



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDROS**

Agnė Uscilaitė

Chemija

Magistro baigiamasis darbas

**LAKIŲJŲ RŪGŠČIŲ NUSTATYMAS VIRŠERDVĖS DUJŲ
CHROMATOGRAFIJOS METODU**

Darbo vadovas
asist. dr. Vilius Poškus

Vilnius 2024



VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES
INSTITUTE OF CHEMISTRY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

Agnė Uscilaitė

Chemistry
Master thesis

**DETERMINATION OF VOLATILE ACIDS USING
HEADSPACE GAS CHROMATOGRAPHY**

Scientific adviser
asist. dr. Vilius Poškus

Vilnius 2024

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	7
1. TRUMPOS GRANDINĖS RIEBALŲ RŪGŠTYS	8
1.1 Riebalų rūgštys	8
1.2 Šaltiniai ir paplitimas	9
1.2.1 Organizme	9
1.2.2 Maisto pramonėje	9
1.3 Svarba ir poveikis	11
1.3.1 Priešuždegiminis poveikis	11
1.3.2 Imunoreguliacinis poveikis.....	11
1.3.3 Nutukimą mažinantis poveikis	12
1.3.4 Kardioprotekcinis poveikis.....	12
1.3.5 Priešvėžinis poveikis	12
1.3.6 Svarba maisto pramonėje.....	12
2. TRUMPOS GRANDINĖS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ NUSTATYMO METODAI	14
2.1 Skysčių chromatografija	14
2.2 Kapiliarinė elektroforezė	15
2.3 Dujų chromatografija.....	17
2.3.1 Dujų chromatografija – masės spektrometrija.....	17
2.3.2 Viršerdvės dujų chromatografija	18
3. TRUMPOS GRANDINĖS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ CHROMATOGRAFIJOS MĖGINIŲ PARUOŠIMO BŪDAI	21
3.1 Skysčio-skysčio ekstrahavimas	21
3.2 Baltymų išsodinimas.....	21
3.3 Kietafazė ekstrakcija.....	22
3.3.1 Kietafazė ekstrakcija.....	22
3.3.2 Kietafazė mikroekstrakcija	22
3.3.3 Supakuoto pluošto kietafazė ekstrakcija.....	22
3.4 Derivatizacija.....	23
3.5 Tiesioginis nustatymas	24
4. EKSPERIMENTO METODIKA	25
4.1 Reagentai ir tirpalai	25
4.2 Aparatūra	25

4.3	Viršerdvės dujų chromatografinės analizės sąlygos	25
4.4	Mėginio paruošimas	26
5.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	27
5.1	Chromatografijos sąlygų optimizavimas	27
5.2	Analizės optimizavimas vandeniniame tirpale	28
5.3	Viršerdvės įvedimo sistemos sąlygų optimizavimas	31
5.4	Kalibracinės kreivės	32
	IŠVADOS	36
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	37
	SANTRAUKA	41
	SUMMARY	42

SANTRUMPOS

- AA – acto rūgštis (angl. *acetic acid*)
ABC – ATP surišančios kasetės (angl. *ATP binding cassette*)
BA – sviesto rūgštis (angl. *butyric acid*)
BGE – fono elektrolitas (angl. *background electrolyte*)
BMR – branduolių magnetinis rezonansas
BSTFA - N, O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamidas
CAR – karboksenas
CE – kapiliarinė elektroforezė (angl. *capillary electrophoresis*)
CYP7A1 – cholesterolio 7 alfa-hidroksilazė
CVD – kraujagyslių ligos (angl. *cardiovascular disease*)
DVB – divinilbenzenas
EI – elektronų srautas (angl. *electron*)
EOF – elektroosmosinis srautas (angl. *electro-osmotic flow*)
FA – riebalų rūgštys (angl. *fatty acids*)
FFAR2 – Laisvųjų riebalų rūgščių receptoriai 2
FID – liepsnos jonizacinis detektorius (angl. *flame ionization detector*)
GC – dujų chromatografija (angl. *gas chromatography*)
GLP-1 – į gliukagoną panašus peptidas 1
HDAC – histono deacetilazė
HPMEC – žmogaus plaučių mikrovaskulinių endotelio ląstelių (angl. *human pulmonary microvascular endothelial cells*)
HS – viršerdvė (angl. *headspace*)
IS – vidinis standartas (angl. *internal standard*)
IsoBA – izosviesto rūgštis (angl. *isobutyric acid*)
LA – pieno rūgštis (angl. *lactic acid*)
LC – skysčių chromatografija (angl. *liquid chromatography*)
LCFA – ilgos grandinės riebalų rūgštys (angl. *Long chain fatty acids*)
LDL – mažo tankio lipoproteinai (angl. *low-density lipoprotein*)
LLE – skysčio skysčio ekstrahavimas (angl. *liquid-liquid extraction*)
LOD – žemiausia aptikimo riba (angl. *Limit of Detection*)
LOQ – žemiausia kvantifikavimo riba (angl. *Limit of Quantitation*)
LPS – lipopolisacharidas
MCFA – vidutinės grandinės riebalų rūgštys (angl. *Medium chain fatty acids*)
MS – masių spektrometrija (angl. *mass spectrometry*)
MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoracetamidas
MUFA – mononesočiosios riebalų rūgštys (angl. *monounsaturated fatty acids*)
O-BHA – O-benzilhidroksilaminas
PA – propiono rūgštis (angl. *propionic acid*)
PAN/PEDOT – poliakrilnitrilas – poli(3,4-etilendioksitiofenas)
PDMS – polidimetiloksanas
PEG – polietilenglikolis
PFSPE – supakuoto pluošto kietos fazės ekstrakcija (angl. *Packed-fiber solid-phase extraction*)
PYY – peptidas YY

PPY – polipirolis
PUFA – polinesočiosios riebalų rūgštys (angl. *polyunsaturated fatty acids*)
ROS – reaktyviosios deguonies rūšys (angl. *reactive oxygen species*)
RP – atvirkštinė fazė (angl. *reverse phase*)
RSD – santykinis standartinis nuokrypis (angl. *relative standart deviation*)
SCFA – trumpos grandinės riebalų rūgštys (angl. *Short chain fatty acids*)
SIM – pasirinkto jono stebėseną (angl. *selected ion monitoring*)
SPE – kietos fazės ekstrahavimas (angl. *solid phase extraction*)
SPME – kietos fazės mikroekstrakcija (angl. *solid phase microextraction*)
SREBP2 – sterolius reguliuojančius elementus surišantis baltymas 2 (angl. *Sterol regulatory element-binding protein 2*)
TMS – trimetilsililas
UHPLC – itin aukšto našumo skysčių chromatografija (angl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*)
UV – ultravioletinė spinduliuotė
VA – valerijono rūgštis (angl. *valeric acid*)
WOA – silpnos organinės rūgštys (angl. *weak organic acids*)

IVADAS

Trumpos grandinės riebalų rūgštys (SCFA), dar vadinamos lakiosiomis riebalų rūgštimis, yra galutiniai endogeninės arba dietinės kilmės angliavandenių ir baltymų, kuriuos sukelia žarnyno bakterijos, fermentacijos produktai. Taip pat šios rūgštys yra naudojamos ir maisto pramonėje fermentacijoje bei kaip konservantai. SCFA turi įvairų poveikį organizmui, pvz., priešuždegiminį, imunoreguliacinį, priešvėžinį, širdies ir kraujagyslių sistemos apsauginį. Dėl šios rūgščių reikšmės yra svarbu sukurti pigų, greitą ir selektyvų aptikimo metodą, kuris gali identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti SCFA įvairiuose mėginiuose.

Savo svarba, SCFA sukėlė didelį susidomėjimą, todėl yra atlikta daug įvairių tyrimų, kaip nustatyti šias rūgštis įvairiuose mėginiuose. Dažniausiai yra naudojama dujų ar skysčių chromatografija, sujungta su skirtingais detektoriais, pvz., MS ar FID. Be šių pagrindinių metodų yra naudojama ir kapiliarinė elektroforezė. Tačiau, dėl savo lakumo bei sunkaus išskyrimo iš sudėtingų matricų, yra sukurti įvairūs mėginio paruošimo būdai – skysčio-skysčio ekstrahavimas, kietafazė ekstrakcija, derivatizacija, viršerdvės chromatografija. Kiekvienas šių būdų turi savų teigiamų ir neigiamų aspektų. Tačiau viršerdvės chromatografija parodė, kad mėginio paruošimas gali būti greitas ir nereikalaujantis daug pastangų, kas padaro šį metodą pranašesniu. Viršerdvės chromatografija yra ne tik paprastas metodas, bet ir turintis didelę skiriamąją gebą, selektyvus bei jautrus analizės metodas.

Darbo tikslas: įvertinti pastovaus slėgio viršerdvės dujų chromatografinės sistemos galimybes nederivatizuotų laisvųjų rūgščių nustatymui vandeniniuose tirpaluose.

Uždaviniai:

1. Optimizuoti dujų chromatografijos sąlygas nederivatizuotų lakiųjų rūgščių atskyrimui.
2. Ištirti įvairių druskų įtaką lakiųjų rūgščių perėjimui iš vandeninės terpės į mėginio viršerdvę.
3. Optimizuoti pastovaus slėgio viršerdvės mėginio įvedimo sąlygas ir įvertinti metodo matavimo ribas.

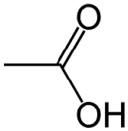
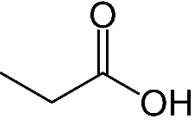
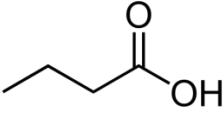
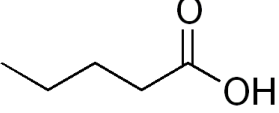
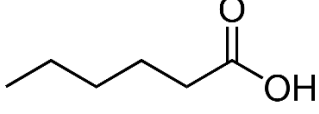
1. TRUMPOS GRANDINĖS RIEBALŲ RŪGŠTYS

1.1 Riebalų rūgštys

Riebalų rūgštys yra alifatinės karboksirūgštys, sudarytos iš įvairaus ilgio anglies grandinių ir įvairaus neprisotinimo laipsnio, kurios baigiasi karboksilo grupe. Anglies grandinės dalis gali būti trumpa (2-6 anglies atomai) – SCFA, vidutinė (8-12 anglies) – MCFA, ilga (14-18 anglies atomų) – LCFA ir labai ilga. Riebalų rūgštys toliau gali būti skirstomos į prisotintas, neturinčias nei vieno dvigubą ryšio, arba į nesočiąsias ir turėti vieną ar daugiau dvigubų nesočiųjų jungčių. Atsižvelgiant į neprisotinimų skaičių, angliavandenilių grandinė gali būti sudaryta iš mononesočiųjų riebalų rūgščių (MUFA) arba polinesočiųjų riebalų rūgščių (PUFA). Jos visos dalyvauja energetinėje, medžiagų apykaitos ir struktūrinėje veikloje. Trumposios grandinės riebalų rūgštys veikia kaip augimo faktoriai; vidutinės grandinės riebalų rūgštys yra lengvai prieinamos kaip energijos šaltinis; sočiosios ilgos grandinės riebalų rūgštys yra energijos šaltinis, bet gali būti susijusios su aterosklerozinio proceso vystymusi; nesočiosios ilgos grandinės riebalų rūgštys apima oleino rūgštį ir nepakeičiamas riebalų rūgštis (linoleatą ir linolenatą), ir visos jos yra susijusios su pagrindiniais medžiagų apykaitos procesais; labai ilgos grandinės riebalų rūgštys yra būdingiausios biologinių membranų molekulės [1].

Trumpos grandinės riebalų rūgštys, taip pat žinomos kaip lakiosios riebalų rūgštys, susideda iš karboksilo grupės (COOH), susijungusios per anglies-anglies ryšius su 1–5 papildomų anglies atomų grandinėmis ir žymimos C2 (acto rūgštis), C3 (propiono rūgštis), C4 (sviesto rūgštis), C5 (valerijono rūgštis) ir C6 (kaprono rūgštis) (1 lentelė) [2,3]. Tarp jų acetatas, propionatas ir butiratas yra trys pagrindiniai SCFA, kurie sudaro 90-95% žarnyno mikrobiotos pagamintų SCFA [3,4].

1 lentelė. Trumpos grandinės riebalų rūgštys

Rūgštis	Anglies atomų skaičius	Struktūra	pKa
Acto rūgštis	2		4.76
Propiono rūgštis	3		4.87
Sviesto rūgštis	4		4.84
Valerijono rūgštis	5		4.82
Kaprono rūgštis	6		4.88

1.2 Šaltiniai ir paplitimas

1.2.1 Organizme

Žarnyno mikrobiota ir jų metabolitai gali atlikti svarbų vaidmenį žmonių sveikatai ir ligoms [4]. Virškinamajame trakte fermentuojami biologiškai aktyvūs junginiai, tokie kaip trumpos grandinės riebalų rūgštys ir amoniakas, gali turėti įtakos sveikatai [5]. Trumposios grandinės riebalų rūgštys (SCFA) daugiausia gaminamos žarnyno mikrobiomui fermentuojant maistines skaidulas, angliavandenius ir kitas augalinės kilmės maistines medžiagas žarnyne (polisacharidus, krakmolą ir net endogeninius glikanus), taip pat gali būti gaminamos odos ir makšties bakterijų [4–7]. Maistinės skaidulos yra pagrindiniai SCFA šaltiniai ir gali būti skirstomi į tirpias (pvz., pektinus ir inulinas) ir netirpias maistines skaidulas (pvz., įvairių formų atsparių krakmolų) [2,4]. Virškinimui atsparūs angliavandeniai ir tie, kurie nepasisavinami plonojoje žarnoje, yra prieinami storosios žarnos bakterijų fermentacijai, dėl kurios susidaro šios rūgštys. Baltymų ir peptidų virškinimas taip pat padidina SCFA gamybą. Apie 80–90% SCFA absorbuojama storosioje žarnoje per protonuotą SCFA difuziją ir anijonų mainus, o likusi dalis pašalinama su išmatomis [6].

Fermentacijos produktai gali skirtis kokybiškai ir kiekybiškai, ypač storosioje žarnoje. Fermentacijos metabolitų koncentracijos yra glaudžiai susijusios su mikrobų aktyvumu, kuris vyksta įvairiose virškinimo sistemose [3]. Sveikų asmenų gaminamų SCFA kiekis ir tipas priklauso nuo gaubtinėje žarnoje esančios mikrobiotos rūšies ir kiekio, pH vertės, substrato šaltinio ir jo prieinamumo ir žarnyno tranzito laiko, kadangi fermentacijai naudojami substratai palaiptai išsenka [3,4,6]. Kombinuotų SCFA koncentracija gaubtinėje žarnoje gali siekti net 150 mM, todėl jos yra vienos iš gausiausių bakterijų metabolitų storosioje žarnoje [2]. Be to, šeimininko fiziologija, tokia kaip žarnyno aplinka, mikrobų ir šeimininko sąveika ir net socialinis stresas, gali turėti įtakos SCFA gamybai [4]. Pavyzdžiui, tyrime nustatyta, kad streso poveikis sumažino gaubtinės žarnos SCFA kiekį pelėse, moduliudamas žarnyno mikrobiotą, pvz., sumažindamas SCFA gaminančių *Anaerostipes*, *Butyricoccus*, *Coprococcus* ir *Parabacteroides* gentis, taip pat padidindamas *Odoribacter* gausą [4,8]. Be to, daugiau nei 90% SCFA yra absorbuojami iš žarnyno ertmės ir metabolizuojami kolonocituose arba kepenyse. Butiratas yra svarbus kolonocitų energijos šaltinis, todėl tik nedidelis butirato kiekis pasiekia kepenų sistemą, o kiti absorbuoti SCFA, kurių kolonocitai nemetabolizuoja, ypač acetatas ir propionatas, gali pasiekti kepenis per vartų veną. Kepenys yra pagrindinė SCFA metabolizmo vieta žmonėms, nes maždaug 40 % acetato ir 80 % propionato vartų venoje pasisavinama ir metabolizuojama kepenyse. Be to, nedidelė dalis SCFA tiesiojoje žarnoje gali apeiti kepenis ir patekti tiesiai į sisteminę kraujotaką per vidinę klubinę veną [4].

1.2.2 Maisto pramonėje

Jogurtas neabejotinai yra vienas iš labiausiai paplitusių fermentuojamų produktų, gaunamas fermentuojant pieną specifiniais bakterijų kamienais, galinčiais jį fermentuoti skaidant molekulinis ryšius su cukrumi, daugiausia su laktoze, ir gaminant rūgštis (daugiausia pieno rūgštį), o dėl to koaguliuoja baltymai, kurie sutirština matricą. Be gerai žinomo teigiamo jogurto vartojimo poveikio žmonių sveikatai, nedaug tyrimų skirta SCFA kiekiui raugintame piene įvertinti [9]. Buvo įrodyta, kad ožkų piene, raugintame su *Lactobacillus rhamnosus* GG, bendras SCFA kiekis buvo reikšmingai didesnis nei nefermentuotame ožkų piene ($p < 0,05$). Kita vertus, ilgų grandinių riebalų

rūgščių (LCFA) kiekis palaipsniui mažėjo, o tai rodo, kad už LCFA hidrolizę gali būti atsakinga lipoproteinų lipazė, dėl kurios susidaro ir SCFA, ir vidutinės grandinės riebalų rūgštys [10].

Visame pasaulyje tradiciškai gaminama ir vartojama daug fermentuotų gėrimų, daugiausia alkoholinių. Tarp jų svarbią vietą užima alus. Įrodyta, kad fermentacijos metu SCFA koncentracija gerokai padidėja - nuo 1,2-2,2 mg/l iki 2,3-8,1 mg/l. Atrodo, kad pradiniai alaus gamybos proceso etapai taip pat gali turėti įtakos SCFA kiekiui galutiniame produkte. Visų pirma, kai naudojamas infuzinis rauginimas, bendras SCFA, daugiausia butiratų, kiekis yra didesnis, palyginti su nuoviru [11].

Dėl didelio cukraus ir nesuvirškinamų angliavandenių kiekio vaisiai gali būti laikomi viena geriausių žaliavų fermentuotiems produktams gaminti. Nustatyta, kad žalių gvajavos vaisių fermentacija su *L. plantarum* gerokai padidino butirato kiekį, palyginti su nefermentuota kontrole (nefermentuota: $1,30 \pm 0,39$ ng/100 ml; fermentuota: $17,85 \pm 0,68$ ng/100 ml) [12]. Tai rodo, kad vaisių angliavandeniai gali būti naudingas substratas bakterinei fermentacijai, dėl kurios padidėja biologiškai aktyvių galutinių produktų, įskaitant SCFA, gamyba. Panašiai kaip ir vaisiai, daržovės taip pat gali būti laikomos gera žaliava fermentuotiems produktams gaminti. Neseniai atlikto tyrimo duomenimis, *L. rhamnosus GG* fermentuotose morkų sultyse, palyginti su nefermentuotomis, gerokai padaugėjo SCFA (nefermentuotose morkų sultyse: acetato $0,16 \pm 0,02$ mg/ml, propionatas $0,51 \pm 0,07$ mg/ml, butiratas $0,64 \pm 0,11$ mg/ml; fermentuotos morkų sultys: acetatas $0,42 \pm 0,05$ mg/ml, propionatas $0,72 \pm 0,09$ mg/ml, butiratas $0,995 \pm 0,09$ mg/ml; $p < 0,05$). Be to, šiuo atveju mitybos skaidulų fermentacija buvo laikoma pagrindiniu padidėjusios SCFA gamybos mechanizmu [13].

Taigi, SCFA kiekis fermentuotuose produktuose yra didesnis nei nefermentuotuose produktuose, pripažįstant, kad mikroorganizmai atlieka svarbų vaidmenį metabolizuojant maisto matricas, gaminant ir išskiriant biologiškai aktyvias medžiagas [9].

Įvairios mažos silpnos organinės rūgštys (WOA) buvo naudojamos kaip maisto konservantai labai ilgą laiką. Šios silpnos rūgštys sulėtina įvairių gendančių bakterijų, mielių ir pelėsių augimą, neturėdamos akivaizdaus nepageidaujamo poveikio skoniu ar toksiškos vartotojui. Nedisocijuotos WOA konservantų forma veiksmingiau sulėtina augimą nei disocijuota forma, nors pastaroji gali turėti tam tikrą toksiškumo lygį. Taigi WOA yra veiksmingiausi, kai naudojami esant žemoms pH vertėms, mažesnėms nei jų pKa vertė. Manoma, kad tokiomis sąlygomis neutrali rūgštis difunduoja per plazmos membraną ir disocijuoja citozolyje, kurio pH paprastai yra didesnis. Tokiu būdu protonų gradientas virš membranos yra išikvotas ir anijonas gali kauptis iki potencialiai toksiško lygio ląstelės viduje. Tai žinoma kaip klasikinė silpnų rūgščių konservantų teorija [14]. Viena iš dažniausiai naudojamų WOA konservantų yra acto rūgštis, kuri yra naudojama kaip pelėsių inhibitorius, jos yra fermentuotuose maisto produktuose, taip pat nesunku gauti komerciškai. Acto rūgšties slopinamasis poveikis pagrįstas „silpnų rūgščių konservantų teorija“ [15].

Propiono (propano) rūgštis (E280) ir jos natrio (E281), kalcio (E282) ir kalio (E283) druskos yra konservantai, kurių galima dėti į miltus, kad būtų slopinamas *Bacillus subtilis* augimas duonos gaminiuose ir tam tikruose miltiniuose konditerijos gaminiuose. Šio mikroorganizmo sporos yra atsparios karščiui ir, jei joms leidžiama sudygti, duona gali tapti „lynė“. Tokia duona turi irstančių vaisių kvapą ir atsiranda geltonai rudų dėmių, kurios yra aiškiai lipnios liesti. Propionatai taip pat naudojami siekiant stabdyti pelėsių augimą, nesukeliant reikšmingo mielių raugo aktyvumo sumažėjimo ir nepažeidžiant duonos organoleptinių savybių [16].

1.3 Svarba ir poveikis

Pastaraisiais metais daug tyrimų įrodė, kad žarnyno mikrobiota ir jos metabolitai atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį žmonių sveikatai. Žarnyno mikrobiotos kilmės SCFA parodė įvairų biologinį poveikį šeiminkui, pvz., priešūždegiminį, imunoreguliacinį, nutukimą mažinantį, priešvėžinį, širdies ir kraujagyslių sistemos apsauginį, hepatoprotekcinį ir neuroprotektinį poveikį. SCFA vaidmuo žmonių sveikatai ir ligoms tapo mokslinių tyrimų tašku [4]. Dėl trumpos grandinės riebalų rūgščių biologinės reikšmės svarbu sukurti pigų, veiksmingą, jautrų, greitą ir selektyvų aptikimo metodą, galintį identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti SCFA sudėtinguose biologiniuose mėginiuose [5,6].

Taip pat vis daugiau tyrimų rodo, kad fermentacija, istoriškai naudota greitai gendančių maisto produktų konservavimui, gali būti laikoma naudinga priemone fermentuotų produktų maistinei vertei padidinti, nes padidėja biologiškai aktyvių junginių, įskaitant trumposios grandinės riebalų rūgštis, kaip galutiniai bakterijų produktai, kurių teigiamas poveikis žmogaus sveikatai yra gerai žinomas [9].

1.3.1 Priešūždegiminis poveikis

Uždegimas yra susijęs su daugelio ligų atsiradimu ir vystymusi. Pastaraisiais metais daugelis tyrimų parodė, kad SCFA gali sumažinti uždegiminių veiksnių gamybą keliais signalizuojančiais būdais. SCFA susilpnino uždegiminį atsaką, sumažindami prouždegiminių mediatorių gamybą ir padidindami priešūždegiminių mediatorių gamybą [4]. Tyrimas parodė, kad propionatas ir butiratas sumažino ląstelių uždegimą, slopindami interleukino (IL)-6, reaktyviųjų deguonies rūšių (ROS) ekspresiją, taip pat sustiprindami IL-10 ekspresiją [17]. Taip pat butiratas susilpnino lipopolisacharido (LPS) sukeltą uždegimą, padidindamas IL-10 reguliavimą esant septiniam šokui [18]. LPS gydytų naujagimių pelių modelyje natrio propionatas sumažino plaučių uždegimą ir oksidacinį stresą; LPS gydytame žmogaus plaučių mikrovaskulinių endotelio ląstelių (HPMEC) modelyje natrio propionatas ne tik pagreitino Nrf2 branduolio translokaciją, apsaugojo ląsteles ir skatino angiogenezę, bet ir sumažino uždegiminį atsaką per NF- κ B kelią [19]. Be to, kai kurie SCFA turėjo sudėtingų dvikrypčių reguliavimo savybių. Nustatyta, kad acetato lygis neigiamai koreliavo su priešūždegiminiu biomarkeriu interferonu- γ (IFN- γ), o butirato ir valerato lygis teigiamai koreliavo su IFN- γ ir naviko nekrozės faktoriumi- α (TNF- α) [4].

1.3.2 Imunoreguliacinis poveikis

Trumposios grandinės riebalų rūgštys gali reguliuoti įgimtų imuninių ląstelių, tokių kaip dendritinės ląstelės, funkciją dalyvauti imuninėje sistemoje [4]. Taikant ovalbumino sukeltą alerginių pelių modelį, maisto papildas su SCFA gali užkirsti kelią vankomicino sukulto plaučių uždegimo paūmėjimui, nes susilpnina dendritinių ląstelių migraciją ir aktyvaciją [20]. Taip pat skatintų T ir B ląstelių diferenciaciją, kad būtų reguliuojamas antigeniui būdingas adaptyvus imunitetas. SCFA imunoreguliacinis poveikis daugiausia pasiekiamas tiesiogiai sujungiant specifinį SCFA su G baltymu susietą receptorių (pvz., GPR41) ant ląstelės paviršiaus ir patenkant į ląsteles, kad reguliuotų ląstelių metabolizmą ir slopintų histono deacetilazę (HDAC) [21].

1.3.3 Nutukimą mažinantis poveikis

Nutukimas atsiranda dėl energijos suvartojimo ir jo disbalanso, o trumposios grandinės riebalų rūgštys vaidina pagrindinį vaidmenį jį valdant [4]. Tyrimai rodo, kad motinos pieno SCFA apsaugo nuo per didelio kūdikių svorio padidėjimo [22]. SCFA reguliuoja apetitą tokiais mechanizmais kaip vagalinis aferentinis aktyvavimas, o butiratas yra veiksmingiausias [23]. SCFA taip pat daro įtaką sotumo hormonams, tokiems kaip į gliukagoną panašus peptidas 1 (GLP-1), peptidas YY (PYY) ir leptinas, mažindami apetitą ir riebalų kaupimąsi moduluodami genus ir hormonus. SCFA slopina lipogenezę, mažina trigliceridų kaupimąsi ir skatina baltojo riebalinio audinio rudumą – visa tai prisideda prie nutukimo mažinimo [24].

1.3.4 Kardioprotekcinis poveikis

Širdies ir kraujagyslių ligos (CVD) yra pagrindinė pasaulinė sveikatos problema, kuriai būdingas didelis sergamumas ir mirtingumas. Trumposios grandinės riebalų rūgštys siūlo apsauginį poveikį nuo CVD įvairiais mechanizmais [4].

SCFA mažina aterosklerozę, nes slopina cholesterolio absorbciją žarnyne. Butiratas ir propionatas reguliuoja cholesterolio pernešėjus, tokius kaip Npc111 (pagrindinis cholesterolio pernešėjas žarnyne) ir ATP surišančios kasetės (ABC) transporterius, mažindami aterosklerozinius pažeidimus. Jie taip pat sumažina bendrą cholesterolio kiekį plazmoje, didindami tulžies rūgšties išsiskyrimą su išmatomis ir reguliuodami genus, tokius kaip sterolius reguliuojančius elementus surišantis baltymas 2 (SREBP2), mažo tankio lipoproteinų (LDL) receptorius ir cholesterolio 7 alfa-hidroksilazę (CYP7A1) [25].

SCFA taip pat turi antihipertenzinį poveikį. Acetatas, butiratas ir propionatas mažina kraujospūdį. Acetatas palaiko kraujagyslių susiaurėjimą ir vazodilatacijos pusiausvyrą per SCFA receptorius, užkertant kelią didelės fruktozės dietos sukeltai hipertenzijai. Propionatas palengvina širdies hipertrofiją, fibrozę ir kraujagyslių disfunkciją, daugiausia per Treg ląsteles [4,26,27].

1.3.5 Priešvėžinis poveikis

Trumposios grandinės riebalų rūgštys parodė priešvėžinį poveikį įvairiais mechanizmais. SCFA slopina gimdos kaklelio vėžio ląstelių dauginimąsi, sumažindami laisvųjų riebalų rūgščių receptoriaus 2 (FFAR2) ekspresiją ir slopina gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio vystymąsi, sukeldami ląstelių ciklo sustabdymą [28,29]. Jie taip pat sumažina su kolitu susijusį gaubtinės ir tiesiosios žarnos naviko dažnį ir dydį, pagerindami gaubtinės žarnos uždegimą ir mažindami ląstelių dauginimąsi. Be to, propionatas ir butiratas sumažina plaučių metastazes melanomos atveju, padidindami CCL20 ekspresiją ir sumažindami Th17 ląstelių įdarbinimą. Valerijono rūgštis slopina kepenų vėžio ląstelių kolonijų susidarymą, migraciją ir invaziją in vitro ir slopina kepenų ląstelių karcinomos vystymąsi in vivo, pagerindama išgyvenamumą. Pentanoatas ir butiratas padidina vėžio imunoterapijos veiksmingumą perprogramuodami citotoksinius T limfocitus ir chimerinių antigenų receptorių T ląsteles [4].

1.3.6 Svarba maisto pramonėje

Fermentacija istoriškai buvo naudojama kaip greitai gendančių maisto produktų galiojimo laiko prailginimo strategija [30]. Laikui bėgant fermentuotų maisto produktų ir gėrimų gamyba bei

vartojimas labai išaugo dėl jų savito ir vertinamo skonio bei pripažintos naudos sveikatai. Pastaraisiais dešimtmečiais moksliniai tyrimai sutelkė dėmesį į naudingąsias fermentuotų maisto produktų ir gėrimų savybes ir jų poveikį žmonių sveikatai [13]. Be gerai žinomo jų vaidmens virškinamojo trakto srityje, daugėja įrodymų, kad šios klasės produktai gali pagerinti keletą medžiagų apykaitos rodiklių, įskaitant glikemiją, lipidemiją ir oksidacinį stresą, kaip parodė in vivo tyrimai su gyvūnais [31,32].

Pažymėtina, kad fermentacija buvo nurodyta kaip priemonė maisto produktų ir gėrimų maistinei vertei padidinti, nes padidėja biologiškai aktyvių junginių (t. y. polifenolių) biologinis prieinamumas ir susidaro sveikatai palankūs galutiniai produktai, tokie kaip SCFA. Iš pastarųjų, trumposios grandinės riebalų rūgštys pastarąjį dešimtmetį tampa vienais iš labiausiai tiriamų junginių dėl įrodyto teigiamo poveikio žmogaus sveikatai [33].

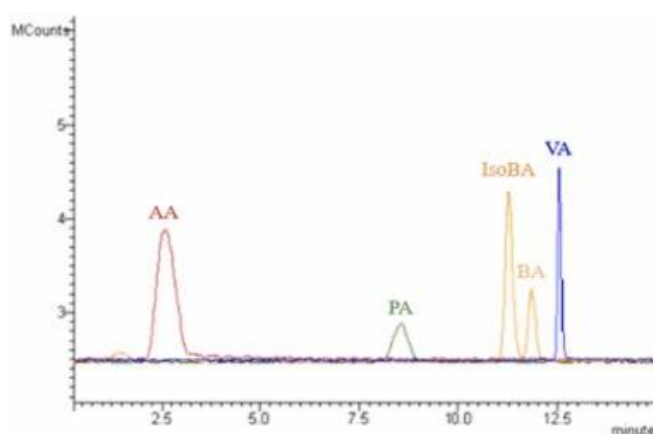
2. TRUMPOS GRANDINĖS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ NUSTATYMO METODAI

Tinkamas metodas, naudojamas SCFA analizei, paprastai priklauso nuo tyrimo tikslo ir yra atliekamas kaip metabolomikos dalis bei maisto pramonės procesuose fermentuojant [34,35]. Įvairuose mėginiuose SCFA nustatyti naudojami skirtingi atskyrimo metodai, dažniausiai dujų chromatografija (GC), sujungta su skirtingais detektoriais [6].

2.1 Skysčių chromatografija

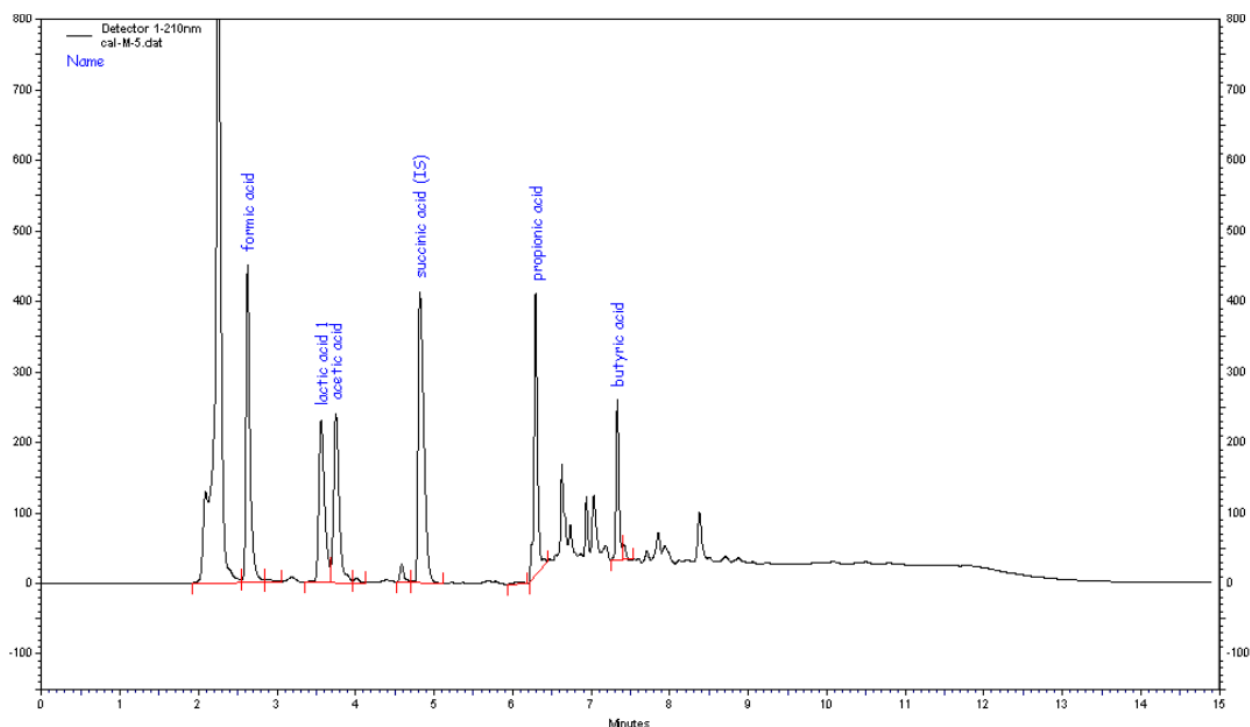
Kaip alternatyva dujų chromatografijai, egzistuoja trumpos grandinės riebalų rūgščių analizės būdas naudojant skysčių chromatografiją (LC). LC-MS sistemos naudojimas pagerina nustatymo jautrumą ir selektyvumą. Be to, patobulinius LC metodus (pvz., įdiegus itin aukšto našumo skysčių chromatografiją – UHPLC), analizės laikas žymiai sutrumpėja neprarandant skiriamosios gebos. Apskritai kūno skysčių LC-MS analizės populiarumas vis dar auga. Taip yra dėl daugybės privalumų, tokių kaip suderinamumas su biologiniais mėginiais, didelis jautrumas, galimybė gauti spektrinę informaciją, leidžiančią apibūdinti analitę, naudojimo paprastumas, platus prieinamumas klinikinėse laboratorijose. Tačiau tiesioginė SCFA analizė LC-MS metodu praktiškai neįmanoma dėl labai prasto jonizacijos efektyvumo. Pagrindinis derivatizacijos procedūros tikslas prieš savo analizės etapą yra analičių chromatografinės elgsenos ir MS aptikimo savybių pagerinimas [35].

Viename iš tyrimų buvo sėkmingai sukurtas paprastas ir patikimas atvirkštinės fazės LC-MS/MS metodas pagrindinių SCFA kiekiui žmogaus, žiurkių ir pelių plazmoje nustatyti. Optimizuotas derivatizavimas, mėginio paruošimas ir LC-MS / MS leido sukurti metodą, kuris buvo patikimas analizuojant SCFA koncentraciją skirtingose plazmos matricose. Kaip derivatizavimo agentas, naudotas O-benzilhidroksilaminas (O-BHA), kartu su skysčio-skysčio ekstrakcija. Analizė optimizuota naudojant anksčiau susintetintus ir kaip standartus naudotus SCFA darinius, kurie buvo charakterizuoti BMR spektroskopija. Analizė buvo atliekama naudojant C18 kolonėlę gradientiniu eliuavimu (tirpiklis A: H₂O, tirpiklis B: acetonitrilas, abu parūgštinti skruzdžių rūgštimi 0,1 % v/ v). Buvo ištirtas kiekvienos analitės (AA, PA, IsoBA, BA ir VA) suskaidymas, siekiant nustatyti geriausią produkto jonų kiekybiniam įvertinimui (1 pav.). Kiekvieno SCFA MS-MS suskirstymas parodė intensyviausią signalą esant m/z 91, atitinkantį benzilo grupės išsiskyrimą. O valerijono rūgštis rodė gausiausią signalą esant m/z 124, atitinkantį O-benzilhidroksilamino grupės išsiskyrimą [36].



1 pav. SCFA metanolio tirpalo LC-MS/MS chromatograma, kiekvienos rūgšties koncentracija yra 200 μM

Taip pat yra sukurtas greitas ir jautrus HPLC-UV metodas, skirtas kiekybiniam keturių trumposios grandinės riebalų rūgščių (SCFA) ir pieno rūgšties (LA), susidarantių *in vitro* fermentacijos metu, nustatymui. SCFA ekstrahavimas iš bakterijų kultūrų supernatantų pasunkėja dėl jų poliškumo ir nepastovumo. Aptikimas gali būti atliekamas tik esant trumpam neselektyvaus UV bangos ilgiui (210 nm), nes nėra reikšmingo chromoforo. Todėl ypatingas dėmesys buvo skiriamas mėginio paruošimo procedūros optimizavimui ir HPLC-UV sąlygoms. Galutinę ekstrahavimo procedūrą sudarė skysčio ir skysčio atgalinis ekstrahavimas naudojant dietileterį. Analizė atliekama naudojant C18 3 µm dalelių dydžio kolonėlę ir rūgštinės terpės mobilią fazę, sudaryta iš 20 mM NaH₂PO₄ ir koreguota iki pH 2,2 su fosforo rūgštimi (A) ir acetonitrilu (B). Chromatografija trunka vos 15 min, kas reiškia, kad per dieną galima išanalizuoti nemažą kiekį mėginių (2 pav.). Taip pat nereikia atlikti derivatizacijos, kas padaro šį metodą paprastu ir pigiu [37].



2 pav. Didelės terpės mėginio (SCFA ir LA koncentracija 25 mM) HPLC-UV analizės chromatograma, naudojant C18 kolonėlę, kurios dalelių dydis yra 3 µm [37]

2.2 Kapiliarinė elektroforezė

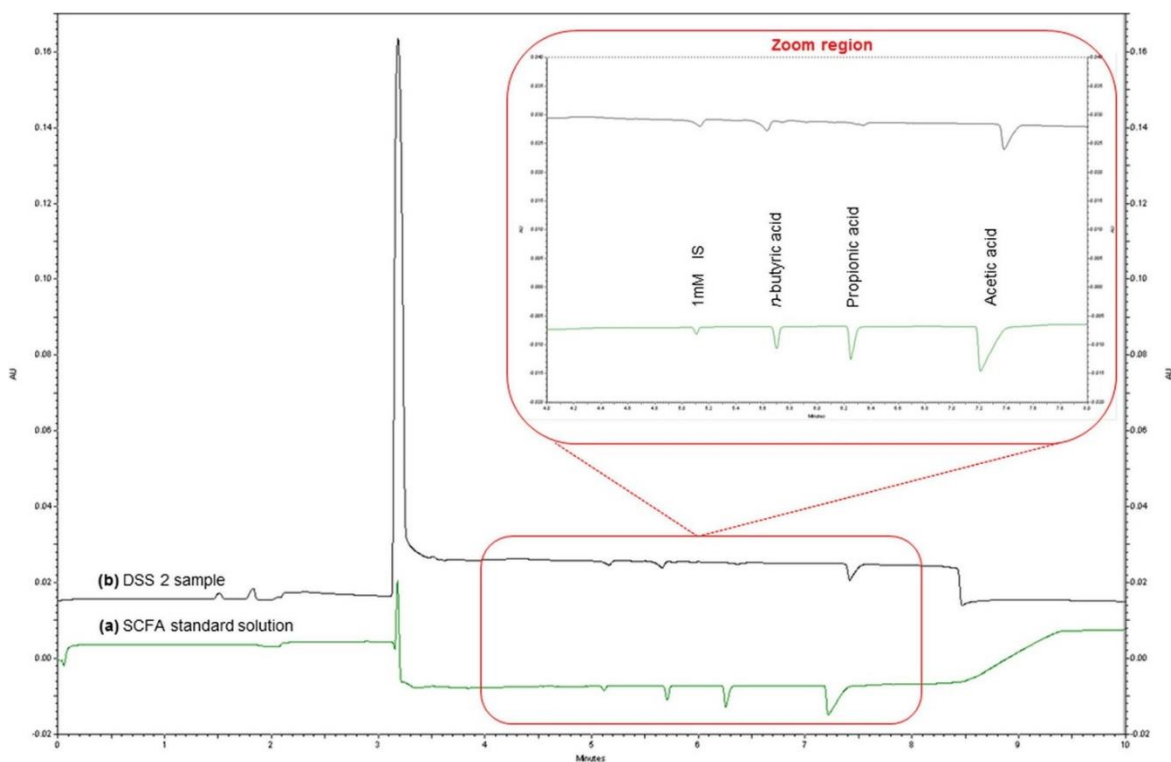
Kapiliarinė elektroforezė (CE) yra atskyrimo metodas, pagrįstas krūvį turinčių junginių judėjimu skystoje terpėje, kai veikiama elektros įtampa [38,39]. Tai yra universalus metodas, kuriuo galima atskirti daugybę analizių – neorganinių jonų, mažų molekulių, peptidų, taip pat ir didelių baltymų. CE yra veiksminga alternatyva ir (arba) papildymas pageidaujamos HPLC ir GC technikoms [35]. Palyginti su chromatografijos metodais, CE turi tam tikrų pranašumų, tokių kaip maža analizės kaina, mažesnis mėginio ir tirpiklio suvartojimas ir mažas zonos išplėtimas, užtikrinantis didelę smailės skiriamąją gebą [38,39].

Buvo sukurtas trumpos grandinės organinių rūgščių (įskaitant keturias SCFA) analizės CE-UV metodas, pagrįstas atskyrimu poliakrilamidu dengtame kapiliare, o atskyrimo terpę sudarė 234 mM fosforo rūgšties (pH 6,1 koreguota NaOH) ir 12 % metanolio. CE-UV keturiems tirtiems SCFA pasiūlė kiekybinio įvertinimo (LOQ) ribą nuo 16,1 iki 49,6 µM. Be to, metodas buvo

apibūdintas kaip greitas ir paprastas, mėginio išankstinis apdorojimas reikalauja tik ekstrakcijos vandenius ir tolesnio tiesioginio įvedimo į CE analizatorių [35].

Taip pat buvo sukurtas ir kitas greitas ir nebrangus kapiliarinis elektroforezinis (CE) metodas acto, propiono ir sviesto rūgštims pelių išmatose (100 mg mėginio) nustatyti. Mėginių pH koreguotas iki 2–3, naudojant druskos rūgšties tirpalą, tuomet mėginiai skiesti 1:10 fono elektrolitu (BGE) ir pastoviu slėgiu įvesti į kapiliarinę elektroforezės sistemą. Kiekvieno mėginio analizė buvo atlikta trimis pakartojimais, naudojant lydytą silicio dioksido kapiliarą. Taikoma +25 kV įtampa. Kaip elektrolitų sistema buvo panaudota 160 mmol/L tris(hidroksimetil)aminometano: 10 mmol/L benzenkarboksirūgšties tirpalo, kurio pH 8,5. Analičių fiksavimas buvo atlikta naudojant ultravioletinį (UV) detektorių esant 228 nm bangos ilgiui. Buvo tiriami ir kiti bandos ilgiai nuo 200 iki 300 nm. Kiekybinis įvertinimas buvo atliktas 228 nm bangos ilgyje, nes tai parodė gerą kompromisą tarp jautrumo ir trikdžių signalo nebuvimo. Tinkamas SCFA smalių atskyrimas buvo pasiektas per 10 min [40].

Skirtingai nuo chromatografijos metodų, atskyrimo mechanizmas CE yra pagrįstas analičių mobilumu kapiliare. Kai įtampa yra tiekama išilgai silicio dioksido kapiliaro, susidaro dvigubas elektrinis sluoksnis ir sukuria elektroosmosinį srautą (EOF), kuris yra atsakingas už katijonų ir anijonų nukreipimą link katodo. Todėl SCFA atskyrimas priklauso nuo jų elektroforetinio judrumo, kuris yra proporcingas jono krūviui ir atvirkščiai proporcingas molekulinėi masei, molekulinės formai (skersmeniui). Esant pH 8,5, SCFA egzistuoja anijonine forma, o tai reiškia, kad analizė, kurios molekulinė masė mažesnė, bus paskutinė, kuri migruos iš kapiliaro ir turės ilgiausią migracijos laiką (T_m). Todėl buvo pastebėta tokia migracijos tvarka: EOF žymuo ($T_m = 3,54$ min.); 2-etilsviesto rūgštis ($T_m = 5,93$ min.); sviesto rūgštis ($T_m = 6,74$ min.); propiono rūgštis ($T_m = 7,54$ min.) ir acto rūgštis ($T_m = 8,72$ min.) [40].



*Concentrations: 1 mM IS (2-ethylbutyric acid); 4.0 mM *n*-butyric acid; 6.5 mM propionic acid and 20mM acetic acid.

3 pav. Elektroferograma, gauta a) etaloninio tirpalo ir b) dekstrano natrio sulfato mėginio SCFA mišiniui [40]

2.3 Dujų chromatografija

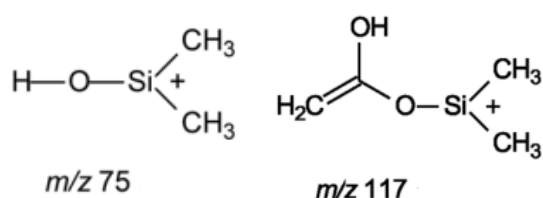
Dujų chromatografija (GC), sujungta su įvairių tipų detektoriais (pvz., liepsnos jonizacijos detektoriumi – FID, MS), yra dažniausiai naudojamas organinių rūgščių analizės metodas biologiniuose mėginiuose. GC-FID yra įprastas metodas, naudojamas SCFA analizėje. FID aptikimas siūlo platų tiesiškumo ir tikslumo intervalą, nebrangias sąnaudas, taip pat galimybę aptikti įvairias organinių junginių koncentracijas. Kitas variantas – GC-MS jungtis, kuri padidina jautrumą ir selektyvumą bei galimybę vienareikšmiškai identifikuoti žinomą / nežinomą analitę, atsižvelgiant į tai, kad yra daug masių spektrinių bibliotekų ir duomenų bazių [35].

2.3.1 Dujų chromatografija – masės spektrometrija

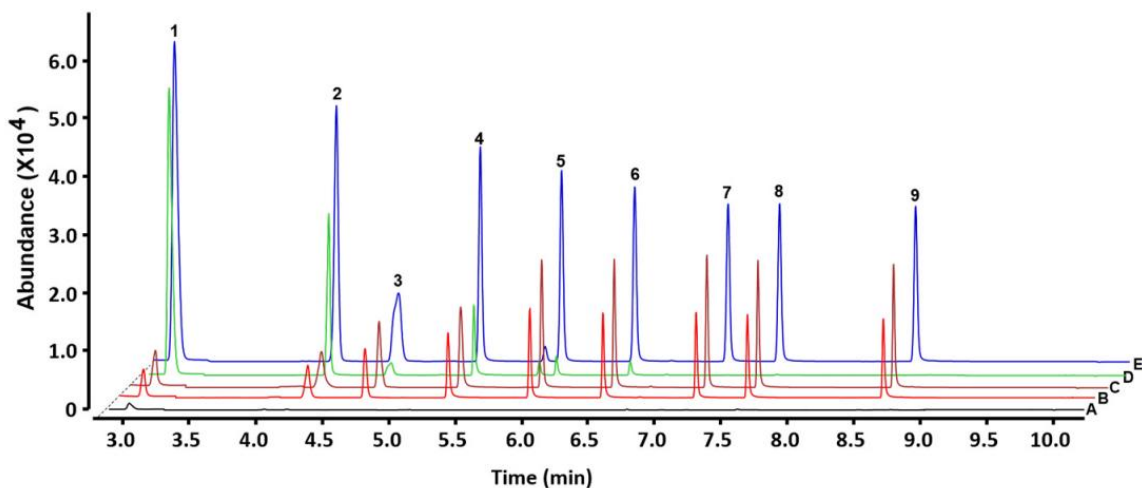
GC-MS yra analizės metodas, puikiai tinkantis SCFA ir kitų (ilgesnių) riebalų rūgščių (FA) analizei. Tačiau vienas iš kritinių FA GC-MS analizės žingsnių yra jų pavertimas tinkamais lakiisiais dariniais derivatizavimo būdu (pvz., alkilinant arba sililinant) [41].

Buvo sukurtas greitas, patogus ir patikimas SCFA profiliavimo mažuose išmatų ir serumo mėginių kiekiuose GC/MS metodas. Pasirinktas jonų stebėjimo režimas buvo naudojamas labai jautriai SCFA kiekybiniam įvertinimui naudojant GC / MS. GC/MS analizė atlikta naudojant masės selektyvų detektorių su HB-5 ms kapiliarine kolonėle. Jonizacija buvo atlikta elektronų srauto (EI) režimu, esant 70 eV. MS duomenys buvo gauti viso nuskaitymo režimu nuo m/z 40–400. Junginių identifikavimas patvirtintas įvedus grynų etalonų tirpalus ir palyginus sulaikymo trukmę bei atitinkamus MS spektrus. Analitės buvo kiekybiškai įvertintos pasirinkto jonų stebėjimo (SIM) režimu, naudojant tikslinį joną, ir patvirtintos patvirtinančiais jonais. Acto, propiono, izosviesto, sviesto, izovalerio, valerijono, 4-metilvalerijono, heksano ir heptano rūgščių tikslinis jonas (m/z) yra atitinkamai 117, 131, 145, 145, 159, 159, 173, 173 ir 189. Pridėjus 75 m/z prie visų jų ir 117 m/z prie rūgščių su C4-C7, veikia kaip patvirtinimo jonas (fragmentai pavaizduoti 4 pav.) [42].

Modifikuotas GC/MS metodas buvo sukurtas atliekant analizę žemoje temperatūroje, naudojant BSTFA kaip derivatizuojantį reagentą kartu su bevandeniu Na_2SO_4 , kaip drėgmės pašalinimo metodą, siekiant profiliuoti SCFA pelių išmatų ir serumo mėginiuose. Metodas parodė didelį jautrumą, puikų tiesiškumą ($R^2 > 0,999$), didelį atsikortojamumą ($\text{RSD} < 2\%$) ir mažą LOD (0,064–0,067 μM), kuris yra tinkamas SCFA ir kitiems lakiems junginiams sudėtinguose nedidelio kiekio biologiniuose mėginiuose, tokiuose kaip pelių išmatų ir serumo mėginiai (5 pav.) [42].



4 pav. GC-MS analizės fragmentai iš trimetilsililo [43]

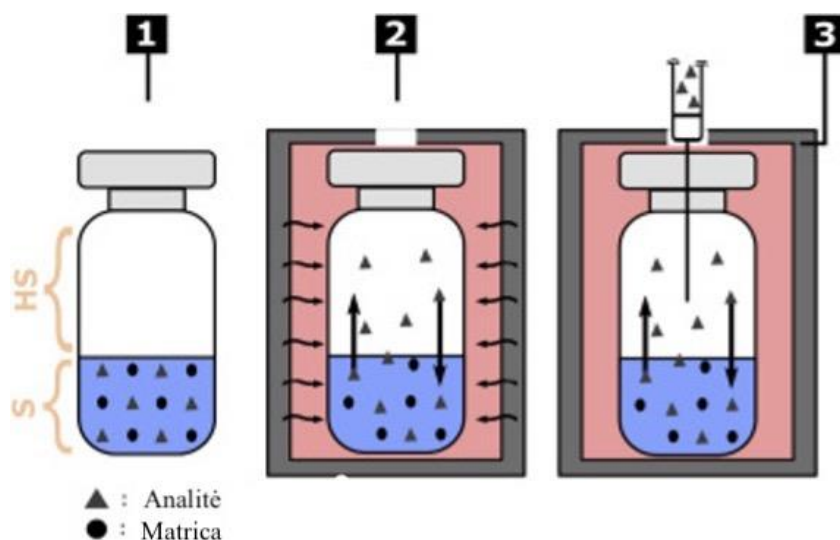


5 pav. SIM dujų chromatogramų perdanga. (A) tuščias; (B) 0,2 mM SCFA mišrus standartas be bevandenio Na_2SO_4 dehidratacijos; (C) 0,2 mM SCFA mišrus standartas; (D) pelių išmatų; (E) išmatos su 0,2 mM SCFA mišriu standartu. Smailės identifikavimas: 1. acto rūgštis, 2. propiono rūgštis, 3. izosviesto rūgštis, 4. n-sviesto rūgštis, 5. izovalerio rūgštis, 6. n-valerijono rūgštis, 7. 4-metilvalerijono rūgštis, 8. n-heksano rūgštis ir 9. n-heptano rūgštis [42]

2.3.2 Viršerdvės dujų chromatografija

Viršerdvės dujų chromatografija (GC) yra mėginių paruošimo metodas, skirtas nustatyti lakiuosius junginius kietuose ir skystuose mėginiuose, analizuojant garų fazę, kuri yra termodinaminėje pusiausvyroje su mėginiu uždaroje sistemoje. Ši technika egzistuoja nuo šeštojo dešimtmečio pabaigos ir vis dar aktyviai naudojama. Taikant šį metodą, į GC kolonėlę įvedama tik virš mėginio esanti dujų fazė. Viršerdvės analizės populiarumą lemia jos paprastumas ir tai, kad tai labai švarus metodas lakioms analitėms įvesti į dujų chromatografą, taip pat dėl didelės skiriamosios gebos, selektyvumo ir jautrumo; injektorių sistemai ir kolonėlėms techninės priežiūros praktiškai nereikia [44,45].

Viršerdvės mėginys paprastai ruošiamas buteliuke, kuriame yra mėginys, skiedimo tirpiklis, matricos modifikatorius ir viršerdvė (6 pav.) [46]. Kai mėginio fazė įvedama į buteliuką ir buteliukas užsandarintas, pirmiausia mėginys termostatuojamas inkubavimo krosnelėje tam tikroje temperatūroje, lakiieji komponentai išsisklaido į dujų fazę, kol viršerdvė pasiekia tašką, kai garavimo greitis yra lygus kondensacijos greičiui, kaip pavaizduota rodyklėmis 6 paveiksle [44,46]. Esant pusiausvyrai, lakiųjų junginių koncentracija viršutinėje erdvėje yra tiesiogiai proporcinga jų koncentracijai mėginio matricoje. Šis pusiausvyros ryšys leidžia tiksliai nustatyti mėginyje esančias analites, analizuojant viršutinę erdvę [44,46]. Lakiieji komponentai iš sudėtingų mėginių mišinių gali būti atskiriami nuo nelakių mėginio komponentų ir izoliuoti mėginio buteliuko viršerdvėje ar garų dalyje [46]. Tuomet mėginys paimamas iš viršerdvės, naudojant dujoms nepralaidų švirkštą ir perduodamas į dujų chromatografijos sistemą, kad būtų galima atskirti visus lakius komponentus [44,46].



6 pav. Pagrindinis viršerdvės mėginių ėmimo principas. 1 – mėginys patalpinamas į buteliuką; 2 – temperatūros reguliavimas; 3 – mėginio paėmimas iš viršerdvės, naudojant dujoms nepralaidų švirškštą. S – mėginys; HS – viršerdvė [47]

Pusiausvyros būsenoje analitės koncentracijos dujų fazėje ir skystoje fazėje santykis yra pastovus. Konstanta apibrėžiama kaip pasiskirstymo koeficientas K [44]:

$$K = \frac{C_{skystis}}{C_{dujos}} [44]$$

Kur: K – pasiskirstymo koeficientas; $C_{skystis}$ – analitės koncentracija mėginyje po pusiausvyros; C_{dujos} – analitės koncentracija dujų fazėje po pusiausvyros [44].

Jis yra mažinamas kylant temperatūrai ir taip pat kinta keičiantis matricai; pvz., kai organinės analitės ištirpinamos vandenyje, druskų pridėjimas sumažina K . Iš aukščiau pateiktos lygties matyti, kad analitės, kurių pasiskirstymo koeficientas labai didelis, linkusios likti mėginio fazėje, o tos, kurių pasiskirstymo koeficientas mažas, kaupiasi dujų fazėje. Todėl analičių aptikimo ribos suderinamoje mėginio matricoje bus daug didesnės (mažesnis jautrumas) nei nesuderinamos mėginio matricos analičių [44].

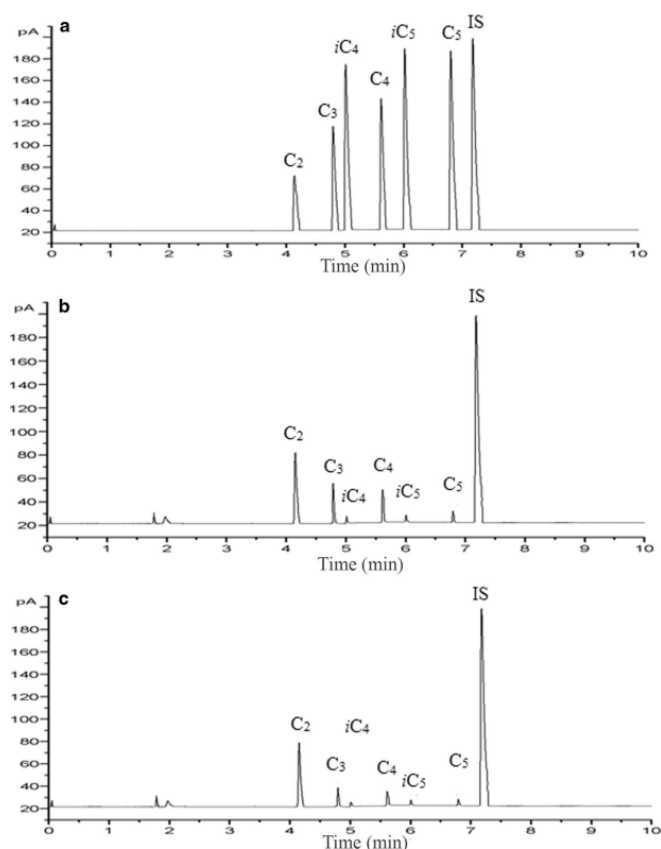
Pusiausvyros susidarymui daro įtaką įvairūs veiksniai, įskaitant temperatūrą, slėgį ir mėginio matricos pobūdį. Aukštesnė temperatūra paprastai pagreitina pusiausvyros procesą, padidindama lakiųjų junginių garų slėgį. Viršerdvės pusiausvyrą taip pat gali paveikti tokie veiksniai kaip analičių tirpumas mėginio matricoje ir kitų lakiųjų arba nelakių komponentų buvimas [44].

Lakiųjų junginių analizei biologiniuose mėginiuose buvo pritaikytas viršerdvės mėginių ėmimo metodas ir gaunami daug žadantys rezultatai. Šis metodas vis plačiau taikomas, nes lengvai paruošiami mėginiai vandenyje. Lakiųjų analičių efektyvumui pagerinti taip pat naudojamos įvairios išsūdymo technikos, kurios leidžia padidinti nepolinių analičių koncentraciją mėginių viršerdvėje. Pridėjus išsūdymo agento, padidėja tirpalo joninė jėga ir sumažėja SFCA tirpumas. Divalentinių druskų naudojimas dar labiau sumažina SFCA tirpumą, nes jos padidina jonų stiprumą labiau nei vienvalečių jonų. Todėl norint analizuoti SCFA biologiniuose mėginiuose, yra rekomenduojama naudoti viršerdvės metodą dėl nedidelio išankstinio mėginių apdorojimo ir didelio jautrumo [48].

Šiame tyrime buvo sukurtas ir patvirtintas statinės viršutinės erdvės (HS) dujų chromatografijos metodas, skirtas SCFA analizei išmatų mėginiuose. Į kiekvieną mėgį įpilta druskos tirpalo, kuriame

yra $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ir NaH_2PO_4 bei 4-metilo valerijono rūgštis, kuri buvo pridėta kaip IS. Tada tirpalo pH buvo pakoreguotas iki 2,5 su H_3PO_4 . GC analizė buvo atlikta dujų chromatografu su HS injektorium ir liepsnos jonizacijos detektoriumi (FID). Naudota chromatografinė kolonėlė buvo kapiliarinė kolonėlė su polietilenglikoliu kaip stacionari fazė. Nešančiosios dujos buvo azotas esant pastoviam slėgiui. Bendras analizės laikas – 10 min. SCFA identifikavimas pagrįstas standartinių junginių sulaikymo laiku [48].

Išsūdyimo technologija pagerina šio metodo jautrumą. Be to, šis metodas yra pakankamai jautrus, kad būtų galima aptikti 0,005–0,020 $\mu\text{g/L}$ SCFA arba 0,1–0,4 $\mu\text{g/g}$ išmatų mėginį ir kiekybiškai įvertinti 0,02–0,08 $\mu\text{g/L}$ SCFA arba 0,4–1,6 $\mu\text{g/g}$ išmatų mėginį. Dėl gero pakartojamumo bei didelio jautrumo šis metodas tinka mažos SCFA koncentracijos biologinių mėginių analizei [48].



7 pav. Standartinio mišinio (a), žiurkės ileocecalinio mėginio (b) ir žiurkės išmatų (c) chromatograma [48]

3. TRUMPOS GRANDINĖS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ CHROMATOGRAFIJOS MĖGINIŲ PARUOŠIMO BŪDAI

Pirmoji problema, susijusi su SCFA nustatymu, yra tai, kaip jas išskirti iš sudėtingų matricių su kuo mažesniais nuostoliais, ypač iš vandeninės fazės mėginių. Šaltiniuose minima apie kelis SCFA ekstrahavimo metodus, tokius kaip vakuuminis distiliavimas [49], ultrafiltravimas [50], ekstrahavimas tirpikliu [51] ir ultragarsas [52], tačiau šie metodai yra labai varginantys, daug laiko ir daug darbo reikalaujantys dėl sudėtingų procedūrų ir didelio analičių išgaravimo, dėl kurio prarandama daugiau lakiųjų SCFA [5]. Žemiau aprašyti pagrindiniai mėginių paruošimo metodai SCFA nustatymui dujų chromatografijoje.

3.1 Skysčio-skysčio ekstrahavimas

Skysčio ir skysčio ekstrahavimas (LLE) yra įprastas pirminio mėginio apdorojimo metodas. Ekstrahavimo procedūra pagrįsta dviejų fazių – vandeninės (mėginio) ir organinės (atstovaujamos organiniais tirpikliais, pvz., chloroformu, etilo acetatu, eteriu ir kt.) – naudojimu. Tokia eksperimentinė aplinka leidžia padalyti analizę tarp vandeninio mėginio ir pridėto organinio tirpiklio. Pagrindinis LLE privalumas yra galimybė atlikti tiesioginius kiekybinius matavimus iškart po ekstrahavimo. Kita vertus, LLE yra kenksminga aplinkai ir daug laiko reikalaujanti procedūra. Tačiau literatūroje per daugelį dešimtmečių sukauptos žinios apie tinkamų ekstrahavimo tirpiklių naudojimą, o tai labai palengvina organinio tirpiklio, pH ir įvairių reagentų, kurie gali būti naudojami mėginių valymui, pasirinkimą [35].

Iš dalies hidrofilinis SCFA pobūdis apsunkina jų kiekybinį ekstrahavimą į hidrofobinius organinius tirpiklius. Todėl metodai, pagrįsti mėginio parūgštinimu, yra naudingi, nes tokia procedūra išlaiko mažiau hidrofilius rūgštis ir taip palengvina ekstrahavimą. Buvo atliktas tyrimas, kurio metu daugiausia dėmesio skyrė SCFA LLE procedūros optimizavimui iš išmatų mėginių. Buvo tiriami trys skirtingi tirpikliai – dietilo eteris, dichlormetanas ir etilo acetatas. Tačiau etilo acetatas ir dietilo eteris parodė panašų ekstrahavimo efektyvumą, galiausiai etilo acetatas buvo pasirinktas dėl dietilo eterio tvarkymo sunkumų ir ypatingo degumo. Parūgštinimas ortofosforo rūgštimi ekstrahavimo procedūros metu taip pat buvo naudingas, todėl pagerėjo SCFA ekstrahavimas. Siūlomas ekstrahavimo metodas buvo paprastas, greitas ir nebrangus. Per vieną valandą pavyko išgauti apie 30 mėginių. Be to, organinio tirpiklio suvartojimas buvo mažas (1 ml vienam mėginiui) ir buvo sunaudota tik 100 mg mėginio [6].

Ekstrahavimas atliekamas imant mililitrą vandens supernatanto ir ekstrahuojant 1 ml organinio tirpiklio. Prieš analizę organinės fazės tūris perkeliamas į mėgintuvėlį ir kaip IS pridedama 4-metilo valerijono rūgštis, kurios galutinė koncentracija 500 μ M. IS naudojamas norint pakoreguoti įpurškimo skirtumus tarp mėginių ir nedidelius pokyčius instrumento atsakas [6].

3.2 Baltymų išsodinimas

Baltymų išsodinimas yra plačiai naudojama pirminio mėginio apdorojimo procedūra biologinių skysčių analizei. Jis naudojamas baltymams atskirti nuo tirpalo ir taip sumažinti reikalingų medžiagų trukdžius su jais. Išsodinimo procesas turi būti greitas ir keičiamas, turi būti naudojami nedideli tirpiklių kiekiai. Baltymų išsodinimo procedūra dažnai naudojama atliekant

SCFA analizę serume arba plazmoje dėl greito mėginio apdoravimo ir galimos tiesioginės analizės, priklausomai nuo naudojamos analizės technikos [53].

Buvo pristayta technika, kuria atliko paprastą supernatanto perkėlimą po išsodinimo ir tuomet analizuota tiesiogine GC-MS analize. Baltymų išsodinimas serumo mėginiuose buvo efektyviai atliktas metafosforo rūgštimi arba šaltu izopropanoliu. Ląstelių kultūros mėginiams kaip tinkama nusodinimo priemonė buvo naudojama 16 % (m/v) trichloracto rūgštis. Plazmos mėginių deproteinizavimo galimybė yra 5-sulfosalicilo rūgštis tirpalas. Išmatų mėginiams galima naudoti daug įvairių organinių tirpiklių, tokių kaip acetonitrilas, metanolis-chloroformas (3:1, t/t), acetonitrilas-chloroformas (3:1, v/v) arba metano [35,53].

3.3 Kietafazė ekstrakcija

3.3.1 Kietafazė ekstrakcija

Kietosios fazės ekstrahavimas (SPE) dažnai naudojamas kaip tinkamas mėginių paruošimo būdas įvairiems biologiniams mėginiams. Pastaruoju metu SPE naudojamos naujos aplinkai stabilios laidžios polimerinės medžiagos. SCFA ekstrakcijai ir koncentracijai buvo sukurti poliakrilnitrilo-poli(3,4-etilendioksitiofeno)-PAN/PEDOT nanopluoštai, kurie buvo SPE paruošimo kolonėlių dalis. SCFA mėginiams ruošti taip pat buvo naudojama SPE segmentinė eliuavimo procedūra [35].

3.3.2 Kietafazė mikroekstrakcija

Visai neseniai pasirodė, kad kietosios fazės mikroekstrakcija (SPME) kartu su GC-MS yra labai naudinga analizuojant riebalų rūgštis, esančias vandeniniuose ekstraktuose su mažomis aptikimo ribomis. Aptikimo ribas galima netgi sumažinti tiesiogiai *in situ* darant šias rūgštis, naudojant SPME su polimerine danga, legiruota derivatizacijos reagentu (ant pluošto derivatizacija). Dėl šio išankstinio apdoravimo mėginio matrica buvo gerai išvalyta, o tai padidino chromatografinės sistemos tarnavimo laiką ir našumą, tačiau pluoštai vis dar yra gana brangūs ir sistemai reikalinga papildoma aparatinė įranga, kad būtų galima atlikti automatizuotą analizę [6].

Kietosios fazės mikroekstrakcija (SPME) yra žalias ir be tirpiklių metodas, skirtas pirminiam mėginių apdoravimui. SPME praturtina ir pasilieka analites tolesnei analizei, ekstrahavimo pluoštą eksponuodamas ant vandens paviršiaus arba įterpdamas jį į vandeninę matricą, kol bus pasiekta adsorbcijos pusiausvyra. Paprastai išmatų mėginiuose esantys SCFA SPME viršutinės erdvės ekstraktai, po kurių buvo atlikta GC-MS analizė, buvo atliekami polietilenglikolio kapiliarinėse kolonėlėse. Nauji tyrimai susiję su viršutinės erdvės SPME metodu, atliekamu naudojant divinilbenzeno/karbokseno/polidimetilsiloksano (DVB/CAR/PDMS) pluoštą arba įvairias komerciškai prieinamas pluošto dangas, tokias kaip polidimetilsiloksanas (PDMS), karboksenas/polidimetilsiloksanas (CAR/PDMS), poliakrilatas arba polietilenglikolis (PEG) [35].

3.3.3 Supakuoto pluošto kietafazė ekstrakcija

Neseniai buvo sukurtas naujas SPE metodas, pagrįstas elektrovertais polimeriniais nanopluoštais, kaip adsorbentu analičių išankstiniam koncentravimui [54]. Nors septintojo dešimtmečio pradžioje buvo pranešta apie elektrospinto nanopluošto metodą, o nuo to laiko buvo tiriami įvairūs pritaikymai daugelyje sričių, iki pastarųjų metų nanopluoštai buvo pasirinkti kaip

adsorbentas, norint išgauti analites iš biologinių mėginių, o tai vadinama supakuoto pluošto kietosios fazės ekstrakcija (PFSPE). Palyginti su įprastais SPE adsorbentais, nanopluoštai turi daug unikalių savybių, tokių kaip mažo dydžio efektas, paviršiaus ir ribos efektas, daug daugiau sąveikos vietų ir pan., o tai palengvina adsorbiciją tarp adsorbento ir analitės, naudojant mažiau adsorbento, mėginio ir eliuento [5]. PFSPE metodas buvo naudojamas kortizoliui nustatyti žmogaus seilėse su kompleksine matrica [55]. Nors PFSPE turi daug unikalių pranašumų iš anksto koncentruojant taikinius biologiniuose mėginiuose, jis netaikomas stipriai poliniams ir labai lakiems junginiams iš biologinių mėginių su sudėtinga matrica ekstrahuoti. Pastaraisiais metais daug laidžių polimerinių medžiagų yra pritaikoma išankstiniam polinių junginių apdorojimui dėl jų jonų mainų, π - π sąveikos, vandenilio jungties, elektrostatinės sąveikos, rūgščių-šarmų savybių ir kt. Be to, šias laidžias polimerines medžiagas galima lengvai susintetinti tiek vandeninėje, tiek nevandeninėje fazėje. Polipirolis (PPY) yra plačiai naudojamas poliariniams junginiams išgauti biomedicinos srityje, nes yra geresnis aplinkos stabilumas, lengvesnė sintezė ir lengvas modifikavimas [5].

Sukurta PPY nanopluošto pagrindu pagaminta kietosios fazės ekstrakcija kartu su GC-MS, o pasiūlytas metodas buvo pritaikytas SCFA ekstrahavimui iš vaikų šlapimo. SCFA pirmiausia ekstrahuojamos ant nanopluošto, o vėliau eliuuojami druskos rūgšties etanolio tirpalu, tuomet aptikamos GC-MS. Siūlomas metodas pagerina mėginių apdorojimo supaprastinimą ir rodo pakankamą analitinį jautrumą ir selektyvumą biologiniuose mėginiuose per <8 min., kad vienu metu būtų galima apdoroti 12 mėginių su ekstrahavimo matricos įrenginiu. Sukurtas metodas gali koncentruoti SCFA šlapime be išgarinimo stadijos, kad būtų išvengta lakiųjų SCFA nuostolių. Šis tyrimas suteikia galimybę stebėti SCFA šlapime klinikiuose ir eksperimentiniuose tyrimuose [5].

3.4 Derivatizacija

Lakiųjų rūgščių parūgštinti vandens arba etilo acetato ekstraktai gali būti tiesiogiai analizuojami GC-MS, naudojant specialią kapiliarinę kolonėlę su laisvųjų riebalų rūgščių faze arba PEG stacionarios fazės kolonėlę, atitinkamai, be derivatizacijos. Tačiau tiesioginė GC-MS analizė rodo prastą atsikartojamumą ir gali užteršti GC kolonėlę dėl priemaišų. Todėl jautrumui pagerinti ir užterštumui sumažinti dažniausiai naudojamas derivatizavimas [42].

Mėginių derivatizacija atliekama siekiant pagerinti junginių identifikavimo ir kiekybinio įvertinimo galimybes. Ši procedūra paprastai atliekama siekiant pakeisti analitės savybes, o tai leidžia geriau atskirti ir aptikti įvairius junginius. Paprastai derivatizacijos procedūra gali būti derinama su kitais ekstrahavimo ir koncentravimo, ar mėginio išankstinio apdorojimo būdais. Pradinė biologinė matrica ne visada tinka derivatizacijai, o kai kuriais atvejais tokiai matricai pakeisti būtinas išankstinis apdorojimas (paprastas džiovinimo procesas arba sudėtingas procesas su daugiau cheminių reakcijų). Be to, reikalaujama, kad pridodant derivatizacijos reagento cheminė reakcija vyktų tik su tiriamomis analitėmis, nepažeidžiant matricos. Tinkamiausios cheminės reakcijos dariniams yra i.) alkilimas, ii.) sililimas, iii.) acilimas, iv.) prisijungimas prie anglies-hetero daugybinių ryšių arba v.) ciklinių junginių susidarymas. Tinkamos derivatizacijos procedūros naudojimas priklauso nuo analizuojamų medžiagų fizikinių-cheminių savybių. Rūgščių junginių atveju tinkamiausias būdas yra alkilimas ir sililimas [35].

Sililimas yra cheminė reakcija, kai reaktyvus vandenilio atomas pakeičiamas tokiose grupėse kaip -OH, -COOH, -SH, -NH, -CONH, -POH ir -SOH dažniausiai pageidaujamu reagentu trimetilsililu (TMS). Pagrindinis šios reakcijos tikslas yra pakeisti poliškumą, padidinti stabilumą ir pagerinti atskyrimo elgesį. Alkilimas – tai alkilo darinių susidarymas perkeliant alkilo grupę iš vieno junginio į kitą. Įprastas rūgštinio junginio alkilimas atliekamas N, N-dimetilformamido

dialkilacetaliais. Rūgščių alkilo arba arilo darinių susidarymas lemia esterinimą. Šią reakciją paprastai katalizuoja stiprios rūgštys, o efektyvumą galima pagerinti pašalinus vandenį iš reakcijos (130). SCFA derivatizavimui naudojami įvairūs metodai, o jų pasirinkimas paprastai priklauso nuo naudojamos atskyrimo technikos [35].

Trimetilsililo (TMS) derivatizacijos reagentai, tokie kaip N, O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamidas (BSTFA) ir N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoracetamidas (MSTFA), dažniausiai naudojami atliekant GC/MS analizę. Šie MS derivatizacijos agentai turi gerą ir platų reaktyvumą su biologinėmis organinėmis molekulėmis, pakeisdami aktyvius vandenilius iš rūgščių, alkoholių, tiolių, aminių, amidus, ketonus ir aldehidus trimetilsililo grupe. Gauti dariniai yra termiškai stabilesni, lakesni ir mažiau poliški, palyginti su kitais, todėl palaiko įvairias mėginio įvedimo ir kolonėlės sąlygas. Tačiau aukščiau minėti reagentai retai naudojami SCFA derivatizacijai dėl didelio jautrumo drėgmei, dėl kurio reikia džiovinti mėginius. Didelis SCFA lakumas neleidžia naudoti įprasto išgarinimo, dėl kurio SCFA prarandama. Dėl to ankstesnėse publikacijose buvo naudojamas sililinimas n-(tret-butildimetilsilil)-n-metil-trifluoracetamidu (MTBSTFA), kuris yra mažiau jautrus drėgmei, arba esterifikavimas chlorformiatais vandeninėje terpėje. Be santykinai neįprasto taikymo derivatizacijoje prieš GC, MTBSTFA reikalauja ilgesnio veikimo laiko ir yra labiau paveikti sterinių kliūčių nei BSTFA, o chloroformiatai blogiau atsiskiria arba turi mažesnę butirato atkūrimo greitį ir (arba) reikalauja sudėtingų procedūrų. Dėl šių problemų reikalingas alternatyvus drėgmės pašalinimo būdas [42].

3.5 Tiesioginis nustatymas

Nors išankstiniai apdorojimai davė gerą išvalymo efektą ir didesnę liepsnos jonizacijos detektoriaus atsaką, jie užima gana daug laiko, taip pat gali turėti įtakos metodo tikslumui ir pakartojamumui. Be to, daugumoje aukščiau paminėtų metodų buvo naudojami dideli kiekiai aplinkai ir žmonių sveikatai pavojingų organinių tirpiklių ir reagentų. Todėl norėusi paprasto ir aplinkai nekenksmingo SCFA nustatymo metodo su nedideliu išankstiniu apdorojimu. Kai kurios specialios kolonėlės leidžia naudoti paprastesnius ir lengvesnius GC metodus. Pavyzdys yra komerciškai prieinamos kolonėlės su laisvųjų riebalų rūgščių faze (FFAP), kurios yra gana atsparios vandeniui ir leidžia tiksliai nustatyti SCFA vandens tirpale be jokių darinių [56].

Tiesioginio nustatymo mėginių paruošimas: vienas gramas išmatų suspenduotas mažiausiai 5 ml vandens ir homogenizuojamas. Po to suspensijos pH buvo koreguojamas iki 2–3 pridedant HCl. Tuomet suspensija centrifuguojama ir gautas supernatantas išvirkščiamas į GC analizei [56].

GC-FID metodai su tiesioginiu mėginių įvedimu, buvo anksčiau optimizuoti ir patvirtinti. Tačiau taikant šiuos metodus kolonėlės tarnavimo laikas buvo žymiai sutrumpintas dėl užteršimo nelakiais junginiais. Be to, kai ruošiant mėginį naudojamas vanduo, reikia naudoti ir atitinkamas kolonėles [6].

4. EKSPERIMENTO METODIKA

4.1 Reagentai ir tirpalai

Naudoti šie reagentai: fosforo rūgštis (85 %), natrio chloridas ($\geq 99,5$ %), natrio sulfatas ($\geq 98,5$ %), natrio dihidrofosfato monohidratas (≥ 98) buvo pirkti iš Roth (Vokietija). Acto rūgštis ($\geq 99,5$ %), propiono rūgštis ($\geq 99,5$ %), sviesto rūgštis (≥ 99 %), valerijono rūgštis (≥ 99 %), kaprono rūgštis (≥ 99 %), buvo įsigyti iš Sigma – Aldrich (Vokietija).

Naudotos priemonės: chromatografiniai viršerdvės indeliai 20 ml, chromatografinių viršerdvės indelių dangteliai (ND20) su silikono/teflono tarpine pirkti iš Roth (Vokietija). 50 ir 100 ml matavimo kolbos (A klasė), 20-200 μ l ir 100-1000 μ l tūrio automatinės pipetės.

Rūgščių mišinio pradinis tirpalas buvo paruoštas 100 ml matavimo kolbutėje sveriant po 100 mg analičių ir tirpinant vandenyje ($c= 1$ mg/ml). Darbiniai tirpalai buvo ruošiami praskiedžiant pradinį tirpalą iki reikiamos koncentracijos.

4.2 Aparatūra

Chromatografiniai analizei buvo naudojamas PerkinElmer, Clarus 580 dujų chromatografas („PerkinElmer“, JAV) su liepsnos jonizaciniu detektoriumi. Dujų chromatografo sistemoje buvo naudota ZB-WAX plus kapiliarinė kolonėlė (30 m \times 0,32 mm id, 1 μ m stacionarios fazės sluoksnio storis) („Phenomenex“, JAV).

Viršerdvės dujų chromatografija buvo atliekama „PerkinElmer HS Sampler Turbomatrix 16“ („PerkinElmer“, JAV), su slėgiu reguliuojama mėginio įleidimo sistema.

Medžiagos buvo sveriamos analizinėmis svarstyklėmis „KERN & Sohn GmbH“.

4.3 Viršerdvės dujų chromatografinės analizės sąlygos

Viršerdvės dujų chromatografiniam nustatymui (HS – GC) buvo naudojamas Perkin Elmer, Clarus 580 dujų chromatografas su liepsnos jonizaciniu detektoriumi, kurio parametrai: temperatūra 250°C, vandenilio srautas 40 ml/min, oro srautas 400 ml/min, pagalbinių dujų (helio) srautas 30 ml/min.

Viršerdvės dujų chromatografina buvo atliekama „PerkinElmer HS Sampler Turbomatrix 16“ („PerkinElmer“, JAV), su slėgiu reguliuojama mėginio įleidimo sistema. Visiems eksperimentams buvo naudojami 20 ml talpos viršerdvės (HS) mėgintuvėliai, kurie buvo termostatuojami 90 °C temperatūroje 10 min. Įleidimo adatos ir perdavimo linijos temperatūra buvo 110 °C.

HS mėginių įvedimo sistemos nustatymai buvo tokie: 1 min. pastovaus viršslėgio formavimui ir 0,09 min. mėginio įvedimui į GC sistemą.

Nešančiomis dujomis buvo naudotas helis, kurio slėgis prieš kolonėlę buvo 16,7 psi. Inžektoriaus temperatūra: 110 °C.

Dujų chromatografo termostato temperatūros parametrai: pradinė termostato temperatūra 150 °C. Nuo 150 °C temperatūra buvo keliami 10 °C/min greičiu iki 200 °C temperatūros ir palaikoma 5 min.

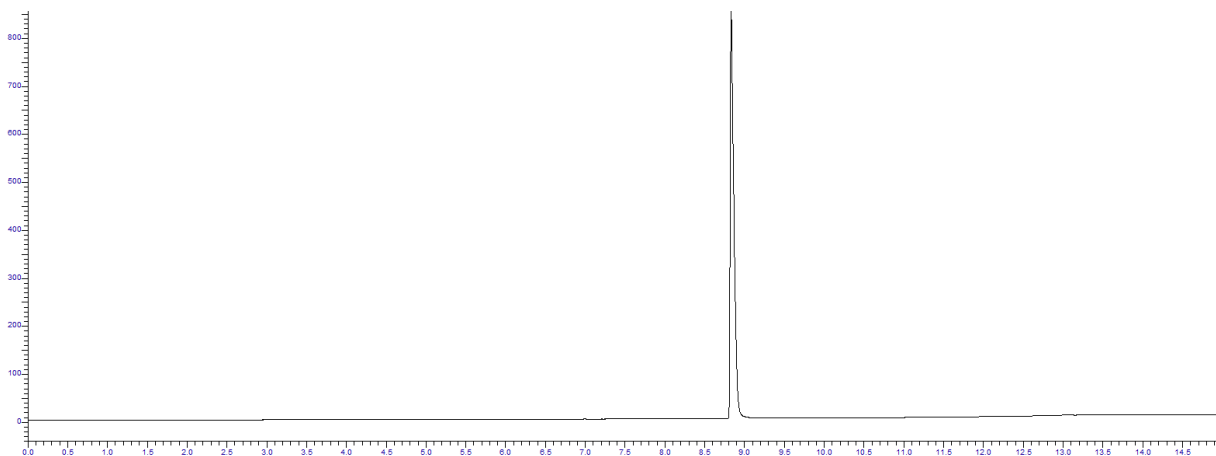
4.4 Mėginio paruošimas

Į 20 ml mėgintuvėlį idedamas analizuojamasis tirpalas ir skiedžiama vandeniu, kad vandeninės fazės tūris būtų 3 ml. Pridedama 50 μl H_3PO_4 ir 10 mmol NaH_2PO_4 monohidrato. Mėgintuvėlis sandariai užkemšamas ir maišoma kol druska ištirps.

5. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

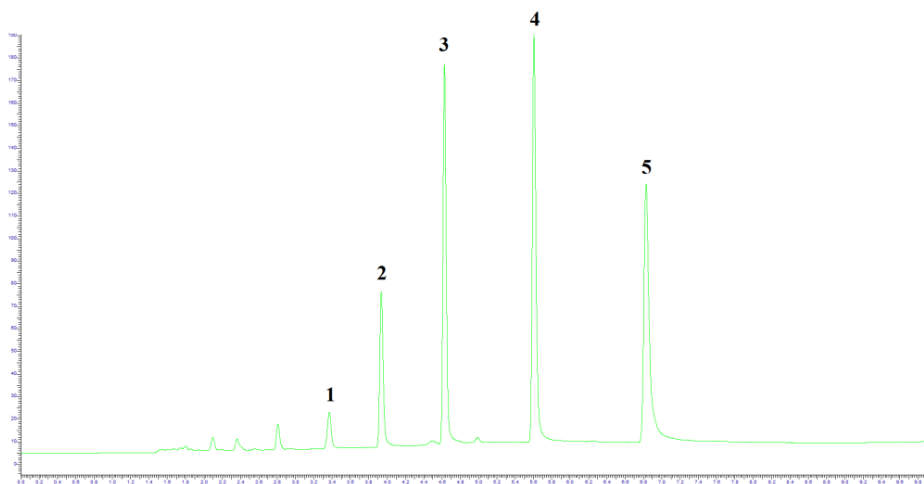
5.1 Chromatografijos sąlygų optimizavimas

Siekiant nustatyti optimalias analizės sąlygas ir analičių sulaikymo laiką, pirmiausia buvo analizuota lakiausia analitė – acto rūgštis. Pradinė temperatūra buvo 80 °C ir keliama 10 laipsnių per minutę greičiu iki 200 °C. 8 paveikle galima matyti, kad naudojant kolonėlę su itin dideliu stacionarios fazės sluoksnio storium (1 μm), gaunama acto rūgšties smailė, kuri labai stipriai sulaikoma (sulaikymo laikas beveik 9 minutes), todėl pradinė GC termostato temperatūra buvo padidinta iki 150 °C.



8 pav. Acto rūgšties chromatograma; pradinė temperatūra 80 °C

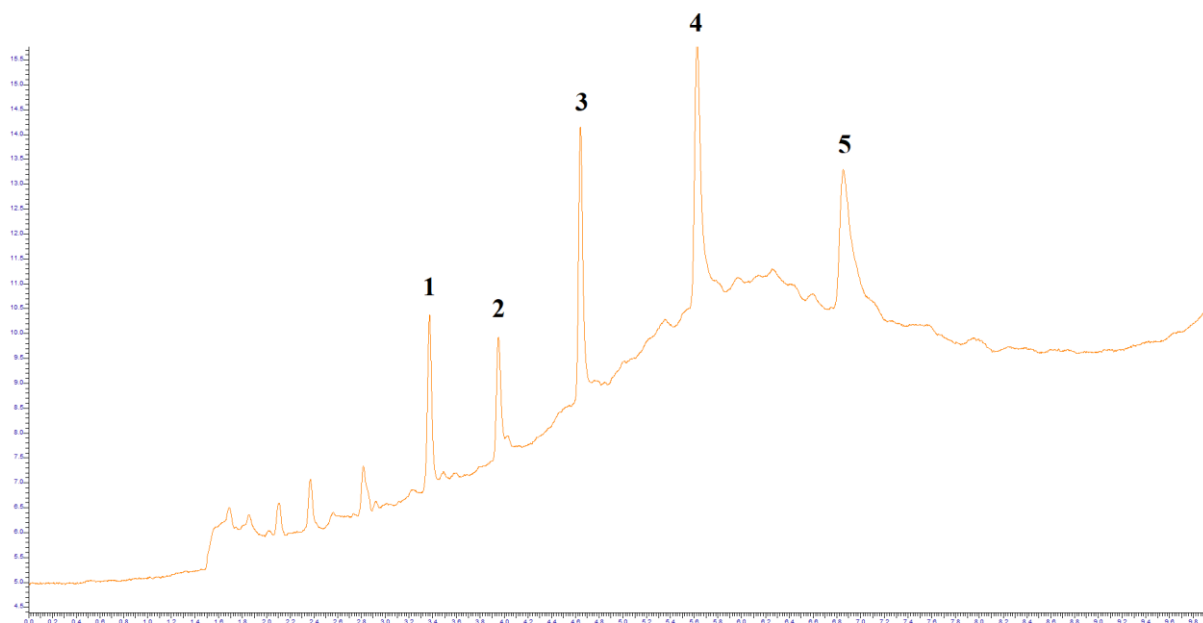
Optimizavus dujų chromatografinės analizės sąlygas, pradinė termostato temperatūra buvo 150 °C. Analizė buvo atliekama temperatūros programavimo režimu. Temperatūra keliama 10 °C/min. greičiu iki 200 °C ir išlaikoma 5 min. 9 paveikle galima matyti lakiųjų rūgščių chromatogramą optimizuotomis sąlygomis su visomis nustatomosiomis analitėmis. Lakiausios analitės (acto rūgštis) sulaikymas sutrumpėjo iki 3,4 minučių. Taip pat galima matyti, kad visos nustatomosios rūgštys puikiai atsiskyrė viena nuo kitos.



9 pav. Lakiųjų rūgščių viršerdvės chromatograma optimizuotomis sąlygomis. 1 – acto rūgštis, 2 – propiono rūgštis, 3 – sviesto rūgštis, 4 – valerijono rūgštis, 5 – kaprono rūgštis

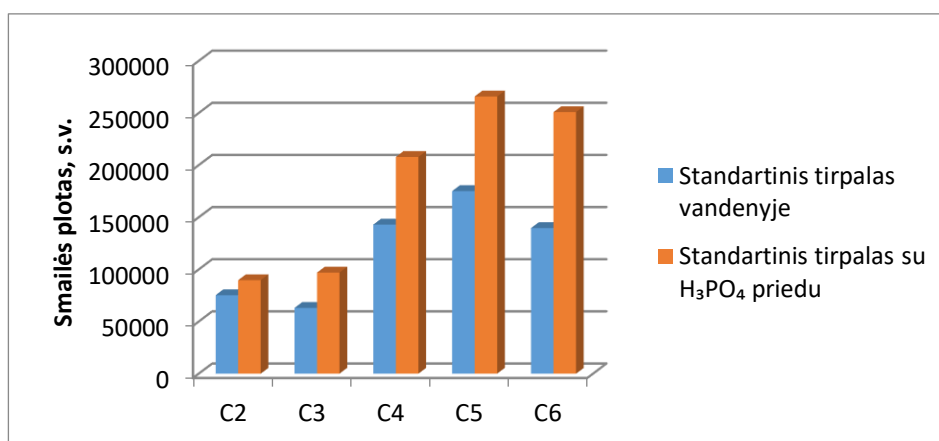
5.2 Analizės optimizavimas vandeniniame tirpale

Buvo atlikta analizė iš vandeninio tirpalo, kai rūgščių koncentracija 1 mg/ml (10 pav.). Chromatogramoje matomos smailės labai nedidelio intensyvumo, to priežastis galėtų būti, kad tiriamos analitės vandenyje yra dalinai disocijavusios dėl jų disocijacijos konstantų reikšmių, kurios beveik nesiskiria viena nuo kitos ir yra 4,76 – 4,89. Taip pat matoma, kad heksano rūgšties intensyvumas mažas, o smailė gaunama nesimetriška. Tam gali daryti įtaką aukšta heksano rūgšties virimo temperatūra (aukštesnė nei atliekamos analizės – 205,8 °C), dėl ko yra apsunkintas jos perėjimas į viršerdvę (mėgintuvėlis su vandeniniu tirpalu termostatuojamas 90 °C temperatūroje).



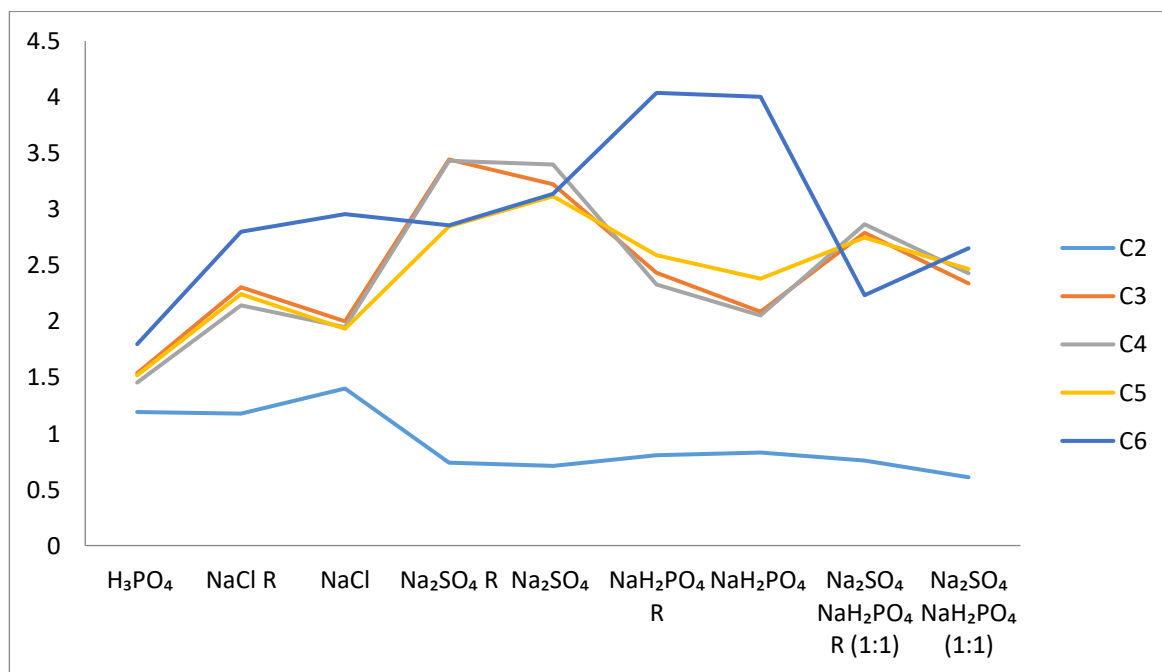
10 pav. Lakiųjų rūgščių viršerdvės chromatograma vandeniniame tirpale. 1 – acto rūgštis, 2 – propiono rūgštis, 3 – sviesto rūgštis, 4 – valerijono rūgštis, 5 – kaprono rūgštis

Siekiant pervesti analites į protonizuotą formą, mėginiai buvo parūgštinti fosforo rūgštimi, pridėjus 50 µL į kiekvieną mėginį. Buvo tikimasi, kad protonizavus analites, sumažės jų tirpumas vandenyje ir didesnė dalis pereis į mėginio viršerdvę. Atlikus šį eksperimentą, pavyko gauti geresnius signalus, kaip matoma oranžiniuose stulpeliuose (11 pav.), tačiau pagerėjimas matomas ne visoms analitėms vienodas, nors jų disocijacijos konstantos reikšmės labai panašios.



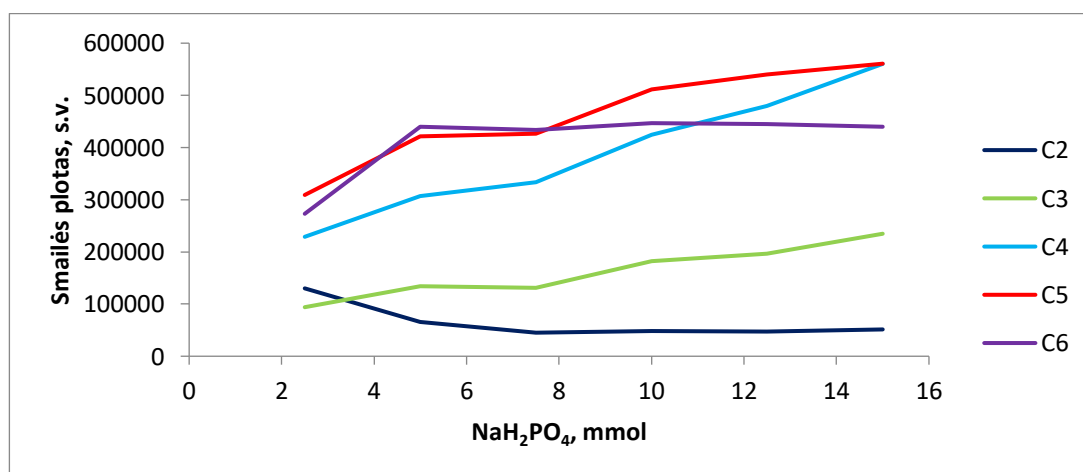
11 pav. Smailių ploto priklausomybė nuo lakiosios rūgšties ir tirpalo sudėties

Stengiantis dar labiau pagerinti analizinį signalą, buvo bandoma padidinti analizuojamo tirpalo joninę jėgą. Šiam tikslui pasirinktos natrio chlorido, natrio sulfato ir natrio dihidrofosfato druskos, kurių buvo dedama po 5 mmol. Taip pat buvo atliekamas paralelinis eksperimentas, kur mėginys su druskos priedu buvo dar rūgštinamas fosforo rūgštimi. Iš grafiko (12 pav.) galima matyti, kad naudojant natrio dihidrofosfatą, heksano rūgšties intensyvumas padidėja net 4 kartus lyginant su vandeniniu tirpalu. Tačiau nepaisant heksano rūgšties smailės ploto padidėjimo, taip pat stebimas įdomus fenomenas – tiek su natrio sulfatu, tiek su natrio hidrofosfatu acto rūgšties smailės plotas sumažėja.



12 pav. Smailės ploto pokytis, lyginant su standartu vandenyje

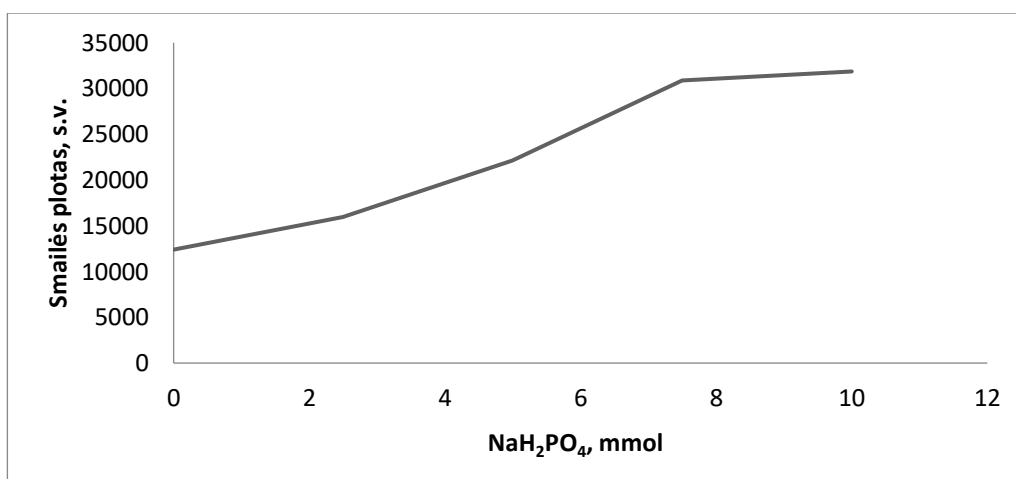
Pasirinkus tinkamą išsūdyimo sistemą buvo nuspręsta ištirti signalo intensyvumo priklausomybę nuo druskos (NaH₂PO₄) kiekio. Šiam eksperimentui buvo naudotas natrio dihidrofosfatas, kuris demonstravo geriausias rezultatus heksano rūgščiai. Šiame tyrime buvo vėl matomas tas pats fenomenas (13 pav.) – didinant druskos kiekį, acto rūgšties intensyvumas sumažėjo ir toliau nebekito.



13 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo NaH₂PO₄ kiekio mėginyje

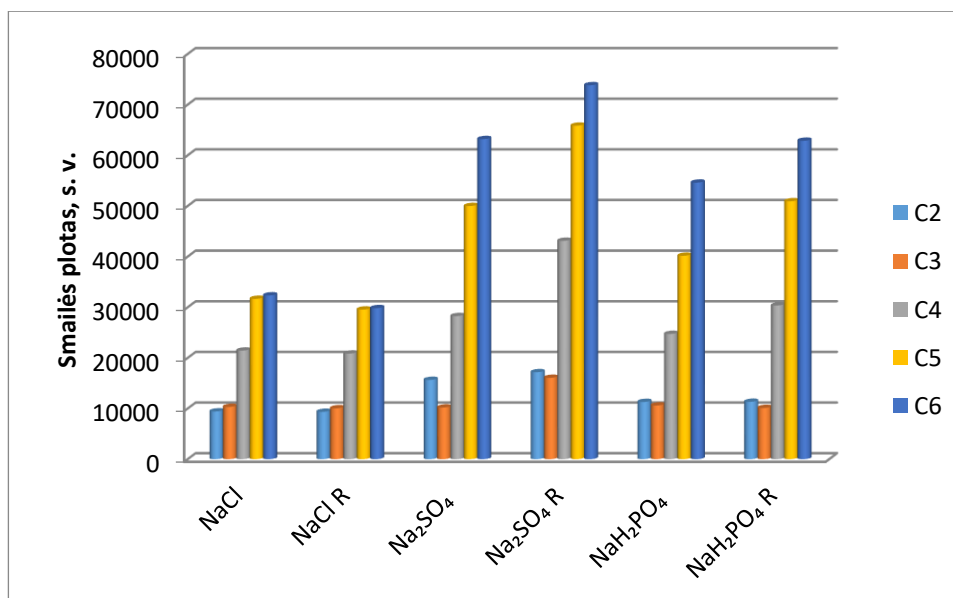
Tyrimo metu, naudojant didelius druskų kiekius, buvo pastebėtas heterogeninės sistemos susidarymas (lašeliai vandenyje), todėl buvo iškelta hipotezė, kad esant didelėms druskos koncentracijoms, heksano rūgšties tirpumas labai sumažėja ir dėl to ima formuotis heterogeninė sistema. Acto rūgšties signalo sumažėjimas gali būti dėl to, kad dalis acto rūgšties pradeda tirpti heksano rūgštyje, ko pasekoje į viršerdvę ji garuoja tiek iš vandens, tiek iš heksano rūgšties, tačiau dėl prastesnio perėjimo iš heksano rūgšties į viršerdvę gali atsirasti signalo sumažėjimas.

Siekiant patvirtinti šią hipotezę buvo pasiruoštas acto rūgšties tirpalas be kitų analičių ir patikrinta, kaip kinta signalo intensyvumas pridėdant skirtingus kiekius natrio dihidrofosfato. Kaip matome grafike (14 pav.), nesant kitų analičių ir didinant tirpalo joninę jėgą signalas didėja ir nusistovi, jokių mažėjimų nepastebime.



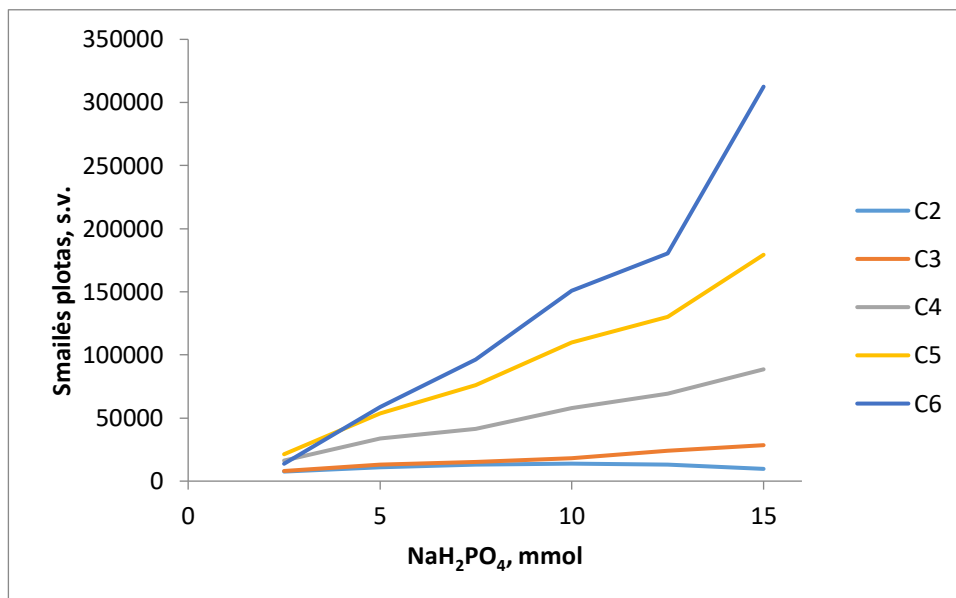
14 pav. Acto rūgšties smailės ploto priklausomybė nuo NaH₂PO₄ kiekio mėginyje.

Siekiant išvengti heterogeninės sistemos formavimosi ir neigiamos jos įtakos tam tikrų analičių perėjimui į viršerdvę buvo nuspręsta sumažinti analičių koncentraciją mėginyje. Naudojant 0,5 mg/ml standartinį lakiųjų rūgščių tirpalą ir 5 mmol druskos priedą buvo palyginti signalo intensyvumai (15 pav.).



15 pav. Smailių ploto priklausomybė nuo lakiosios rūgšties ir tirpalo sudėties

Iš gautų rezultatų matome, kad didžiausi smailių intensyvumai gaunami naudojant Na_2SO_4 ir fosforo rūgšties priedus. Tačiau Na_2SO_4 tirpumas vandenyje yra gana nedidelis, kas apriboja didesnių šios druskos priedų panaudojimo galimybes. Dėl šios priežasties buvo nuspręsta ištirti didesnių kiekių NaH_2PO_4 (kuris taip pat pasižymėjo gana geru išsūdyimo efektu) panaudojimo šioje sistemoje galimybes. Buvo ruošiami standartinio tirpalo mėginiai, kuriuose NaH_2PO_4 kiekis buvo keičiamas nuo 2,5 iki 15 mmol.



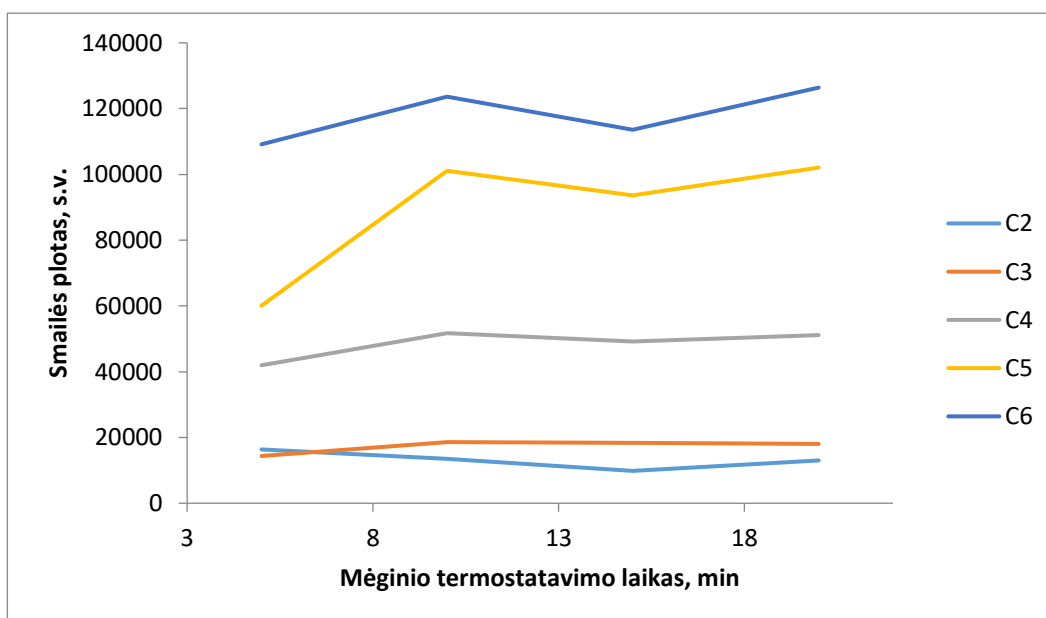
16 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo NaH_2PO_4 kiekio mėginyje

Kaip matome iš 16 pav. druskos kiekio didinimas labiausiai daro įtaką ilgesnės grandinės lakiųjų rūgščių signalo didėjimui. Taip pat matome, kad nuo 10 iki 12,5 mmol ženklaus kitimo nėra, o viršijus 12,5 mmol vėl stebimas staigus pentano ir heksano rūgšties signalo augimas ir acto rūgšties signalo sumažėjimas. Iš to galima spręsti, kad analičių koncentracijos sumažinimas leidžia naudoti didesnius druskos priedo kiekius, nutolinant heterogeninės sistemos formavimąsi.

Remiantis šiais duomenimis tolimesniuose tyrimuose buvo nuspręsta naudoti fosforo rūgštimi parūgštintus tirpalus, kurių koncentracija neviršija 0,5 mg/ml ir 10 mmol NaH_2PO_4 priedą.

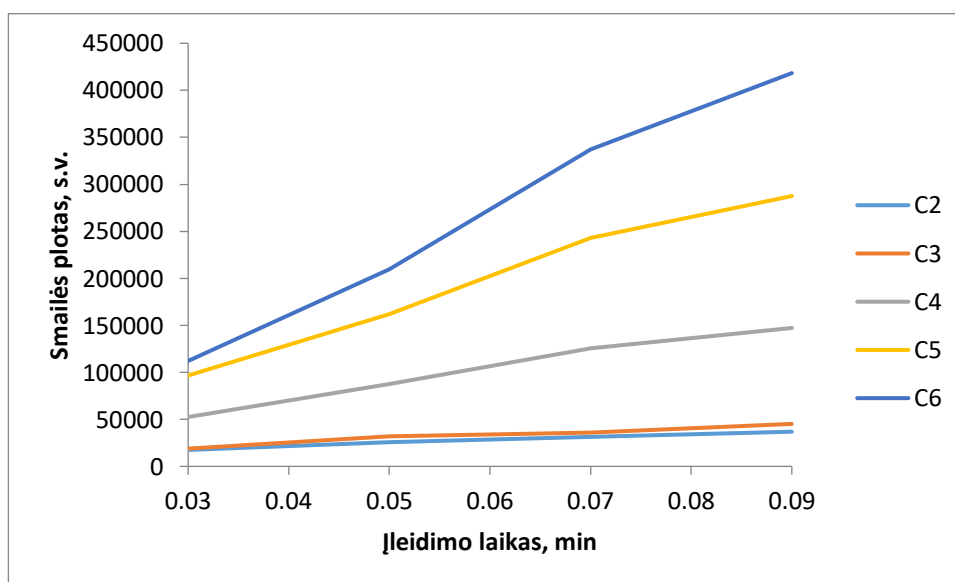
5.3 Viršerdvės įvedimo sistemos sąlygų optimizavimas

Gerus viršerdvės analizės rezultatus galime gauti tada, kai analizė (norimomis sąlygomis) yra pusiausvyroje tarp mėginio ir viršerdvės. Siekiant optimizuoti analizės laiką, bei išsiaiškinti per kiek laiko nusistovi pusiausvyra, buvo atliktas tyrimas keičiant mėginių termostataavimo laiką. Iš 17 paveikslo galime matyti, kad padidinus termostataavimo laiką nuo 5 min iki 10 min smailių plotai padidėjo, o dar labiau didinant trukmę, beveik nebekito. Todėl mėginių termostataavimo laikas buvo pasirinktas 10 min.



16 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo mėginių termostavimo trukmės

Kitas svarbus parametras darantis įtaką viršerdvės analizės jautriui – mėginio įleidimo laikas. Buvo tiriamos mėginio įleidimo trukmės nuo 0,01 iki 0,09 min. Taikant 0,01 min. įleidimo trukmę buvo gaunami itin maži analičių signalai, kuriuos sunku atskirti nuo bazinės linijos triukšmo. 17 paveiksle matoma, kad didinant mėginio įvedimo trukmę, smailių plotai didėja, todėl tolimesniems darbams buvo pasirinkta maksimali mėginio įvedimo trukmė (0.09 min).

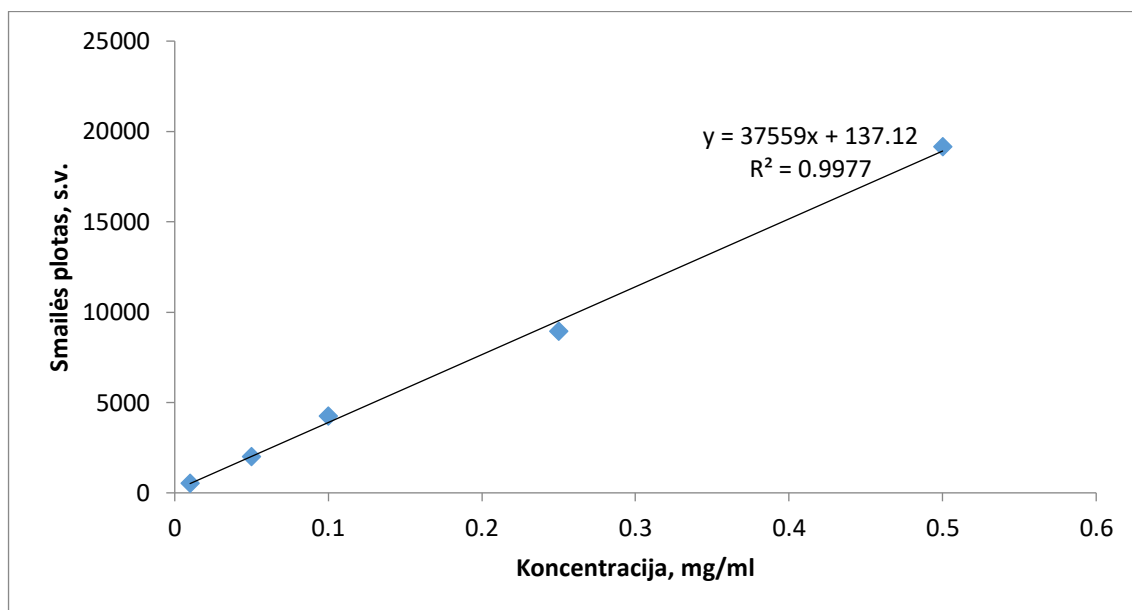


17 pav. Smailės ploto priklausomybė nuo mėginių įleidimo trukmės

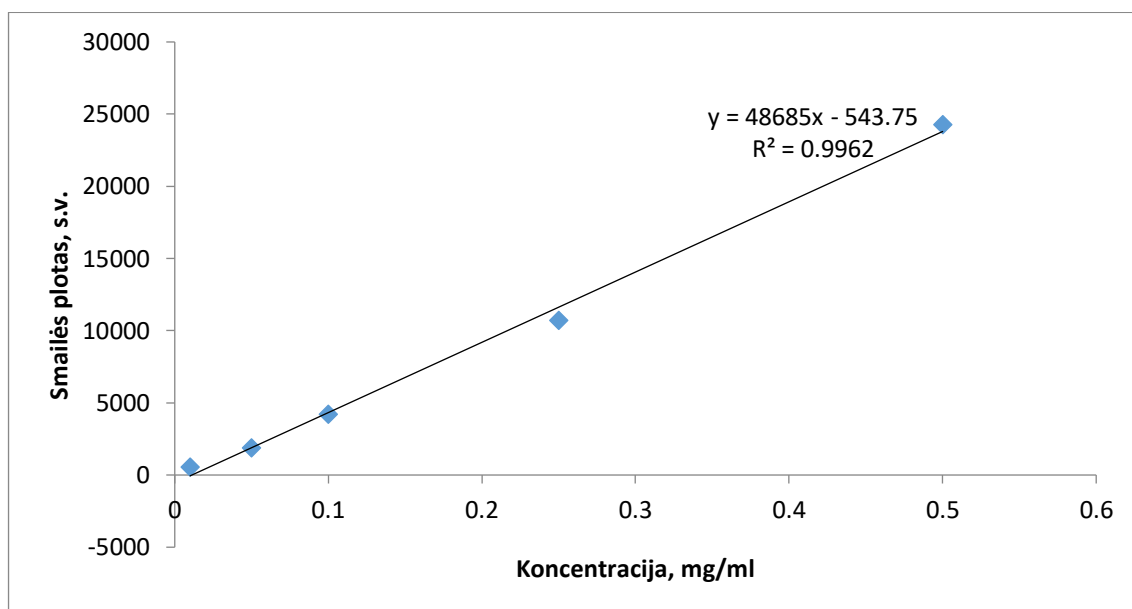
5.4 Kalibracinės kreivės

Kalibracinė kreivė reikalinga kiekybiniam analičių įvertinimui, todėl buvo sudarytos 5 taškų kalibracinės kreivės kiekvienai rūgščiai – 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,01 mg/ml. Buvo naudota tiesės lygties formulė $y = ax + b$, kuri su skaitinėmis reikšmėmis yra matoma žemiau pateiktose kreivėse (18-22 pav.) kartu su koreliacijos koeficientu. Visų kreivių koreliacijos koeficientai gauti sąlyginai aukšti – 0,9949-0.9977. Heksano rūgties kalibracinė kreivė neturi tiesinės priklausomybės

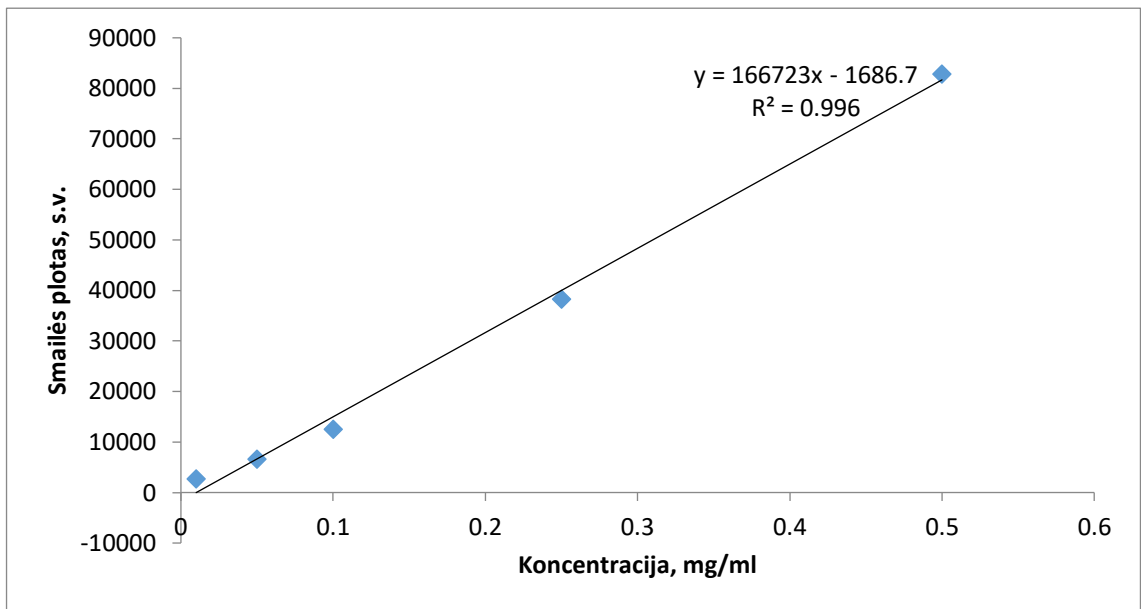
greičiausiai dėl išsūdyimo efekto priklausomybės nuo analizės koncentracijos. Taip pat buvo analizuoti ir mažesnių koncentracijų mėginiai – 0,005 bei 0,001 mg/ml, tačiau šių mėginių smaيليų intensyvumas buvo per mažas ($S/N < 10$). Dėl šios priežasties analizės nustatymo riba yra 10 $\mu\text{g/ml}$.



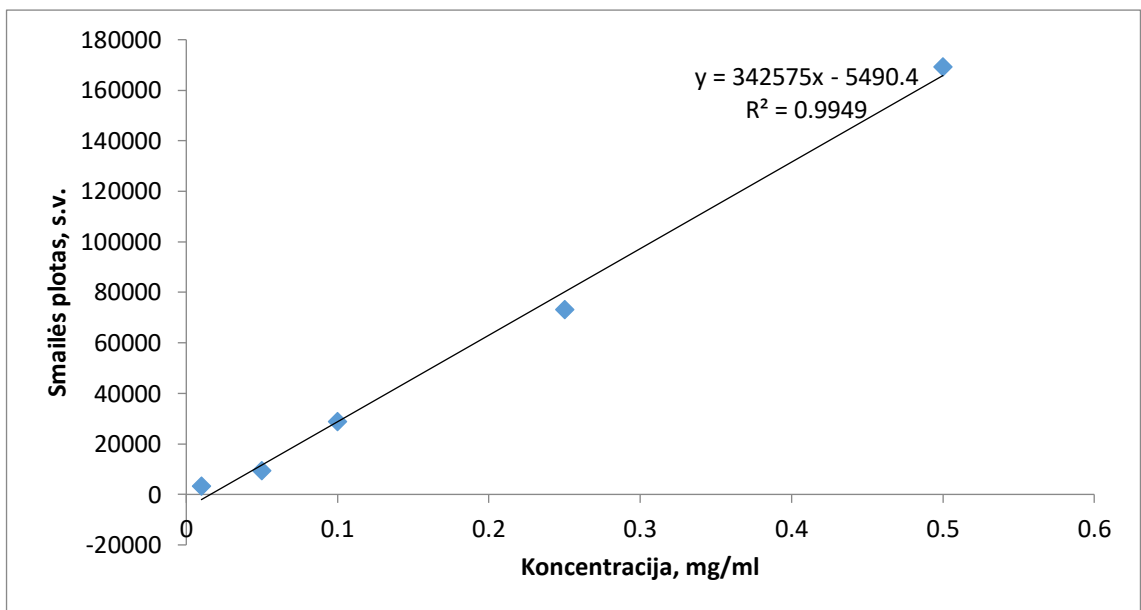
18 pav. Acto rūgšties kalibracinė kreivė



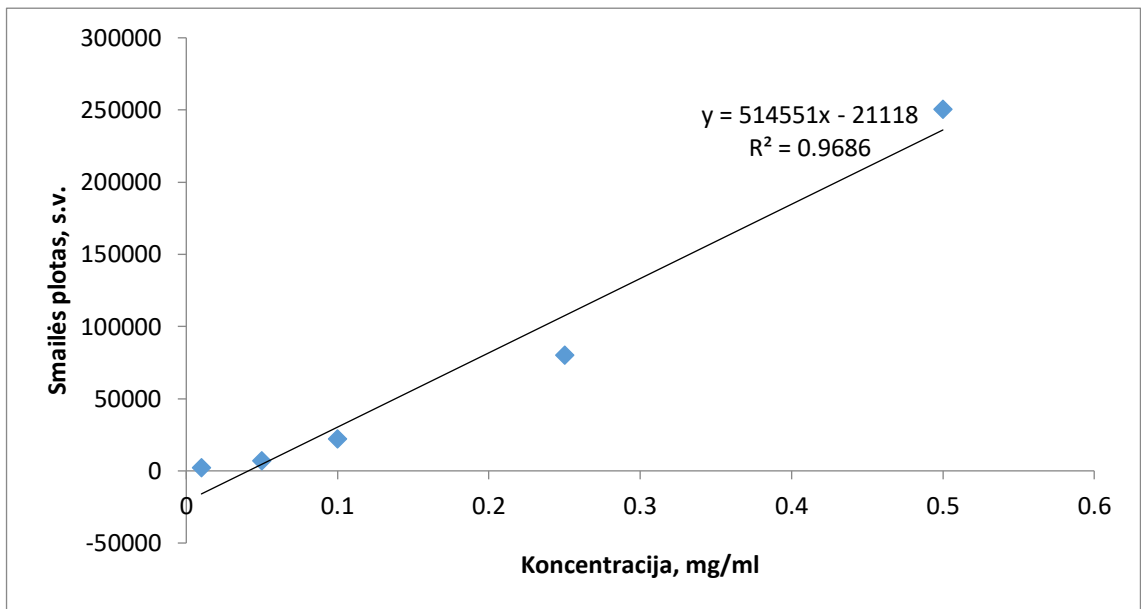
19 pav. Propano rūgšties kalibracinė kreivė



20 pav. Sviesto rūgšties kalibracinē kreivē



21 pav. Pentano rūgšties kalibracinē kreivē



22 pav. Heksano rūgšties kalibracinē kreivē

IŠVADOS

1. Optimizuotos dujų chromatografijos sąlygos leidžiančios per trumpą laiką atskirti visas nederivatizuotas lakiąsias rūgštis.

2. Ištirta įvairių druskų ir mėginio rūgštinimo įtaka analičių perėjimui iš vandeninės terpės į viršerdvę. Nustatyta, kad geriausias rezultatus galima gauti naudojant 10 mmol NaH₂PO₄ priedą bei mėginį parūgštinus fosforo rūgštimi. Didelių druskų kiekio naudojimas sukelia heterogeninių sistemų formavimąsi.

3. Optimizuotos pastovaus slėgio viršerdvės mėginio įvedimo sąlygos: termostataavimo laikas 10 min. mėginio įleidimo trukmė 0,09 min. Metodas tinkamas acto, propiono, sviesto ir pentano rūgščių nustatymui koncentracijų intervale nuo 10 µg/ml iki 0,5 mg/ml, tačiau netinkamas heksano rūgšties nustatymui.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] M. C, G. A, Idania D. Fatty Acids and Emotional Behavior. *Neuroscience - Dealing With Frontiers*, (2012).
- [2] Mihaylova MM, Stratton MS. Short chain fatty acids as epigenetic and metabolic regulators of neurocognitive health and disease. *Nutritional Epigenomics*, **14**, 381–97 (2019).
- [3] Douny C, Dufourny S, Brose F, Verachtert P, Rondia P, Lebrun S, Marzorati M, Everaert N, Delcenserie V, Scippo ML. Development of an analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME-GC–MS in samples coming from an in vitro gastrointestinal model. *Journal of Chromatography B*, **1124**, 188–96 (2019).
- [4] Xiong RG, Zhou DD, Wu SX, Huang SY, Saimaiti A, Yang ZJ, Shang A, Zhao CN, Gan RY, Li H Bin. Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids. *Foods 2022*, Vol. 11, Page 2863, **11**, 2863 (2022).
- [5] Zhao R, Chu L, Wang Y, Song Y, Liu P, Li C, Huang J, Kang X. Application of packed-fiber solid-phase extraction coupled with GC–MS for the determination of short-chain fatty acids in children’s urine. *Clinica Chimica Acta*, **468**, 120–5 (2017).
- [6] García-Villalba R, Giménez-Bastida JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Carlos Espín J, Larrosa M. Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in faecal samples. *J Sep Sci*, **35**, 1906–13 (2012).
- [7] Fiori J, Turroni S, Candela M, Brigidi P, Gotti R. Simultaneous HS-SPME GC-MS determination of short chain fatty acids, trimethylamine and trimethylamine N-oxide for gut microbiota metabolic profile. *Talanta*, **189**, 573–8 (2018).
- [8] Maltz RM, Keirse J, Kim SC, Mackos AR, Gharaibeh RZ, Moore CC, Xu J, Somogyi A, Bailey MT. Social Stress Affects Colonic Inflammation, the Gut Microbiome, and Short-chain Fatty Acid Levels and Receptors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **68**, 533–40 (2019).
- [9] Annunziata G, Arnone A, Ciampaglia R, Tenore GC, Novellino E. Fermentation of Foods and Beverages as a Tool for Increasing Availability of Bioactive Compounds. Focus on Short-Chain Fatty Acids. *Foods 2020*, Vol. 9, Page 999, **9**, 999 (2020).
- [10] Jia R, Chen H, Chen H, Ding W. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *J Dairy Sci*, **99**, 221–7 (2016).
- [11] Olšovská J, Vrzal T, Štěrba K, Slabý M, Kubizniaková P, Čejka P. The chemical profiling of fatty acids during the brewing process. *J Sci Food Agric*, **99**, 1772–9 (2019).
- [12] Bhat R, Suryanarayana LC, Chandrashekara KA, Krishnan P, Kush A, Ravikumar P. *Lactobacillus plantarum* mediated fermentation of *Psidium guajava* L. fruit extract. *J Biosci Bioeng*, **119**, 430–2 (2015).
- [13] Hu R, Zeng F, Wu L, Wan X, Chen Y, Zhang J, Liu B. Fermented carrot juice attenuates type 2 diabetes by mediating gut microbiota in rats. *Food Funct*, **10**, 2935–46 (2019).
- [14] Beilen JWA van, Mattos MJT de, Hellingwerf KJ, Brul S. Distinct Effects of Sorbic Acid and Acetic Acid on the Electrophysiology and Metabolism of *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, **80**, 5918 (2014).
- [15] León Peláez AM, Serna Cataño CA, Quintero Yepes EA, Gamba Villarroel RR, De Antoni GL, Giannuzzi L. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*, **24**, 177–83 (2012).

- [16] Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR. A rapid capillary gas chromatographic method for the determination of propionic acid and propionates in bread and bread products. *Food Addit Contam*, **11**, 295–300 (1994).
- [17] Wen X, Xiaoyue D, Longkun D, Yue X, Man Y, Min Z, Liang W, Chengxue Y, Huaxi X. Three main short-chain fatty acids inhibit the activation of THP-1 cells by *Mycoplasma pneumoniae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **85**, 923–30 (2021).
- [18] Wang F, Liu J, Weng T, Shen K, Chen Z, Yu Y, Huang Q, Wang G, Liu Z, Jin S. The Inflammation Induced by Lipopolysaccharide can be Mitigated by Short-chain Fatty Acid, Butyrate, through Upregulation of IL-10 in Septic Shock. *Scand J Immunol*, **85**, 258–63 (2017).
- [19] Chen D, Gao ZQ, Wang YY, Wan B Bin, Liu G, Chen JL, Wu YX, Zhou Q, Jiang SY, Yu RQ, Pang QF. Sodium Propionate Enhances Nrf2-Mediated Protective Defense Against Oxidative Stress and Inflammation in Lipopolysaccharide-Induced Neonatal Mice. *J Inflamm Res*, **14**, 803–16 (2021).
- [20] Cait A, Hughes MR, Antignano F, Cait J, Dimitriu PA, Maas KR, Reynolds LA, Hacker L, Mohr J, Finlay BB, Zaph C, McNagny KM, Mohn WW. Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunol*, **11**, 785–95 (2018).
- [21] Yang W, Yu T, Huang X, Bilotta AJ, Xu L, Lu Y, Sun J, Pan F, Zhou J, Zhang W, Yao S, Maynard CL, Singh N, Dann SM, Liu Z, Cong Y. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity. *Nat Commun*, **11**, (2020).
- [22] Prentice PM, Schoemaker MH, Vervoort J, Hettinga K, Lambers TT, Van Tol EAF, Acerini CL, Olga L, Petry CJ, Hughes IA, Koulman A, Ong KK, Dunger DB. Human Milk Short-Chain Fatty Acid Composition is Associated with Adiposity Outcomes in Infants. *J Nutr*, **149**, 716–22 (2019).
- [23] Goswami C, Iwasaki Y, Yada T. Short-chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons. *J Nutr Biochem*, **57**, 130–5 (2018).
- [24] Jiao A, Yu B, He J, Yu J, Zheng P, Luo Y, Luo J, Mao X, Chen D. Short chain fatty acids could prevent fat deposition in pigs via regulating related hormones and genes. *Food Funct*, **11**, 1845–55 (2020).
- [25] Chen Y, Xu C, Huang R, Song J, Li D, Xia M. Butyrate from pectin fermentation inhibits intestinal cholesterol absorption and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr Biochem*, **56**, 175–82 (2018).
- [26] Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Markó L, Höges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kräker K, Hering L, Maase M, Kusche-Vihrog K, Grandoch M, Fielitz J, Kempa S, Gollasch M, Zhumadilov Z, Kozhakhmetov S, Kushugulova A, Eckardt KU, Dechend R, Rump LC, Forslund SK, Müller DN, Stegbauer J, Wilck N. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation*, **139**, 1407–21 (2019).
- [27] Hsu CN, Chang-Chien GP, Lin S, Hou CY, Tain YL. Targeting on Gut Microbial Metabolite Trimethylamine-N-Oxide and Short-Chain Fatty Acid to Prevent Maternal High-Fructose-Diet-Induced Developmental Programming of Hypertension in Adult Male Offspring. *Mol Nutr Food Res*, **63**, (2019).

- [28] Casanova MR, Azevedo-Silva J, Rodrigues LR, Preto A. Colorectal Cancer Cells Increase the Production of Short Chain Fatty Acids by Propionibacterium freudenreichii Impacting on Cancer Cells Survival. *Front Nutr*, **5**, (2018).
- [29] Matsuya-Ogawa M, Shibata T, Itoh H, Murakami H, Yaguchi C, Sugihara K, Kanayama N. Oncoprotective Effects of Short-Chain Fatty Acids on Uterine Cervical Neoplasia. *Nutr Cancer*, **71**, 312–9 (2019).
- [30] De Roos J, De Vuyst L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr Opin Biotechnol*, **49**, 115–9 (2018).
- [31] Marazza JA, LeBlanc JG, de Giori GS, Garro MS. Soymilk fermented with Lactobacillus rhamnosus CRL981 ameliorates hyperglycemia, lipid profiles and increases antioxidant enzyme activities in diabetic mice. *J Funct Foods*, **5**, 1848–53 (2013).
- [32] Li C, Nie SP, Zhu KX, Xiong T, Xie MY. Lactobacillus plantarum NCU116 fermented carrot juice evokes changes of metabolites in serum from type 2 diabetic rats. *Food Research International*, **80**, 36–40 (2016).
- [33] Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **11**, 508738 (2020).
- [34] Asarat M, Vasiljevic T, Ravikumar M, Apostolopoulos V, Donkor O. Extraction and Purification of Short-chain Fatty Acids from Fermented Reconstituted Skim Milk Supplemented with Inulin. *Food Anal Methods*, **9**, 3069–79 (2016).
- [35] Chalova P, Tazky A, Skultety L, Minichova L, Chovanec M, Ciernikova S, Mikus P, Piestansky J. Determination of short-chain fatty acids as putative biomarkers of cancer diseases by modern analytical strategies and tools: a review. *Front Oncol*, **13**, (2023).
- [36] Vagaggini C, Brai A, Bonente D, Lombardi J, Poggialini F, Pasqualini C, Barone V, Nicoletti C, Bertelli E, Dreassi E. Development and validation of derivatization-based LC-MS/MS method for quantification of short-chain fatty acids in human, rat, and mouse plasma. *J Pharm Biomed Anal*, **235**, 115599 (2023).
- [37] De Baere S, Eeckhaut V, Steppe M, De Maesschalck C, De Backer P, Van Immerseel F, Croubels S. Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *J Pharm Biomed Anal*, **80**, 107–15 (2013).
- [38] Altria KD. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Vol. 2, (1996).
- [39] Monnig CA, Kennedy RT. Capillary electrophoresis. *Anal Chem*, **66**, 280–314 (1994).
- [40] Marques LA, Cazarin CBB, Bicas J, Maróstica MR, Carrilho E, Bogusz S. Determination of Short Chain Fatty Acids in Mice Feces by Capillary Electrophoresis. *J Braz Chem Soc*, **30**, 1326–34 (2019).
- [41] Hoving LR, Heijink M, van Harmelen V, van Dijk KW, Giera M. GC-MS Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Feces, Cecum Content, and Blood Samples. *Methods Mol Biol*, **1730**, 247–56 (2018).
- [42] Zhang S, Wang H, Zhu MJ. A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. *Talanta*, **196**, 249–54 (2019).
- [43] Harvey DJ, Vouros P. MASS SPECTROMETRIC FRAGMENTATION OF TRIMETHYLSILYL AND RELATED ALKYL SILYL DERIVATIVES. *Mass Spectrom Rev*, **39**, 105–211 (2020).
- [44] Sparkman OD, Penton ZE, Kitson FG. Gas Chromatography. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Elsevier, pp.15–83 (2011).

- [45] Robards K, Haddad PR, Jackson PE. Gas Chromatography. *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Chap. 3, Academic Press, pp.75–177 (2004).
- [46] “A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC”.: <<https://d1l1qgfmy9cwjff.cloudfront.net/csi/pdf/e/rk67.pdf>>, cited 23 January, 2023.
- [47] Weggler BA, Gruber B, Teehan P, Jaramillo R, Dorman FL. Inlets and sampling. *Separation Science and Technology (New York)*, **12**, 141–203 (2020).
- [48] Zhang C, Tang P, Xu H, Weng Y, Tang Q, Zhao H. Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Fecal Samples by Headspace-Gas Chromatography. *Chromatographia*, **81**, 1317–23 (2018).
- [49] Tangerman A, van Schaik A, Meuwese-Arends MT, van Tongeren JHM. Quantitative determination of C2-C8 volatile fatty acids in human serum by vacuum distillation and gas chromatography. *Clinica Chimica Acta*, **133**, 341–8 (1983).
- [50] McGrath LT, Weir CD, Maynard S, Rowlands BJ. Gas-liquid chromatographic analysis of volatile short chain fatty acids in fecal samples as pentafluorobenzyl esters. *Anal Biochem*, **207**, 227–30 (1992).
- [51] Pruksatrakul T, Phoopraintra P, Wilairat P, Chaiyen P, Chantiwas R. Development of a sequential injection-liquid microextraction procedure with GC-FID for analysis of short-chain fatty acids in palm oil mill effluent. *Talanta*, **165**, 612–8 (2017).
- [52] Dobrowolska-Iwanek J, Zagrodzki P, Woźniakiewicz M, Woźniakiewicz A, Zwolińska - Wcisło M, Winnicka D, Paśko P. Procedure optimization for extracting short-chain fatty acids from human faeces. *J Pharm Biomed Anal*, **124**, 337–40 (2016).
- [53] Rahman MN, Diantini A, Fattah M, Barliana MI, Wijaya A. A highly sensitive, simple, and fast gas chromatography-mass spectrometry method for the quantification of serum short-chain fatty acids and their potential features in central obesity.
- [54] Sasaki R, Umezawa M, Tsukahara S, Ishiguro T, Sato S, Watanabe Y. Assignment of Milk Fat Fatty Acid Propyl Esters by GC-FID Analysis with the Aid of Ag-ion Solid-phase Extraction. *J Oleo Sci*, **64**, 1251–8 (2015).
- [55] Chen LQ, Kang XJ, Sun J, Deng JJ, Gu ZZ, Lu ZH. Application of nanofiber-packed SPE for determination of salivary-free cortisol using fluorescence precolumn derivatization and HPLC detection. *J Sep Sci*, **33**, 2369–75 (2010).
- [56] Zhao G, Nyman M, Jönsson JÅ. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr*, **20**, 674–82 (2006).

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

AGNĖ USCILAITĖ

Lakiųjų rūgščių nustatymas viršerdvės dujų chromatografijos metodu

Trumposios grandinės riebalų rūgštys (SCFA) pastaruoju metu sulaukė didelio dėmesio dėl savo teigiamo poveikio organizmui. Dėl lakiųjų rūgščių pritaikomumo biologijoje bei maisto pramonėje, yra svarbu sukurti pigų, greitą, lengvą ir patikimą nustatymo metodą. Šiame darbe buvo sukurtas greitas, lengvas ir patikimas viršerdvės dujų chromatografijos metodas penkioms lakiosioms rūgštims nustatyti. Metodika apima paprastą mėginių paruošimą – į analizuojamąjį tirpalą pridedant NaH_2PO_4 bei mėginius parūgštinant su fosforo rūgštimi. Tuomet mėginiai analizuojami viršerdvės dujų chromatografija, naudojant polietilenglikolio kapiliarinę kolonėlę ir liepsnos jonizacinį detektorių. Šis optimizuotas metodas leidžia per trumpą laiką atsikirti lakiąsias rūgštis. Taip pat tirta įvairių druskų įtaką ir nustatyta, kad geriausi analizės rezultatai pasiekiami, naudojant 10 mmol NaH_2PO_4 . Optimizavus viršerdvės mėginio įvedimo sąlygas, nustatyta, kad geriausias mėginio termostataavimo laikas yra 10 min, o mėginio įleidimo trukmė 0,09 min. Metodas tinkamas acto, propiono, sviesto ir pentano rūgščių nustatymui koncentracijų intervale nuo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iki 0,5 mg/ml, tačiau netinkamas heksano rūgšties nustatymui.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

AGNĖ USCILAITĖ

Determination of volatile acids using headspace gas chromatography

Short-chain fatty acids (SCFA) have recently received a lot of attention for their beneficial effects for the body. Due to the applicability of volatile acids in biology and food industry, it is important to develop a cheap, fast, easy and reliable method for their determination. In this study, a fast, easy and reliable headspace gas chromatography method was developed for the determination of five volatile acids. The methodology includes simple sample preparation - adding NaH_2PO_4 to the analyzed solution and acidifying the samples with phosphoric acid. The samples are then analyzed by headspace gas chromatography using a polyethylene glycol capillary column and flame ionization detector. This optimized method makes it possible to separate volatile acids in a short analysis time. The influence of various salts was also studied and it was found that the best analysis results are obtained by using 10 mmol NaH_2PO_4 . After optimizing the headspace sample injection conditions, the best sample incubation time was found to be 10 min, with a sample injection time of 0.09 min. The method is suitable for the determination of acetic, propionic, butyric and pentanoic acids in the concentration range from 10 $\mu\text{g/ml}$ to 0.5 mg/ml , but is not suitable for the determination of hexanoic acid.