

ROBERT DULIŃSKI, ANNA STARZYŃSKA-JANISZEWSKA

**ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII JONOWEJ SPRZĘŻONEJ
Z PULSACYJNĄ DETEKcją AMPEROMETRYCZNĄ
DO OZNACZANIA ZAWARTOŚCI *MIO*-INOZYTOLU
W MATERIAŁACH PASZOWYCH POCHODZENIA ROŚLINNEGO**

Streszczenie

W pracy zastosowano technikę chromatografii jonowej do oznaczania zawartości *mio*-inozytolu w roślinnych komponentach pasz, jako alternatywę testu mikrobiologicznego. Materiał badawczy stanowiły: pszenica, kukurydza i soja niemodyfikowane oraz odmiany GMO, a także przygotowane na ich bazie mieszanki paszowe. Oznaczono inozytol: całkowity, wolny oraz uwolniony w procesie *in vitro*, symulującym przewód pokarmowy drobiu. *Mio*-inozytol został rozdzielony w wysokosprawnej kolumnie anionowymiennej CarboPack PA100 i oznaczony w trybie pulsacyjnej detekcji amperometrycznej (ang. high performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection, HPAEC–PAD). Całkowity inozytol oznaczony techniką HPAEC–PAD kształtował się na poziomie od 2572 µg/g (pasza kukurydziano-sojowa) do 3667 µg/g (kukurydza). Otrzymane dane były porównywalne z testem mikrobiologicznym tylko w przypadku śruty sojowej, zarówno w formie niemodyfikowanej, jak i GMO (odpowiednio: 2392 i 2636 µg/g). W odniesieniu do pozostałych komponentów pasz wyniki uzyskane za pomocą techniki HPAEC–PAD były wyższe od rezultatów testu mikrobiologicznego, średnio o 30 - 50 %. Korelacja pomiędzy obiema metodami w zakresie stężeń 0,1-100 µg/ml była najwyższa w przypadku analizy *mio*-inozytolu uwolnionego w procedurze trawienia *in vitro* ($r = 0,88$). W pozostałych przypadkach, w teście mikrobiologicznym uzyskiwano systematycznie niższe wyniki, ponieważ uwolnienie całkowitego inozytolu przez kwaśną hydrolizę było niepełne i testowy mikroorganizm *S.cerevisiae* ATCC 9080 nie mógł wykorzystać do wzrostu monofosforanu inozytolu. Inna możliwość to efekt dużej zawartości aminokwasów hydrofobowych w komponentach pasz zawierających soję, które mogą interferować z systemem pulsacyjnej detekcji amperometrycznej.

Słowa kluczowe: *mio*-inozytol, fosforany *mio*-inozytolu, chromatografia jonowa, detekcja elektrochemiczna

Wprowadzenie

Mio-inozytol jest komponentem fosfolipidów błon, a fosforany inozytolu pełnią funkcję w sygnalizacji międzykomórkowej [6, 10, 28]. Związek ten jest również uważany za czynnik wzrostowy oraz wskaźnik nieprawidłowego metabolizmu lub choroby [13]. U gryzoni oraz ryb niedobór tego składnika może być związany z otluszczeniem wątroby, wewnętrzną lipodystrofią oraz zahamowaniem wzrostu [1, 18, 21]. Deraniem i Greenberg [5] oraz Eagle i wsp. [8] stwierdzili, że niedobór *mio*-inozytolu hamował proliferację i prowadził do śmierci hodowlanych komórek ludzkich.

Enzymatyczna hydroliza kwasu fitynowego (sześćfosforanu *mio*-inozytolu) – głównej formy magazynowania fosforu w nasionach traw oraz roślin oleistych, które są powszechnymi komponentami pasz zwierzęcych – prowadzi do powstania fosforanów *mio*-inozytolu [3, 11, 24, 25]. Kwas fitynowy oraz jego sole (fityniany) są uważane za czynniki przeciwożywcze z uwagi na zdolność chelatowania jonów metali, a przez to obniżania biodostępności białka i żywieniowo istotnych minerałów [25]. Jednoczesne działanie fitazy i grzybowej kwaśnej fosfatazy na cząsteczkę fitynianu prowadzi do powstania fosforu oraz *mio*-inozytolu jako finalnego produktu hydrolizy [31].

Żyła i wsp. [32] stwierdzili znaczący przyrost masy ciała kurcząt broilerów karmionych niskofitynianową dietą wzbogaconą inozytolem. Oczekuje się, że enzymatycznie generowany inozytol (ang. enzymatically generated inositol, EGI) może poprawić parametry odchowu i wzrostu rosnących broilerów. Oznaczenie tego składnika w paszy i jej komponentach jest zatem istotnym czynnikiem w oszacowaniu puli EGI i określeniu ewentualnych efektów metabolicznych.

Dotychczas opracowano kilka metod analitycznych do oznaczania *mio*-inozytolu w żywności i płynach biologicznych: test mikrobiologiczny [19], procedurę enzymatyczną [17], chromatografię gazową [23] oraz technikę HPLC [14]. Generalnie, wymagają one derywatywacji, pośredniego pomiaru i są, jak w przypadku metod mikrobiologicznych, czasochłonne, a zatem trudne do zastosowania w przypadku rutynowych analiz dużej liczby próbek.

Od momentu wprowadzenia techniki wysokosprawnej anionowymiennej chromatografii cieczowej sprzężonej z pulsacyjną detekcją amperometryczną (ang. high performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection, HPAEC–PAD) znacząco poprawiła się czułość i selektywność rozdzielania węglowodanów oraz polioli w napojach fermentowanych i sokach owocowych [2, 4, 27]. Jednak dane literaturowe są dość ubogie w zakresie oznaczania poziomu inozytolu w paszach oraz ich komponentach przy zastosowaniu tej techniki.

Celem niniejszej pracy było alternatywne, wobec metody mikrobiologicznej, oznaczenie *mio*-inozytolu w roślinnych komponentach pasz i mieszkankach paszowych.

Material i metody badań

Analizie poddano roślinne komponenty pasz oraz mieszanki paszowe zawierające: pszenicę, soję i kukurydzę niemodyfikowane, jak również odmiany genetycznie zmodyfikowane (GMO, poekstrakcyjna śruta sojowa HT RoundUpReady, kukurydza BT MON-810, materiały z Instytutu Zootechniki - PIB Balice).

Stosowano enzymy: pepsynę (aktywność deklarowana $225\ 000\ \text{units}\cdot\text{mg}^{-1}$) i pankreatynę (aktywność: $8\times\text{U.S. Pharmacopeia}$), Sigma Chemical Co.

Ekstrakty śrut i pasz do oznaczeń wolnego inozytoliu przygotowywano zgodnie z metodą Norrisa i Darbre'a [19] oznaczania inozytoliu wolnego oraz związanego w materiale roślinnym. Naważkę materiału do oznaczeń w ilości 100 - 200 mg inkubowano w temp. $123\ ^\circ\text{C}$ przez 48 h z dodatkiem 2 ml 1 M HCl. Po zakończonej hydrolyzie próbowki chłodzono, a zawartość filtrowano przez bibułę Whatman nr 1. Czarne pozostałości filtrowanych próbek w lejku przemywano wodą destylowaną do momentu, gdy kropla wymywanego roztworu była neutralna wobec zieleni bromokrezolowej, jako wskaźnika. Ustalano pH całości na poziomie 4,8 - 5,0, a następnie uzupełniano wodą destylowaną do określonej objętości. Próbkę ogrzewano w łaźni wodnej do temp. $90\ ^\circ\text{C}$, pozostawiano do ochłodzenia i przechowywano w chłodni w temp. $0 - 4\ ^\circ\text{C}$.

Metoda in vitro

W celu oznaczenia biodostępności inozytoliu uwolnionego z pasz i jej komponentów zastosowano metodę *in vitro* opisaną przez Żyłę i wsp. [31]. Metoda ta symuluje trawienie w przewodzie pokarmowym drobiu. W tym celu 1 g paszy lub jej roślinnych komponentów inkubowano w łaźni wodnej w temp. $40\ ^\circ\text{C}$ przez 30 min. Następnie do próbek wprowadzano 1,7 mg roztworu pepsyny (Sigma, Niemcy, deklarowana aktywność $4750\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Kontynuowano inkubację w łaźni wodnej o temp. $40\ ^\circ\text{C}$ przez 45 min. Inkubację przerywano, dodając do próbek 2,5 mg pankreatyny (Sigma, aktywność $8\times\text{U.S. Pharmacopeia}$). Próbkę przenoszono ilościowo do worków dializacyjnych, które następnie umieszczano w kolbach stożkowych zawierających 50 ml buforu bursztynianowego. Kolby wstawiano do łaźni wodnej i wytrząsając, inkubowano przez 4 h w temp. $40\ ^\circ\text{C}$. W uzyskanych dializatach oznaczano zawartość inozytoliu uwolnionego z paszy podczas jej trawienia (w pracy definiowany jako dializowany lub *in vitro*).

Oznaczanie inozytoliu metodą mikrobiologiczną z udziałem drożdży S. cerevisiae ATCC 9080

Oznaczanie inozytoliu metodą mikrobiologiczną z udziałem auksotroficznego szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 wykonywano według metody Norris i Darbre [19]. Z hodowli drożdży na skosie agarowym pobierano oczko ezy

i zawieszano w 10 ml sterylnego roztworu 0,85 % NaCl. Po odwirowaniu i przemyciu, 0,5 ml zawiesiny komórek wprowadzano do 500 ml 0,85 % sterylnego roztworu NaCl. Następnie 40 μ l zawiesiny drożdży dodawano do wcześniej wysterylizowanych kolbek stożkowych zawierających płynną pożywkę hodowlaną pozbawioną inozytoli (Difco Inositol Assay Medium) oraz badane roztwory lub wzorce (zakres krzywej wzorcowej: 0 - 1 μ g inozytoli \cdot ml⁻¹). Wszystkie wzorce wykonano w trzech powtórzeniach. Po zaszczepieniu kolbki inkubowano 24 h w temp. 30 °C, a następnie przerywano hodowlę przez umieszczenie próbek w chłodziarce na 15 - 30 min. Miarą wzrostu *S. cerevisiae* ATCC 9080 był pomiar gęstości optycznej przy długości fali 660 nm. W obliczeniach zastosowano transformację logarymiczną danych, zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Norris i Darbre [19].

System HPLC z detekcją RI

Rozdział chromatograficzny wykonywano w układzie izokratycznym przy zastosowaniu wody dejonizowanej jako fazy ruchomej, przy prędkości przepływu 0,6 ml \cdot min⁻¹, w kolumnie analitycznej Aminex HPX-87C (300 mm \times 7,8 mm; BioRad, Hercules, CA, USA) termostatowanej w temp. 85 °C. Zastosowano chromatograf cieczowy Ultimate 3000 wyposażony w pompę gradientową LPG-3400A, autosampler WPS-3000SL, termostat do kolumn TCC-3000, detektor UV-VIS z matrycą diodową PDA-3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) oraz detektor RI 2300 (Knauer, Berlin, Niemcy), współpracujące z oprogramowaniem do akwizycji danych Chromeleon wersja 8,0. Przed rozdziałem próbki filtrowano przez filtry strzykawkowe z nylonu o średnicy 0,22 μ m. Objętość iniekcji wynosiła 100 μ l.

System chromatografii jonowej HPAEC-PAD

Rozdział prowadzono przy zastosowaniu pompy izokratycznej, model ISO-3000 oraz pulsacyjnego detektora amperometrycznego, model ED50 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), półautomatycznego zaworu nastrzykowego z pętlą o pojemności 20 μ l (Rheodyne) oraz kolumny CarboPac PA100 (250 \times 4 mm) wraz z kolumną ochronną CarboPac PA100 (5 \times 4 mm) (Dionex). Cella detekcyjna zawierała złotą elektrodę roboczą oraz elektrodę referencyjną z Ag/AgCl. Wszystkie analizy zostały przeprowadzono w temperaturze pokojowej przy prędkości przepływu 1 ml \cdot min⁻¹ i wykorzystaniu jako eluentu 0,15 M wodorotlenku sodu oraz 0,175 M octanu sodu, tryb detekcji to zintegrowana pulsacyjna detekcja amperometryczna (IPAD) [27]. Przed rozdziałem próbki filtrowano przez filtry strzykawkowe z nylonu o średnicy 0,22 μ m. Objętość iniekcji wynosiła 100 μ l. Akwizycja i obróbka danych zostały wykonane za pomocą programu Chromeleon wersja 8.0.

Z otrzymanych wyników obliczano średnie arytmetyczne (n = 3 w teście mikrobiologicznym, n = 4 w technice HPAEC) i odchylenia standardowe. Analizę staty-

styczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica wer. 9.0. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem NIR Tukey'a na poziomie $p \leq 0,05$. Analizę korelacji pomiędzy metodami oznaczania *mio*-inozytolu przeprowadzono na poziomie prawdopodobieństwa 95 %.

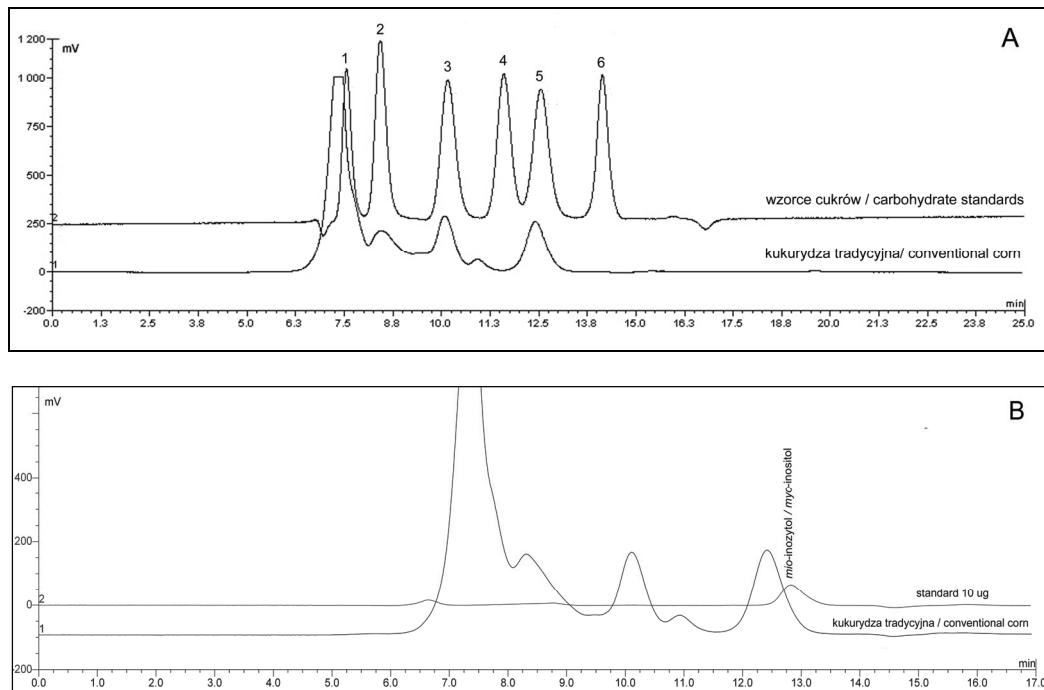
Wyniki i dyskusja

W metodzie mikrobiologicznej do oznaczania *mio*-inozytolu w materiale biologicznym wykorzystano auksotroficzny szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080. Przyrost biomasy drożdży warunkowany był obecnością *mio*-inozytolu w badanych próbkach, miarą wzrostu *S. cerevisiae* był pomiar gęstości optycznej hodowli przy długości fali 660 nm.

W pierwszej fazie badań, jako alternatywną technikę instrumentalną rozwijano metodę HPLC z detekcją refraktometryczną. Niestety, w warunkach rekomendowanych dla pracy kolumny (temp. 85 °C) uzyskane chromatogramy z analizy próbek zarówno *mio*-inozytolu dializowanego, jak i wolnego nie pozwalały na identyfikację piku reprezentowanego przez *mio*-inozytol (rys. 1B). Specyfika metody *in vitro* powoduje, że zastosowany na etapie trawienia zestaw enzymatyczny przyczynił się do uzyskania w dializatach (inozytol dializowalny) bardzo szerokiego spektrum związków o charakterze peptydów, aminokwasów oraz sacharydów. Jeden z monosacharydów – na podstawie analizy wzorców można wnioskować, że to jest fruktoza (rys. 1A), o czasie retencji (12,43 min) zbliżonym do *mio*-inozytolu (12,85 min) – obecny w dializacie w dużym stężeniu powodował przypuszczalnie trudności z identyfikacją interesującego polioliu. Zastosowany izokratyczny układ rozdziału, który nie pozwala na operowanie gradientem i stosunkowo niska czułość w trybie detekcji RI (*mio*-inozytol charakteryzuje niewielka aktywność optyczna), zadecydowały o rezygnacji z dalszych analiz w tym układzie pomiarowym.

Z uwagi na relatywnie niski poziom *mio*-inozytolu m.in. w próbkach uzyskanych z procedury *in vitro* wprowadzono technikę chromatografii jonowej z czułym systemem pulsacyjnej detekcji amperometrycznej (sygnały standardów rys. 1B (10 µg) oraz (0,1 µg)). Zastosowana kolumna CarboPack PA-100 pozwalała na obserwację profilu sacharydów oraz *mio*-inozytolu. Typowy chromatogram z analizy tą metodą przedstawiono na rys. 2.

Zawartość całkowitego inozytolu oznaczona metodą HPAEC była największa w kukurydzy niemodyfikowanej (3667 µg·g⁻¹), natomiast metodą mikrobiologiczną wykazano najwyższy poziom w śrucie sojowej GMO (2636,40 µg·g⁻¹) (tab. 1).

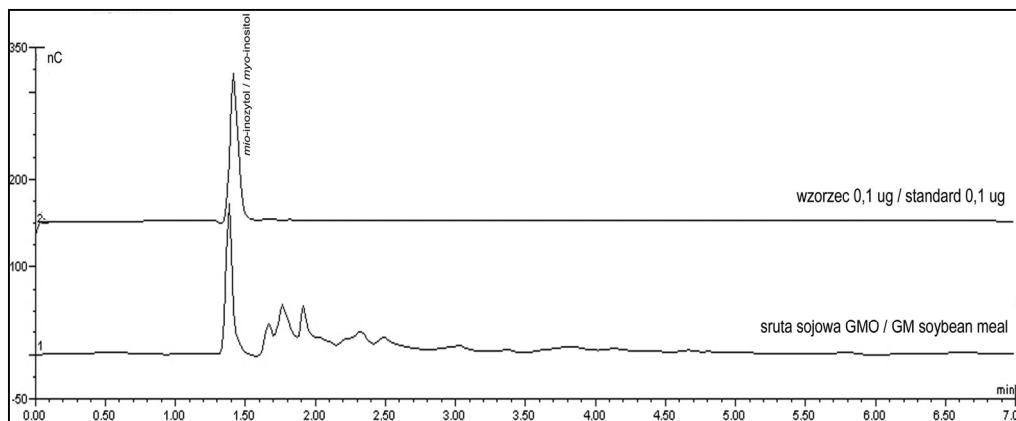


Rys. 1. Nałożone chromatogramy wzorców cukrów: (1) melezitosa; (2) maltoza; (3) glukoza; (4) mannoza; (5) fruktoza; (6) rybitol oraz wolnego *mio*-inozytolu w próbce kukurydzy niemodyfikowanej (A); wzorca *mio*-inozytolu (10 μg) oraz wolnego *mio*-inozytolu w próbce kukurydzy niemodyfikowanej (B), kolumna Aminex HPX-87C, detekcja refraktometryczna.

Fig. 1. Overlaid chromatograms of carbohydrate standards: (1) melezitose; (2) maltose; (3) glucose; (4) mannose; (5) fructose; (6) ribitol and free *myo*-inositol in non-modified corn sample (A); *myo*-inositol standard (10 μg) and free *myo*-inositol in non-modified corn sample (B); Aminex HPX-87C column, refractive index detection.

W metodzie chromatograficznej analizowane pasze charakteryzował zbliżony poziom puli całkowitego inozytolu (2748 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ w paszy pszenno-sojowej, 2575 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ w mieszance kukurydziano-sojowej). Podobna obserwacja dotyczy testu mikrobiologicznego, przy czym zawartość inozytolu całkowitego była odpowiednio mniejsza (1564 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ w paszy pszenno-sojowej, 1357 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ w mieszance kukurydziano-sojowej).

W przypadku metody mikrobiologicznej nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy kukurydzą GMO i niemodyfikowaną pod względem zawartości inozytolu całkowitego, chociaż w analogicznym oznaczeniu techniką HPAEC uzyskano wyższy poziom całkowitej puli tego związku w kukurydzy tradycyjnej.

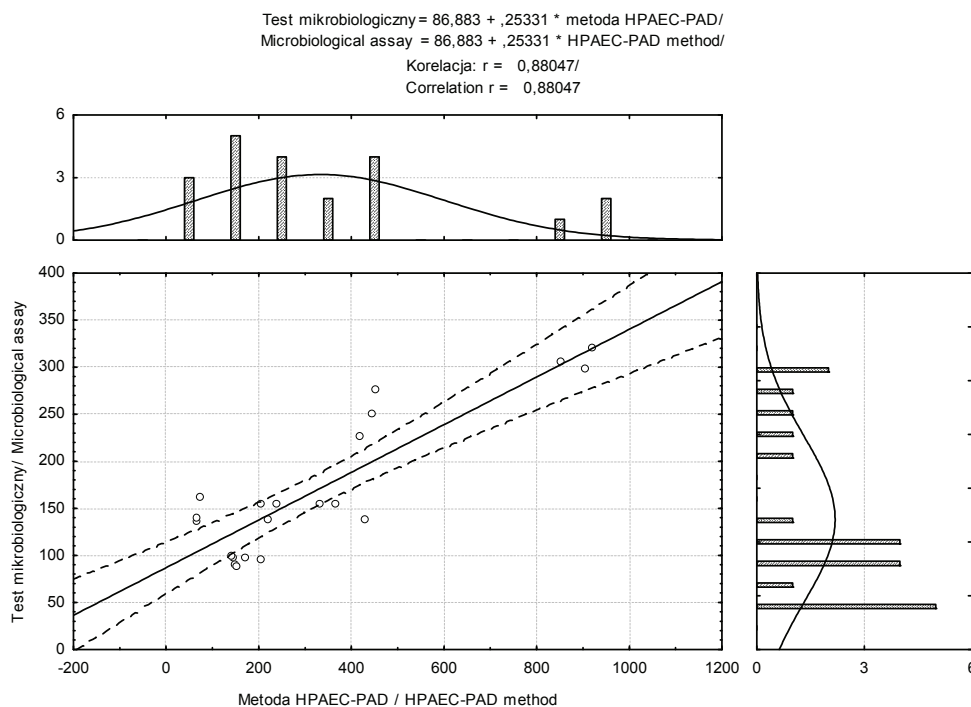


Rys. 2. Nałożone chromatogramy wzorca *mio*-inozytolu (0,1 μg) oraz *mio*-inozytolu dializowalnego w próbce śruty sojowej GMO, kolumna CarboPack PA-100, detekcja elektrochemiczna (PAD).

Fig. 2. Overlaid chromatograms of *myo*-inositol standard (0,1 μg) and dialyzable *myo*-inositol in GM soybean pellet sample, CarboPack PA-100 column, electrochemical detection (PAD).

Zawartość wolnego inozytolu oznaczona techniką HPAEC, wyrażona jako procent całkowitej puli tego związku, była największa w paszy kukurydziano-sojowej i śrucie sojowej (odpowiednio: 23 i 21 %), najmniejsza w pszenicy (6,8 %), podobnie jak w oznaczeniu mikrobiologicznym (3,6 %). W oznaczeniu chromatograficznym nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy pulą wolnego inozytolu w kukurydzy GMO i niemodyfikowanej (odpowiednio: 465 i 482 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Ilość inozytolu uwolnionego *in vitro* z komponentów paszowych w przypadku metody HPAEC była największa w śrucie sojowej tradycyjnej (850,17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), natomiast najmniejszą zawartość stwierdzono w pszenicy (73 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Podobne zależności wykazano w teście mikrobiologicznym, przy czym zawartość dializowalnego inozytolu była, podobnie jak w przypadku pozostałych pul inozytolu, odpowiednio mniejsza, w śrucie sojowej wynosiła 308 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Biorąc pod uwagę obydwie metody, nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic pod względem puli inozytolu uwolnionego *in vitro* pomiędzy kukurydzą GMO oraz niemodyfikowaną, ale w ujęciu procentowym wobec całkowitej puli inozytolu wartości odczytów techniką HPAEC były niższe (4,4 - 16 %) w stosunku do testu z *S. cerevisiae* (ok. 10 %). Pula biodostępnego inozytolu, oznaczonego w komponentach paszowych za pomocą testu mikrobiologicznego, oscylowała pomiędzy 9,6 a 12,9 %, natomiast w przypadku techniki HPAEC rozpiętość wyników była znacznie większa (2,43 - 34,5 %) (tab. 1). Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy danymi uzyskanymi w ramach obu metod i każdej puli inozytolu indywidualnie (całkowity, wolny, dializowalny). Najwyższy współczynnik korelacji ($r = 0,88$) uzyskano pomiędzy zawartością inozytolu uwolnionego *in vitro* i oznaczonego metodą mikrobiologiczną a poziomem związku oznaczonym techniką HPAEC (rys. 3). Analogiczne

parametry obliczone w przypadku inozytoli całkowitego i wolnego (odpowiednio $r = 0,66$ oraz $0,69$) wskazują na znaczne rozbieżności pomiędzy obydwoma metodami analizy *mio*-inozytoli.



Rys. 3. Wykres rozrzutu wyników oraz krzywa regresji pomiędzy wynikami dwóch metod oznaczania zawartości *mio*-inozytoli dializowalnego (*in vitro*): za pomocą testu mikrobiologicznego i techniki HPAEC-PAD.

Fig. 3. Graph of scatter results, and regression curve, between the content determination results of dialyzable *myo*-inositol (*in vitro*) obtained using two methods: microbiological assay vs. HPAEC-PAD method.

Znacznie większe zawartości inozytoli całkowitego uzyskane techniką HPAEC, w stosunku do wyników metody mikrobiologicznej są zgodne z danymi opublikowanymi przez Tagliaferrogo i wsp. [26]. W materiale sypkim typu odżywki dla niemowląt czy mleko w proszku stwierdzili oni 30 - 50 % różnice pomiędzy testem mikrobiologicznym a chromatografią jonową. Porównując materiał zawierający soję, który testowali wymienieni autorzy, z analizowanymi w niniejszej pracy śrutami sojowymi, uzyskano kilkukrotnie większe zawartości (odpowiednio: 300 - 1500 i 2464 - 2822 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Powyższe różnice mogą być spowodowane odmienną procedurą przygotowania próbek, która w przypadku Tagliaferrogo i wsp. obejmowała hydrolizę

Tabela 1

Zawartość *mio*-inozytolu analizowanego metodami: mikrobiologiczną oraz HPAEC-PAD
Content of *myo*-inositol analyzed using methods: microbiological assay and HPAEC-PAD.

Typ próbki Type of sample	<i>MIO</i> -INOZYTOL [$\mu\text{G/G S.M. PRÓBKII}$] / <i>MYO</i> -INOSITOL ¹ [$\mu\text{G/G D.M. SAMPLE}$]					
	Metoda mikrobiologiczna / Microbiological assay			HPAEC-PAD		
	Całkowity Total	Wolny Free	Dializowalny Dialyzable	Całkowity Total	Wolny Free	Dializowalny Dialyzable
Pasza pszenno-sojowa Wheat-soybean feed	1565,06 ^a ± 42,87	128,46 ^a ± 12,2	276,51 ^a ± 22,13	2748,65 ^b ± 104,27	506,07 ^a ± 40,59	225,93 ^a ± 13,09
Pasza kukurydziano-sojowa Corn-soybean feed	1357,52 ^b ± 42,87	121 ^a ± 10,72	148,96 ^b ± 10,01	2575,12 ^a ± 156,13	595,21 ^b ± 33,68	364,11 ^b ± 38,95
Śruta sojowa GMO GM soybean meal	2636,40 ^c ± 58,53	215,07 ^b ± 8,89	250,85 ^a ± 24,8	2822,31 ^a ± 262,44	592,91 ^b ± 42,52	439,34 ^c ± 14,93
Śruta sojowa tradycyjna Conventional soybean pellet	2392,12 ^d ± 30,27	188,57 ^b ± 14,64	308,23 ^c ± 10,76	2464,86 ^b ± 88,34	547,04 ^a ± 21,39	850,17 ^d ± 50,23
Kukurydza GMO GM corn	961,29 ^e ± 13,43	73,03 ^c ± 3,64	97,58 ^d ± 2,54	2906 ^a ± 119,15	465,52 ^c ± 41,42	180,48 ^e ± 31,58
Kukurydza tradycyjna Conventional corn	849,95 ^e ± 40,13	57,55 ^d ± 7,06	92,71 ^d ± 5,32	3667 ^c ± 252,62	482,07 ^c ± 68,82	161,07 ^e ± 9,89
Pszrenica Wheat	1196,72 ^{fb} ± 128,31	43,03 ^e ± 1,32	145,99 ^b ± 13,47	3017 ^{ad} ± 201,13	205,11 ^d ± 12,47	73,51 ^f ± 8,56

Objaśnienia: / Explanatory notes:

¹ Średnia arytmetyczna ± błąd standardowy (n = 3 w teście mikrobiologicznym, n = 4 w metodzie HPAEC-PAD) / Mean arithmetic value ± SD (n = 3 for microbiological assay, n = 4 for HPAEC-PAD);

^{a-f} te same litery w kolumnie oznaczają brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi (p ≥ 0,05) / mean values marked with the same index letters / ^{a-f} in the column mean no statistically significant differences between mean values (p ≥ 0.05).

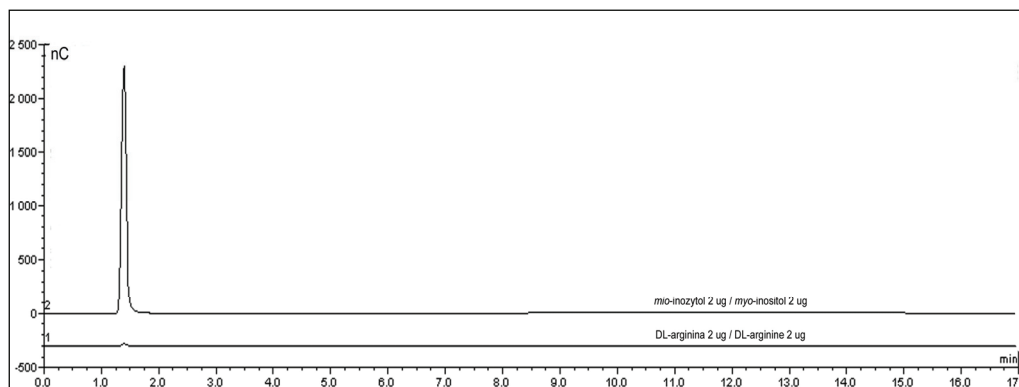
alkaliczną (3 M KOH) oraz enzymatyczną (alkaliczna fosfataza), wobec znacznie ostrzejszej hydrolizy kwasowo-termicznej zastosowanej w niniejszej pracy (1 M HCl, temp. 123 °C, 48 h). Pierwsza procedura nie pozwoliła na uwolnienie całkowitej puli inozytolu obecnego m.in. w fosfolipidach i związkach fitynowych. Autorzy pracy nie określili również zawartości dodatków sojowych w materiale sypkim, która w przypadku analizowanej śrutu sojowej czy mieszanek paszowych jest duża.

Biorąc pod uwagę bardzo podobną stereochemię *mio*- i *chiro*-inozytolu oba izomery mogą charakteryzować identyczne czasy retencji, chociaż Kong i wsp. rozdzielili te związki przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej sprzężonej z detekcją elektrochemiczną [15]. *Chiro*-inozytol jest obecny w znacznych ilościach w tkankach soi, pełniąc funkcję osmoprotektanta, może to być wytłumaczenie większej zawartości oznaczonej w produktach zawierających soję [12]. Powszechnie wiadomo, że soja zawiera dużą ilość białka i aminokwasów. Eggleston [9] podaje, że szczególnie hydrofobowe aminokwasy wpływają na zafałszowanie odczytu w systemach detekcji elektrochemicznej ze złotą elektrodą roboczą, jednak, w przeciwieństwie do jego obserwacji sugerujących efekt supresyjny w przypadku obecności argininy, wykluczono możliwość nakładania się czasów retencji obu związków przy zastosowanych warunkach rozdziału i ustawieniach detektora PAD (rys. 3).

W pszenicy oznaczono relatywnie niski poziom inozytolu wolnego zarówno metodą mikrobiologiczną ($43 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), jak i HPAEC ($205 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) w stosunku do pozostałych komponentów pasz, m.in. kukurydzy, co jest zgodne z wynikami Koninga [16]. Większość inozytolu związana jest z pulą kwasu fitynowego, więc różnice można przypisać większej zawartości fitynianów w kukurydzy, aż do 88 % całkowitego fosforu [20] w stosunku do 70 - 75 % całkowitego fosforu w pszenicy [22].

Obliczona, na podstawie wyników metody mikrobiologicznej, 10 % biodostępność inozytolu z konwencjonalnej kukurydzy, trawionej *in vitro*, jest zbliżona do uzyskanej przez Spencera [25].

Zawartość *mio*-inozytolu w produktach żywnościowych oraz tkankach zwierzęcych była z sukcesem oznaczana za pomocą metod mikrobiologicznych [14, 30]. Pomimo wysokiej czułości i selektywności na odczyt może jednak wpływać obecność inhibitorów wzrostu testowego mikroorganizmu *S. cerevisiae* ATCC 9080 oraz niekompletne uwolnienie związku z materiału w trakcie testu [26]. W przeciwieństwie do tych mankamentów, metoda chromatografii jonowej może pozwolić na rutynowe, zautomatyzowane i wymagające relatywnie niewielkiego nakładu czasowego pomiary zawartości inozytolu.



Rys. 4. Nałożone chromatogramy wzorców *myo*-inozytoli (2 μ g) oraz DL-argininy (2 μ g), kolumna CarboPack PA-100, detekcja elektrochemiczna (PAD).

Fig. 4. Overlaid chromatograms of *myo*-inositol (2 μ g) and DL-arginine (2 μ g) standards, CarboPack PA-100 column, electrochemical detection (PAD).

Dość złożony charakter matrycy, zwłaszcza w przypadku próbek inozytoli dializowalnego oraz wolnego, może wpływać na zawyżenie odczytu detektora elektrochemicznego.

Podsumowanie

Analiza statystyczna wyników uzyskanych przy zastosowaniu techniki HPAEC-PAD oraz testu mikrobiologicznego wskazuje na znaczące rozbieżności pomiędzy obydwiema metodami oznaczania *myo*-inozytoli w paszach i ich roślinnych komponentach. Weryfikacji wymaga ewentualny wpływ substancji pochodzenia białkowego obecnych w dużym stężeniu m.in. w próbkach uzyskanych z procedury *in vitro*, na zafałszowanie odczytu w systemie pulsacyjnej detekcji elektrochemicznej. Powyższe wątpliwości mogą rozstrzygnąć dodatkowe analizy za pomocą chromatografii gazowej GC/MS.

Literatura

- [1] Agranoff B.: W. Turtles all the way: Reflections on *myo*-Inositol. J. Biol. Chem., 2009, **284** (32), 21121-21126.
- [2] Cataldi T.R.I, Margiotta G., Zambonin C.G.: Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. Food Chem., 1998, **62**, 109-115.
- [3] Clements R.S. Jr, Darnell B.: *Myo*-inositol content of common foods: development of a high *myo*-inositol diet. Am. J. Clin. Nutr., 1980, **33**, 1954-1967.

- [4] Corradini C., Canali G., Cogliandro E., Nicoletti I.: Separation of alditols of interests in food products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 1997, **791**, 343-349.
- [5] Deranieh R.M., Greenberg M.L.: Cellular consequences of inositol depletion. *Biochem. Soc. Trans.*, 2009, **37**, 1099-1103.
- [6] Di Paolo G., De Camilli P.: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 2006, **443**, 651-657.
- [7] Downes C.P., Macphee C.H.: *Myo*-Inositol metabolites as cellular signals. *Eur. J. Biochem.*, 1990, **193**, 1-18.
- [8] Eagle H., Oyama V.I., Levy M., Freeman A.: *myo*-Inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 191-205.
- [9] Eggleston G.: Improved quantitative ion chromatography of industrial sugars: removal of interfering amino acids. *Food Chem.*, 1999, **65**, 483-491.
- [10] Eyster K.M.: The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv. Physiol. Education*, 2006, **31**, 5-16.
- [11] Garcia-Esteva R. M.: Phytic acid content in milled cereal products and Brades. *Food Res. Int.*, 1999, **32**, 217-221.
- [12] Gomes C. I., Obendorf R. L., Horbowicz M.: *Myo*-inositol, *D-chiro*-inositol, and *D*-pinitol synthesis, transport, and galactoside formation in soybean explants. *Crop Sci.*, 2005, **45**, 1312-1319.
- [13] Holub B. J.: Metabolism and function of *myo*-inositol and inositol phospholipids. *Annu. Rev. Nutr.*, 1986, **6**, 563-97.
- [14] Indyk H.E., Woollard D.C.: Determination of free *myo*-inositol in milk and infant formula by High-Performance Liquid Chromatography. *Analyst*, 1994, **119**, 397-402
- [15] Kong L., Wang Y., Cao Y.: Determination of *Myo*-inositol and *D-chiro*-inositol in black rice bran by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Food Composit. Anal.*, 2008, **21**, 501-504.
- [16] Koning A.J.: Determination of *myo*-inositol and phytic acid by gas chromatography using scyllitol as a internal standard. *Analyst*, 1994, **119**, 1319-1323.
- [17] Kozuma T., Takahasi M., Endoh T., Kaneko R., Ura N., Shimamoto K., Watanabe N.: An enzymatic cycling method for measurement of *myo*-inositol in biological samples. *Clin. Chim. Acta*, 2001, **312**, 143-151.
- [18] Nicot A., Laporte J.: Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic*, 2008, **9**, 1240-1249.
- [19] Norris F.W., Darbre A.: The microbiological assay of inositol with a strain of *Schizosaccharomyces pombe*. *Analyst*, 1956, **81**, 394-400.
- [20] O'Dell B.L., de Boland A.R., Koirtyohann S.R.: Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.*, 1972, **20**, 718-721.
- [21] Pearce J.: The effects of choline and inositol on hepatic lipid metabolism and the incidence of the fatty liver and kidney syndrome in broilers. *Br. Poult. Sci.*, 1975, **16**, 565-570.
- [22] Peers F.G.: The phytase of wheat. *Biochem. J.*, 1953, **53**, 102-110.
- [23] Perello J., Isern B., Costa-Bauza A., Grases F.: Determination of *myo*-inositol in biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2004, **802**, 367-370.
- [24] Selle P.H., Ravindran V.: Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2007, **135**, 1-41.
- [25] Spencer J.D., Allee G.L., Sauber T.E.: Phosphorus bioavailability and digestibility of normal and genetically modified low-phytate corn for pigs. *J. Anim. Sci.*, 2000, **78**, 675-681.

- [26] Tagliaferri E.G., Bonetti G., Blake C.J.: Ion chromatographic determination of inositol in infant formulae and clinical products for enteral feeding. *J. Chromatogr. A*, 2000, **879**, 129-135.
- [27] Technical Note No. **66**.: Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD), Dionex Corporation, 2000.
- [28] Van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W.: Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, **9**, 112-124.
- [29] Viveros A., Centeno C., Brenes A., Canales R., Lozano A.: Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 4009-4013.
- [30] Waagbo R., Sandnes K., Lie O.: Effects of inositol supplementation on growth, chemical composition and blood chemistry in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry. *Aquacult. Nutr.*, 1998, **4**, 53-59.
- [31] Żyła K., Ledoux D.R, Garcia A., Veum T.L.: An *in vitro* procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize-soya bean feeds for turkey poults. *Brit. J. Nutr.*, 1995, **74**, 3-17.
- [32] Żyła K., Mika M., Stodolak B., Wikiera A., Korelski J., Świątkiewicz S.: Towards complete dephosphorylation and total conversion of phytates in poultry feeds. *Poultry Sci.*, 2004, **83**, 1175-1186.

**APPLICATION OF ION CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH PULSE
AMPEROMETRIC DETECTION TO DETERMINE MYO-INOSITOL CONTENT
IN PLANT COMPONENTS OF FEED**

S u m m a r y

In the research project, an ion chromatography technique was used as an alternative to microbiological assay to determine the content of *myo*-inositol in plant components of feeds. The analyzed material consisted of both genetically non-modified and modified varieties of wheat, corn, and soybean, as well as of feed mixtures made on the basis thereof. The contents of total and free inositol were determined as was the content of dialyzable inositol released by *in vitro* procedure to simulate the intestinal tract of broilers. The *myo*-inositol was separated on a high-performance, anion-exchange CarboPack PA100 column, and determined using a pulsed amperometric detection procedure (i.e. high performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection, HPAEC-PAD). The content of total inositol determined by the HPAEC-PAD method ranged between 2572 µg/g (corn-soybean feed) and 3667 µg/g (corn). The data obtained were comparable only with the results of the microbiological assay of both the genetically non-modified and modified soybean pellets, (2392 and 2636 µg/g, respectively). As regards the other feed components, the results obtained by the HPAEC-PAD method were higher than those obtained using the microbiological method, on average: by 30 to 50 %. In the range of the concentration values from 0.1 to 100 µg/ml, a correlation between the two methods analyzed was the highest in the case of the analysis of *myo*-inositol released during the *in vitro* digestion procedure ($r = 0.88$). In all other cases, the results of the microbiological assay were systematically lower because the liberation of total inositol by the acid hydrolysis was incomplete, and *S. cerevisiae* ATCC 9080, the micro-organism analyzed, couldn't utilize the inositol monophosphate to grow. The other possibility was a common presence of hydrophobic aminoacids in soy-containing components of feeds, which could interfere with the system of pulsed amperometric detection.

Key words: *myo*-inositol, *myo*-inositol phosphates, ion-chromatography, electrochemical detection 