



Application Note AN-P-088

Test di qualità per alimenti per lattanti

Determinazione rapida e affidabile del lattosio a bassi livelli con IC-PAD

Il lattosio, un disaccaride composto da glucosio e galattosio, è presente nel latte e nei suoi derivati. Essendo il principale carboidrato nel latte materno (55–70 g/l), è anche un componente principale degli alimenti per neonati con raccomandazioni minime di 4,5 g/100 kcal [1]. Analiticamente, concentrazioni così elevate possono essere facilmente determinate con metodi multicomponente come ISO 22184 o metodi di sensibilità inferiori come il rilevamento dell'indice di rifrazione. Talvolta, i neonati possono soffrire di malassorbimento del lattosio. In questi casi, l'attività enzimatica della lattasi è limitata oppure assente dalla nascita, compromettendo il metabolismo del lattosio. Il lattosio non può essere idrolizzato in glucosio e galattosio nell'intestino tenue, con conseguente impedimento dell'assorbimento dei carboidrati

digeribili come monosaccaridi. Di conseguenza, compaiono numerosi sintomi e disturbi gastrointestinali ed extra-intestinali (ad es. diarrea) [1–3]. Il malassorbimento di glucosio-galattosio colpisce anche un sottogruppo molto piccolo della popolazione. Per tutti i tipi di malassorbimento, è fondamentale eliminare le fonti alimentari di lattosio. Gli alimenti privi di lattosio sono pertanto fondamentali per i neonati e devono soddisfare adeguatamente i requisiti prescritti dalla legge (lattosio <10 mg/100 kcal) [1,3–5]. Per l'analisi **del contenuto ridotto di lattosio** in matrici complesse come il latte artificiale, la **cromatografia ionica con rivelazione amperometrica pulsata (IC-PAD)** rappresenta una soluzione affidabile e sensibile.

CAMPIONE E PREPARAZIONE CAMPIONE

La determinazione del **Lattosio** è stata eseguita per un ampio spettro di matrici di campioni a basso contenuto di lattosio, compreso gli alimenti per neonati e per l'infanzia come i materiali di riferimento NIST 2383a (composito per alimenti per l'infanzia) e NIST 1869 (polvere per lattanti), un latte artificiale di HiPP (HiPP comfort, lattosio ridotto) e un latte senza lattosio disponibile in commercio (1,5% di grassi, Spar Svizzera).

I materiali in polvere e liquidi sono stati omogeneizzati e pesati direttamente in contenitori adatti (provette da centrifuga in polipropilene da 0,1–5 g, 50 mL). Il peso del campione (w_s in g) è stato registrato con lo 0,001 g più vicino per i calcoli successivi. Un estratto acquoso è stato preparato aggiungendo acqua ultrapura (UPW) per ottenere un volume totale di 50 ml (w_{UPW} in kg). Successivamente, le fiale sono state tappate e miscelate vigorosamente con un miscelatore a vortice per circa 20 secondi.

La precipitazione di Carrez è un metodo standard per

rimuovere le proteine e le molecole più grandi dai campioni al fine di proteggere il sistema analitico. Seguendo questa pratica comune, sono stati aggiunti i reagenti e annotato il peso finale (w_{UPWC} in kg). Dopo un'accurata miscelazione, i campioni sono stati centrifugati ($5000 \times g$) per 10 minuti e travasati. Le fiale sono state coperte e collocate direttamente nell'autocampionatore. Una maggiore protezione della colonna può essere assicurata da un ulteriore step di ultrafiltrazione.

In alternativa, c'è la preparazione automatizzata del campione da parte di Dialisi in linea con una cella per dialisi a basso volume. Per questa, i campioni sono stati preparati in modo identico agli estratti acquosi, agitati bene e coperti prima di posizionarli sul rack dell'autocampionatore. Per la dialisi, non è necessaria la precipitazione di Carrez prima dell'analisi, risparmiando tempo e reagenti chimici. L'utilizzo della cella per dialisi a basso volume richiede solo 5 ml di campione.

ANALISI

La **quantità di lattosio** in estratti acquosi di campioni è stata determinata mediante cromatografia ionica (IC) su una colonna **Metrosep Carb 2 - 250/4.0** utilizzando un eluente di idrossido isocratico (400 mmol/L NaOH) e il rilevamento amperometrico pulsato (PAD) con la forma d'onda di scansione (Figura 1).

Insieme alla **cella amperometrica a strato sottile Metrohm** (elettrodo di riferimento Au e Pd), è possibile ottenere una lunga durata dell'elettrodo con una manutenzione minima. La modalità di scansione combinata con un flusso meno turbolento nella cella a strato sottile si traduce in una linea di base regolare, una preconditione necessaria per analizzare concentrazioni molto basse come nei prodotti a basso contenuto di lattosio. Gli schemi di flusso per l'analisi diretta e successiva alla dialisi in linea Metrohm sono mostrati in **figura 2**. Sebbene l'impostazione per la dialisi possa sembrare più complessa, l'automazione ripaga lo sforzo per l'intero processo analitico.

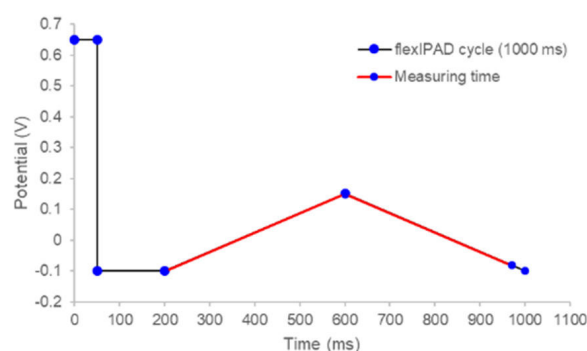


Figure 1. La forma d'onda sweep per l'ossidazione dei carboidrati supporta il rilevamento sensibile dei carboidrati con un basso livello di rumore.

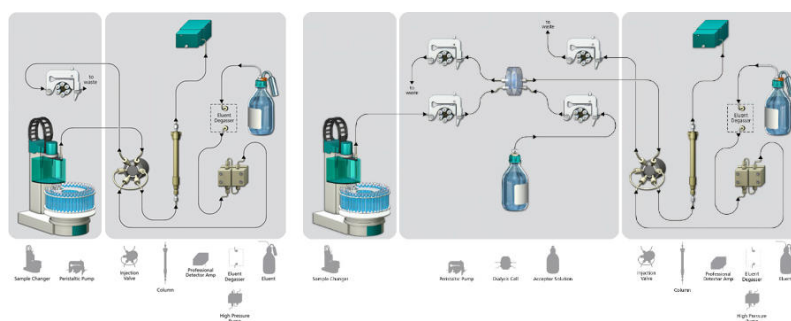


Figure 2. Esempio di configurazione del sistema per l'analisi diretta del lattosio (a sinistra, preparazione del campione obbligatoria come ad esempio la precipitazione di Carrez) e con dialisi opzionale (a destra, non è necessaria alcuna preparazione aggiuntiva del campione). La dialisi in linea è opzionale e può essere aggiunta a qualsiasi configurazione di strumentazione esistente. Per la precipitazione Carrez, il percorso del campione va direttamente dall'autocampionatore al circuito del campione (PEEK, 10 µL). Il trasporto del campione avviene tramite pompa peristaltica. Dal circuito del campione, il campione viene iniettato direttamente nella colonna (Metrosep Carb 2 - 250/4.0), dove viene eluito con un eluente isocratico NaOH da 400 mmol/L prima del rilevamento amperometrico pulsato (PAD).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il lattosio eluisce in meno di 20 minuti (**Figura 3**), indipendentemente dal fatto che venga utilizzata l'iniezione diretta o la dialisi in linea. Contrariamente ai metodi cromatografici precedentemente pubblicati, i derivati del lattosio (cioè epilattosio, lattulosio, allolattosio e galattosillattosio), come dagli additivi prebiotici, sono stati separati con successo dal lattosio, aumentando la selettività e l'accuratezza del metodo. L'intervallo di lavoro complessivo del metodo

è compreso tra 0,05 e 80 mg/L per gli standard di lattosio liquido, con la possibilità di analizzare i campioni in un intervallo di 0,2–21.000 mg/100 g con rispettiva diluizione. Le concentrazioni del campione sono determinate da una calibrazione lineare ($c(\text{lattosio})_S$ in mg/kg) e sono calcolati in base al peso del campione così da fornire il contenuto finale di lattosio ($c(\text{lattosio})_{FIN}$ in g/100 g):

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

I risultati della convalida vengono visualizzati per alimenti per neonati, l'infanzia e latte (**Tabella 1**). Questi mostrano il rispetto dei criteri di accettazione complessivi di AOAC per una validazione completa di un singolo laboratorio (RSD_R e variabilità $\leq 10\%$ e $\leq 7\%$, recuperi di spike 85–115% e 90–110% per un intervallo analitico di 10–100 mg/100 g e >100 mg/100 g, rispettivamente).

I risultati ottenuti per l'analisi utilizzando la precipitazione di Carrez prima dell'iniezione (**Tabella 1**) e utilizzando la dialisi in linea erano comparabili per campioni di test selezionati analizzati come mostrato in **Figura 3**. I dati forniscono un'eccellente verifica per l'utilizzo della dialisi in linea come alternativa efficiente in termini di tempo alla precipitazione di Carrez.

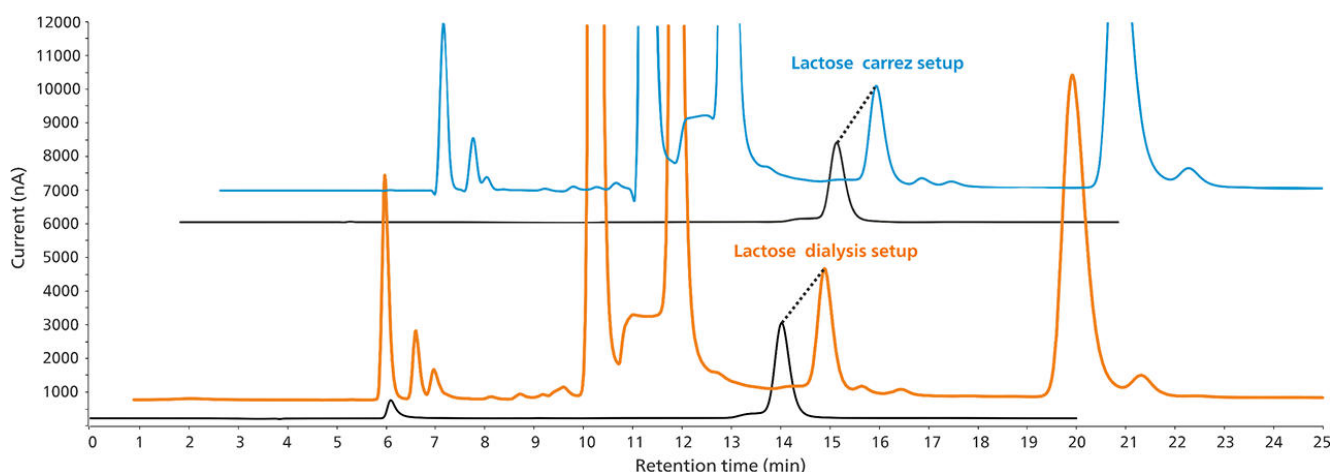


Figure 3. Determinazione del lattosio negli alimenti per l'infanzia (NIST 2383a). Confronto di due metodi di preparazione del campione: dialisi in linea ($c(\text{lattosio}) = 51,1$ mg/L, arancione) e precipitazione Carrez ($c(\text{lattosio}) = 49,6$ mg/L, blu). La deviazione standard relativa dei due campioni è del 2,1%. Per confronto, viene sovrapposto uno standard di lattosio da 40 mg/L (nero).

Tabella 1. Lattosio espresso come lattosio monoidrato (conversione fattore 1,05) in alimenti per neonati senza lattosio e campioni di latte determinati dopo la preparazione del campione mediante precipitazione di Carrez. La tabella mostra la ripetibilità RR come RSD da campioni preparati individualmente misurati in un breve periodo di tempo (n = 7), la variabilità giornaliera come RSD rispetto ai singoli campioni preparati misurati in giorni diversi (4–8 d) e il recupero dello spike come media di tutti gli esperimenti Spike analizzati per diversi giorni.

Ripetibilità (mg/100 g) (RSD _R , %)	Giorno per giorno variabilità (mg/100 g) (%)	Picco totale recupero (%)
NIST 2383a alimenti per l'infanzia (media 520 ± 27 mg/100 g (n = 7), target 500 ± 100 mg/100 g, recupero 106±6%)		
520 ± 27 (5,1)	528 ± 29 (5,5)	103 ± 2
NIST 1869 latte artificiale in polvere (media 569 ± 33 mg/100 g (n = 7), target 520 ± 120 mg/100 g, recupero target 109 ± 6%)		
569 ± 33 (5,5)	523 ± 31 (5,9)	98 ± 3
Formula per neonati HiPP Comfort (20,8 g/100 g (n = 7), target 22,1 g/100 g, recupero target 97 ± 4%)		
20751 ± 743 (3,6)	22163 ± 258 (1,2)	102 ± 3
Spar aha 1,5% di grassi, latte senza lattosio		
2,35 ± 0,18 (7,9)	2,10 ± 0,05 (2,2)	111 ± 2

CONCLUSIONE

Il latte artificiale è una matrice molto complessa e stimolante in quanto contiene tutti i tipi di nutrienti (ad es. proteine, grassi, carboidrati, vitamine e minerali). La preparazione del campione dedicata e metodi di analisi sono necessari per garantire elevata accuratezza, sensibilità e selettività per la determinazione di basse concentrazioni di lattosio. IC-PAD supera tali sfide analitiche con le opzioni di preparazione automatizzata del campione in linea e si traduce in un'eccellente separazione del lattosio dagli altri componenti della matrice e dai derivati del lattosio.

Il LOQ stimato di 4 mg di lattosio/100 g in queste matrici di campioni è inferiore ai requisiti e alle soglie note per i prodotti formulati per neonati senza lattosio. Quindi, l'adeguata sensibilità e robustezza, come mostrato dall'analisi a lungo termine e dagli esperimenti di spike, è data da questo metodo. Inoltre, la flessibilità per le applicazioni adattate dall'utente, la preparazione del campione opzionale e/o l'automazione IC-PAD è ideale per analisi di routine e un'aggiunta altamente preziosa al portfolio di analisi di laboratorio.

RIFERIMENTI

1. EFSA. Parere scientifico: composizione essenziale delle formule per lattanti e di follow-up. *Eur. Cibo sicuro. Aut. EFSA J.* **2014**, 12 (7), 3760.
2. Facioni, M. S.; Raspini, B.; Pivari, F.; Dogliotti, E.; Cena, H. Gestione nutrizionale dell'intolleranza al lattosio: l'importanza della dieta e dell'etichettatura degli alimenti. *J. trad. Med.* **2020**, 18 (1), 260.
3. EFSA. Parere scientifico sulle soglie del lattosio nell'intolleranza al lattosio e nella galattosemia. *Eur. Cibo sicuro. Aut. EFSA J.* **2010**, 8 (9), 1777.
4. Commissione europea. Regolamento delegato (UE) 2016/127 della Commissione, del 25 settembre 2015, che integra il regolamento (UE) n. 609/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i requisiti specifici di composizione e di informazione per gli alimenti per l'infanzia e gli alimenti di proseguimento e per quanto riguarda i requisiti sulle informazioni relative all'alimentazione dei neonati e dei bambini piccoli. *Spento. J. Eur. Unione* **2016**, 29.
5. FAO/OMS. CODEX Alimentarius - Norma generale per l'etichettatura degli alimenti preconfezionati CXS 1-1985. *int. Stand gastronomico.*

Internal reference: AW IC CH6-1435-022021

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



940 Professional IC Vario ONE/Prep 1

Il 940 Professional IC Vario ONE/Prep 1 è l'intelligente strumento IC **senza soppressione** in combinazione con la preparazione in linea dei campioni Metrohm come l'**ultrafiltrazione in linea** o la **dialisi in linea**. Lo strumento può essere impiegato con qualsiasi metodo di separazione e di rilevamento.

Campi d'impiego tipici:

- Determinazione di anioni e cationi senza soppressione dopo l'ultrafiltrazione in linea o la dialisi in linea
- Applicazioni UV/VIS dopo ultrafiltrazione in linea o dialisi in linea
- Applicazioni con rilevamento amperometrico dopo ultrafiltrazione in linea o dialisi in linea



945 Professional Detector Vario – Amperometry

Rilevatore intelligente stand alone dotato di IC Amperometric Detector. Con eccellente selettività grazie alle quattro modalità di misura: DC, PAD, flexIPAD e CV L'eccellente rapporto segnale/rumore e la rapidissima disponibilità per la misurazione garantiscono la massima precisione della misurazione. Per l'impiego con gli strumenti intelligenti IC o come rilevatore indipendente.



Metrosep Carb 2 - 250/4,0

La colonna IC Metrosep Carb 2 - 250/4,0 è particolarmente adatta per la determinazione di carboidrati utilizzando eluenti alcalini e rivelazione amperometrica pulsata. La colonna di scambio anionico altamente capacitiva è basata su un copolimero di stirene/divinilbenzene. È stabile nell'intervallo di pH da 0 a 14 e separa monosaccaridi e disaccaridi. Inoltre, è adatta anche per l'analisi di alcoli degli zuccheri, anidrozuccheri, amminozuccheri ecc. La variante 250 mm della colonna di separazione Metrosep Carb 2 è ottimizzata per le separazioni complesse.



858 Professional Sample Processor – Pump

L'858 Professional Sample Processor – Pump per il trattamento di campioni con volumi compresi tra 500 μL e 500 mL. Il trasferimento del campione avviene o attraverso la pompa peristaltica bidirezionale a doppio canale integrata o tramite un 800 Dosino.



Equipaggiamento IC: dialisi in linea Low Volume

Kit di accessori per la dialisi in linea veloce. Per l'utilizzo con l'858 Professional Sample Processor e un'ulteriore pompa peristaltica a 2 canali.



Equipaggiamento IC: cella Thin-Layer: Carb (Au, Pd)

Equipaggiamento composto da cella Thin-Layer con accessori aggiuntivi, con elettrodi per l'analisi dei carboidrati con un elettrodo da lavoro in oro e un elettrodo di riferimento in Pd.