



Application Note AN-P-087

Qualitätssiegel für Novel Foods

Verbesserung gegenüber AOAC 2001.02: GOS-Analyse mit IC-PAD

ZUSAMMENFASSUNG

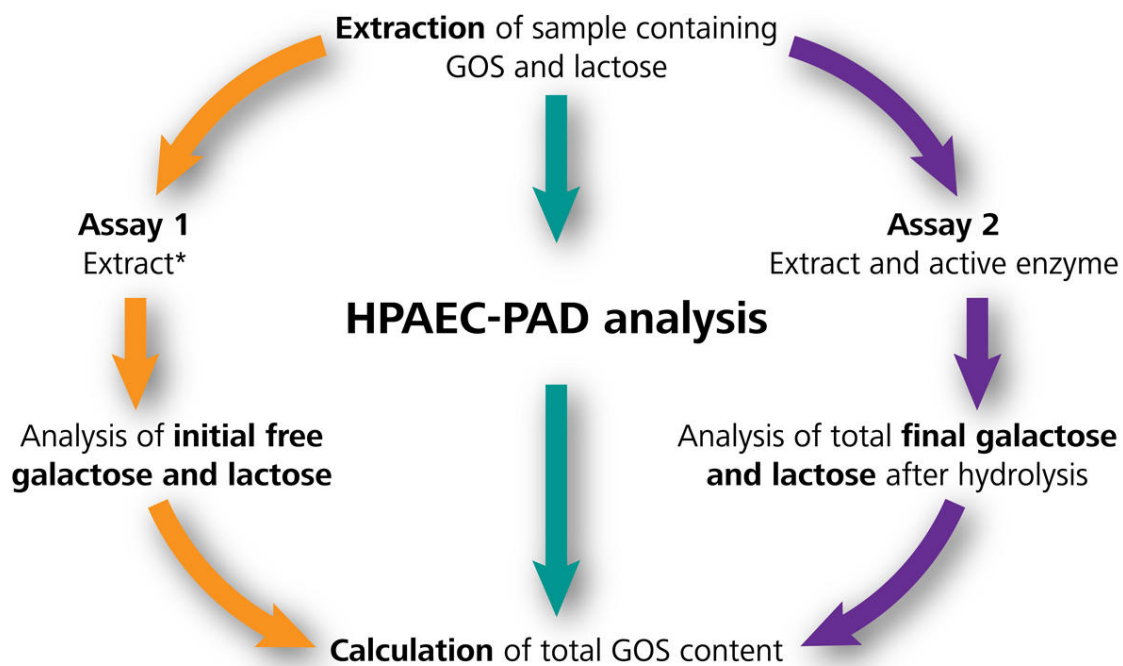
In den letzten Jahren hat das Interesse an Lebensmittelzusatzstoffen und Nahrungsergänzungsmitteln, die Präbiotika wie β -Galactooligosaccharide (bekannt als GOS) enthalten, zugenommen. Die GOS sind Ketten von Galactoseeinheiten mit einem optionalen Glucoseende [1,2]. Sie wirken bifidogen, d.h. sie fördern das Wachstum und das Wohlbefinden von nicht-pathogenen Darmbakterien [1]. Ursprünglich als Hauptbestandteil des Kolostrums (bis zu 12 g/L) entdeckt, werden GOS als präbiotischer Zusatz zu Säuglingsnahrung hinzugefügt, um ähnliche positive Effekte zu erzielen. Das zunehmende Bewusstsein der Verbraucher für eine gesunde Ernährung hat zu einem kontinuierlichen Wachstum des globalen Marktes für Präbiotika und GOS geführt. Ebenso

haben die gestiegenen Anforderungen an die Lebensmittelqualität zu strengeren und umfassenderen Vorschriften für die Lebensmittelkennzeichnung und -sicherheit geführt (z. B. EU 2015/2283). Um diese Anforderungen zu erfüllen, ist die Bestimmung des Gesamtgehalts an GOS in Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln oder Rohprodukten unerlässlich. Diese Application Note stellt eine Optimierung der AOAC-Standardmethode zur Bestimmung von Gesamt-GOS in Lebensmitteln vor. Mit dem gleichen Prinzip (enzymatische Hydrolyse komplexer GOS-Moleküle und anschließende chromatographische Analyse einfacher Kohlenhydrate) wurde die Effizienz der Analyseverfahren zu Gunsten von manueller Arbeitszeit und Betriebskosten verbessert.

PROBE UND PROBENVORBEREITUNG

Verschiedene im Handel erhältliche Proben, z. B. GOS-Pulver (Carbosynth Ltd.), Vivinal® GOS-Pulver (FrieslandCampina) und das Nahrungsergänzungsmittel Bimuno Daily (Clasado Biosciences) [3], wurden, gemäß AOAC 2001.02, für 30 Minuten bei 80 °C in einer Phosphatpufferlösung extrahiert. Für die Differenzialanalyse von Glucose,

Galactose und Lactose wurde der Extrakt in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot wurde vor (Assay 1) und das andere nach (Assay 2) der enzymatischen Hydrolyse mit dem Enzym β -Galactosidase *Aspergillus oryzae* behandelt (Abbildung 1). Die Proben wurden vor der Analyse zentrifugiert und mit Reinstwasser (RW) verdünnt.



*AOAC(2001.02): Extract plus deactivated enzyme

Abbildung 1. Schema für die Bestimmung des Gesamtgehalts an GOS mittels Ionenchromatographie kombiniert mit gepulster amperometrischer Detektion (IC-flexiPAD). Die Anionen-Chromatographie wird in der AOAC als HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography) bezeichnet, hier aber vereinfacht als IC abgekürzt. Bei der verbesserten Methode wird der Extrakt zur Messung der Ausgangskonzentrationen von Glucose, Galactose und Lactose verwendet (Assay 1). Dies hat sich als äquivalent zum AOAC-Schritt mit dem deaktivierten Enzym erwiesen [3], reduziert aber den chemischen Aufwand und die zusätzliche manuelle Arbeit. Der Gesamtgehalt an GOS wird aus den Analytkonzentrationen in Assay 1 und Assay 2 (Extrakt mit aktivem Enzym) berechnet. Die Grafik stammt aus [2].

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die ionenchromatographische Trennung von Galactose, Glucose und Lactose erfolgte auf einer Metrosep Carb 2 - 250/4.0 Trennsäule unter Verwendung eines Hydroxid-Eluenten (**Abbildung 2**). Dabei betrug die Aufnahmedauer 18 Minuten. Zur Reinigung der Säule wurde nach der Aufnahme ein Acetat-Hochdruckgradient (HPG) mit einer Gesamtlaufzeit von etwa 30 Minuten angewendet. Die Signaldetektion erfolgte mit einem amperometrischen Detektor (945 Professional Detector Vario - Amperometry), der mit einer Dünnschichtzelle (Au-Arbeits- und Pd-Referenzelektrode) ausgestattet war. Die Verwendung der Dünnschichtzelle in Kombination mit einer speziellen flexiPAD-Wellenform (gepulste amperometrische Detektion) zeigte die beste Leistung für die GOS-Analyse. Im Vergleich zu den Standard-PAD-Bedingungen lieferte dieses Setup ein besseres Signal und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis.

Nach der manuellen Probenvorbereitung wurden die Proben vor der Injektion in den IC durch Inline-Dialyse mit der Low Volume-Dialysezelle gereinigt. In diesem vollautomatischen Schritt werden Proteine und größere Moleküle aus der Probenmatrix entfernt, wodurch die Säule geschützt und die Lebensdauer der Säule verlängert wird. Der Gesamtgehalt an GOS wurde nach der automatischen Datenauswertung (MagIC Net 3.3 Software) gemäß AOAC berechnet. Dabei wurde die Differenz von Galactose und Glucose zwischen Assay 1 und Assay 2 bestimmt (**Abbildung 2**), der Wert um die anfängliche Lactose korrigiert und schließlich auf ein Probengewicht von 100 g angepasst.

Im Zuge der Anpassung und Weiterentwicklung der AOAC-Standardmethode wurden verschiedene Variablen getestet und schließlich nach gemeinsamen Standards validiert. Alle Einzelheiten sind in dem frei zugänglichen Artikel Ziegler et al. [3] enthalten.

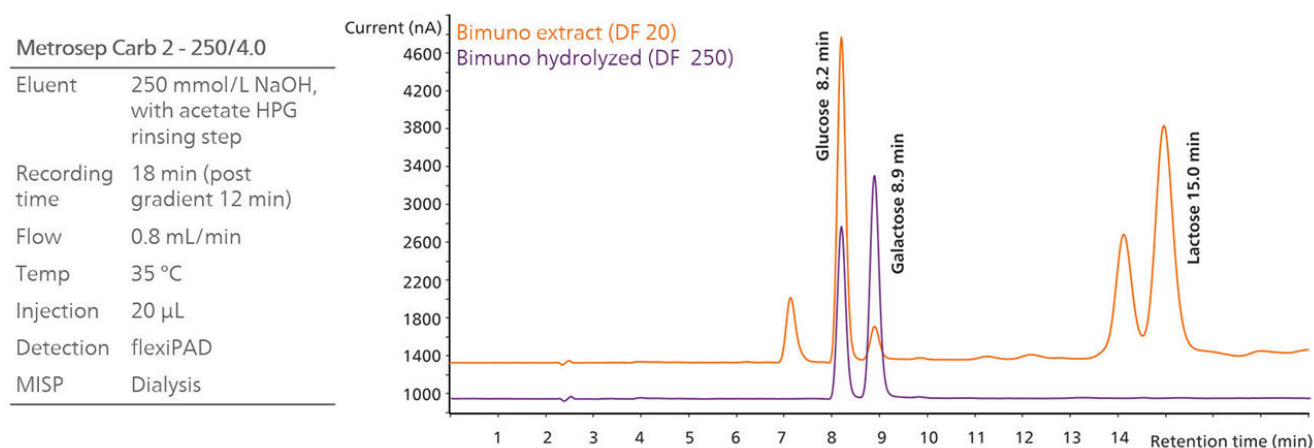


Abbildung 2. Überlagerung (mit Offset) des Extrakts aus der Probe Bimuno (Assay 1, Verdünnungsfaktor (DF) 20 in UPW, orange) mit dem mit β -Galactosidase behandelten Extrakt (Assay 2, DF 250 in RW, lila). Aufgrund der Hydrolyse von GOS, d. h. des Abbaus der Galactose-Galactose- und Galactose-Glucose-Bindungen, liegen die Konzentrationen von Galactose und Glucose in Assay 2 deutlich über denen in Assay 1. Ein höherer DF garantiert die richtige Quantifizierung innerhalb der gegebenen Kalibrierung. Die chromatographischen Bedingungen sind auf der linken Seite zusammengefasst. Als Metrohm-Inline-Probenvorbereitungsschritt wurde die Inline-Dialyse zur zusätzlichen Probenreinigung eingesetzt, was die Systemleistung und die Lebensdauer der Säule verbessert.

ERGEBNISSE

Der Gesamtgehalt an GOS in den verschiedenen Proben reichte von 28-83 g/100 g mit einer Variabilität von bis zu 5 % bei Messungen einzelner Wiederholungen über mehrere Tage. Für Säuglingsanfangsnahrung wurde eine höhere Variabilität von 6-10 % festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die höheren Lactosegehalte in solchen Matrices führen zu erhöhten Unsicherheiten bei der Bestimmung der Gesamt-GOS [3]. Insgesamt erwies

sich die Methode als wertvoll und robust aufgrund der zufriedenstellenden Variabilität, der Wiederfindung des Soll-Gehalts und der Aufstockung (Tabelle 1) sowie der Interferenztests [2]. Die niedrigen Nachweisgrenzen (NWGs) (DIN 32645) von 0,1 mg/L (Galactose) und 0,2 mg/L (Glucose, Lactose) in Lösung ermöglichen auch die Bestimmung geringer Gesamt-GOS-Gehalte mit hoher Präzision.

Tabelle 1. Der Gesamtgehalt an GOS wurde mit der modifizierten Methode AOAC 2001.02 für die im Handel erhältlichen Proben GOS-Pulver, Bimuno Daily Supplement und Vivinal®-Pulver bestimmt. Diese Proben wurden einzeln vorbereitet und über mehrere Tage (n) zweifach analysiert. Die berechnete RSD ist ein Maß für die Variabilität des Gesamtgehalts an GOS in den verschiedenen Proben. Um die Präzision und Robustheit der Methode zu bestimmen, wurden die Wiederfindungsraten für die Zielreferenzwerte und aus den Aufstockungen mit dem GOS-Pulver (Referenzmaterial) bestimmt.

Probe	Gesamt-GOS (n) (g/100 g)	Variabilität über n Tage (RSD in %)	Gesamt-GOS Ziel (g/100 g)	Wiederfindung (%)	MW Aufstockung 1 (g/100 g) (Wiederfindung %)	MW Aufstockung 2 (g/100 g) (Wiederfindung %)
GOS-Pulver	82,6 ± 4,1 (n = 7)	5,0	>70	n / A	n / A	n / A
Bimuno	75,7 ± 3,0 (n = 7)	3,9	79,7	95	36,8 ± 1,4 (98%)	88,4 ± 12,7 (96%)
Vivinal-Pulver	27,8 ± 0,5 (n = 4)	1,8	28,5	98	37,8 ± 0,1 (91%)	48,6 ± 0,1 (91%)

FAZIT

Als Mehrkomponentenmethode ist die Ionenchromatographie mit amperometrischer Detektion eine sehr selektive, empfindliche und robuste Analysemethode für Kohlenhydrate ohne zusätzliche Derivatisierungsschritte. In Kombination mit einer enzymatischen Behandlung können auch komplexere Kohlenhydrate quantifiziert werden. Die fortschrittliche und validierte IC-flexiPAD-Methode für die Gesamt-GOS-Analyse bietet den Analytikern eine höhere Effizienz. Durch wesentliche Verbesserungen

bei der Probenvorbereitung wird das Verfahren nicht nur schneller, da weniger zusätzliche Laborarbeit anfällt, sondern es können auch Reagenzien und Verbrauchsmaterialien eingespart werden, wodurch die Gesamtbetriebskosten gesenkt werden. Daher ist diese Methode eine wertvolle Alternative zur AOAC 2001.02. Automatisierungsschritte, wie die Metrohm Inline-Verdünnung und automatische Kalibrierungen, optimieren zusätzlich die Methode.

REFERENZEN

1. Sangwan et al. (2011), J. Food Sci. 76(4)
2. Boehm & Stahl (2007), J. Nutr. 137(3 Suppl 2)

Interne Referenz: AW IC CH6-1436-032021

3. Ziegler et al. (2001), The Column – Europe/Asia 17(02)

CONTACT

Metrohm Schweiz AG
Industriestrasse 13
4800 Zofingen

info@metrohm.ch

GERÄTEKONFIGURATION

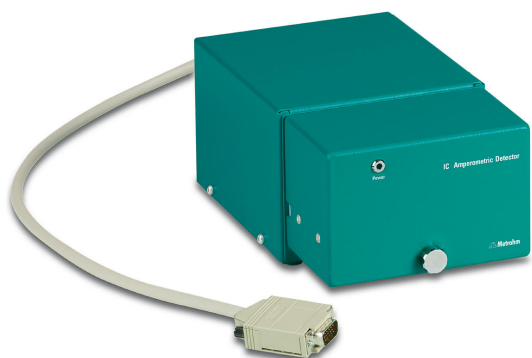


940 Professional IC Vario ONE/HPG

Der 940 Professional IC Vario ONE/HPG ist das intelligente IC-Gerät **ohne Suppression** mit **binärem Hochdruckgradient**. Es kann mit 942 Extension Modulen bis zu einem quaternären Gradientensystem ausgebaut werden. Das Gerät kann mit beliebigen Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden.

Typische Anwendungsgebiete:

- Kohlenhydratanalytik mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) nach Gradientenelution
- Gradientenanwendungen mit UV/VIS-Detektion mit oder ohne Nachsäulenderivatisierung



IC Amperometric Detector

Kompakter und intelligenter amperometrischer Detektor zu den intelligenten IC Geräten. Hervorragende Selektivität durch die vier Messmodi: DC, PAD, flexIPAD und CV, sowie das exzellente Signal/Rausch-Verhältnis und die sehr schnelle Messbereitschaft garantieren höchste Präzision der Messung.



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.