле качества пищевой продукции [3–5]. Электрофоретические методы определения сахаров востребованы в равной степени с хроматографическими [6], что обусловлено высокой эффективностью и простотой их аппаратного оформления, а также возможностью снижения пределов обнаружения за счет внутрикапиллярного концентрирования аналитов.

Существуют различные подходы к электрофоретическому определению сахаров с УФ-детектированием. Отсутствие хромофорных групп в молекулах углеводов требует либо изменения состава фонового электролита (ФЭ), либо предварительной пробоподготовки с использованием дериватизации аналитов. Применение в качестве ФЭ боратного буферного раствора, с которым vicинальные диольные группы аналитов способны образовывать поглощающие комплексы – одно из решений этой проблемы; подобный эффект может оказать и введение в ФЭ ионов меди (II), также возможен вариант косвенного детектирования с добавлением в состав ФЭ поглощающей добавки [6–8]. Из всех перечисленных подходов, связанных с изменением состава ФЭ, наиболее низких пределов обнаружения (ПО) (4–10 мкг/мл) позволяет добиться исследованный нами ранее режим косвенного детектирования [9]. При этом предварительное получение производных моно- и дисахаридов с введением хромофорных групп в состав их молекул – другое возможное аналитическое решение [10]. Наиболее востребованы восстановительное аминирование, основанное на реакции альдегидной группы сахаров с образованием основания Шиффа, восстановлением его до вторичного амина (схема 1), и конденсация с 1-фенил-3-метил-пиразолоном

(ФМП) (схема 2) [11–14]. Применение этилового эфира *l*-аминобензойной кислоты в качестве реагента дериватизации позволяет существенно снизить ПО сахаров до 50 фмоль [15–18].

Помимо предварительной дериватизации с последующим электрофоретическим разделением производных возможно введение хромофорных групп в молекулы сахаров непосредственно в самом кварцевом капилляре при последовательном вводе анализируемой пробы и реагента дериватизации. Такая возможность была показана для ФМП [12].

В [20] сообщается о внутрикапиллярном восстановительном аминировании в зонном режиме с применением в качестве реагента дериватизации 7-амино-1,3-нафталендисульфоновой кислоты. Тем не менее, доступно сравнительно немного работ, посвященных сопоставлению параметров разделения для различных режимов и реагентов дериватизации с целью поиска дополнительных аналитических возможностей метода КЭ, таких как внутрикапиллярная дериватизация и он-лайн концентрирование.

Данная работа посвящена выявлению аналитических характеристик различных вариантов дериватизации моно- и дисахаридов в офф- и онлайн режимах при электрофоретическом определении этих аналитов. Выявлены резервы снижения ПО за счет внутрикапиллярного концентрирования.

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 с внутренним диаметром 50 мкм и внешним полиимидным покрытием. Обработку результатов электрофоретических экспериментов проводи-



Схема 1. Восстановительное аминирование сахаров на примере глюкозы [4]

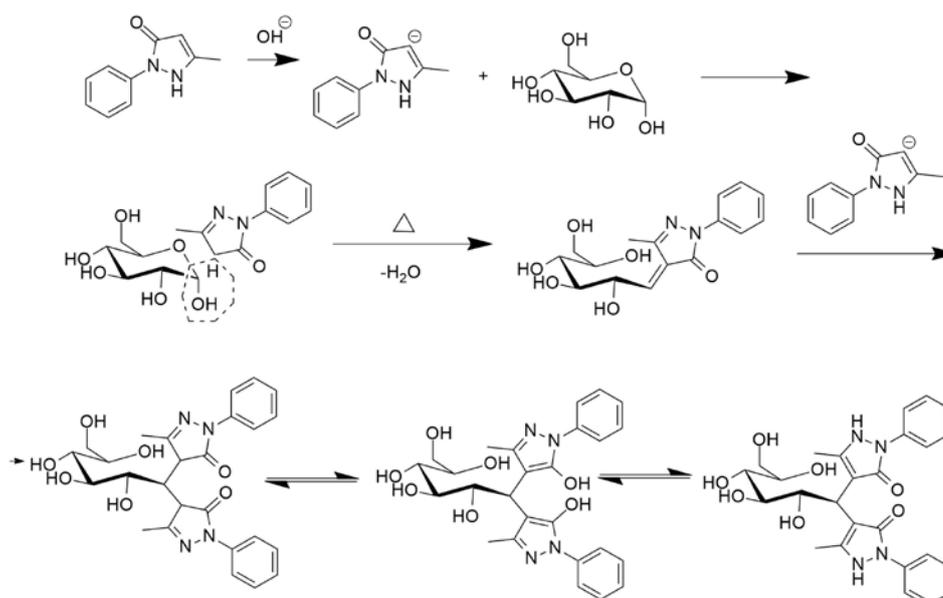


Схема 2. Дериватизация углеводов 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном [4]

ли с использованием программного обеспечения “Эльфوران” (“Люмэкс”, Россия), RStudio (Posit PBC, США) и пакетов rsm [21] и desirability [22].

Аналитические весы Shimadzu AUW (Shimadzu, Япония), деионизатор “АКВИЛОН Д 301” (“Аквилон”, Россия), рН-метр HI 2210-2216 (“Hanna”, Италия), лабораторный сушильный шкаф LOIP LF-25/350-VS2 («ЛОИП», Россия). Автоматические дозаторы вместимостью 20, 200, 1000 мкл, вортекс BioSan V-32 (“BioSan”, Латвия), центрифуга с максимальной скоростью 14000 оборотов/мин Eppendorf 5430 (“Eppendorf”, Германия).

Реагенты. Гидроксид натрия (ч.д.а., “Реахим”, Россия), соляная кислота (ч.), борная кислота (ос. ч., “Реахим”, Россия), дигидрофосфат натрия (ч.д.а., “Реахим”, Россия), метанол (Fluka, США), этиловый эфир *пара*-аминобензойной кислоты (ЭАБ) (Alpha Aesar, США), додецилсульфат натрия (ДДСН) (AppliChem, Германия), 1-фенил-3-метил-5-пиразолон (ФМП) (BLD Pharm, Китай), цианборгидрид натрия (SRL, Индия), ледяная уксусная кислота (Sigma-Aldrich, США), глюкоза (х.ч., PanReas, Испания), мальтоза (х.ч., Sigma-Aldrich, США), лактоза (х.ч., Sigma-Aldrich, США), хлороформ («Экос-1», Россия), деионизированная вода.

В качестве маркера электроосмотического потока (ЭОП) использовали диметилсульфоксид (ДМСО) (Merck, Германия).

Объекты анализа. Образцы детского питания различных производителей: сухое молоко (Nestle, Россия) и безлактозное сухое молоко (Nutrilon, Россия).

Приготовление растворов углеводов.

Концентрированные растворы углеводов (*глюкоза, лактоза, мальтоза*) с концентрацией 10 мг/мл готовили следующим образом: точные навески аналитов вносили в пробирку типа Эппендорфа вместимостью 1.5 мл, добавляли 0.5 мл деиони-

зированной воды, тщательно перемешивали до полного растворения и доводили объем раствора деионизированной водой до 1 мл. Подготовленные растворы хранили в морозильной камере при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рабочие и калибровочные растворы углеводов заданной концентрации готовили путем размораживания и разбавления концентрированных растворов в требуемое количество раз деионизированной водой. Рабочие растворы хранили в холодильнике при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение недели.

Проведение восстановительного аминирования. К раствору сахаров концентрацией 1 мг/мл (500 мкл) добавляли 40 мкл ледяной уксусной кислоты, 40 мкл 0.6 М раствора цианоборогидрида натрия (NaBH_3CN) и 200 мкл 1.4 М раствора ЭАБ в метаноле. Реагенты перемешивали и смесь термостатировали при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. Затем добавляли 400 мкл хлороформа и 220 мкл деионизированной воды и перемешивали. Автоматической пипеткой отбирали верхний (водный) слой пробы и анализировали. При оптимизации условий дериватизации температуру термостатирования варьировали в диапазоне $30 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, объем ледяной уксусной кислоты – $40 - 120$ мкл; время термостатирования – $10 - 30$ мин.

Проведение конденсации с 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном (ФМП). К раствору сахаров концентрацией 1 мг/мл (100 мкл) добавляли 75 мкл 0.8 М раствора NaOH и 200 мкл 0.5 М раствора ФМП в метаноле. Реагенты перемешивали и смесь термостатировали при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 45 мин. Затем добавляли 360 мкл 0.1 М раствора HCl и 265 мкл деионизированной воды. После этого к реакционной смеси добавляли 500 мкл хлороформа и тщательно перемешивали. Автоматической пипеткой отбирали верхний (водный) слой пробы и анализировали методом капиллярного электрофореза (КЭ).

Приготовление фоновых электролитов. Боратный фоновый электролит (БФЭ) готовили следующим образом: точную навеску борной кислоты вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 40 мл деионизированной воды, тщательно перемешивали до полного растворения кислоты, потенциометрически доводили рН раствора до необходимого значения (использовали 4 М раствор NaOH) и доводили объем раствора деионизированной водой до метки. Фосфатный фоновый электролит (ФФЭ) готовили аналогичным образом с использованием вместо борной кислоты дигидрофосфата натрия. Раствор ДДСН готовили следующим образом: точную навеску ДДСН вносили в пробирку типа Эппендорфа вместимостью 50 мл, добавляли 40 мл деионизированной воды, тщательно перемешивали до полного растворения ДДСН и доводили объем раствора деионизированной водой до метки.

При исследовании влияния состава фонового электролита на параметры миграции производных углеводов после восстановительного аминирования концентрацию боратного ФЭ варьировали в диапазоне 10 – 300 мМ; ДДСН – 5 – 40 мМ; значение рН – от 6 до 10. Для производных углеводов с ФМП концентрацию фосфатного ФЭ варьировали в диапазоне 10 – 50 мМ, а значение рН – от 7 до 9.5. В обоих случаях под концентрацией фонового электролита подразумевается суммарная концентрация протонированной и непротонированной форм электролита).

Пробоподготовка образцов детского питания. Навески образцов массой ~ 25 мг вносили в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1.5 мл. Затем добавляли 500 мкл (для восстановительного аминирования) либо 100 мкл (для конденсации с ФМП) деионизированной воды и проводили процедуру дериватизации, как было описано выше. После дериватизации образцы центрифугировали в течение 5 мин при 10000 об/мин (6800g). Водный надосадочный слой жидкости отбирали автоматической пипеткой и разбавляли деионизированной водой в требуемое количество раз.

Условия электрофоретических экспериментов

Подготовка капилляра к работе. Новый кварцевый капилляр последовательно промывали ацетонитрилом (10 мин), деионизированной водой (10 мин), 0.1 М раствором HCl (10 мин), деионизированной водой (5 мин), 0.5 М раствором NaOH (30 мин) и снова деионизированной водой (10 мин). Перед началом работы каждый день капилляр промывали ацетонитрилом (1 мин), водой (3 мин), 0.1 М раствором 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).

Внутрикапиллярная дериватизация. В качестве фонового электролита использовали 100 мМ БФЭ (рН = 5) с добавлением 60 мМ ДДСН; рН фонового электролита доводили до необходимого значения с использованием HCl. Для проведения дериватизации в капилляр последовательно вводили: 50 мМ раствор ЭАБ с добавлением 60 мМ ДДСН, 0.4 мМ уксусной кислоты и 10 % (объемн.) ацетонитрила (5 с, 3 кПа), модельный раствор углеводов концентрацией 1 мг/мл (5 с, 3 кПа), фоновый электролит (10 с, 3 кПа). Для перемешивания зон пробы и реагента пропускали ток при напряжении 5 кВ в течение 3 мин. В дальнейшем смесь выдерживали 10 мин при температуре 45° С.

Внутрикапиллярное концентрирование. После восстановительного аминирования в режиме офф-лайн проводили внутрикапиллярное концентрирование полученных производных в режиме стэкинга (100 мМ БФЭ, рН = 10) и свипинга (100 мМ БФЭ, рН = 10, 25 мМ ДДСН). Внутрикапиллярное концентрирование для производных с ФМП проводили в режиме стэкинга (100 мМ ФФЭ, рН = 8). Для разбавления пробы использовали ФЭ того же состава. Время ввода пробы варьировали от 20 до 60 с. Напряжение – 20 кВ; температура термостатирования – 20° С; длина волны детектирования – 305 нм; давление ввода пробы – 3 кПа.

Анализ реальных объектов. Анализ реальных объектов с предварительным восстановительным аминированием проводили с использованием фонового электролита следующего состава: 100 мМ боратный ФЭ (рН = 10), 25 мМ ДДСН. Напряжение – 20 кВ; температура термостатирования – 20° С; длина волны детектирования – 305 нм; время гидродинамического ввода пробы – 5 с; давление ввода пробы – 3 кПа.

После предварительной конденсации с ФМП использовали фоновый электролит состава: 100 мМ фосфатный ФЭ (рН = 8). Напряжение – 20 кВ; температура термостатирования – 20° С; длина волны детектирования – 248 нм; время гидродинамического ввода пробы – 5 с; давление ввода пробы – 3 кПа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка способов электрофоретического определения углеводов с предварительной процедурой дериватизации включала следующие этапы:

- проведение дериватизации с выбранным реагентом для восстановительного аминирования и конденсации с ФМП с достижением оптимальных параметров миграции производных углеводов;
- оптимизация условий восстановительного аминирования с использованием центрального композитного дизайна эксперимента;
- выявление принципиальной возможности проведения дериватизации во внутрикапиллярном формате;

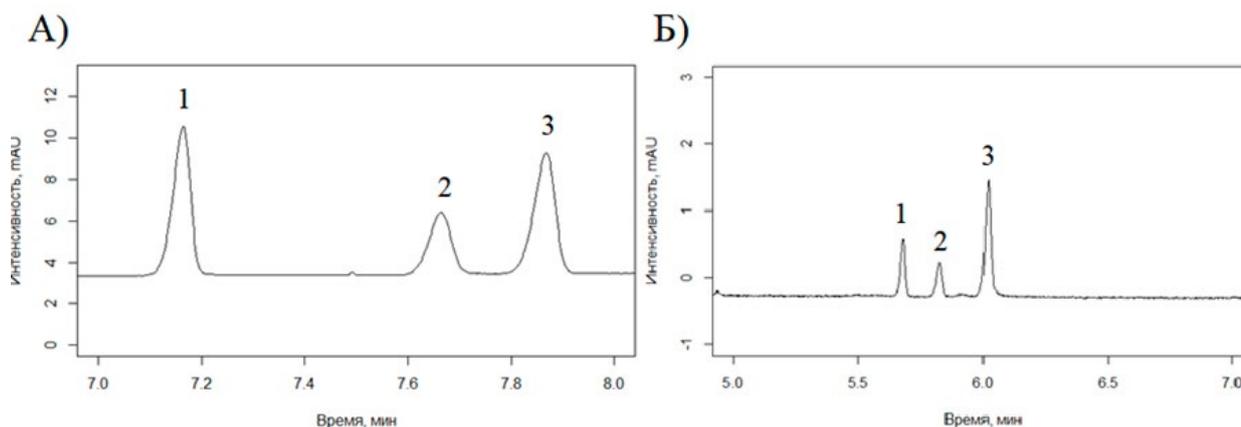


Рис. 1. (А) Раствор смеси сахаров (250 мкг/мл) после восстановительного аминирования с ЭАБ в режиме КЗЭ: 1 – мальтоза, 2 – лактоза, 3 – глюкоза. ФЭ: 100 мМ БФЭ, pH = 10. Условия: ввод пробы – 5 с, 3 кПа; 20 кВ, 20 °С, λ = 305 нм. (Б) Раствор смеси сахаров (20 мкг/мл) после восстановительного аминирования с ЭАБ в режиме МЭКХ: 1 – мальтоза, 2 – лактоза, 3 – глюкоза. ФЭ: 100 мМ БФЭ, 20 мМ ДДСН, pH = 8. Условия: ввод пробы – 5 с, 3 кПа; 20 кВ, 20 °С, λ = 305 нм

Fig. 1. (A) Solution of sugars mixture (250 μg/mL) after reductive amination with ABEE in CZE mode. 1 – maltose, 2 – lactose, 3 – glucose. BGE: 100 mM borate, pH = 10. Conditions: sample injection – 5 s, 3 kPa; 20 kV; 20 °C; λ = 305 nm. (B) Solution of sugars mixture (20 μg/mL) after reductive amination with ABEE in MEKC mode. 1 – maltose, 2 – lactose, 3 – glucose. BGE: 100 mM borate, 20 mM SDS, pH = 8. Conditions: sample injection – 5 s, 3 kPa; 20 kV; 20 °C; λ = 305 nm

- снижение ПО аналитов при проведении внутрикапиллярного концентрирования;
- апробация найденных условий к анализу реальных объектов.

Восстановительное аминирование. Дериватизацию сахаров осуществляли в соответствии с [23] с незначительными изменениями. Для изучения влияния концентрации и природы компонентов фонового электролита на параметры миграции углеводов нами были реализованы зонный и мицеллярный режимы разделения (рис. 1).

При разделении в зонном режиме варьировали концентрацию и pH ФЭ с целью увеличения эффективности, улучшения факторов разрешения аналитов и сокращения времени анализа. Концентрацию БФЭ варьировали в пределах от 10 до 300 мМ; pH фонового электролита – от 9.5 до 12. Лучшие значения эффективности и факторов разрешения достигнуты для 100 мМ БФЭ с pH = 10; значения эффективности - 118 – 194 тыс. т.т.; факторы разрешения – 1.5 – 5.1; пределы обнаружения – 1.3 – 4.7 мкг/мл. Время анализа - менее 9 мин.

Независимо был реализован и режим мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) с введением в состав ФЭ поверхностно-активного вещества (ПАВ) – ДДСН – в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования. ПАВ вводили в фоновый электролит того же состава; pH ФЭ варьировали от 7 до 10, а концентрацию ДДСН - от 5 до 40 мМ; лучшие значения факторов разрешения и эффективности получены при добавлении 20 мМ ДДСН в 100 мМ БФЭ, pH = 8. В этих условиях достигнута эффективность 408 – 654 тыс. т.т., факторы разрешения – 2.1 – 2.4,

пределы обнаружения – 0.8 – 2.9 мкг/мл. Время анализа менее 7 мин.

Конденсация с ФМП. Процедуру дериватизации проводили в соответствии с [7]. Изначально для определения сахаров применяли 100 мМ боратный фоновый электролит (БФЭ) с pH = 10, но при использовании последнего ЭОП регистрировали после лактозы, что затрудняло определение глюкозы. Таким образом, в дальнейшем для анализа применяли фосфатный фоновый электролит (ФФЭ), использование которого позволило отделить ЭОП и пики аналитов. Концентрацию ФФЭ варьировали

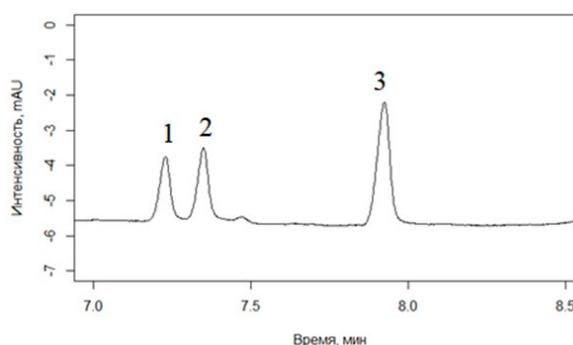


Рис. 2. Раствор смеси сахаров (100 мкг/мл) после конденсации с ФМП в режиме КЗЭ: 1 – мальтоза, 2 – лактоза, 3 – глюкоза. ФЭ: 25 мМ ФФЭ, pH = 8. Условия: ввод пробы – 5 с, 3 кПа; 20 кВ, 20 °С, λ = 248 нм

Fig. 2. Solution of sugars mixture (100 μg/mL) after condensation with PMP in CZE mode. 1 – maltose, 2 – lactose, 3 – glucose. BGE: 100 mM borate, 20 mM SDS, pH = 8. Conditions: sample injection – 5 s, 3 kPa; 20 kV; 20 °C; λ = 248 nm

Таблица 1

Параметры разделения производных сахаров

Table 1

Separation parameters for sugars' derivatives

Параметр, единицы измерения	Значения параметра		
	Восстановительное аминирование		Конденсация с ФМП
	КЗЭ	МЭКХ	КЗЭ
N , тыс. т.т.	118 – 194	408 – 654	210 – 260
R_s	1.5 – 5.1	2.1 – 2.4	1.0 – 3.4
ПО, мкг/мл	1.3 – 4.7	0.8 – 2.9	0.30 – 0.49
Время, мин	< 9	< 7	< 9

от 10 до 50 мМ; рН – от 7 до 9.5. Лучшие параметры разделения достигнуты в случае 25 мМ ФФЭ с рН = 8 (рис. 2); режим КЗЭ ($N = 200 – 260$ тыс. т.т.;

R_s в диапазоне – 1.0 – 3.4; ПО – 0.30 – 0.49 мкг/мл; время - менее 9 мин.).

При реализации мицеллярного режима добавление ПАВ в фоновый электролит лишь незначительно улучшило параметры разделения сахаров при сохранении общего времени анализа, поэтому был выбран зонный режим, к тому же проще реализуемый.

Полученные параметры разделения производных сахаров в различных режимах представлены в табл. 1.

Оптимизация условий восстановительного аминирования. Для оптимизации условий дериватизации использовали центральный композитный дизайн эксперимента. В качестве параметров выбраны температура, время дериватизации и объем ледяной уксусной кислоты. Для варьирования параметров по выбранным уровням проведено 20 электрофоретических экспериментов с дериватизацией аналитов при различных сочетаниях условий. Для сопоставления эффективности дериватизации в различных условиях оценивали площади пиков аналитов. Для поиска оптимального сочетания параметров применяли метод крутого восхождения по поверхности отклика (метод Бокса-Уилсона). Построены поверхности отклика для мальтозы, лактозы и глюкозы (рис. 3). Для описания изменений параметров использовали модели второго порядка. Методом дисперсионного анализа (ANOVA) проведена оценка статистических параметров полученных моделей для отдельных аналитов. Поскольку точки оптимума для каждого аналита на полученных поверхностях отстояли достаточно далеко друг от друга (рис. 3), провели оптимизацию условий для трех аналитов одновременно с целью поиска условий, при которых значения площадей пиков каждого из них были бы максимальными. Для совместной оптимизации использовали функцию желательности. Наибольшее значение этого параметра соответствовало следующим значениям факторов: температура – 30 °С, количество ледяной уксусной кислоты – 40 мкл, время – 15 мин. Полученные значения параметров моделей, построенных для каждого аналита в отдельности и отклика при дериватизации в найденных условиях для совместной оптимизации, представлены в табл. 2.

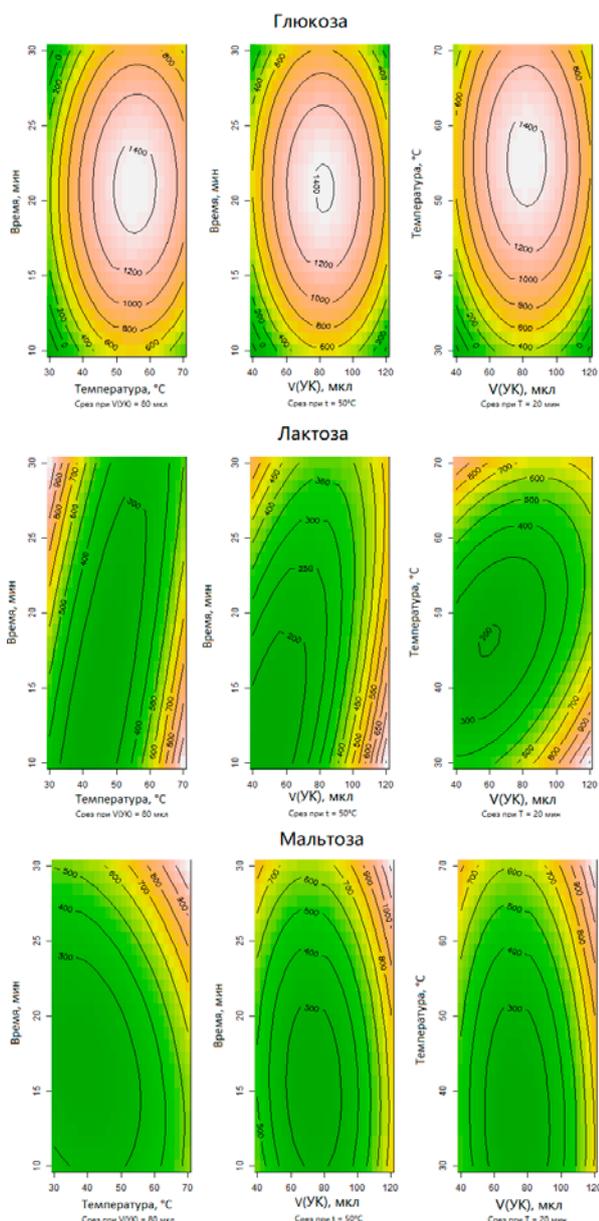


Рис. 3. Поверхности отклика после оптимизации условий дериватизации для аналитов

Fig. 3. Response surfaces after optimization of derivatization conditions for analytes

Таблица 2

Статистические параметры моделей для каждого аналита и отклик в условиях после совместной оптимизации

Table 2

Statistical parameters of models for each analyte and response for the post-optimization conditions

Статистические параметры	Значения для отдельных углеводов		
	Мальтоза	Глюкоза	Лактоза
R^2 (коэффициент корреляции модели)	93.25 %	90.05 %	89.33 %
p -критерий модели	0.0009	0.0008	0.0009
p -критерий ошибки регрессии	0.493	0.07	0.08
Отклик, полученный после совместной оптимизации условий			
Предсказанные значения	342.88	141.17	161.32
Экспериментальные	338 ± 10	142 ± 4	161 ± 2.5

Экспериментальные значения отклика показали соответствие прогнозируемым и подтвердили возможность проведения дериватизации восстановительным аминированием при более низких температурах, в том числе и во внутрикапиллярном варианте.

Внутрикапиллярная дериватизация. Отдельная серия электрофоретических экспериментов была посвящена выявлению возможностей проведения внутрикапиллярной дериватизации сахаров с последовательным вводом в кварцевый капилляр зоны реагента, анализируемой пробы и фонового электролита. В случае восстановительного аминирования электрофоретическая подвижность производных обусловлена введением отрицательно заряженных мицелл ДДСН в раствор.

Внутрикапиллярное концентрирование. В дополнительной серии электрофоретических экспериментов выявлены возможности онлайн концентрирования сахаров в режиме КЗЭ с использованием стэкинга с усилением поля и стэкинга с водной пробкой. В режиме стэкинга концентрирование осуществляется за счет разницы проводимости разбавленной в 10 раз пробы и фонового электролита, которая приводит к формированию узких сконцентрированных зон аналитов на границе раствора пробы и ФЭ. Для оценки степени концентрирования применяли факторы концентрирования (SEF), рассчитанные по следующей формуле:

$$SEF = \frac{H_2}{H_1} \cdot \Delta$$

где H_2 – высота пика после концентрирования, H_1 – высота пика при стандартном вводе пробы (2 с), Δ – степень разбавления пробы.

При проведении стэкинга для приготовления пробы использовали как деионизированную воду, так и разбавленный фоновый электролит (10 мМ БФЭ, pH = 10). При разбавлении пробы в ФЭ в 200 раз (время ввода – 30 с, давление – 3 кПа) была достигнута эффективность 113 – 137 тыс. т.т., факторы разрешения 1.3 – 3.4, пределы обнаружения 0.15 – 0.58 мкг/мл. Факторы концентрирования относительно стандартного ввода пробы (2 с) составили 8 – 12.

Ввод водной пробки практически не повлиял на факторы концентрирования.

Помимо стэкинга реализован режим свипинга с введением в состав ФЭ мицелл. Концентрирование в режиме свипинга достигается за счет распределения аналитов между ФЭ и псевдостационарной мицеллярной фазой ПАВ, отсутствующей в пробе. Пробу готовили как в деионизированной воде, так и в разбавленном фоновом электролите (10 мМ БФЭ, pH = 8). При разбавлении пробы в ФЭ в 200 раз (время ввода – 40 с, давление – 3 кПа) достигнута эффективность 146 – 340 тыс. т.т. и факторы разрешения 1.9 – 2, пределы обнаружения 0.12 – 0.27 мкг/мл (рис. 4). Факторы концентрирования относи-

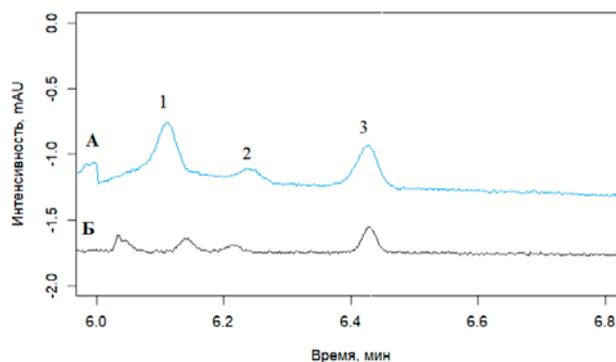


Рис. 4. Концентрирование образца в режиме свипинга (А) сконцентрированный образец (разбавление в 2000 раз в 10 мМ БФЭ, pH = 8): 1 – мальтоза, 2 – лактоза, 3 – глюкоза. ФЭ: 100 мМ БФЭ, 20 мМ ДДСН, pH = 8. Условия: ввод пробы – 40 с, 3 кПа; 20 кВ, 20 °С, $\lambda = 305$ нм (Б) стандартный образец (разбавление в 200 раз в 10 мМ БФЭ, pH = 8). ФЭ: 100 мМ БФЭ, 20 мМ ДДСН, pH = 8. Условия: ввод пробы – 2 с, 3 кПа; 20 кВ, 20 °С, $\lambda = 305$ нм

Fig. 4. Sample intracapillary concentration using sweeping (A) concentrated sample (2000 times dilution in 10 mM borate, pH = 8). 1 – maltose, 2 – lactose, 3 – glucose. BGE: 100 mM borate, 20 mM SDS, pH = 8. Conditions: sample injection – 50 s, 3 kPa; 20 kV; 20 °C; $\lambda = 305$ nm (B) standard sample (200 times dilution in 10 mM BBR, pH = 8). BGE: 100 mM borate, 20 mM SDS, pH = 8. Conditions: sample injection – 50 s, 3 kPa; 20 kV; 20 °C; $\lambda = 305$ nm

Таблица 3

Параметры внутрикапиллярного концентрирования производных сахаров

Table 3

Parameters of intracapillary concentration of sugars' derivatives

Параметр, единицы измерения	Восстановительное аминирование			
	Стэкинг		Свилинг	
	Разбавление в воде	Разбавление в 10 мМ БФЭ, pH = 10	Разбавление в воде	Разбавление в 10 мМ БФЭ, pH = 8
N , тыс. т.т.	41 – 50	113 – 137	99 – 207	146 – 340
R_s	1 – 2.3	1.3 – 3.4	1.4 – 1.9	1.9 – 2
ПО, мкг/мл	0.18 – 0.64	0.15 – 0.58	0.22 – 0.62	0.12 – 0.27
SEF	7 – 9	8 – 12	4 – 8	13 – 19
	Конденсация с ФМП			
	Стэкинг			
	Разбавление в воде		Разбавление в 2.5 мМ ФФЭ, pH = 8	
N , тыс. т.т.	67 – 113		95 – 128	
R_s	1.1 – 4.9		1.6 – 3.5	
ПО, мкг/мл	0.10 – 0.16		0.11 – 0.22	
SEF	3 – 6		4 – 5	

тельно стандартного ввода пробы составили 13 – 19. Результаты внутрикапиллярного концентрирования производных сахаров после восстановительного аминирования в различных режимах представлены в табл. 3.

Для производных с ФМП проводили онлайн концентрирование сахаров в режиме КЗЭ с использованием стэкинга с усилением поля и стэкинга с водной пробкой. Для приготовления пробы использовали как деионизированную воду, так и разбавленный ФЭ (2.5 мМ ФФЭ, pH = 8) (табл. 3).

Анализ реальных объектов. Для определения сахаров в образцах детского питания использовали метод абсолютной градуировки. Градуировочные кривые построены для трех углеводов (*глюкоза, мальтоза, лактоза*) в диапазоне концентраций 25 – 500 мкг/мл. Коэффициент корреляции для всех градуировочных зависимостей составил $r > 0.99$. В

образцах безлактозного сухого молока выявлены глюкоза и мальтоза, в образцах сухого молока – лактоза (рис. 5). Определение проводили в трехкратной повторности, результаты соответствовали данным о составе, заявленным производителем (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучены следующие подходы к дериватизации восстанавливающих сахаров с последующим электрофоретическим определением: восстановительное аминирование с этиловым эфиром *пара*-аминобензойной кислоты и конденсация с 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном. Лучшие значения эффективности (400 – 650 тыс. т.т), факторов разрешения (2.1 – 2.4) и ПО (0.8 – 2.9 мкг/мл) достигнуты для восстановительного аминирования с разделением производных в режиме

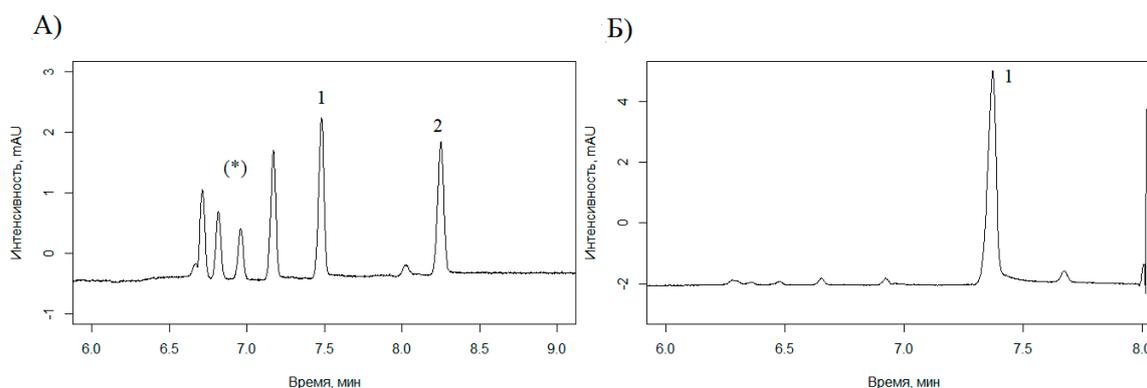


Рис. 5. (А) Образец безлактозного сухого молока: 1 – мальтоза, 2 – глюкоза, (*) – неидентифицированные сахара. (Б) Образец сухого молока: 1 – лактоза. ФЭ: 100 мМ БФЭ, 20 мМ ДДСН, pH = 8. Условия: ввод пробы – 5 с, 3 кПа; 20 кВ, 20 °С, $\lambda = 305$ нм

Fig. 5. (A) Lactose-free milk powder sample. 1 – maltose, 2 – glucose, (*) – unidentified sugars. (B) Milk powder sample. 1 – lactose. BGE: 100 mM borate, 20 mM SDS, pH = 8. Conditions: sample injection – 5 s, 3 kPa; 20 kV; 20 °C; $\lambda = 305$ nm

Количественное содержание сахаров в реальных объектах

Table 4

Sugars content in real objects

Аналит	Массовая доля в объекте, г/100 г			
	Сухое молоко		Безлактозное сухое молоко	
	Определено	Заявлено	Определено	Заявлено
Мальтоза	≤ПО	≤ПО	6.7 ± 0.9	6.7
Лактоза	36.0 ± 2.1	34.1	≤ПО	≤ПО
Глюкоза	≤ПО	≤ПО	1.8 ± 0.3	1.7

МЭКХ. Время электрофоретического анализа не превысило 7 мин. Пределы обнаружения снижены внутрикапиллярным концентрированием (свипинг; факторы концентрирования 13 – 19).

Условия дериватизации восстановительного аминирования оптимизированы с использованием центрального композитного дизайна эксперимента. Построены поверхности отклика для каждого аналита и проведена их совместная оптимизация. Показана принципиальная возможность внутрикапиллярного восстановительного аминирования с обеспечением электрофоретической подвижности реагента дериватизации за счет введения в раствор мицелл ПАВ. Оба исследованных подхода апробированы на образцах детского питания: сухого молока и безлактозного сухого молока.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (номер гранта 24-13-00378).

ACKNOWLEDGES

The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant number 24-13-00378).

ЛИТЕРАТУРА

- The Burden of Carbohydrates in Health and Disease / V. J. Clemente-Suárez [et al.] // *Nutrients*. 2022. V. 14, № 18. Article 3809.
- Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease / H. Yki-Järvinen [et al.] // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021. V. 18, № 11. P. 770-786.
- Measurement of available carbohydrates, digestible, and resistant starch in food ingredients and products / B. V. McCleary [et al.] // *Cereal Chem.* 2020. V. 97, № 1. P. 114-137.
- Bolshakov D.S., Amelin V.G. Capillary electrophoresis in assessing the quality and safety of foods // *J. Anal. Chem.* 2023. V. 78, № 7. P. 815-855.
- Progress in the pretreatment and analysis of carbohydrates in food: An update since 2013 / L. Jie [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2021. V. 1655. Article 462496.
- 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. 144-161.
- Kurzyna-Szklarek M., Cybulska J., Zdunek A. Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – an overview of methods // *Food Chem.* 2022. V. 394. Article 133466.
- Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides / V. Mantovani [et al.] // *Electrophoresis*. 2017. V. 39, № 1. P. 179-189.
- Kolobova E. A., Maliushevskaya A. V., Kartsova L. A. Electrophoretic Determination of Carbohydrates in Samples of Natural Origin by an Indirect Detection Method // *J. Anal. Chem.* 2024. V. 79, № 2. P. 224-232.
- Smolkova D., Cmelik R., Lavicka J. Labeling strategies for analysis of oligosaccharides and glycans by capillary electrophoresis // *Trends Analyt. Chem.* 2023. V. 163. Article 117068.
- Guček M., Pihlar B. Capillary electrochromatography of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of some mono- and disaccharides // *Chromatographia*. 2000. V. 51, № 1. P. S139-S142.
- Honda S., Suzuki S., Taga A. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003. V. 30, № 6. P. 1689-1714.
- 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. 259-267.
- Optimization of synthesis of carbohydrates and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) by response surface methodology (RSM) for improved carbohydrate detection / W. Wang [и др.] // *Food Chem.* 2020. V. 309. Article 125686.
- Blanco D., Muro D., Gutiérrez M. D. A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 517, № 1. P. 65-70.
- Kwon H., Kim J. High Performance Liquid Chromatography of Mono- and Oligosaccharides Derivatized with P-Aminobenzoic Ethyl Ester on a C18-Bonded Silica Column // *J. Liq. Chromatogr.* 1995. V. 18, № 7. P. 1437-1449.
- Separation of derivatized carbohydrates by co-electroosmotic capillary electrophoresis / D. T. Nguyen [и др.] // *Chromatographia*. 1997. V. 46, № 3. P. 113-121.
- Molnár-Gábor D., Lengyel M., Krongaard T. Rapid method for quantitation of seven human milk oligosaccharides in infant formula and premix // *Carbohydr. Res.* 2024. V. 541. Article 109149.
- An optimized CZE method for analysis of mono- and oligomeric aldose mixtures / J. Sjöberg [et al.] // *Carbohydr. Res.* 2004. V. 339, № 11. P. 2037-2043.
- Čokrtová K., Mareš V., Křížek T. On-capillary fluorescent labeling of saccharides for capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2023. V. 44, № 1–2. P. 35-43.

21. Lenth R. V. Response-Surface Methods in R, Using rsm // *J. Stat. Softw.* 2010. V. 32. P. 1-17.
22. Kuhn M. Desirability package. [Электронный ресурс]: <https://github.com/topepo/desirability> (дата обращения: 03.04.2024).
23. Blanco D., Muro D., Mangas Alonso J. Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta.* 2001. V. 436, № 1. P. 173-180.

REFERENCES

1. Clemente-Suárez V.J., Mielgo-Ayuso J., Martín-Rodríguez A., Ramos-Campo, L. Redondo-Flórez D.J., Tornero-Aguilera J.F. The Burden of Carbohydrates in Health and Disease. *Nutrients*, 2022, vol. 14, no. 18, article 3809. doi:10.3390/nu14183809.
2. Yki-Järvinen H., Luukkonen P.K., Hodson L., Moore J.B. Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2021, vol. 18, no. 11, pp. 770-786. doi:10.1038/s41575-021-00472-y.
3. McCleary B.V., McLoughlin C., Charmier L.M.J., McGeough P. Measurement of available carbohydrates, digestible, and resistant starch in food ingredients and products. *Cereal Chem.*, 2020, vol. 97, no. 1, pp. 114-137. doi:10.1002/cche.10208.
4. Bolshakov D.S., Amelin V.G. Capillary electrophoresis in assessing the quality and safety of foods. *J. Anal. Chem.*, 2023, vol. 78, no. 7, pp. 815-855. doi:10.1134/s106193482307002x.
5. Jie L., Yuan Z., Yu Z., Xue-Song F. Progress in the pre-treatment and analysis of carbohydrates in food: An update since 2013. *J. Chromatogr. A*, 2021, vol. 1655, article 462496. doi:10.1016/j.chroma.2021.462496.
6. Kartsova L.A., Malushevskaya A.V., Kolobova E.A. Analytical Capabilities of the Determination of Carbohydrates by Chromatographic and Electrophoretic Methods. *J. Anal. Chem.*, 2023, vol. 78, no. 2, pp. 144-161. doi:10.1134/S1061934823020041.
7. Kurzyna-Szklarek M., Cybulska J., Zdunek A. Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates – an overview of methods. *Food Chem.*, 2022, vol. 394, article 133466. doi:10.1016/j.foodchem.2022.133466.
8. Mantovani V., Galeotti F., Maccari F., Volpi N. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides. *Electrophoresis*, 2017, vol. 39, no. 1, pp. 179-189. doi:10.1002/elps.201700290.
9. Kolobova E.A., Malushevskaya A.V., Kartsova L.A. Electrophoretic Determination of Carbohydrates in Samples of Natural Origin by an Indirect Detection Method. *J. Anal. Chem.*, 2024, vol. 79, no. 2, pp. 224-232. doi:10.1134/S1061934824020102.
10. Smolkova D., Cmelik R., Lavicka J. Labeling strategies for analysis of oligosaccharides and glycans by capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.*, 2023, vol. 163, article 117068. doi:10.1016/j.trac.2023.117068.
11. Guček M., Pihlar B. Capillary electrochromatography of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of some mono- and disaccharides. *Chromatographia*, 2000, vol. 51, no. 1, pp. S139-S142. doi:10.1007/BF02492796.
12. Honda S., Suzuki S., Taga A. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, vol. 30, no. 6, pp. 1689-1714. doi:10.1016/S0731-7085(02)00512-5.
13. 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, vol. 911, no. 2, pp. 259-267. doi:10.1016/S0021-9673(01)00516-7.
14. Wang W., Chen F., Zheng F., Russell B.T. Optimization of synthesis of carbohydrates and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) by response surface methodology (RSM) for improved carbohydrate detection. *Food Chem.*, 2020, vol. 309, article 125686. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125686.
15. Blanco D., Muro D., Gutiérrez M.D. A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 2004, vol. 517, no. 1, pp. 65-70. doi:10.1016/j.aca.2004.04.056.
16. Kwon H., Kim J. High Performance Liquid Chromatography of Mono- and Oligosaccharides Derivatized with P-Aminobenzoic Ethyl Ester on a C18-Bonded Silica Column. *J. Liq. Chromatogr.*, 1995, vol. 18, no. 7, pp. 1437-1449. doi:10.1080/10826079508010422.
17. Nguyen D.T., Lerch H., Zemmann A., Bonn G. Separation of derivatized carbohydrates by co-electroosmotic capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 1997, vol. 46, no. 3, pp. 113-121. doi:10.1007/BF02495320.
18. Molnár-Gábor D., Lengyel M., Krongaard T. Rapid method for quantitation of seven human milk oligosaccharides in infant formula and premix. *Carbohydr. Res.*, 2024, vol. 541, article 109149. doi:10.1016/j.carres.2024.109149.
19. Sjöberg J., Adorjan I., Rosenau T., Kosma P. An optimized CZE method for analysis of mono- and oligomeric aldose mixtures. *Carbohydr. Res.*, 2004, vol. 339, no. 11, pp. 2037-2043. doi:10.1016/j.carres.2004.06.003.
20. Čokrtová K., Mareš V., Křížek T. On-capillary fluorescent labeling of saccharides for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2023, vol. 44, no. 1-2, pp. 35-43. doi:10.1002/elps.202200136.
21. Lenth R.V. Response-Surface Methods in R, Using rsm. *J. Stat. Softw.*, 2010, vol. 32, pp. 1-17. doi:10.18637/jss.v032.i07.
22. Kuhn M. *Desirability package* (2018). Available at: <https://github.com/topepo/desirability> (accessed April 3, 2024).
23. Blanco D., Muro D., Mangas J. Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 2001, vol. 436, no. 1, pp. 173-180. doi:10.1016/S0003-2670(01)00889-3.