



Application Note AN-P-088

Pruebas de calidad para fórmula infantil

Determinación rápida y fiable de niveles bajos de lactosa con IC-PAD

La lactosa, un disacárido formado por glucosa y galactosa, está presente en la leche y los productos lácteos. Como el carbohidrato principal en la leche humana (55–70 g/L), también es un componente principal de las fórmulas infantiles con recomendaciones mínimas de 4,5 g/100 kcal.^{1]}. Analíticamente, estas altas concentraciones pueden determinarse fácilmente mediante métodos de componentes múltiples como ISO 22184 o métodos de menor sensibilidad como la detección del índice de refracción. En algunos casos, los bebés pueden sufrir de malabsorción de la lactosa. Cuando esto ocurre, la actividad enzimática de la lactasa es limitada o está ausente desde el nacimiento, lo que afecta a la metabolización de la lactosa. La lactosa no puede ser hidrolizada en glucosa y galactosa en el intestino delgado, lo que impide la absorción de los hidratos de

carbono digeribles como monosacáridos. En consecuencia, aparecen numerosos síntomas y molestias gastrointestinales y extraintestinales (por ejemplo, diarrea) [1–3]. La malabsorción de glucosa-galactosa también afecta a un subconjunto muy pequeño de la población. Para todos los tipos de malabsorción, es fundamental eliminar cualquier fuente dietética de lactosa. Las fuentes nutricionales sin lactosa son especialmente cruciales para los bebés, y estos alimentos deben cumplir adecuadamente con los requisitos reglamentarios. (lactosa <10 mg/100 kcal) [1,3–5]. Para analizar tal **bajo contenido de lactosa** en matrices complejas como la fórmula infantil, **cromatografía iónica con detección amperométrica pulsada (IC-PAD)** ofrece una solución robusta y sensible.

MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Lactosa La determinación se realizó para un amplio espectro de matrices de muestra con bajo contenido de lactosa, que comprenden fórmulas infantiles y alimentos para bebés de seguimiento, como los materiales de referencia NIST 2383a (compuesto de alimentos para bebés) y NIST 1869 (fórmula en polvo para bebés), una fórmula infantil de HiPP (HiPP Comfort, sin lactosa) y una leche sin lactosa disponible en el mercado (1,5 % de grasa, Spar Suiza).

Los materiales líquidos y en polvo se homogeneizaron y pesaron directamente en recipientes adecuados (de 0,1 a 5 g, tubos de centrífuga 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 dar como resultado un volumen total de 50 mL (W_{UPW} en kg). Posteriormente, los viales se taparon y se mezclaron vigorosamente con un mezclador vortex durante aproximadamente 20 segundos.

La precipitación de Carrez es un método estándar

para eliminar proteínas y moléculas más grandes de las muestras para proteger el sistema analítico. Siguiendo esta práctica común, se añadieron los reactivos y se anotó el peso final (W_{UPWC} en kg). Después de mezclar bien, las muestras se centrifugaron (5000 × g) durante 10 minutos y se decanta. Los viales cubiertos se colocaron directamente en el muestreador automático. Se puede asegurar una mayor protección de la columna con un ultrafiltración paso.

Como alternativa, la preparación de muestras automatizada por Diálisis en línea Se recomienda una celda de diálisis de bajo volumen. Para ello, las muestras se prepararon de forma idéntica a los extractos acuosos, se agitaron bien y se cubrieron antes de colocarlas en la gradilla del automuestreador. Para la diálisis, no es necesaria la precipitación de Carrez antes del análisis, lo que ahorra tiempo y reactivos químicos. El uso de la celda de diálisis de bajo volumen requiere solo 5 ml de muestra

EXPERIMENTAL

los **cantidad de lactosa** en extractos de muestras acuosas se determinó mediante cromatografía iónica (IC) en un **Metrosep Carb 2 - 250/4.0** columna usando un eluyente de hidróxido isocrático (400 mmol/L NaOH) y detección amperométrica pulsada (PAD) con la forma de onda de barrido (Figura 1).

Junto con la **Célula amperométrica de capa fina de Metrohm** (electrodo de trabajo de Au y de referencia de Pd), se puede obtener una larga vida útil del electrodo con un mantenimiento mínimo. El modo de barrido combinado con un flujo menos turbulento en la celda de capa fina da como resultado una línea de base suave, 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 y el análisis después de la diálisis en línea de Metrohm se muestran en **Figura 2**. Aunque la configuración de la diálisis puede parecer más compleja, la automatización hace que el esfuerzo valga la pena para el proceso analítico general.

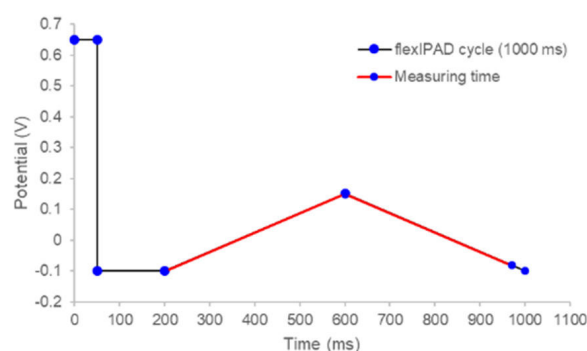


Figure 1. La forma de onda de barrido para la oxidación de carbohidratos admite la detección sensible de carbohidratos con un bajo nivel de ruido.

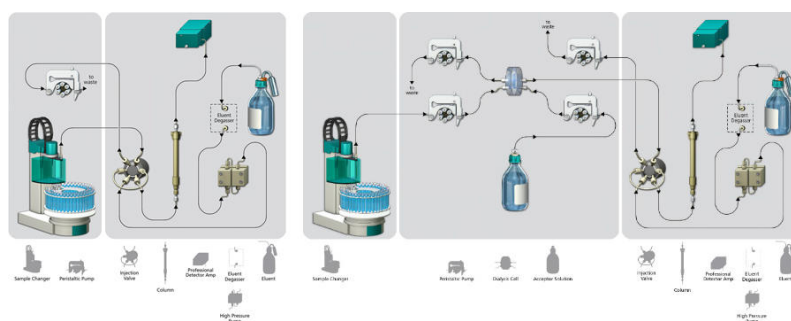


Figure 2. Ejemplo de configuración del sistema para análisis directo de lactosa (izquierda, preparación de muestras obligatoria como, por ejemplo, la precipitación de Carrez) y con diálisis opcional (derecha, no es necesaria una preparación de muestras adicional). La diálisis en línea es opcional y se puede agregar a cualquier configuración de instrumentación existente. Para la precipitación de Carrez, la ruta de la muestra va directamente desde el muestreador automático al bucle de muestra (PEEK, 10 μ L). El transporte de muestras se produce mediante bomba peristáltica. Desde el loop de muestra, la muestra se inyecta directamente en la columna (Metrosep Carb 2 - 250/4.0), donde se eluye con un eluyente isocrático de NaOH de 400 mmol/L antes de la detección amperométrica pulsada (PAD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La lactosa se eluye en menos de 20 minutos (**figura 3**), independientemente de si se utiliza inyección directa o diálisis en línea. A diferencia de los métodos cromatográficos publicados anteriormente, los derivados de la lactosa (es decir, epilactosa, lactulosa, alolactosa y galactosilactosa), como los aditivos prebióticos, se separaron con éxito de la lactosa, aumentando la selectividad y precisión del método. El rango de trabajo general del método es de 0,05 a 80

mg/L para estándares de lactosa líquida, con la capacidad de analizar muestras en un rango de 0,2–21.000 mg/100g con la respectiva dilución. Las concentraciones de la muestra se determinan a partir de una calibración lineal ($c(\text{lactosa})_S$ en mg/kg) y son calculado en base al peso de la muestra para dar el contenido final de lactosa ($c(\text{lactosa})_{\text{ALETA}}$ en g/100 g):

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

Los resultados de la validación se muestran para fórmulas infantiles, alimentos para bebés y leche (**tabla 1**). Estos muestran el cumplimiento de los criterios generales de aceptación de AOAC para una validación completa en un solo laboratorio (RSD_r y variabilidad $\leq 10\%$ y $\leq 7\%$, recuperaciones de picos 85–115% y 90–110% para un rango analítico de 10–100 mg/100 g y >100 mg/100 g, respectivamente).

Los resultados obtenidos para el análisis utilizando la precipitación de Carrez antes de la inyección (**tabla 1**) y el uso de diálisis en línea fueron comparables para las muestras de prueba seleccionadas analizadas como se muestra en **figura 3**. Los datos brindan una excelente verificación para usar la diálisis en línea como una alternativa eficiente en el tiempo a la precipitación de Carrez.

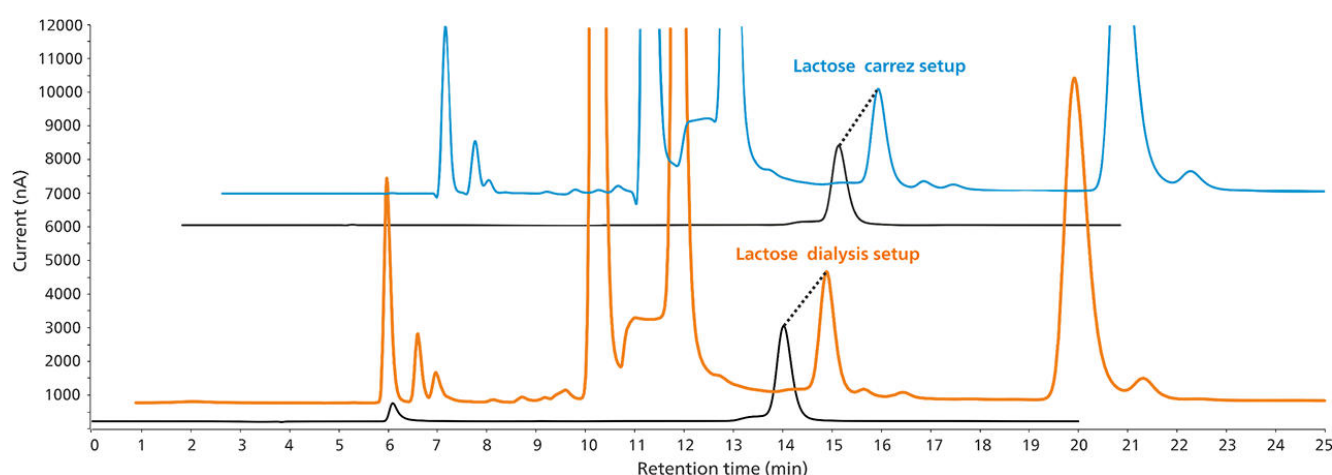


Figure 3. Determinación de lactosa en alimentos para bebés (NIST 2383a). Comparación de dos métodos de preparación de muestras: Diálisis en línea ($c(\text{lactosa}) = 51,1$ mg/L, naranja) y precipitación de Carrez ($c(\text{lactosa}) = 49,6$ mg/L, azul). La desviación estándar relativa de las dos muestras es 2,1%. A modo de comparación, se superpone un estándar de lactosa de 40 mg/L (negro).

Tabla 1. Lactosa expresada como Lactosa monohidrato (conversión factor 1,05) en fórmulas infantiles sin lactosa y muestras de leche determinadas después de la preparación de la muestra por precipitación de Carrez. Los la tabla muestra la repetibilidad R_r como RSD de muestras preparadas individualmente medidas en un período de tiempo corto (n = 7), la variabilidad de un día a día como RSD sobre muestras preparadas individuales medidas en diferentes días (4–8 d), y la recuperación del pico como el promedio de todos experimentos de picos analizados durante varios días.

Repetibilidad (mg/100 g) (RSD _r , %)	Día a día variabilidad (mg/100g) (%)	pico total recuperación (%)
NIST 2383a alimentos para bebés (promedio 520 ± 27 mg/100 g (n = 7), objetivo 500 ± 100 mg/100 g, recuperación 106±6%)		
520 ± 27 (5,1)	528 ± 29 (5,5)	103 ± 2
Polvo de fórmula infantil NIST 1869 (promedio 569 ± 33 mg/100 g (n = 7), objetivo 520 ± 120 mg/100 g, recuperación objetivo 109 ± 6%)		
569 ± 33 (5,5)	523 ± 31 (5,9)	98 ± 3
Fórmula infantil HiPP Comfort (20,8 g/100 g (n = 7), objetivo 22,1 g/100 g, recuperación objetivo 97 ± 4%)		
20751 ± 743 (3,6)	22163 ± 258 (1,2)	102 ± 3
Spar aha 1,5% grasa, leche sin lactosa		
2,35 ± 0,18 (7,9)	2,10 ± 0,05 (2,2)	111 ± 2

CONCLUSIÓN

La fórmula infantil es una matriz muy compleja y desafiante, ya que contiene todo tipo de nutrientes (p. ej., proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales). Preparación de muestras y Se necesitan métodos de análisis para garantizar una alta precisión, sensibilidad y selectividad para la determinación de bajas concentraciones de lactosa. IC-PAD supera tales desafíos analíticos con preparación automatizada de muestras en línea opciones y da como resultado una excelente separación de la lactosa de otros componentes de la matriz y derivados de la lactosa.

El LOQ estimado de 4 mg de lactosa/100 g en estas matrices de muestra es inferior a los requisitos y umbrales conocidos para productos de fórmula infantil sin lactosa. Así, adecuado Este método proporciona sensibilidad y robustez, como se muestra en el análisis a largo plazo y en los experimentos de picos. Además, la flexibilidad para aplicaciones adaptadas al usuario, la preparación de muestras opcional y/o la automatización hacen IC-PAD ideal para análisis de rutina y un altamente valiosa adición a la cartera analítica de laboratorio.

REFERENCIAS

1. EFSA. Opinión científica: composición esencial de los preparados para lactantes y de seguimiento. *Eur. Seguridad alimentaria Aut. EFSA J.* **2014**, 12 (7), 3760.
2. 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. *J Traducir. Medicina.* **2020**, 18 (1), 260.
3. EFSA. Opinión científica sobre los umbrales de lactosa en la intolerancia a la lactosa y la galactosemia. *Eur. Seguridad alimentaria Aut. EFSA J.* **2010**, 8 (9), 1777.
4. Comisión Europea. Reglamento Delegado (UE) 2016/127 de la Comisión, de 25 de septiembre de 2015, por el que se completa el Reglamento (UE) n.º 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información de los preparados para lactantes y los preparados de continuación y en lo que respecta a los requisitos sobre información relacionada con la alimentación de lactantes y niños pequeños. *Apagado. J Eur. Unión* **2016**, 29.
5. FAO/OMS. CODEX Alimentarius - Norma General para el Etiquetado de Alimentos Preenvasados CXS 1-1985. *En t. Puesto de comida.*

Internal reference: AW IC CH6-1435-022021

CONTACT

Metrohm Hispania
Calle Aguacate 15
28044 Madrid

mh@metrohm.es

CONFIGURACIÓN



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



945 Professional Detector Vario – Amperometry

Detector autónomo inteligente equipado con el IC Amperometric Detector. Extraordinaria selectividad mediante los diferentes modos de medida: DC, PAD, flexIPAD y CV. La excelente relación señal/ruido y su rápida disponibilidad para la medición, garantizan una gran precisión de la medición. Se puede utilizar con los aparatos CI inteligentes o como detector de conductividad independiente.



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.



858 Professional Sample Processor – Pump

El 858 Professional Sample Processor – Pump procesa muestras de 500 µL a 500 mL. La transferencia de muestras se realiza por medio de la bomba peristáltica de dos canales bidireccional integrada o con un 800 Dosino.



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.



Juego de accesorios CI: Celda Thin-Layer: Carb (Au, Pd)

El juego de accesorios consiste en una celda Thin-Layer con accesorios adicionales, con electrodos para el análisis de carbohidratos con un electrodo de trabajo chapado en oro y un electrodo de referencia de paladio.