



Application Note AN-P-087

# Etiquetas de calidad para nuevos alimentos

## Mejora en AOAC 2001.02: análisis de GOS con IC-PAD

En los últimos años, ha aumentado el interés por los aditivos alimentarios y los suplementos dietéticos, incluidos los prebióticos como los  $\beta$ -galactooligosacáridos (conocidos como GOS). Los GOS son cadenas de unidades de galactosa con un extremo de glucosa opcional.<sup>1,2</sup> Muestran efectos bifidogénicos, es decir, favorecen el crecimiento y el bienestar de las bacterias intestinales no patógenas [1]. Inicialmente descubiertos como componentes principales del calostro (presentes hasta 12 g/L), los GOS se agregan como un suplemento prebiótico a las fórmulas infantiles para lograr efectos beneficiosos

similares.

La creciente concienciación de los consumidores sobre los hábitos alimentarios saludables ha provocado el crecimiento continuo de los mercados mundiales de prebióticos y GOS. Del mismo modo, el aumento de la demanda en relación con la calidad de los alimentos ha dado lugar a normas más estrictas y completas para el etiquetado y la seguridad de los alimentos (por ejemplo, UE 2015/2283). Por lo tanto, la determinación del contenido total de GOS en los alimentos, suplementos o productos sin procesar es esencial para cumplir con tales requisitos.

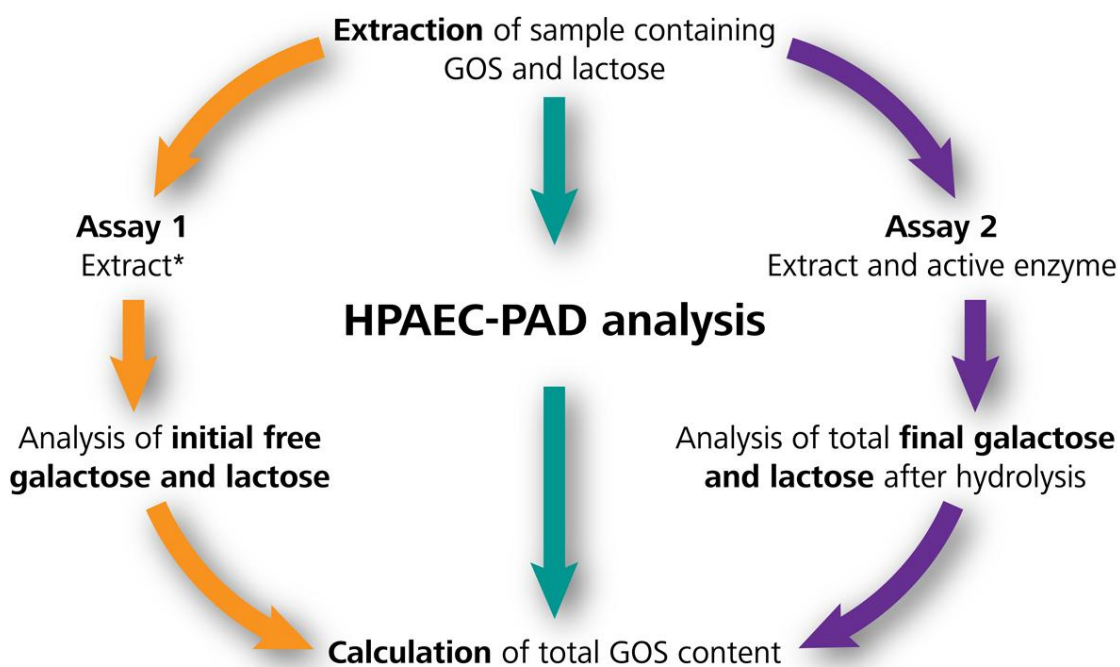
Esta nota de aplicación presenta una actualización del método estándar de la AOAC para la determinación del GOS total en productos alimenticios. Con el mismo principio (hidrólisis enzimática de moléculas

GOS complejas seguida de análisis cromatográfico de carbohidratos simples), se mejoró la eficiencia del método analítico a favor del tiempo de laboratorio y los costos de funcionamiento.

## MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Diferentes muestras disponibles comercialmente, es decir, GOS en polvo (Carbosyht Ltd.), Vivinal® GOS en polvo (FrieslandCampina) y el suplemento Bimuno Daily (Clasado Biosciences) [3], se extrajeron durante 30 minutos a 80 °C en una solución tampón de fosfato como se describe en AOAC 2001.02. El extracto se dividió en dos alícuotas para el análisis

diferencial de glucosa, galactosa y lactosa, antes (Ensayo 1) y después (Ensayo 2) de la hidrólisis enzimática con la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Figura 1). Las muestras se centrifugaron y diluyeron en agua ultrapura (UPW) antes del análisis.



\*AOAC(2001.02): Extract plus deactivated enzyme

**Figure 1.** Esquema para la determinación del contenido de GOS total mediante cromatografía iónica acoplada a detección amperométrica pulsada (IC-flexiPAD). La cromatografía de aniones en AOAC se conoce como HPAEC (cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento), pero aquí se simplifica al término genérico de IC. El método mejorado usa el extracto para medir las concentraciones iniciales de glucosa, galactosa y lactosa (Ensayo 1). Esto se mostró como equivalente al paso AOAC con la enzima desactivada [3], pero reduce los gastos químicos y el trabajo manual adicional. El contenido total de GOS se calcula a partir de las concentraciones de analito en el Ensayo 1 y el Ensayo 2 (extracto con la enzima activa). Gráfico adaptado de [2].

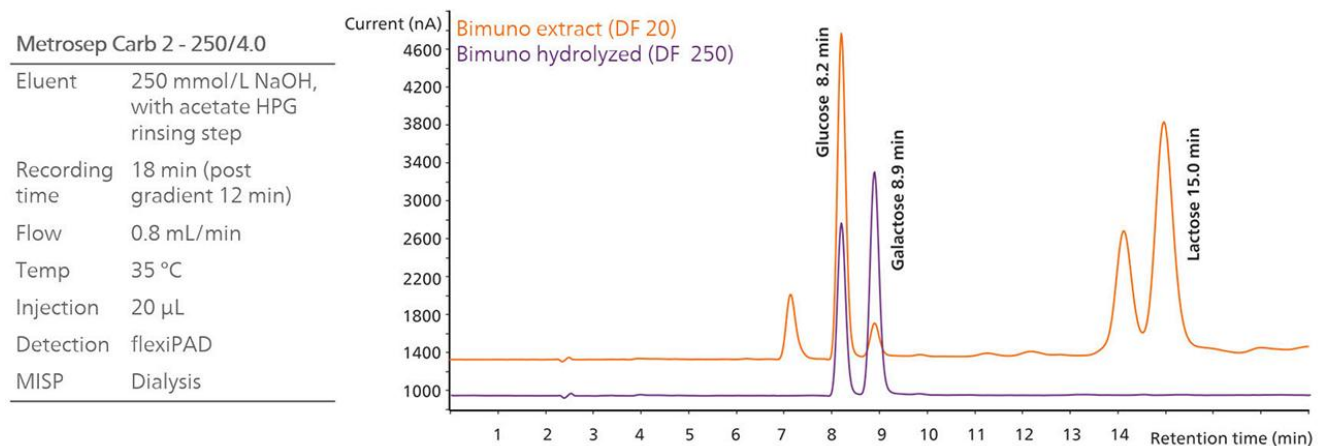
## EXPERIMENTAL

La separación de galactosa, glucosa y lactosa se realizó en una columna de separación Metrosep Carb 2 - 250/4.0 usando un eluyente de hidróxido (Figura 2) en un tiempo de grabación de 18 minutos. Para la limpieza de la columna, se ejecutó un gradiente de alta presión (HPG) de acetato posterior al registro en un tiempo total de ejecución de la muestra de aproximadamente 30 minutos. La detección de la señal se produjo con un detector amperométrico (945 Professional Detector Vario - Amperometry) equipado con una celda de capa fina (electrodo de trabajo de Au y de referencia de Pd). El uso de la celda de capa delgada en combinación con una forma de onda especial flexiPAD (detección amperométrica pulsada) exhibió el mejor rendimiento para el análisis de GOS. En comparación con las condiciones estándar de PAD, esta configuración proporcionó una mayor respuesta y relación señal-ruido.

Después de la preparación manual de la muestra, se

usó la diálisis en línea con la celda de diálisis de bajo volumen para purificar las muestras antes de inyectarlas en el CI. Como un paso completamente automatizado, las proteínas y las moléculas más grandes se eliminan de la matriz de la muestra, protegiendo la columna y aumentando la vida útil de la columna.

El contenido total de GOS se calculó después de la evaluación automática de datos (software MagIC Net 3.3) según AOAC. En resumen, se determinó la diferencia de galactosa y glucosa entre el Ensayo 1 y el Ensayo 2 (Figura 2), corregido por lactosa inicial y finalmente ajustado a un peso de muestra de 100 g. A lo largo del curso para adaptar y avanzar en el método estándar de la AOAC, se probaron diferentes variables y finalmente se validaron de acuerdo con los estándares comunes. Todos los detalles se dan en el artículo de acceso abierto. Ziegler *et al.* [3].



**Figure 2** Superposición (con desplazamiento) del extracto de la muestra Bimuno (Ensayo 1, factor de dilución (DF) 20 en UPW, naranja) con el extracto tratado con  $\beta$ -galactosidasa (Ensayo 2, DF 250 en UPW, violeta). Debido a la hidrólisis de los GOS, es decir, la ruptura de los enlaces galactosa-galactosa y galactosa-glucosa, las concentraciones de galactosa y glucosa en el Ensayo 2 superan significativamente las del Ensayo 1. Un DF más alto garantiza la cuantificación adecuada dentro de la calibración dada. Las condiciones cromatográficas se resumen a la izquierda. Como paso de preparación de muestras en línea de Metrohm, se utilizó la diálisis en línea para una limpieza adicional de las muestras, lo que mejoró el rendimiento del sistema y la vida útil de la columna.

## RESULTADOS

El contenido total de GOS de las diferentes muestras osciló entre 28 y 83 g/100 g con una variabilidad de hasta el 5 % para mediciones de réplicas individuales durante varios días. Se mostró una mayor variabilidad de 6 a 10% para las fórmulas infantiles (datos no mostrados). El mayor contenido de lactosa en tales matrices da como resultado mayores incertidumbres para la determinación del GOS total [3].

En general, las recuperaciones satisfactorias de variabilidad, objetivo y pico (**tabla 1**), junto con las pruebas de interferencia [2], demostró que el método es valioso y robusto. Con límites de detección (LOD) (DIN 32645) de 0,1 mg/L (galactosa) y 0,2 mg/L (glucosa, lactosa) en solución, se pueden determinar con alta precisión incluso contenidos de GOS totales bajos.

**Tabla 1.** Contenido total de GOS determinado con el método AOAC 2001.02 modificado para las muestras disponibles comercialmente de polvo de GOS, suplemento diario Bimuno y polvo Vivinal®. Estas muestras se prepararon individualmente y se analizaron por duplicado durante varios días (n). La RSD calculada es una medida de la variabilidad del contenido total de GOS para las diferentes muestras. Las recuperaciones se calcularon para los valores de referencia objetivo y a partir de picos con el polvo GOS (material de referencia) que muestran la precisión y solidez del método.

Muestra	GOS totales (n) (g/100 g)	Variabilidad durante n días (RSD en %)	GOS totales objetivo (g/100g)	Recuperación objetivo (%)	Pico promedio 1 (g/100 g) (% de recuperación)	AVG Spike 2 (g/100 g) (% de recuperación)
GOS en polvo	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%)
Polvo Vivinal	27,8 ± 0,5 (n = 4)	1,8	28,5	98	37,8 ± 0,1 (91%)	48,6 ± 0,1 (91%)

## CONCLUSIÓN

Como método multicomponente, la cromatografía iónica con detección amperométrica es un método de análisis muy selectivo, sensible y robusto para carbohidratos sin ningún paso de derivatización adicional. En combinación con el tratamiento enzimático, se pueden cuantificar carbohidratos aún más complejos. El método IC-flexiPAD avanzado y validado para el análisis de GOS total beneficia a los analistas con una mayor eficiencia. A través de importantes mejoras en la preparación de muestras,

el procedimiento general no solo es más rápido al reducir el trabajo de laboratorio adicional, sino que también se pueden ahorrar reactivos y consumibles, lo que reduce los costos totales de funcionamiento. Esto lo convierte en una valiosa alternativa al Método Oficial 2001.02 de la AOAC.

Los pasos de automatización adicionales (p. ej., dilución en línea Metrohm y calibraciones automáticas) pueden mejorar aún más la eficiencia del método.

## REFERENCIAS

1. Sangwan et al. (2011), j. ciencia de la comida 76(4)
2. Boehm & Stahl (2007), J. Nutrición 137(3 suplemento 2)
3. Ziegler et al. (2001), La columna – Europa/Asia 17(02)

Internal reference: AW IC CH6-1436-032021

## CONTACT

Metrohm Hispania  
Calle Aguacate 15  
28044 Madrid

[mh@metrohm.es](mailto:mh@metrohm.es)

## CONFIGURACIÓN

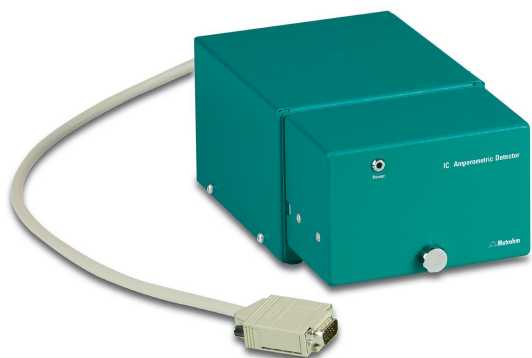


### 940 Professional IC Vario ONE/HPG

El 940 Professional IC Vario ONE/HPG es un aparato CI inteligente **sin supresión** con **gradiente de alta presión binario**. Con el 942 Extension Module se puede ampliar hasta un sistema de gradiente cuaternario. El aparato se puede emplear con cualquier método de separación o de detección.

Ámbitos típicos de aplicación:

- Análisis de hidratos de carbono con detección amperométrica pulsada (PAD) después de elución de gradiente
- Aplicaciones de gradiente con detección UV/VIS con o sin derivatización post-columna



### 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.



### 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.

# MagIC Net

### MagIC Net 4.0 Professional: 1 licencia

Programa profesional de ordenador para el control de todos los sistemas inteligentes Professional IC, los aparatos Compact IC y sus periféricos, todos los detectores y los distintos Autosampler, el 800 Dosino, el 771 Compact Interface, etc. El software permite el control, el registro, la evaluación y la monitorización de datos, así como la generación de informes de análisis de cromatografía iónica.

Interfaz de usuario gráfica para las operaciones más frecuentes, amplios programas de base de datos, desarrollo de métodos, configuración y control manual de sistemas; administración de usuarios muy flexible, eficientes operaciones de base de datos, amplias funciones de exportación de datos, generador de informes que se puede configurar de forma individual, control y monitorización de todos los componentes del sistema y de los resultados de la cromatografía.

MagIC Net Professional cumple plenamente con la normativa FDA 21 CFR Part 11 y también con las Prácticas Correctas de Laboratorio.

MagIC Net está disponible en 16 idiomas de diálogo: alemán, inglés, chino, chino tradicional, francés, italiano, español, portugués, búlgaro, checo, húngaro, japonés, coreano, ruso, eslovaco, polaco

1 licencia

Los archivos de instalación y los documentos se suministran en una memoria USB.