



Application Note AN-P-089

Intolerancia a la lactosa y dependencia de etiquetas alimentarias precisas

Análisis rápido y robusto de niveles bajos de lactosa con IC-PAD

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo, la leche y los productos lácteos son fuentes vitales de nutrición para los seres humanos. [1]. Además de los nutrientes, minerales, proteínas y grasas, la lactosa es un componente importante de los productos lácteos y sirve como fuente de energía. Para metabolizar eficientemente la lactosa, la enzima lactasa es indispensable [2]. Sin embargo, a nivel mundial casi el 70% de la población es intolerante a la lactosa, es decir, tiene dificultades para digerir la lactosa. [3, 4]. La malabsorción de lactosa provoca numerosos síntomas gastrointestinales y extraintestinales y otras molestias de diferente magnitud. Si bien algunas personas intolerantes a la

lactosa son sensibles a cualquier cantidad, otras pueden consumir una pequeña cantidad sin efectos nocivos. Aún faltan un valor límite específico y regulaciones para las etiquetas y la producción de productos sin lactosa; por lo tanto, es necesario analizar y etiquetar los alimentos con precisión utilizando técnicas estándar sensibles. **Cromatografía iónica con detección amperométrica pulsada.** (IC-PAD) permite la determinación de contenidos muy bajos de lactosa. La validación según los requisitos de la AOAC muestra la alta sensibilidad y fiabilidad de este método como análisis de rutina.

SAMPLE AND SAMPLE PREPARATION

La determinación de lactosa se realizó para una amplia selección de matrices de muestra que comprenden fórmulas infantiles y alimentos de seguimiento para bebés (AN-P-088), referencias certificadas (por ejemplo, la referencia de leche baja en lactosa muva ML-2312), así como 15 productos comerciales bajos en lactosa y sin lactosa, incluidos yogur, mantequilla, crema, requesón, bebidas lácteas, chocolate con leche y suplementos.

Se picaron los sólidos (por ejemplo, queso y chocolate con leche), mientras que se homogeneizaron los materiales en polvo y líquidos. Después de este pretratamiento, las muestras se pesaron directamente en recipientes adecuados (0,1 a 5 g, tubos de polipropileno de 50 ml). El peso de la muestra (W_s En g) se registró con una precisión de 0,001 g para cálculos posteriores. Se preparó un extracto acuoso agregando agua ultrapura (UPW) a un volumen total de 50 ml (W_{UPW} en kilogramos). Posteriormente, los viales se taparon y se mezclaron vigorosamente con un mezclador vórtex durante aproximadamente 20 segundos. Para mejorar la solubilidad de determinadas muestras (p. ej., queso crema o chocolate), los viales se calentaron en un baño de

agua templada a 70 °C durante 10 minutos.

La precipitación de Carrez es un método estándar para eliminar proteínas y moléculas más grandes con el fin de proteger el sistema analítico. Siguiendo esta práctica común, se agregaron los reactivos y se anotó el peso final (W_{UPWC} en kilogramos). Después de mezclar bien, las muestras se centrifugaron (5000 xg) durante 10 minutos y se decantaron. Los viales cubiertos se colocaron directamente en el muestreador automático. Se puede lograr una mayor protección de la columna mediante un ultrafiltración paso.

Alternativamente, la preparación automatizada de muestras mediante diálisis en línea con el Celda de diálisis de bajo volumen es recomendado. Para ello, las muestras se prepararon como se describió anteriormente con respecto a los extractos acuosos, se agitaron bien y se taparon antes de colocarlas directamente en el bastidor del muestreador automático. Cuando se utiliza diálisis, no es necesaria la precipitación de Carrez antes del análisis, lo que ahorra tiempo y productos químicos. El uso de la celda de diálisis de bajo volumen requiere solo 5 ml de muestra.

EXPERIMENTAL

La cantidad de lactosa en los extractos acuosos de la muestra se determinó mediante cromatografía iónica (IC) con un **Metrosep Carb 2 - 250/4.0** columna de separación usando un eluyente de hidróxido isocrático (400 mmol/L NaOH) y detección amperométrica pulsada (PAD) con la forma de onda de barrido ([AN-P-088](#), [WP-077](#)). Es posible lograr una larga vida útil del electrodo con mínimos requisitos de mantenimiento utilizando la celda amperométrica de capa fina de Metrohm (electrodo de trabajo de Au y

electrodo de referencia de Pd). El modo de barrido combinado con el flujo menos turbulento en la celda de capa fina da como resultado una línea base suave con poco ruido, una condición previa necesaria para analizar concentraciones muy bajas, como en productos con bajo contenido de lactosa.

Los esquemas de flujo para el análisis directo de lactosa con preparación de muestra obligatoria, como la precipitación de Carrez, se muestran en **Figura 1**.

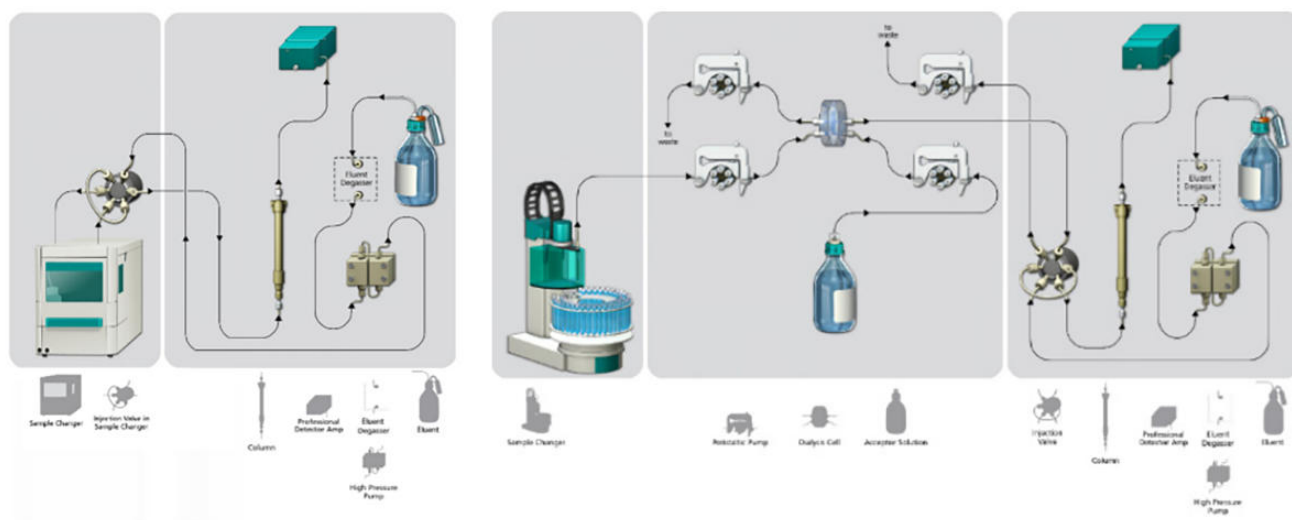


Figure 1. Ejemplos de configuraciones de sistema para análisis directo de lactosa utilizando el Metrohm 889 Sample Center – frío (izquierda).

La preparación de muestras para análisis directo es obligatoria, por ejemplo, con precipitación Carrez para proteger el sistema analítico. La diálisis en línea (derecha) se puede agregar opcionalmente a cualquier instrumentación existente, lo que permite una alternativa automatizada a la preparación de muestras convencional. El transporte de muestras y la manipulación de líquidos se pueden realizar con una bomba peristáltica, Dosino, o directamente utilizando el muestreador automático 889. En ambos ejemplos, la elución isocrática se realiza con un eluyente de hidróxido de sodio antes de la detección mediante PAD.

La estabilidad de la muestra se mejora utilizando el 889 IC Sample Center – fresco. La preparación automatizada de muestras mediante diálisis en línea se puede agregar a cualquier configuración existente. Más detalles están disponibles en la literatura de Metrohm para Preparación de muestras en línea

Metrohm así como en [AN-P-088](#).

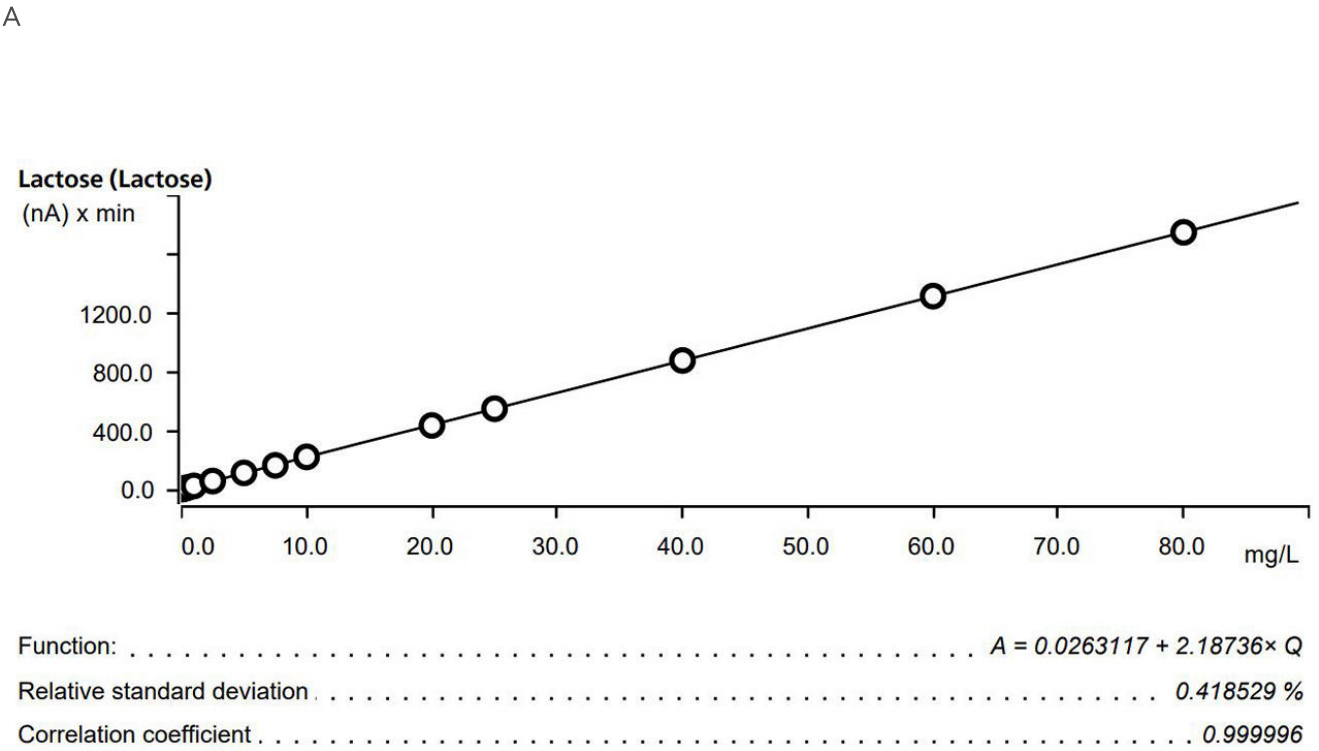
Cualquier manipulación de líquidos para el transporte de muestras o la limpieza del recorrido de las muestras también se puede automatizar utilizando la herramienta más flexible de Metrohm para la manipulación de líquidos: el Dosino.

RESULTS AND DISCUSSION

La lactosa eluye en menos de 30 minutos (Figura 2–6). El rango de trabajo general del método es de 0,05 a 80 mg/L para estándares de lactosa líquida (Figura 2 A), con capacidad de analizar muestras en un rango de 0,2 a 21.000 mg/ 100 g con respectiva dilución. A diferencia de los métodos cromatográficos publicados anteriormente, los derivados de la lactosa (epilactosa, lactulosa, alolactosa y galactosilactosa), como los de

los aditivos prebióticos, se separaron con éxito de la lactosa, lo que aumentó la selectividad y precisión del método.Figura 2B). Las concentraciones de las muestras se determinan a partir de la calibración lineal (c(lactosa)_S en mg/kg) (Figura 2 A) y calculado para determinar el contenido final de lactosa (c(lactosa)_{ALETA} en gramos/ 100 gramos) basado en el peso de la muestra:

c(Lactose)_{FIN} = (100 × c(Lactose)_S × W_{UPW/UPWc}) / (1000 × W_S)



B



Figure 2. Calibración para lactosa (A) que muestra una fuerte linealidad en el rango de concentración de 0,05 mg/L a 80 mg/L (requisito de validación). Es obligatoria una separación adecuada de la lactosa de las interferencias. Además de otros azúcares, alcoholes de azúcar e iones inorgánicos, es fundamental separar los derivados de lactosa estructuralmente similares (B): epilactosa, lactulosa, alolactosa y galactosilactosa (picos de izquierda a derecha), lo cual es posible en las condiciones de elución descritas.

Se muestran ejemplos de resultados de validación para muestras seleccionadas en **Figura 3–6** (material de referencia de leche baja en lactosa (muva), un suplemento que contiene lactosa además de galactooligosacáridos (Bimuno), un yogur sin lactosa y una mantequilla sin lactosa). Las concentraciones de lactosa oscilaron entre <0,5 mg/100 g (mantequilla baja en lactosa) y casi 13 g/100 g (suplemento prebiótico). Los datos muestran el cumplimiento de los criterios de aceptación de la AOAC en cuanto a repetibilidad y variabilidad diaria ($RSD \leq 7\%$), recuperaciones de picos (90–110%) y una resolución ($>1,5$, es decir, separación de referencia) determinada dentro del único validación de laboratorio.

Los resultados obtenidos para el análisis usando precipitación de Carrez antes de la inyección y usando diálisis en línea mostraron resultados comparables para muestras de prueba seleccionadas (**Figura 3–6**,

AN-P-088). Los resultados de un conjunto de seis matrices diferentes que comprenden réplicas a corto plazo y pruebas de picos (como se describe en **Figura 3–6**) difieren con RSD inferiores al 7% (promedio 3,2%).

Figura 3–6 mostrar las concentraciones medias y la repetibilidad R_r como RSD de muestras preparadas individualmente medidas en un corto tiempo ($n = 7$) o como concentración determinada sobre muestras preparadas individuales medidas en diferentes días (4–8 días) (variabilidad de día a día (R_{var}) y sus RSD), y la recuperación total del pico R_s como promedio de todos los experimentos de picos analizados durante varios días. La resolución de la lactosa a los picos posteriores se expresan como R. Los resultados de la diálisis en línea para muestras seleccionadas están marcados con una estrella (*).



Figura 3. Lactosa expresada como lactosa monohidrato (factor de conversión 1,05 para lactosa en lactosa monohidrato) en muvaML-2312 (objetivo 217 ± 45 g/ 100 g).

R_r (mg/100g) (RSD _r %)	R_{var} (mg/ 100 g) (RSD _{var} %)	R_S (%)	R
226 ± 7 (3,2)	228 ± 12 (5,4)	102 ± 3	2,3

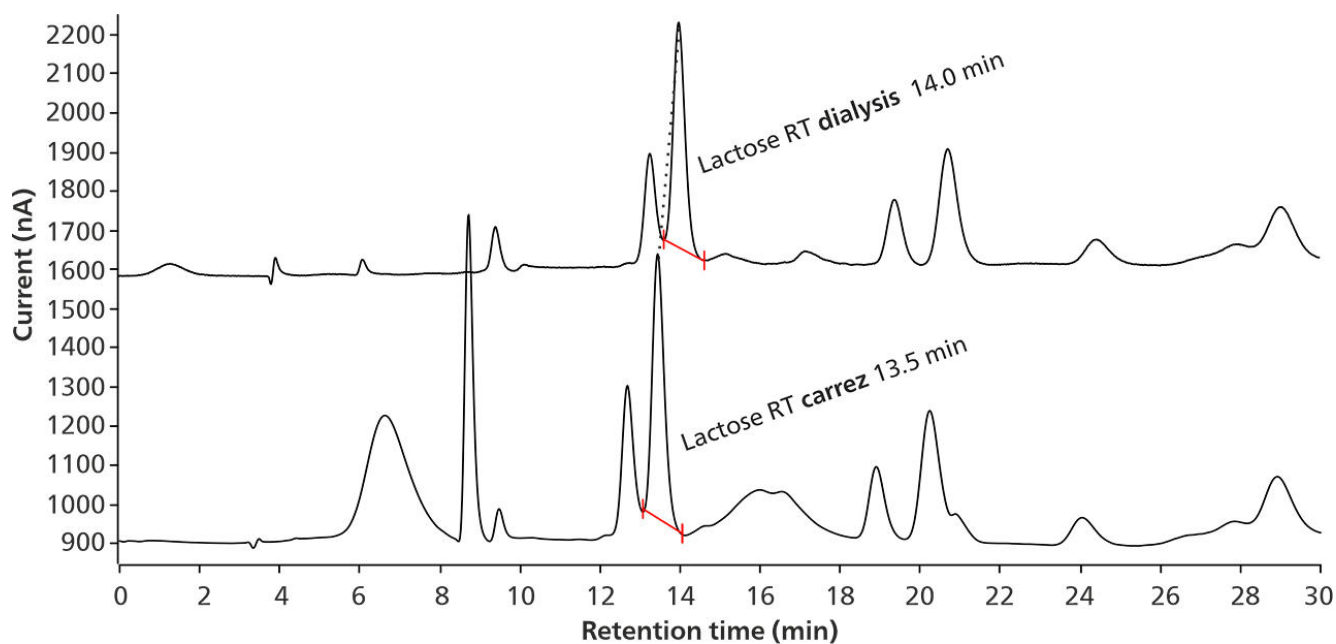


Figura 4. Lactosa expresada como lactosa monohidrato (factor de conversión 1,05 para lactosa en lactosa monohidrato) en Bimuno diario (Nutrición Digestiva Dirigida).

R_r (mg/ 100 g) (RSD_r %)	R_{var} (mg/ 100 g) (RSD_{var} %)	R_S (%)	R
13009 ± 288 (2,2)*	13125 ± 484 (3,9)*	$99 \pm 6^*$	1,9*
11795 ± 130 (1,1)	11807 ± 465 (3,9)	99 ± 5	1,6



Figura 5. Lactosa expresada como lactosa monohidrato (factor de conversión 1,05 para lactosa en lactosa monohidrato) en Yogur, libre de, Coop, sin lactosa.

R_r (mg/ 100 g) (RSD_r %)	R_{var} (mg/ 100 g) (RSD_{var} %)	R_S (%)	R
$4,69 \pm 0,18$ (3,9)*	$4,88 \pm 0,05$ (2,3)*	$94 \pm 3^*$	2,6*
$4,60 \pm 0,15$ (3,3)	$4,40 \pm 0,05$ (1,0)	96 ± 3	2,2

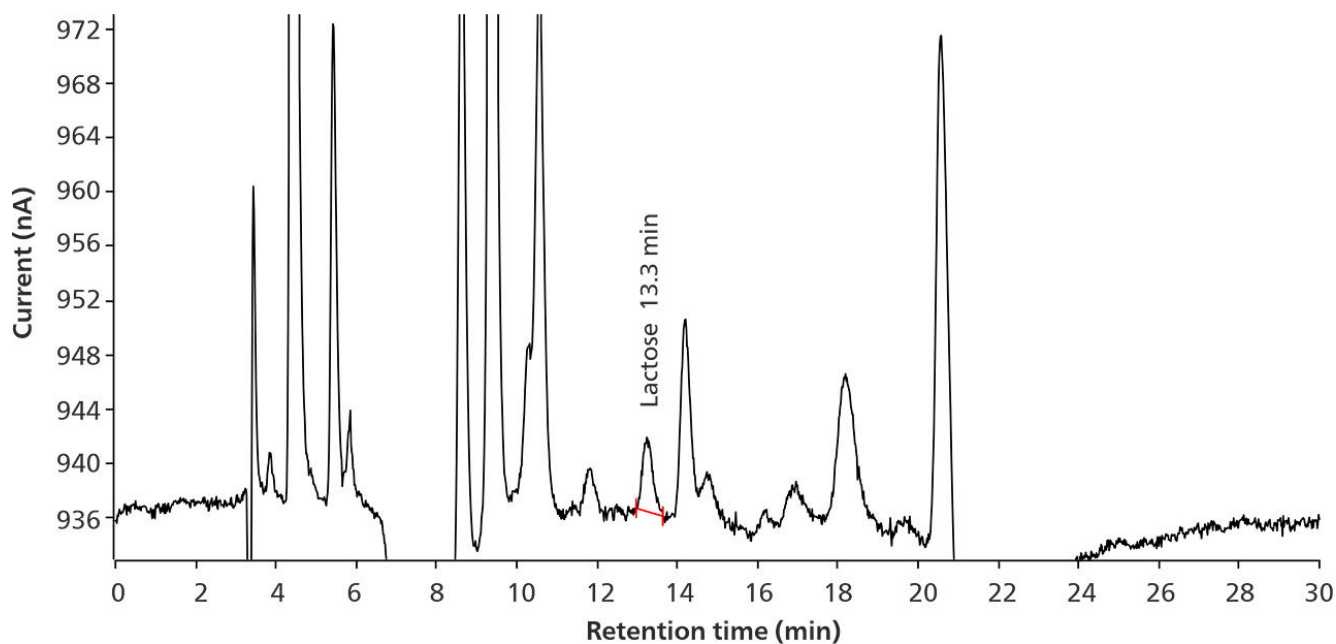


Figura 6. Lactosa expresada como lactosa monohidrato (factor de conversión 1,05 para lactosa en lactosa monohidrato) en Mantequilla, ajá, Spar, sin lactosa.

R_r (mg/ 100 g) (RSD _r %)	R_{var} (mg/ 100 g) (RSD _{var} %)	R_s (%)	R
0,40 ± 0,02 (5,9)	0,39 ± 0,01 (2,5)	103 ± 6	2,3

La validez según los criterios de una prueba de laboratorio único de la AOAC muestra la confiabilidad, sensibilidad y solidez adecuadas del método IC-PAD descrito para la determinación de lactosa en productos lácteos bajos en lactosa y sin lactosa. El análisis comparativo para la preparación de muestras con precipitación de Carrez y diálisis en línea Metrohm mostró una conformidad excelente. Se recomienda la diálisis en línea Metrohm como

alternativa eficiente en el tiempo a la precipitación de Carrez. Los sistemas Metrohm IC se caracterizan por un alto grado de flexibilidad: los sistemas se pueden actualizar, por ejemplo, para integrar adicionalmente la dilución, lo que también permite la calibración en línea y la dilución inteligente. Cualquier automatización hace que el método sea aún más sencillo y adecuado para análisis de rutina y de alto rendimiento.

REFERENCES

1. Muehlhoff, E.; Bennett, A.; McMahon, D. *Leche y productos lácteos en la nutrición humana*; FAO: Roma, **2013**.
2. Monti, L.; Negri, S.; Meucci, A.; Stroppa, A.; Galli, A.; Contarini, G. Determinación de lactosa, galactosa y glucosa en queso duro naturalmente "libre de lactosa": Validación del método HPAEC-PAD. *química alimentaria* **2017**, 220, 18-24.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.185>.
3. Bayless, T. METRO.; Marrón, E.; Paige, D. METRO. Falta de persistencia de lactasa e intolerancia a la lactosa. *Representante Curr Gastroenterol* **2017**, 19 (5), 23.
<https://doi.org/10.1007/s11894-017-0558-9>.
4. Facioni, M. S.; Raspini, B.; Pivari, F.; Dogliotti, E.; Cena, H. Manejo nutricional de la intolerancia a la lactosa: la importancia de la dieta y el etiquetado de los alimentos. *Revista de medicina traslacional* **2020**, 18 (1), 260.
<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>.

Referencia interna: AWIC CH6-1435-022021

CONTACT

Metrohm Argentina S.A.
Avda. Regimiento de
Patricios 1456
1266 Buenos Aires

info@metrohm.com.ar

CONFIGURATION



940 Professional IC Vario ONE/Prep 1

El 940 Professional IC Vario ONE/Prep 1 es el aparato CI inteligente **sin supresión** en combinación con la preparación de muestras inline de Metrohm, **como la ultrafiltración inline o la diálisis inline**. El aparato se puede emplear con cualquier método de separación o de detección.

Ámbitos típicos de aplicación:

- Determinaciones de cationes y aniones sin supresión después de ultrafiltración inline o diálisis inline
- Aplicaciones UV/VIS después de ultrafiltración inline o diálisis inline
- Aplicaciones con detección amperométrica después de ultrafiltración inline o diálisis inline



Metrosep Carb 2 - 250/4,0

La columna CI Metrosep Carb 2 - 250/4,0 es particularmente apta para la determinación de carbohidratos empleando eluyentes alcalinos y la detección amperométrica por impulsos. El material de la columna de intercambio de aniones de alta capacidad ha sido realizado a base de un copolímero de estireno-divinilbenceno. Es estable dentro de la gama de pH = 0-14 y separa monosacáridos y disacáridos. Además, también es apta para el análisis de alcoholes de azúcar, anhidroazúcares, aminoazúcares, etc. La variante de 250 mm de la columna de separación Metrosep Carb 2 está optimizada para separaciones complejas.



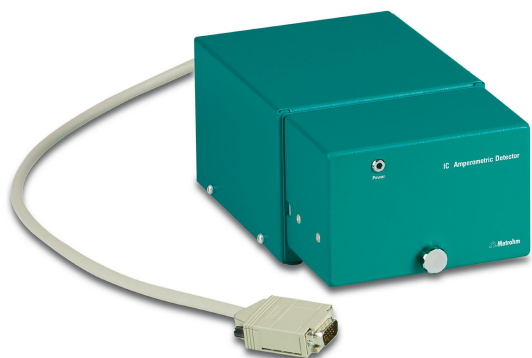
Juego de accesorios CI de celda Wall-Jet: carb (Au, Pd)

Juego de accesorios compuesto por celda Wall-Jet con accesorios adicionales. Para el análisis de hidrato de carbono con un electrodo de trabajo de oro y un electrodo de referencia Pd.



Juego de accesorios CI: diálisis inline Low Volume

Set de accesorios para una diálisis inline rápida. Para el uso con el 858 Professional Sample Processor y una bomba peristáltica bicanal adicional.



IC Amperometric Detector

Detector amperométrico inteligente y compacto para los aparatos CI inteligentes. La extraordinaria selectividad mediante los cuatro modos de medida: DC, PAD, flexIPAD y CV; así como su excelente relación señal/ruido y su rápida disponibilidad para la medida, garantizan una gran precisión de la medida.



Juego de accesorios CI: ultrafiltración inline 2 (modo extracción)

Set de accesorios para la ultrafiltración inline 2 (modo extracción). Para el uso con el 858 Professional Sample Processor / 919 IC Autosampler plus.



930 Compact IC Flex Oven/Deg

El 930 Compact IC Flex Oven/Deg es un aparato inteligente Compact IC con **horno para columnas**, **sin supresión** y con un **desgasificador** incorporado. El aparato se puede emplear con cualquier método de separación o de detección.

Ámbitos típicos de aplicación:

- Determinaciones de cationes y aniones sin supresión con detección de conductividad
- Aplicaciones sencillas con detección amperométrica o UV/VIS