



Application Note AN-P-088

Qualitätsprüfung für Säuglingsnahrung

Schnelle und zuverlässige Bestimmung von Lactose in niedrigen
Konzentrationen mit IC-PAD

Lactose, ein Disaccharid bestehend aus Glucose und Galactose, ist in Milch und Milchprodukten enthalten. Da sie das Hauptkohlenhydrat in der menschlichen Milch ist (55-70 g/L), ist sie auch ein Hauptbestandteil von Säuglingsnahrung mit einem empfohlenen Mindestgehalt von 4,5 g/100 kcal [1]. Analytisch können solch hohe Konzentrationen leicht mit Mehrkomponentenmethoden wie ISO 22184 oder Methoden mit geringerer Empfindlichkeit, wie z. B. der Refraktometrie, bestimmt werden. In manchen Fällen können Säuglinge an einer Laktosemalabsorption leiden. Hierbei ist die enzymatische Aktivität der Lactase von Geburt an entweder eingeschränkt oder nicht vorhanden, wodurch der Lactosestoffwechsel beeinträchtigt ist. Die Lactose kann im Dünndarm nicht in Glucose und Galactose hydrolysiert werden, was die Aufnahme

von verdaulichen Kohlenhydraten als Monosaccharide erschwert. Infolgedessen treten zahlreiche gastrointestinale und extraintestinale Symptome und Beschwerden auf (z. B. Durchfall) [1-3]. Auch die Glucose-Galactose-Malabsorption betrifft einen sehr kleinen Teil der Bevölkerung. Bei allen Malabsorptionstypen ist es entscheidend, alle Lactosequellen in der Nahrung zu eliminieren. Lactosefreie Nahrungsquellen sind insbesondere für Säuglinge sehr wichtig, und diese Nahrungsmittel müssen den gesetzlichen Anforderungen entsprechen (Lactose <10 mg/100 kcal) [1,3-5]. Für die Analyse solch **niedriger Lactosegehalte** in komplexen Matrices wie Säuglingsnahrung bietet die **Ionenchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (IC-PAD)** eine robuste und empfindliche Lösung.

PROBE UND PROBENVORBEREITUNG

Die **Lactosebestimmung** wurde für eine große Auswahl an lactosearmen Probenmatrices durchgeführt, bestehend aus Säuglingsanfangsnahrung und Folgebabynahrung wie den Referenzmaterialien NIST 2383a (Babynahrungsmischung) und NIST 1869 (Säuglingsnahrungspulver), einer Säuglingsnahrung von HiPP (HiPP comfort, lactosereduziert) und einer handelsüblichen lactosefreien Milch (1,5% Fett, Spar Schweiz).

Die pulverförmigen und flüssigen Proben wurden homogenisiert und direkt in geeignete Gefäße eingewogen (von 0,1-5 g, 50 mL Polypropylen-Zentrifugenröhrchen). Für spätere Berechnungen wurde das Probengewicht (W_s in g) auf 0,001 g genau erfasst. Durch Zugabe von Reinstwasser (UPW) wurde ein wässriger Extrakt mit einem Gesamtvolumen von 50 mL (W_{UPW} in kg) hergestellt. Anschließend wurden die Probengefäße verschlossen und mit einem Vortex-Mixer etwa 20 Sekunden lang kräftig gemischt.

Um das Analysesystem zu schützen, wird als

Standardmethode die Carrez-Fällung zur Entfernung von Proteinen und größeren Molekülen aus den Proben eingesetzt. Hierfür wurden den Proben die notwendigen Reagenzien zugegeben und das Endgewicht notiert (W_{UPWC} in kg). Nach gründlichem Mischen wurden die Proben 10 Minuten lang zentrifugiert (5000×g) und dekantiert. Die verschlossenen Probengefäße wurden direkt auf den Autosampler gestellt. Eine zusätzliche Ultrafiltration der Proben kann dazu beitragen, den Schutz der Säule zu erhöhen.

Als Alternative wird als automatisierte Probenvorbereitung die Inline-Dialyse mit einer Low Volume-Dialysezelle eingesetzt. Dabei werden die Proben in gleicher Weise wie die wässrigen Extrakte vorbereitet, gut geschüttelt und verschlossen, bevor sie auf den Autosampler gestellt werden. Bei der Dialyse ist keine Carrez-Fällung vor der Analyse erforderlich, wodurch Zeit und chemische Reagenzien gespart werden. Bei Verwendung der Low-Volume-Dialysezelle werden nur 5 mL Probe benötigt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Der **Gehalt an Lactose** in wässrigen Probenextrakten wurde mittels Ionenchromatographie (IC) auf einer **Metrosep Carb 2 - 250/4,0-Säule** unter Verwendung eines isokratischen Hydroxid-Eluenten (400 mmol/L NaOH) und gepulster amperometrischer Detektion (PAD) mit der Sweep-Wellenform bestimmt (Abbildung 1).

Durch Verwendung der **amperometrischen Thin-Layer-Zelle von Metrohm** (Au-Arbeits- und Pd-Referenzelektrode) wird eine lange Lebensdauer der Elektrode bei minimalem Wartungsaufwand erreicht. Der Sweep-Modus in Kombination mit der weniger turbulenten Strömung in der Thin-Layer-Zelle führt zu einer ruhigen Basislinie. Dies ist für die Analyse sehr geringer Konzentrationen, wie z.B. in lactosearmen Produkten, notwendig. Die Flussschemata für die direkte Analyse und die Analyse mittels Metrohm-Inline-Dialyse sind in **Abbildung 2** dargestellt. Obwohl die Dialyse auf den ersten Blick komplex erscheinen mag, rechtfertigt die Automatisierung den Aufwand im gesamten analytischen Prozess.

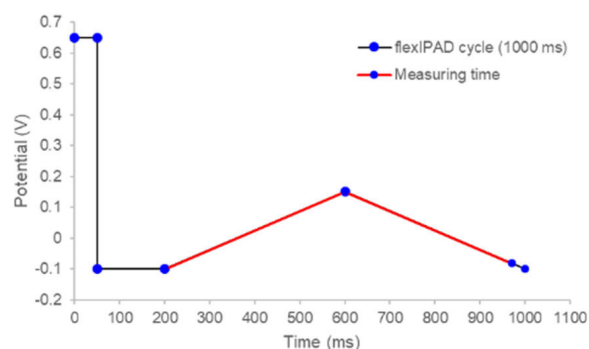


Abbildung 1. Die Sweep-Wellenform für die Kohlenhydratoxidation unterstützt die empfindliche Detektion von Kohlenhydraten mit einem niedrigen Rauschen.

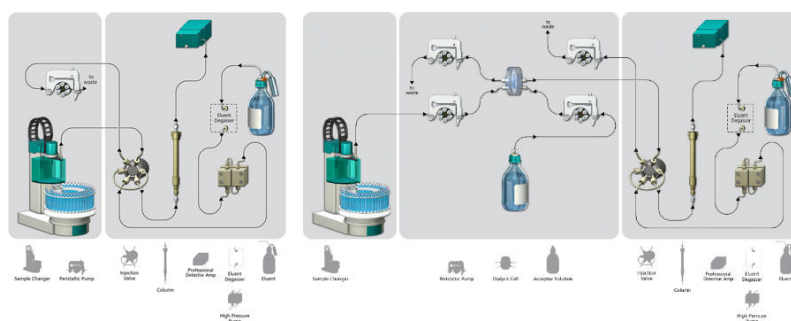


Abbildung 2. Beispielhafte Flussschemata für die direkte Lactoseanalyse (links, Probenvorbereitung obligatorisch, z. B. Carrez-Fällung) und mit optionaler Dialyse (rechts, keine zusätzliche Probenvorbereitung erforderlich). Die Inline-Dialyse ist optional und kann zu jeder bestehenden Gerätekonfiguration hinzugefügt werden. Bei der Carrez-Fällung geht der Probenweg direkt vom Autosampler in die Probenschleife (PEEK, 10 µL). Der Proben transport erfolgt mit einer Peristaltikpumpe. Von der Probenschleife wird die Probe direkt auf die Säule (Metrosep Carb 2 - 250/4.0) injiziert, wo sie vor der gepulsten amperometrischen Detektion (PAD) mit einem isokratischen 400 mmol/L NaOH-Eluenten chromatographisch getrennt wird.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Lactose eluiert in weniger als 20 Minuten (**Abbildung 3**), unabhängig davon, ob direkt injiziert oder die Inline-Dialyse verwendet wird. Im Gegensatz zu früher veröffentlichten chromatographischen Methoden wurden Lactosederivate (d. h. Epilactose, Lactulose, Allolactose und Galactosyllactose), die aus präbiotischen Zusätzen stammen, erfolgreich von Lactose getrennt, wodurch die Selektivität und Genauigkeit der Methode erhöht werden. Der

Gesamtarbeitsbereich der Methode liegt bei 0,05 bis 80 mg/L für flüssige Lactosestandards, mit der Möglichkeit, Proben in einem Bereich von 0,2-21.000 mg/100g mit entsprechender Verdünnung zu analysieren. Die Probenkonzentrationen werden anhand einer linearen Kalibrierung bestimmt ($c(\text{Lactose})_S$ in mg/kg) und auf der Grundlage des Probengewichts berechnet, um den endgültigen Lactosegehalt zu ermitteln ($c(\text{Lactose})_{\text{FIN}}$ in g/100 g):

$$c(\text{Lactose})_{\text{FIN}} = \frac{100 \times c(\text{Lactose})_S \times W_{\text{UPW/UPWc}}}{1000 \times W_S}$$

Die Ergebnisse der Validierung sind für Säuglingsnahrung, Babynahrung und Milch dargestellt (**Tabelle 1**). Sie zeigen, dass die allgemeinen Akzeptanzkriterien der AOAC für eine vollständige Validierung durch ein einzelnes Labor erfüllt sind (RSDr und Varianz $\leq 10\%$ und $\leq 7\%$, Wiederfindung der Aufstockung 85-115 % und 90-110 % für einen Analysebereich von 10-100 mg/100

g bzw. >100 mg/100 g). Die Ergebnisse der Analyse mit Carrez-Fällung vor der Injektion (**Tabelle 1**) und mit Inline-Dialyse waren für ausgewählte Testproben vergleichbar (siehe **Abbildung 3**). Die Daten sind ein hervorragender Nachweis für die Verwendung der Inline-Dialyse als zeitsparende Alternative zur Carrez-Fällung.

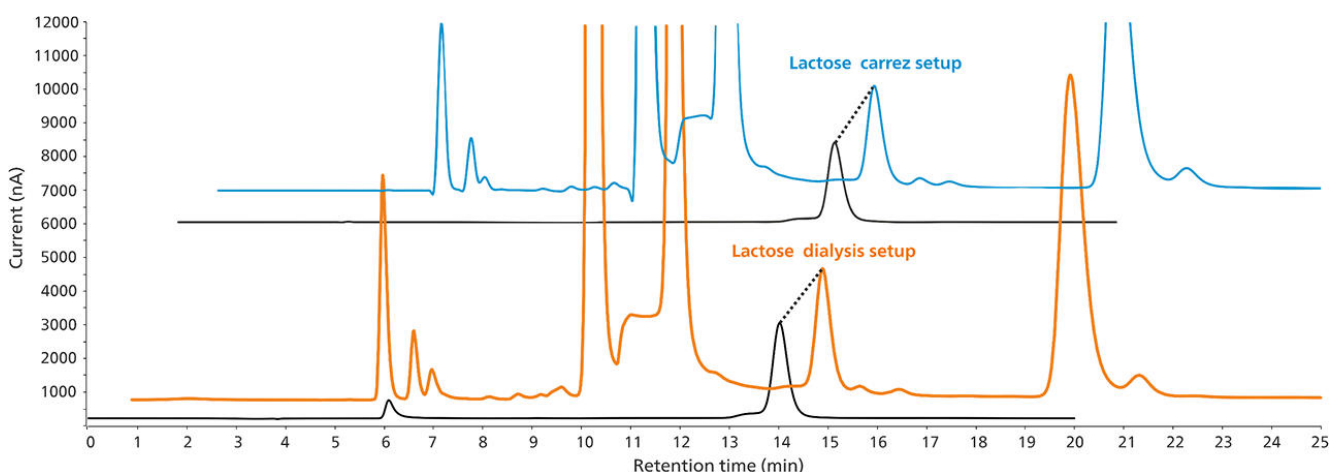


Abbildung 3. Lactosebestimmung in Babynahrung (NIST 2383a). Vergleich von zwei Probenvorbereitungsmethoden: Inline-Dialyse ($c(\text{Lactose}) = 51,1$ mg/L, orange) und Carrez-Fällung ($c(\text{Lactose}) = 49,6$ mg/L, blau). Die relative Standardabweichung der beiden Proben beträgt 2,1 %. Zum Vergleich ist ein 40 mg/L Lactose-Standard (schwarz) überlagert.

Tabelle 1. Lactose, angegeben als Lactosemonohydrat (Umrechnungsfaktor 1,05), in lactosefreier Säuglingsnahrung und Milchproben, bestimmt nach Probenvorbereitung durch Carrez-Fällung. Die Tabelle zeigt die Reproduzierbarkeit R_r als RSD von einzeln vorbereiteten Proben ($n = 7$), die innerhalb eines kurzen Zeitraums gemessen wurden, die tägliche Varianz als RSD von einzeln vorbereiteten Proben, die an verschiedenen Tagen (4-8 Tage) gemessen wurden, und die Wiederfindung der Aufstockung als Durchschnitt aller Aufstockungsversuche, die über mehrere Tage analysiert wurden.

Reproduzierbarkeit (mg/100 g) (RSD_R , %)	Varianz von Tag zu Tag (mg/100g) (%)	Gesamtwiederfindung der Aufstockung (%)
NIST 2383a Säuglingsnahrung (Durchschnitt 520 ± 27 mg/100 g ($n = 7$), Ziel 500 ± 100 mg/100 g, Wiederfindung 106 ± 6 %)		
520 ± 27 (5,1)	528 ± 29 (5,5)	103 ± 2
NIST 1869 Säuglingsanfangsnahrungspulver (Durchschnitt 569 ± 33 mg/100 g ($n = 7$), Ziel 520 ± 120 mg/100 g, Zielwiederfindung 109 ± 6 %)		
569 ± 33 (5,5)	523 ± 31 (5,9)	98 ± 3
HiPP Comfort Säuglingsnahrung (20,8 g/100 g ($n = 7$), Ziel 22,1 g/100 g, Zielwiederfindung 97 ± 4 %)		
20751 ± 743 (3,6)	22163 ± 258 (1,2)	102 ± 3
Sparaha 1,5 % Fett, lactosefreie Milch		
$2,35 \pm 0,18$ (7,9)	$2,10 \pm 0,05$ (2,2)	111 ± 2

Säuglingsnahrung ist eine sehr komplexe und schwierige Matrix, da sie alle möglichen Nährstoffe enthält (z. B. Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Vitamine und Mineralien). Um eine hohe Genauigkeit, Empfindlichkeit und Selektivität bei der Bestimmung geringer Lactosekonzentrationen zu gewährleisten, sind spezielle Probenvorbereitungs- und Analyseverfahren erforderlich. IC-PAD überwindet solche analytischen Herausforderungen mit automatisierten Inline-Probenvorbereitungsoptionen und führt zu einer hervorragenden Trennung der Lactose von anderen Matrixkomponenten und Lactosederivaten.

Die geschätzte Bestimmungsgrenze von 4 mg Lactose/100 g in diesen Probenmatrices liegt unter den Anforderungen und bekannten Grenzwerten für lactosefreie Säuglingsnahrungsprodukte. Wie Langzeitanalysen und Aufstockungsversuche gezeigt haben, bietet diese Methode eine angemessene Empfindlichkeit und Robustheit. Darüber hinaus ist die IC-PAD aufgrund ihrer Flexibilität für benutzerangepasste Anwendungen, optionaler Probenvorbereitung und/oder Automatisierung ideal für Routineanalysen und stellt eine sehr wertvolle Ergänzung des analytischen Portfolios im Labor dar.

REFERENZEN

1. EFSA. Scientific Opinion: Essential Composition of Infant and Follow-up Formulae. *Eur. Food Saf. Auth. EFSA J.* **2014**, 12 (7), 3760.
2. Facioni, M. S.; Raspini, B.; Pivari, F.; Dogliotti, E.; Cena, H. Nutritional Management of Lactose Intolerance: The Importance of Diet and Food Labelling. *J. Transl. Med.* **2020**, 18 (1), 260.
3. EFSA. Scientific Opinion on Lactose Thresholds in Lactose Intolerance and Galactosaemia. *Eur. Food Saf. Auth. EFSA J.* **2010**, 8 (9), 1777.
4. European Commission. Commission Delegated Regulation (EU) 2016/127 of 25 September 2015 Supplementing Regulation (EU) No 609/2013 of the European Parliament and of the Council as Regards the Specific Compositional and Information Requirements for Infant Formula and Follow-on Formula and as Regards Requirements on Information Relating to Infant and Young Child Feeding. *Off. J. Eur. Union* **2016**, 29.
5. FAO/WHO. CODEX Alimentarius - General Standard for the Labelling of Prepacked Foods CXS 1-1985. *Int. Food Stand.*

Interne Referenz: AW IC CH6-1435-022021

CONTACT

Metrohm Inula
Shuttleworthstraße 25
1210 Wien

office@metrohm.at

GERÄTEKONFIGURATION



940 Professional IC Vario ONE/Prep 1

Der 940 Professional IC Vario ONE/Prep 1 ist das intelligente IC-Gerät **ohne Suppression** in Kombination mit Metrohm Inline-Probenvorbereitung wie **Inline-Ultrafiltration** oder **Inline-Dialyse**. Das Gerät kann mit beliebigen Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden.

Typische Anwendungsgebiete:

- Anionen- und Kationenbestimmungen ohne Suppression nach Inline-Ultrafiltration oder Inline-Dialyse
- UV/VIS-Anwendungen nach Inline-Ultrafiltration oder Inline-Dialyse
- Anwendungen mit amperometrischer Detektion nach Inline-Ultrafiltration oder Inline-Dialyse



945 Professional Detector Vario – Amperometry

Intelligenter Stand-Alone-Detektor ausgerüstet mit dem IC Amperometric Detector. Mit hervorragender Selektivität durch die vier Messmodi: DC, PAD, flexIPAD und CV. Das exzellente Signal/Rausch-Verhältnis und die sehr schnelle Messbereitschaft garantieren höchste Präzision der Messung. Zum Einsatz mit den intelligenten IC Geräten oder als unabhängiger Detektor.



Metrosep Carb 2 - 250/4.0

Die IC-Säule Metrosep Carb 2 - 250/4.0 eignet sich speziell für die Bestimmung von Kohlenhydraten unter Verwendung alkalischer Eluenten und der gepulsten amperometrischen Detektion. Die hochkapazitive Anionenaustauschsäule basiert auf einem Styrol/Divinylbenzol-Copolymer. Sie ist im Bereich von pH = 0–14 stabil und trennt Mono- und Disaccharide. Darüber hinaus ist sie auch für die Analyse von Zuckeralkoholen, Anhydrozucker, Aminosucker usw. geeignet. Die 250-mm-Variante der Metrosep Carb 2 Trennsäule ist für komplexe Trennungen optimiert.



858 Professional Sample Processor – Pump

Der 858 Professional Sample Processor – Pump verarbeitet Proben von 500 µL bis 500 mL. Der Probentransfer erfolgt entweder mit der eingebauten bidirektionalen Zweikanal-Peristaltikpumpe oder mittels eines 800 Dosino.



IC-Ausrüstung: Inline-Dialyse Low Volume

Zubehörset zur schnellen Inline-Dialyse. Zur Verwendung mit dem 858 Professional Sample Processor und einer zusätzlichen 2-Kanal-Peristaltikpumpe.



IC-Ausrüstung: Thin-Layer-Zelle: Carb (Au,Pd)

Ausrüstung bestehend aus Thin-Layer-Zelle mit zusätzlichem Zubehör, mit Elektroden für Kohlenhydratanalytik mit einer Goldarbeits- und einer Pd-Referenzelektrode.