



Application Note AN-P-089

Lactoseintoleranz und Vertrauen in die Richtigkeit der Lebensmittelkennzeichnung

Schnelle und robuste Analyse von Lactose in geringen Mengen mit IC-PAD

Milch und Milcherzeugnisse sind weltweit eine wichtige Nahrungsquelle für den Menschen [1]. Neben Nährstoffen, Mineralien, Proteinen und Fett ist Lactose ein wichtiger Bestandteil von Milchprodukten und dient als Energiequelle. Um Lactose effizient zu verstoffwechseln, ist das Enzym Lactase unerlässlich [2]. Weltweit sind jedoch fast 70 % der Bevölkerung lactoseintolerant, d. h., sie haben Schwierigkeiten, Lactose zu verdauen [3, 4]. Die Lactosemalabsorption führt zu zahlreichen gastrointestinalen und extraintestinalen Symptomen und anderen Beschwerden in unterschiedlichem Ausmaß. Obwohl manche Menschen mit Lactoseintoleranz bereits auf kleinste Mengen empfindlich reagieren, vertragen

andere eine geringe Menge ohne negative gesundheitliche Auswirkungen. Bislang gibt es keine spezifischen Grenzwerte oder Vorschriften für die Kennzeichnung und Produktion von lactosefreien Produkten. Daher müssen Lebensmittel mit Hilfe empfindlicher Standardtechniken genau analysiert und gekennzeichnet werden. Die **Ionenchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion** (IC-PAD) ermöglicht die Bestimmung von sehr niedrigen Lactosegehalten. Die Validierung gemäß den AOAC-Anforderungen zeigt die hohe Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode für die Routineanalyse.

PROBE UND PROBENVORBEREITUNG

Die Lactosebestimmung wurde für eine breite Auswahl an Probenmatrizes durchgeführt, darunter Säuglingsanfangsnahrung und Folgebabynahrung (AN-P-088), zertifizierte Referenzproben (z. B. die lactosearme Referenzmilch muva ML-2312) sowie 15 im Handel erhältliche lactosearme und lactosefreie Produkte, darunter Joghurt, Butter, Sahne, Hüttenkäse, Milchgetränke, Milkschokolade und Nahrungsergänzungsmittel.

Feststoffe (z. B. Käse und Milkschokolade) wurden zerkleinert, während die pulverförmigen und flüssigen Stoffe homogenisiert wurden. Nach dieser Vorbehandlung wurden die Proben direkt in geeignete Gefäße (0,1-5 g, 50 mL Polypropylenröhrchen) eingewogen. Das Probengewicht (**W_s in g**) wurde für spätere Berechnungen auf 0,001 g genau notiert. Ein wässriger Extrakt wurde durch Zugabe von Reinstwasser (UPW) auf ein Gesamtvolumen von 50 mL (**W_{UPW} in kg**) hergestellt. Anschließend wurden die Fläschchen verschlossen und mit einem Vortex-Mixer etwa 20 Sekunden lang kräftig gemischt. Um die Löslichkeit bestimmter Proben (z. B. Frischkäse oder Schokolade) zu verbessern, wurden die

Fläschchen 10 Minuten lang in einem auf 70 °C temperierten Wasserbad erhitzt.

Um das Analysensystem zu schützen, ist die Carrez-Fällung eine Standardmethode zur Entfernung von Proteinen und größeren Molekülen. Hierfür wurde den Proben die Carrez-Reagenzien hinzugegeben und das Endgewicht notiert (**W_{UPW} in kg**). Nach gründlichem Mischen wurden die Proben 10 Minuten lang zentrifugiert (5000×g) und dekantiert. Die abgedeckten Fläschchen wurden direkt in den Autosampler gestellt. Ein erhöhter Säulenschutz kann durch eine zusätzliche Ultrafiltration der Proben erreicht werden.

Alternativ kann zur automatischen Probenvorbereitung die Inline-Dialyse mit Low Volume Dialysezelle eingesetzt werden. Dabei werden die Proben wie zuvor beschrieben als wässrige Extrakte vorbereitet, gut geschüttelt und abgedeckt, bevor sie direkt auf den Autosampler gestellt werden. Bei Verwendung der Dialyse ist keine Carrez-Fällung vor der Analyse erforderlich, wodurch Zeit und Chemikalien gespart werden. Bei Verwendung der Low-Volume-Dialysezelle werden nur 5 mL der Probe pro Analyse benötigt.

Die Konzentration an Lactose in den wässrigen Probenextrakten wurde mit Hilfe der Ionenchromatographie (IC) bestimmt. Die Trennung erfolgte auf einer **Metrosep Carb 2 - 250/4.0** Trennsäule unter Verwendung eines isokratischen Hydroxid-Eluenten (400 mmol/L NaOH) und gepulste amperometrische Detektion (PAD) mit der Sweep-Wellenform ([AN-P-088](#), [WP-077](#)). Eine lange Elektrodenlebensdauer bei minimalem Wartungsaufwand ist durch den Einsatz der amperometrischen Thin-Layer-Zelle von Metrohm

(Au-Arbeits- und Pd-Referenzelektrode) möglich. Der Sweep-Modus in Kombination mit der weniger turbulenten Strömung in der Thin-Layer-Zelle führt zu einer glatten Basislinie mit geringem Rauschen - eine notwendige Voraussetzung für die Analyse sehr niedriger Konzentrationen, wie z.B. in lactosearmen Produkten.

Die Flussschemata für die direkte Analyse von Lactose mit obligatorischer Probenvorbereitung wie der Carrez-Fällung sind in **Abbildung 1** dargestellt.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

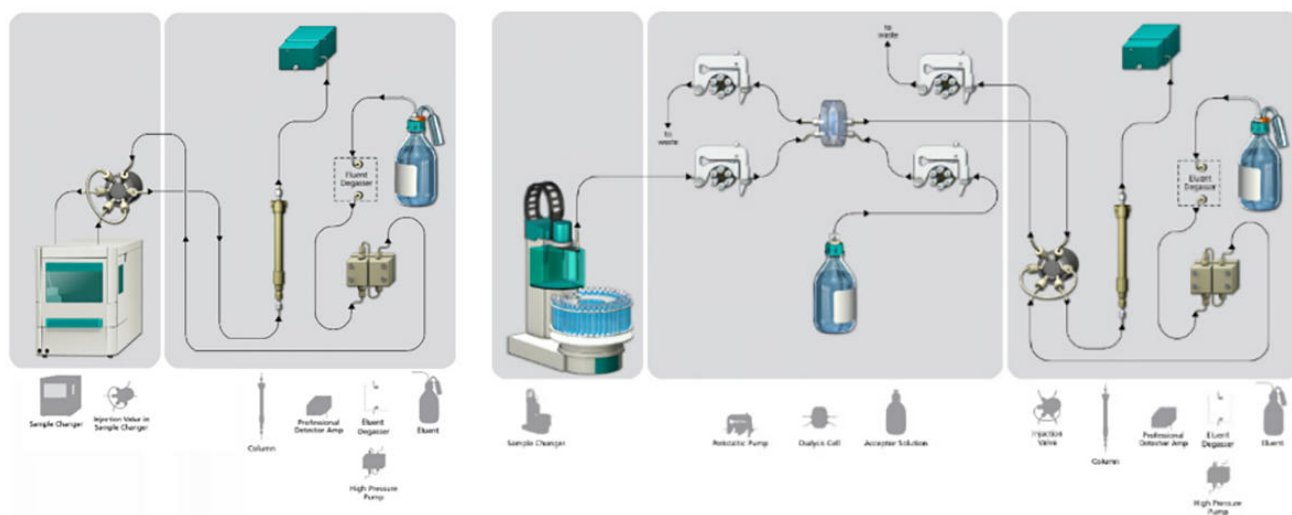


Abbildung 1. Beispielhafte Systemkonfigurationen für die direkte Lactoseanalyse mit dem Metrohm 889 Sample Center - cool (links). Zum Schutz des Analysensystems ist für die direkte Analyse eine Probenvorbereitung wie die Carrez-Fällung notwendig. Die Inline-Dialyse (rechts) kann optional zu jedem bestehenden Gerät hinzugefügt werden, was eine automatisierte Alternative zur herkömmlichen Probenvorbereitung ermöglicht. Der Proben transport und das Liquid-Handling können entweder mit einer Peristaltikpumpe, dem Dosino oder direkt mit dem 889 Sample Center durchgeführt werden. Die Analyten werden mit einem Natriumhydroxid-Eluenten isokratisch getrennt und mittels PAD detektiert.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die Probenstabilität kann mit dem Einsatz eines 889 IC Sample Center - cool verbessert werden. Die automatisierte Probenvorbereitung mittels Inline-Dialyse kann zu jeder bestehenden Konfiguration hinzugefügt werden. Weitere Details finden Sie in der Metrohm-Literatur zur Metrohm Inline-

Probenvorbereitung sowie im Application Note [AN-P-088](#).

Mit dem Dosino von Metrohm, das flexibelste Gerät für Liquid Handling, ist die Automatisierung aller Liquid-Handling-Prozesse, ob für den Transport von Proben oder die Reinigung des Probenwegs, möglich.

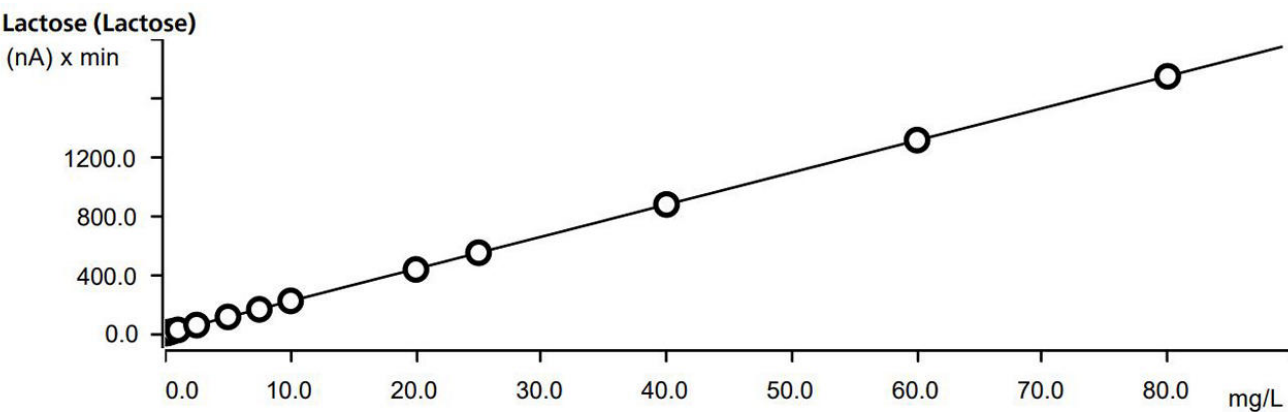
ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Lactose eluiert in weniger als 30 Minuten (Abbildung 2-6). Der Gesamtarbeitsbereich der Methode liegt bei 0,05 bis 80 mg/L für flüssige Lactosestandards (Abbildung 2 A), mit der Möglichkeit, Proben in einem Bereich von 0,2 bis 21.000 mg/100 g mit entsprechender Verdünnung zu analysieren. Im Gegensatz zu früher veröffentlichten chromatographischen Methoden konnten Lactosederivate (Epilactose, Lactulose, Allolactose und

Galactosyllactose), z. B. aus präbiotischen Zusatzstoffen, erfolgreich von Lactose getrennt werden, was die Selektivität und Genauigkeit der Methode erhöht (Abbildung 2 B). Die Probenkonzentrationen werden anhand der linearen Kalibrierung bestimmt (c(Lactose)_S in mg/kg) (Abbildung 2 A) und zur Bestimmung des endgültigen Lactosegehalts (c(Lactose)_{FIN} in g/ 100 g) auf der Grundlage des Probengewichts berechnet:

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

A



Function: A = 0.0263117 + 2.18736 × Q
Relative standard deviation 0.418529 %
Correlation coefficient 0.999996

B

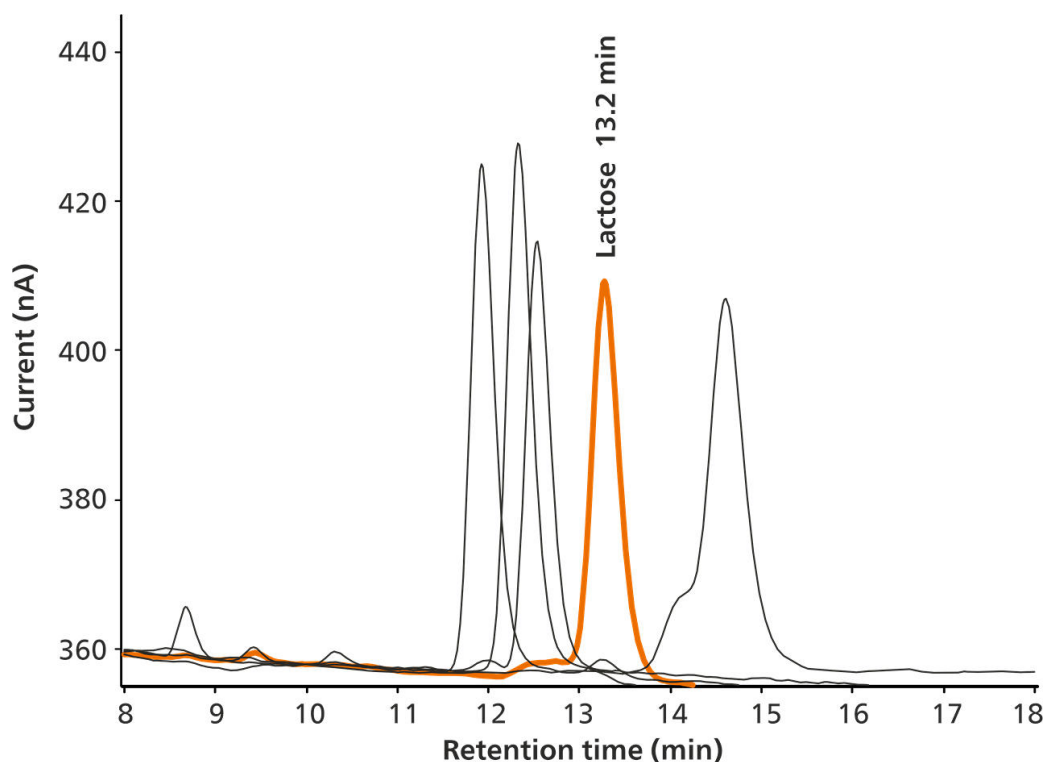


Abbildung 2. Die Kalibrierung für Lactose (A) weist eine ausgeprägte Linearität im Konzentrationsbereich von 0,05 mg/L bis 80 mg/L auf (Validierungsanforderung). Eine genaue Trennung von Lactose von Störstoffen ist für die Analyse zwingend erforderlich. Neben anderen Zuckern, Zuckeralkoholen und anorganischen Ionen ist es entscheidend, die strukturell ähnlichen Lactosederivate (B) zu trennen: Epilactose, Lactulose, Allolactose und Galactosyllactose (Peaks von links nach rechts). Dies ist mit den beschriebenen Elutionsbedingungen möglich ist.

Beispiele für Validierungsergebnisse sind in **Abbildung 3-6** für ausgewählte Proben dargestellt (lactosearmes Milchreferenzmaterial (muva), ein Nahrungsergänzungsmittel, das neben Galacto-Oligosacchariden auch Lactose enthält (Bimuno), ein lactosefreier Joghurt und eine lactosefreie Butter). Die Lactosekonzentrationen reichten von <0,5 mg/100 g (lactosearme Butter) bis zu fast 13 g/100 g (präbiotischer Zusatz). Die Daten zeigen die Einhaltung der AOAC-Akzeptanzkriterien für die Wiederholbarkeit und die tägliche Variabilität (RSDs $\leq 7\%$), die Wiederfindungsraten der Aufstockungen

(90-110%) und die Auflösung ($>1,5$, d.h. die Basislinientrennung), die im Rahmen der Einzellaborvalidierung ermittelt wurden.

Die Ergebnisse für die Analyse mit Carrez-Fällung vor der Injektion und mit Inline-Dialyse zeigten vergleichbare Ergebnisse für ausgewählte Testproben (**Abbildung 3-6**, [AN-P-088](#)).

Bei einer Messreihe von sechs verschiedenen Matrices, einschließlich der kurzzeitigen Wiederholungen und den Aufstockungsversuchen (wie in **Abbildung 3-6** dargestellt), variierten die Ergebnisse mit RSDs von weniger als 7 % (durchschnittlich 3,2 %).

In den **Abbildungen 3-6** sind die durchschnittlichen Konzentrationen und die Reproduzierbarkeit R_r (als RSD) von einzeln vorbereiteten Proben, die innerhalb kurzer Zeit ($n = 7$) gemessen wurden, oder als Konzentration, die über einzeln vorbereitete Proben bestimmt wurde, die an verschiedenen Tagen (4-8 d) gemessen wurden (Tagesvariabilität (R_{var}) und ihre RSDs), sowie die Wiederfindung R_s der

Aufstockungen als Durchschnitt über alle Aufstockungsversuche, die über mehrere Tage analysiert wurden, dargestellt. Die Auflösung der Lactose zu den nachfolgenden Peaks wird als R ausgedrückt. Die Ergebnisse der Inline-Dialyse für ausgewählte Proben sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

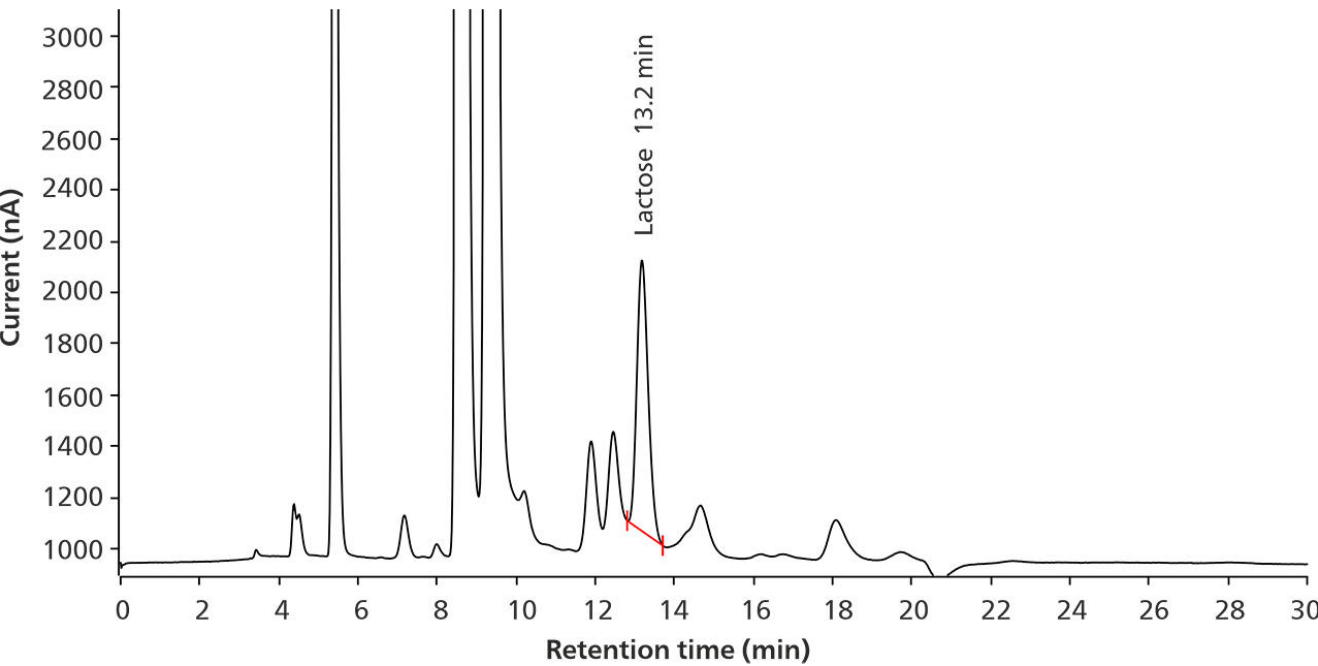


Abbildung 3. Lactose, ausgedrückt als Lactosemonohydrat (Umrechnungsfaktor 1,05 für Lactose in Lactosemonohydrat) in Muva ML-2312 (Zielwert 217 ± 45 g/100 g).

R_R (mg/ 100 g) (RSD_R %)	R_{Var} (mg/ 100 g) (RSD_{Var} %)	R_S (%)	R
226 ± 7 (3,2)	228 ± 12 (5,4)	102 ± 3	2,3

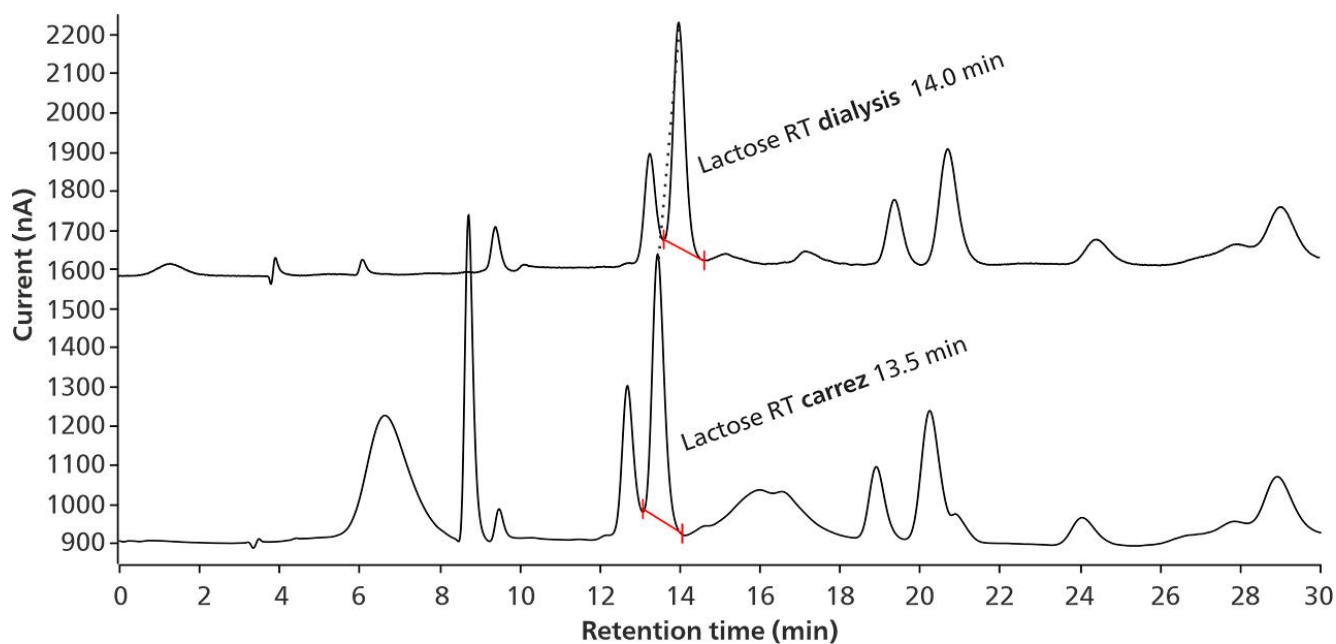


Tabelle 4. Lactose, ausgedrückt als Lactosemonohydrat (Umrechnungsfaktor 1,05 für Lactose in Lactosemonohydrat) in Bimuno daily (Targeted Digestive Nutrition).

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

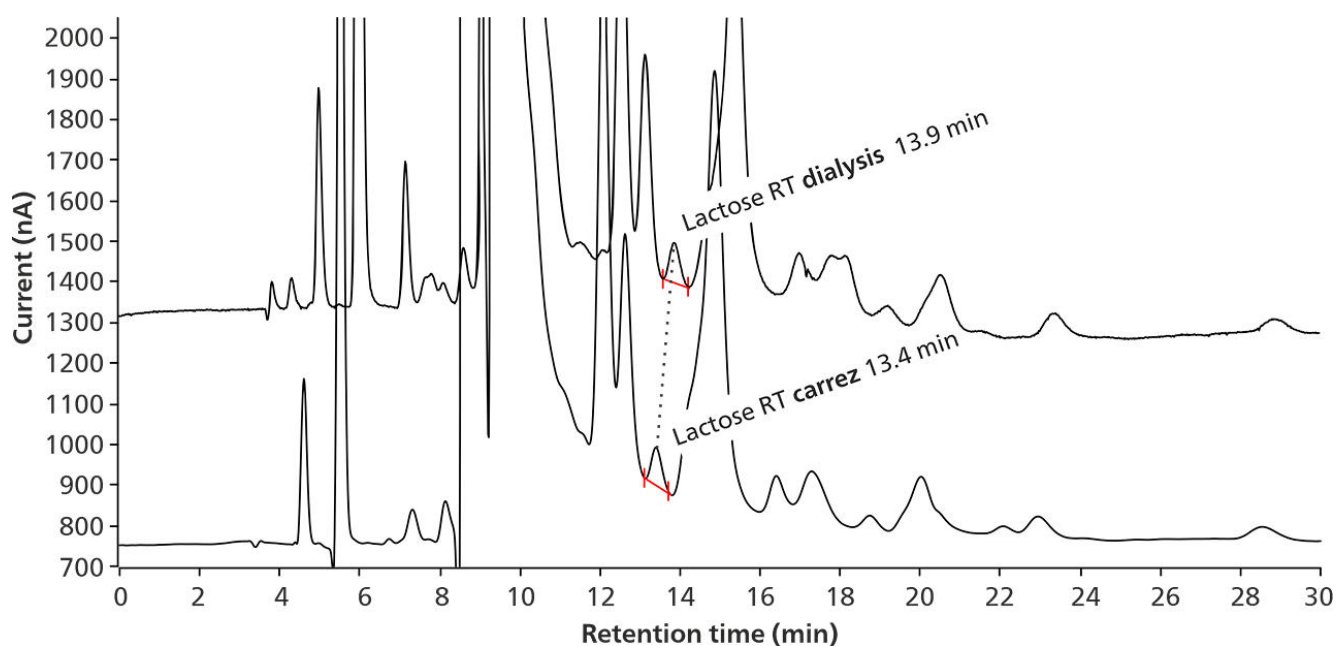


Abbildung 5. Lactose, ausgedrückt als Lactosemonohydrat (Umrechnungsfaktor 1,05 für Lactose in Lactosemonohydrat) in Bimuno daily (Targeted Digestive Nutrition).

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

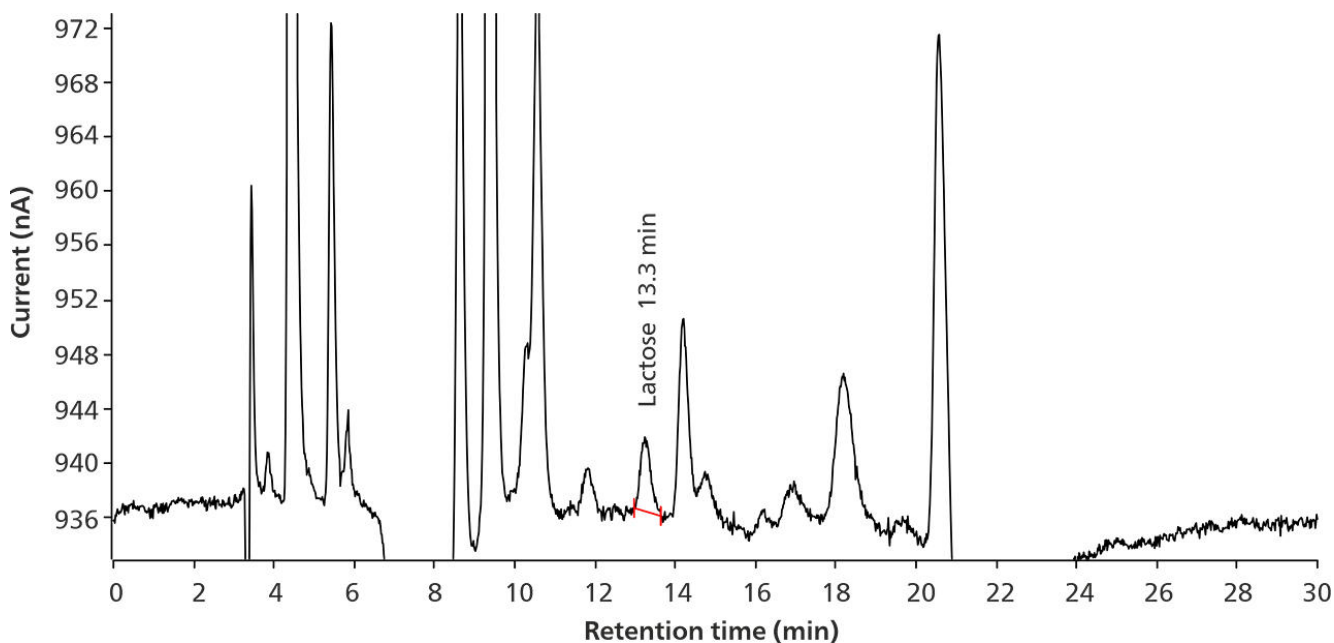


Abbildung 6. Lactose ausgedrückt als Lactosemonohydrat (Umrechnungsfaktor 1,05 für Lactose in Lactosemonohydrat) in Joghurt, frei von, Coop, lactosefrei.

R_R (mg/ 100 g) (RSD_R %)	R_{Var} (mg/ 100 g) (RSD_{Var} %)	R_S (%)	R
$0,40 \pm 0,02$ (5,9)	$0,39 \pm 0,01$ (2,5)	103 ± 6	2,3

FAZIT

Die beschriebene IC-PAD-Methode zur Lactosebestimmung in lactosearmen und lactosefreien Milchprodukten erfüllt die AOAC-Einzellabortest-Kriterien. Dies beweist ihre Zuverlässigkeit, Empfindlichkeit und Robustheit. Eine Vergleichsanalyse zur Probenvorbereitung mit Carrez-Fällung und Metrohm-Inline-Dialyse zeigte eine hervorragende Übereinstimmung. Als zeiteffiziente Alternative zur Carrez-Fällung empfiehlt sich die Metrohm-Inline-Dialyse. Metrohm IC-

Systeme zeichnen sich durch ein hohes Maß an Flexibilität aus. Die Systeme können zum Beispiel mit einer Inline-Verdünnung aufgerüstet werden. Damit ist es möglich neben einer automatischen Verdünnung auch eine Inline-Kalibrierung und logische Verdünnung durchzuführen. Die Automatisierung vereinfacht die Methode für den Anwendenden und ist besonders für Analysen mit hohem Durchsatz und Routineanalysen geeignet.

REFERENZEN

1. Muehlhoff, E.; Bennett, A.; McMahon, D. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*; FAO: Rome, **2013**.
2. Monti, L.; Negri, S.; Meucci, A.; Stroppa, A.; Galli, A.; Contarini, G. Lactose, Galactose and Glucose Determination in Naturally "Lactose Free" Hard Cheese: HPAEC-PAD Method Validation. *Food Chem* **2017**, 220, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.185>.
3. Bayless, T. M.; Brown, E.; Paige, D. M. Lactase Non-Persistence and Lactose Intolerance. *Curr Gastroenterol Rep* **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. Nutritional Management of Lactose Intolerance: The Importance of Diet and Food Labelling. *Journal of Translational Medicine* **2020**, 18 (1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>.

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



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, Anhydrosucker, Aminosucker usw. geeignet. Die 250-mm-Variante der Metrosep Carb 2 Trennsäule ist für komplexe Trennungen optimiert.



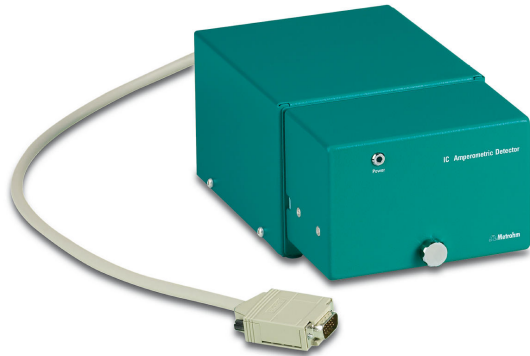
IC-Ausrüstung Wall-Jet-Zelle: Carb (Au, Pd)

Ausrüstung bestehend aus Wall-Jet-Zelle mit zusätzlichem Zubehör. Für Kohlenhydratanalytik mit einer Goldarbeits- und einer Pd-Referenzelektrode.



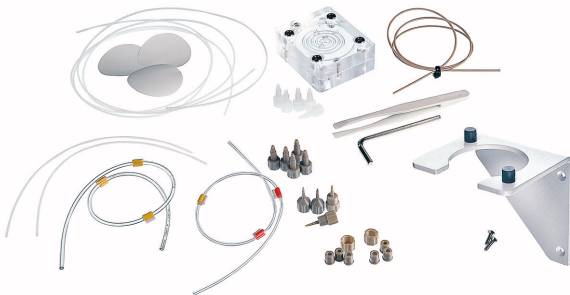
IC-Ausrüstung: Inline-Dialyse Low Volume

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



IC 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.



IC-Ausrüstung: Inline-Ultrafiltration 2 - pull mode

Zubehörset zur Inline-Ultrafiltration 2 - pull mode. Zur Verwendung mit dem 858 Professional Sample Processor / 919 IC Autosampler plus.



930 Compact IC Flex Oven/Deg

Der 930 Compact IC Flex Oven/Deg ist das intelligente Compact-IC-Gerät mit **Säulenofen**, **ohne Suppression** und mit eingebautem **Degasser**. Das Gerät kann mit beliebigen Trenn- und Detektionsmethoden eingesetzt werden.

Typische Anwendungsgebiete:

- Anionen- und Kationenbestimmungen ohne Suppression mit Leitfähigkeitsdetektion
- Einfache Anwendungen mit UV/VIS- oder amperometrischer Detektion