



Application Note AN-P-087

Etichette qualitative per i nuovi alimenti

Miglioramenti al metodo AOAC 2001.02: analisi GOS con IC-PAD

Negli ultimi anni, l'interesse per gli additivi e gli integratori alimentari, inclusi i prebiotici come i β -galattooligosaccaridi (noti come GOS) è aumentato. I GOS sono catene di unità di galattosio con un'estremità di glucosio opzionale [1,2]. Mostrano effetti bifidogenici, ovvero favoriscono la crescita e il benessere di batteri intestinali non patogeni [1]. Inizialmente scoperti come costituenti principali del colostro (presente fino a 12 g/l), i GOS vengono aggiunti come integratore prebiotico agli alimenti per lattanti per ottenere effetti benefici simili.

Una maggiore consapevolezza da parte dei consumatori in fatto di abitudini alimentari sane ha portato alla crescita costante dei mercati dei GOS e dei probiotici in tutto il mondo. Allo stesso tempo, le richieste maggiori in fatto di qualità degli alimenti hanno portato a norme più complete e rigide riguardo all'etichettatura e alla sicurezza alimentare (ad es., UE 2015/2283). Pertanto, la determinazione del contenuto totale dei GOS negli alimenti, negli integratori e nelle materie prime è essenziale per poter soddisfare tali requisiti.

Questa Application Note presenta un aggiornamento del metodo AOAC per la determinazione del GOS totale negli alimenti. Utilizzando lo stesso principio (idrolisi enzimatica di molecole GOS complesse

seguita da analisi cromatografica di carboidrati semplici), è stata migliorata l'efficacia del metodo a vantaggio dei tempi di laboratorio e dei costi d'esercizio.

CAMPIONE E PREPARAZIONE CAMPIONE

Diversi campioni disponibili in commercio, ad esempio polvere GOS (Carbosynth Ltd.), polvere Vivinal® GOS (FrieslandCampina) e il supplemento Bimuno Daily (Clasado Biosciences) [3], sono stati estratti per 30 minuti a 80°C in una soluzione tampone fosfato come descritto in AOAC 2001.02. L'estratto è stato

suddiviso in due aliquote per l'analisi differenziale di glucosio, galattosio e lattosio, sia prima (Saggio 1) che dopo (Saggio 2) l'idrolisi enzimatica con l'enzima β -galattosidasi da *Aspergillus oryzae* (Figura 1). I campioni sono stati centrifugati e diluiti in acqua ultrapura (UPW) prima dell'analisi.

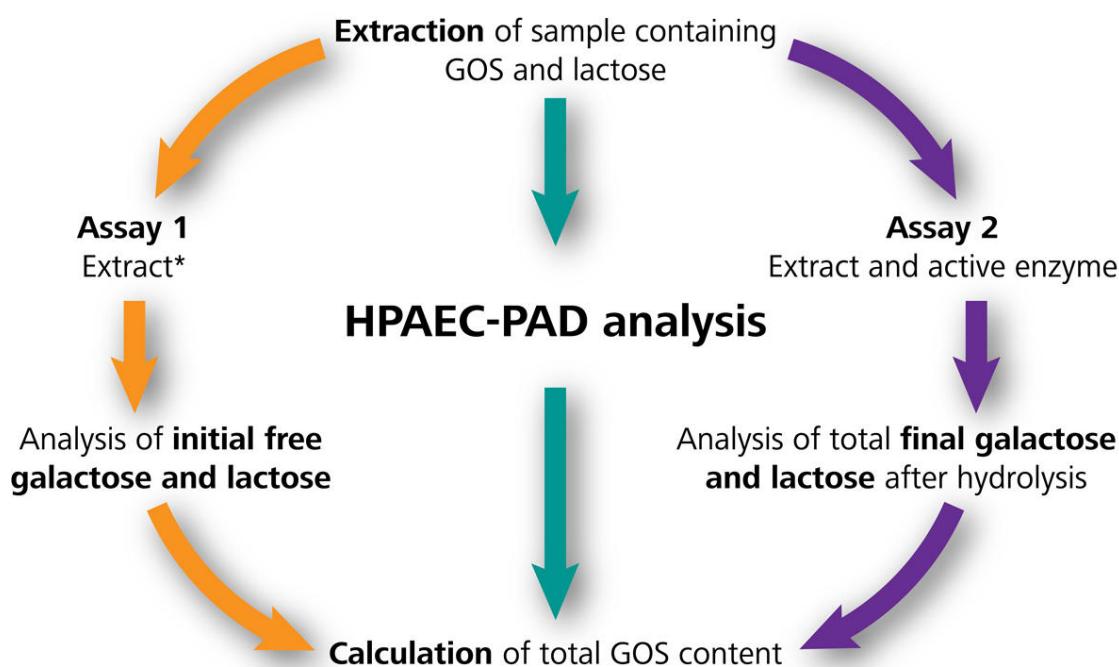


Figure 1. Schema per la determinazione del contenuto totale di GOS mediante cromatografia ionica accoppiata a rilevamento amperometrico pulsato (IC-flexiPAD). La cromatografia per anioni in AOAC è indicata come HPAEC (cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni) ma è qui semplificata con il termine generico di IC. Il metodo migliorato utilizza l'estratto per misurare le concentrazioni iniziali di glucosio, galattosio e lattosio (Saggio 1). Questo è stato dimostrato come equivalente alla fase AOAC con l'enzima disattivato [3], ma riduce le spese chimiche e il lavoro manuale aggiuntivo. Il contenuto totale di GOS viene calcolato dalle concentrazioni di analita nel test 1 e nel test 2 (estratto con l'enzima attivo). Grafico adattato da [2].

ANALISI

La separazione di galattosio, glucosio e lattosio è stata eseguita su una colonna di separazione Metrosep Carb 2 - 250/4,0 utilizzando un eluente di idrossido (**figura 2**) entro un tempo di registrazione di 18 minuti. Per la pulizia della colonna, è stato eseguito un gradiente ad alta pressione (HPG) in acetato post-registrazione entro un tempo di esecuzione totale del campione di circa 30 minuti. Il rilevamento del segnale è avvenuto con un rivelatore amperometrico (945 Professional Detector Vario - Amperometry) dotato di cella Thin-Layer (Au working e elettrodo di riferimento Pd). L'uso della cella Thin-Layer in combinazione con una speciale forma d'onda flexiPAD (rilevamento amperometrico pulsato) ha mostrato le migliori prestazioni per l'analisi GOS. Rispetto alle condizioni PAD standard, questa configurazione ha fornito una risposta e un rapporto segnale-rumore maggiori.

Dopo la preparazione manuale del campione, è stata

utilizzata la dialisi in linea con la cella di dialisi a basso volume per purificare i campioni prima dell'iniezione nell'IC. Come passaggio completamente automatizzato, le proteine e le molecole più grandi vengono rimosse dalla matrice del campione, proteggendo la colonna e aumentando la durata della colonna.

Il contenuto totale di GOS è stato calcolato dopo la valutazione automatica dei dati (software MagIC Net 3.3) secondo AOAC. In breve, è stata determinata la differenza di galattosio e glucosio tra il test 1 e il test 2 (**figura 2**), corretto con lattosio iniziale e infine aggiustato ad un peso campione di 100 g.

Nel corso dell'adattamento e dell'avanzamento del metodo AOAC standard, diverse variabili sono state testate e infine convalidate secondo standard comuni. Tutti i dettagli sono forniti nell'articolo ad accesso aperto Ziegler *et al.* [3].

ANALISI

Metrosep Carb 2 - 250/4,0	
Eluent	250 mmol/L NaOH, with acetate HPG rinsing step
Recording time	18 min (post gradient 12 min)
Flow	0.8 mL/min
Temp	35 °C
Injection	20 µL
Detection	flexiPAD
MISP	Dialysis

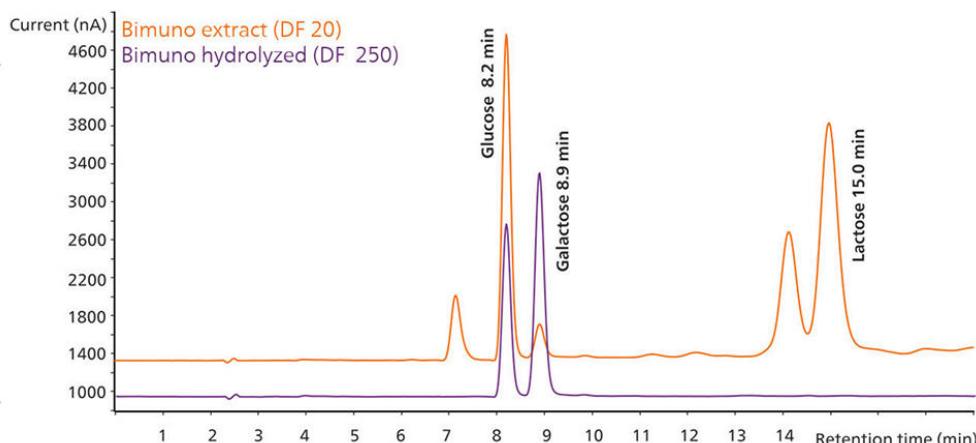


Figura 2 Sovrapposizione (con offset) dell'estratto dal campione Bimuno (Saggio 1, fattore di diluizione (DF) 20 in UPW, arancione) con l'estratto trattato con β -galattosidasi (Saggio 2, DF 250 in UPW, viola). A causa dell'idrolisi dei GOS, ovvero della rottura dei legami galattosio-galattosio e galattosio-glucosio, le concentrazioni di galattosio e glucosio nel test 2 superano significativamente quelle nel test 1. Un DF più alto garantisce la corretta quantificazione all'interno della calibrazione data. Le condizioni cromatografiche sono riassunte a sinistra. Come fase di preparazione del campione in linea Metrohm, la dialisi in linea è stata utilizzata per un'ulteriore pulizia del campione, migliorando le prestazioni del sistema e la durata della colonna.

Il contenuto totale di GOS dei diversi campioni variava da 28 a 83 g/100 g con una variabilità fino al 5% per le misurazioni dei singoli replicati nell'arco di diversi giorni. È stata mostrata una maggiore variabilità del 6-10% per gli alimenti per lattanti (dati non mostrati). Il contenuto di lattosio più elevato in tali matrici determina un aumento delle incertezze per la determinazione del GOS totale [3].

Nel complesso, la variabilità soddisfacente, i recuperi target e spike (**Tabella 1**), insieme alle prove di interferenza [2], hanno dimostrato che il metodo è valido e consistente. Con limiti di rilevabilità (LOD) (DIN 32645) di 0,1 mg/L (galattosio) e 0,2 mg/L (glucosio, lattosio) in soluzione, è possibile determinare con elevata precisione anche bassi contenuti di GOS totali.

Tabella 1. Contenuto totale di GOS determinato con il metodo AOAC 2001.02 modificato per i campioni disponibili in commercio polvere GOS, integratore giornaliero Bimuno e polvere Vivinal®. Questi campioni sono stati preparati individualmente e analizzati in duplice per diversi giorni (n). L'RSD calcolato è una misura della variabilità del contenuto totale di GOS per i diversi campioni. I recuperi sono stati calcolati per valori di riferimento target e da picchi con la polvere GOS (materiale di riferimento) che mostra la precisione e la robustezza del metodo.

Campione	GOS totale (n) (g/100 g)	Variabilità su n giorni (RSD in %)	GOS totale obiettivo (g/100 g)	Recupero obiettivo (%)	AVG Spike 1 (g/100 g) (Recupero %)	AVG Spike 2 (g/100 g) (Recupero %)
Polvere di GOS	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%)
Polvere Vivinale	27,8 ± 0,5 (n = 4)	1,8	28,5	98	37,8 ± 0,1 (91%)	48,6 ± 0,1 (91%)

CONCLUSIONE

In quanto metodo multicomponente, la cromatografia ionica con rilevamento amperometrico è un metodo di analisi molto selettivo, sensibile e consistente per i carboidrati senza ulteriori passaggi di derivatizzazione. In combinazione con il trattamento enzimatico si possono quantificare anche carboidrati più complessi. Il metodo IC-flexiPAD avanzato e convalidato per l'analisi GOS totale avvantaggia gli analisti con una maggiore efficienza. Grazie a importanti miglioramenti nella preparazione dei

campioni, la procedura complessiva non solo è più veloce riducendo il lavoro di laboratorio aggiuntivo, ma è anche possibile risparmiare reagenti e materiali di consumo, riducendo i costi di gestione totali. Questo lo rende una valida alternativa al metodo ufficiale AOAC 2001.02.

Ulteriori passaggi di automazione (ad es. Metrohm Inline Dilution e calibrazioni automatiche) possono migliorare ulteriormente l'efficienza del metodo.

RIFERIMENTI

1. Sangwan et al. (2011), J. Scienza del cibo 76(4)
2. Boehm & Stahl (2007), J. Nutr. 137(3 Suppl 2)
3. Ziegler et al. (2001), La Colonna – Europa/Asia 17(02)

CONTACT

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

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



940 Professional IC Vario ONE/HPG

Il 940 Compact IC Vario ONE/HPG è l'intelligente strumento IC **senza soppressione con gradiente binario di alta pressione**. Con i 942 Extension Module può essere espanso fino a un sistema gradiente quaternario. Lo strumento può essere impiegato con qualsiasi metodo di separazione e di rilevamento.

Campi d'impiego tipici:

- Analisi dei carboidrati con rilevamento amperometrico pulsato (PAD) dopo l'eluizione del gradiente
- Applicazioni di gradienti con rilevazione UV/VIS con o senza derivatizzazione post-colonna



IC Amperometric Detector

Rilevatore amperometrico compatto e intelligente per gli strumenti IC intelligenti. La straordinaria selettività grazie alle quattro modalità di misurazione: DC, PAD, flexIPAD e CV, nonché l'eccellente rapporto segnale/rumore e la rapidissima disponibilità per la misurazione garantiscono la massima precisione della misurazione.



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, aminozuccheri 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 attraverso la pompa peristaltica bidirezionale a doppio canale integrata o tramite un 800 Dosino.