



Application Note AN-P-089

Intolleranza al lattosio e affidamento sulla precisione delle etichette alimentari

Analisi rapida e affidabile del livello di lattosio con IC-PAD

In tutto il mondo, il latte e i prodotti lattiero-caseari sono fonti di nutrimento vitali per l'uomo [1]. Oltre ai nutrienti, ai minerali, alle proteine e ai grassi, il lattosio è un componente importante dei prodotti lattiero-caseari, fungendo da fonte di energia. Per metabolizzare efficacemente il lattosio, l'enzima lattasi è indispensabile [2]. Tuttavia, a livello globale quasi il 70% della popolazione è intollerante al lattosio, cioè ha difficoltà a digerire il lattosio [3, 4]. Il malassorbimento del lattosio comporta molti sintomi gastrointestinali ed extra intestinali e altri fastidi di diversa portata. Mentre alcune persone intolleranti al

lattosio sono sensibili a qualsiasi quantità, altre possono consumarne una piccola quantità senza effetti negativi. Mancano ancora un valore limite specifico e normative per le etichette e la produzione dei prodotti senza lattosio, pertanto è necessario analizzare ed etichettare accuratamente gli alimenti utilizzando tecniche standard sensibili. La **Cromatografia ionica con rivelazione amperometrica pulsata** (IC-PAD) consente di determinare un contenuto di lattosio molto basso. La convalida secondo i requisiti AOAC mostra l'elevata sensibilità e affidabilità di questo metodo come analisi di routine.

La determinazione del lattosio è stata eseguita per un'ampia selezione di matrici di campioni comprendenti alimenti per neonati e per l'infanzia (AN-P-088), referenze certificate (ad esempio, il latte a basso contenuto di lattosio di riferimento muva ML-2312), nonché 15 prodotti a basso contenuto di lattosio e senza lattosio disponibili in commercio tra cui yogurt, burro, panna, ricotta, bevande al latte, cioccolato al latte e integratori.

I solidi (ad es. formaggio e cioccolato al latte) sono stati tritati, mentre le polveri e i materiali liquidi sono stati omogeneizzati. Dopo questo pretrattamento, i campioni sono stati pesati direttamente in contenitori adatti (provette 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) ad un volume totale di 50 ml (w_{UPW} in kg). Successivamente, le fiale sono state tappate e misurate vigorosamente con un miscelatore a vortice per circa 20 secondi. Per migliorare la solubilità di alcuni campioni (p. es., crema di formaggio o cioccolato), state riscaldate le fiale in un bagno

d'acqua temperato a 70 °C per 10 minuti.

La precipitazione di Carrez è un metodo standard per rimuovere le proteine e le molecole più grandi 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×g) per 10 minuti e decantati. Le fiale coperte sono state inserite direttamente nell'autocampionatore. È possibile ottenere una maggiore protezione della colonna con un ulteriore step di ultrafiltrazione.

In alternativa, è raccomandata la preparazione automatizzata del campione utilizzando la dialisi in linea con la Cella per dialisi a basso volume. Per questo, i campioni sono stati preparati come descritto in precedenza per quanto riguarda gli estratti acquosi, agitati bene e coperti prima di posizionarli direttamente sul rack dell'autocampionatore. Quando si utilizza la dialisi, non è necessaria alcuna precipitazione Carrez prima dell'analisi, risparmiando tempo e sostanze chimiche. L'utilizzo della cella per dialisi a basso volume richiede solo 5 ml di campione.

ANALISI

La quantità di lattosio negli estratti acquosi del campione è stata determinata mediante cromatografia ionica (IC) con la colonna di separazione **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 ([AN-P-088](#), [WP-077](#)). Una lunga durata dell'elettrodo con requisiti di manutenzione minimi è possibile utilizzando la cella amperometrica Metrohm Thin-Layer (elettrodo di

lavoro Au e di riferimento Pd). La modalità di scansione combinata con il flusso meno turbolento nella cella a strato sottile si traduce in una linea di base regolare con basso rumore, è una precondizione necessaria per analizzare concentrazioni molto basse, come nei prodotti a basso contenuto di lattosio. Gli schemi di flusso per l'analisi diretta del lattosio con la preparazione del campione obbligatoria come la precipitazione di Carrez sono mostrati in **Figura 1**.

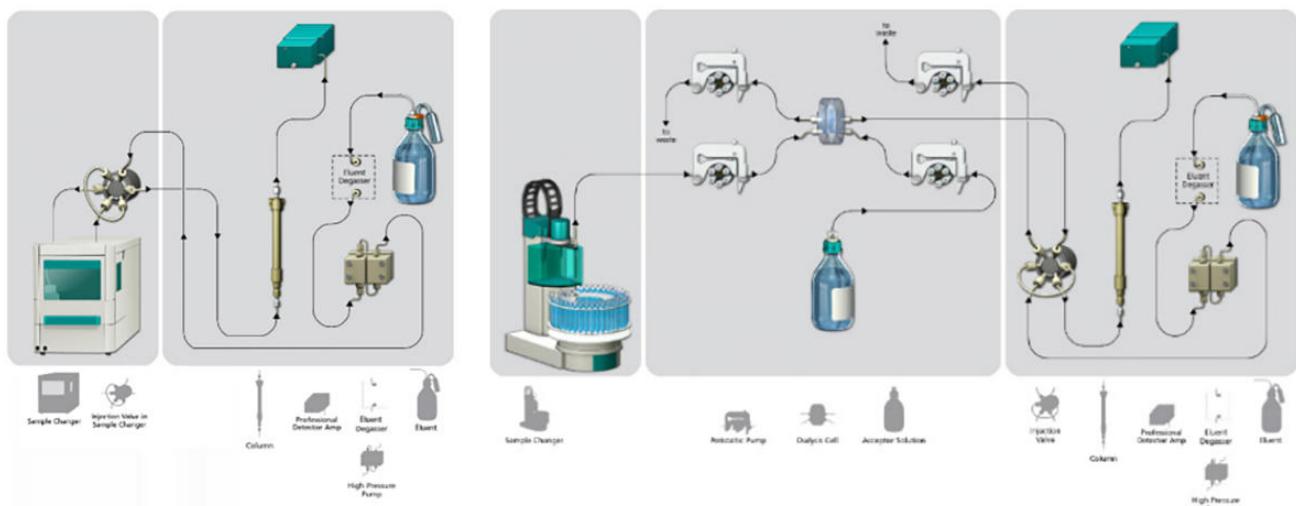


Figura 1. Esempi di configurazioni di sistema per l'analisi diretta del lattosio utilizzando il Metrohm 889 Sample Center – freddo (a sinistra). La preparazione del campione per l'analisi diretta è obbligatoria, ad esempio con precipitazione Carrez per proteggere il sistema analitico. La dialisi in linea (a destra) può essere aggiunta opzionalmente a qualsiasi strumentazione esistente, il che consente un'alternativa automatizzata alla preparazione del campione convenzionale. Il trasporto del campione e la manipolazione dei liquidi possono essere eseguiti con una pompa peristaltica, Dosino, o direttamente utilizzando l'autocampionatore 889. In entrambi gli esempi l'eluizione isocratica viene eseguita con un eluente di idrossido di sodio prima del rilevamento mediante PAD.

La stabilità del campione è migliorata utilizzando l'889 IC Sample Center – cool. La preparazione automatizzata del campione mediante dialisi in linea può essere aggiunta a qualsiasi configurazione esistente. Maggiori dettagli sono disponibili nella letteratura Metrohm per Preparazione del campione

in linea Metrohm così come dentro [AN-P-088](#).

Qualsiasi gestione dei liquidi per il trasporto del campione o la pulizia del percorso del campione può anche essere automatizzata utilizzando lo strumento più flessibile di Metrohm per la manipolazione dei liquidi: il Dosino.

RISULTATI E DISCUSSIONE

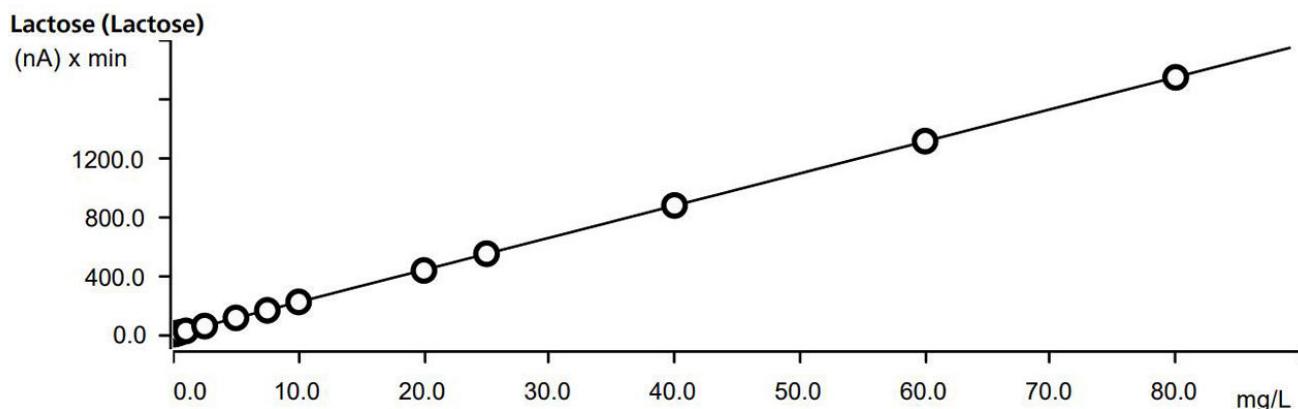
Il lattosio eluisce in meno di 30 minuti (**Figura 2–6**). L'intervallo di lavoro complessivo del metodo è compreso tra 0,05 e 80 mg/L per standard di lattosio liquido (**Figura 2 A**), con la capacità di analizzare campioni in un intervallo da 0,2 a 21.000 mg/ 100 g con la rispettiva diluizione. Contrariamente ai metodi cromatografici precedentemente pubblicati, i derivati del lattosio (epilattosio, lattulosio, allolattosio e galattosillattosio), come quelli degli additivi prebiotici,

sono stati separati con successo dal lattosio, aumentando la selettività e l'accuratezza del metodo (**Figura 2 B**).

Le concentrazioni del campione sono determinate dalla calibrazione lineare ($c(\text{lattosio})_S$ in mg/kg) (**Figura 2 A**) e calcolate per determinare il contenuto di lattosio finale ($c(\text{lattosio})_{\text{FIN}}$ in g/ 100 g) in base al peso del campione:

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

UN



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

B

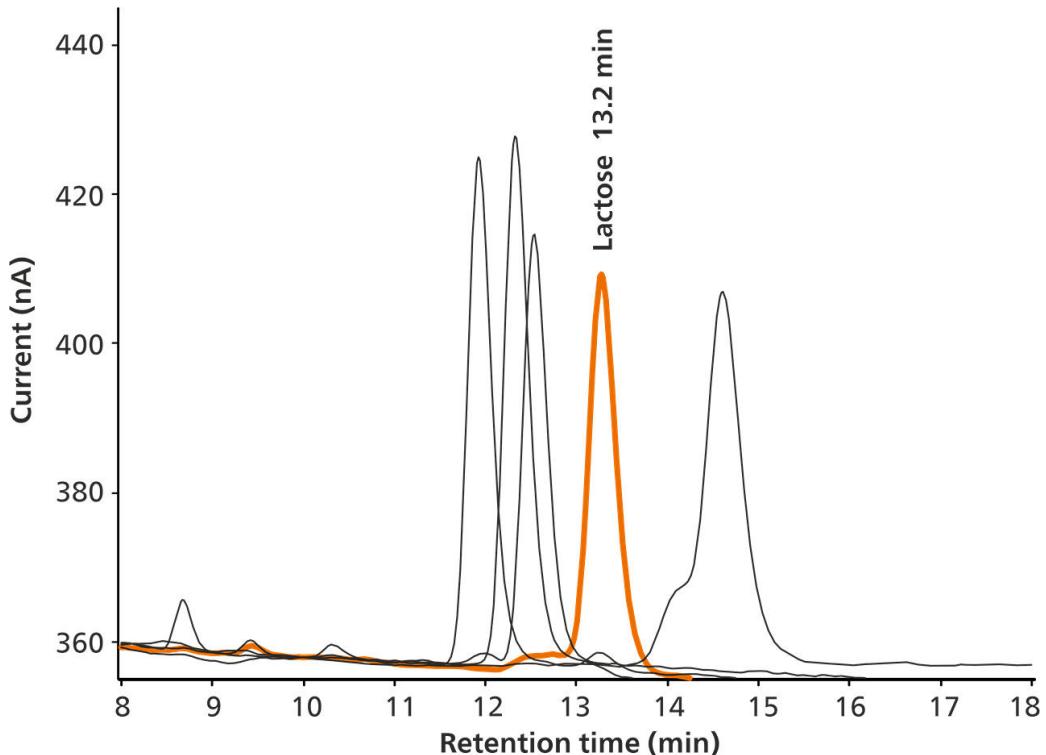


Figura 2. Calibrazione per lattosio (A) che mostra una forte linearità nell'intervallo di concentrazione da 0,05 mg/L a 80 mg/L (requisito di convalida). È obbligatoria una corretta separazione del lattosio dalle interferenze. Oltre ad altri zuccheri, alcoli di zucchero e ioni inorganici, è fondamentale separare i lattosederivati strutturalmente simili (B): epilattosio, lattulosio, allolattosio e galattosillattosio (picchi da sinistra a destra), che è possibile con le condizioni di eluizione descritte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Esempi di risultati di validazione sono mostrati per campioni selezionati in **Figura 3–6** (materiale di riferimento del latte a basso contenuto di lattosio (muva), un integratore contenente lattosio oltre ai galatto-oligosaccaridi (Bimuno), uno yogurt senza lattosio e un burro senza lattosio). Le concentrazioni di lattosio variavano da <0,5 mg/100 g (burro a basso contenuto di lattosio) a quasi 13 g/100 g (integratore prebiotico). I dati mostrano la conformità ai criteri di accettazione dell'AOAC per la ripetibilità e la variabilità giornaliera ($\text{RSD} \leq 7\%$), i recuperi degli spike (90–110%) e una risoluzione (>1,5, ovvero la separazione della linea di base) accertata all'interno del validazione in laboratorio unico.

I risultati ottenuti per l'analisi utilizzando la precipitazione Carrez prima dell'iniezione e utilizzando la dialisi in linea hanno mostrato risultati

comparabili per campioni di test selezionati (**Figura 3–6, AN-P-088**). I risultati per un insieme di sei diverse matrici comprendenti repliche a breve termine e spike test (come descritto in **Figura 3–6**) differiscono con RSD inferiori al 7% (media 3,2%).

Figura 3–6 mostrano le concentrazioni medie e la ripetibilità R_p come RSD da campioni preparati individualmente misurati in breve tempo tempo ($n = 7$) o come concentrazione determinata su singoli campioni preparati misurati in giorni diversi (4–8 d) (variabilità giornaliera (R_{Var}) e i loro RSD) e il recupero totale del picco R_s come media su tutti gli esperimenti di spike analizzati in diversi giorni. La risoluzione dei lattosio a i picchi successivi sono espressi come R. I risultati della dialisi in linea per campioni selezionati sono contrassegnati da un asterisco (*).

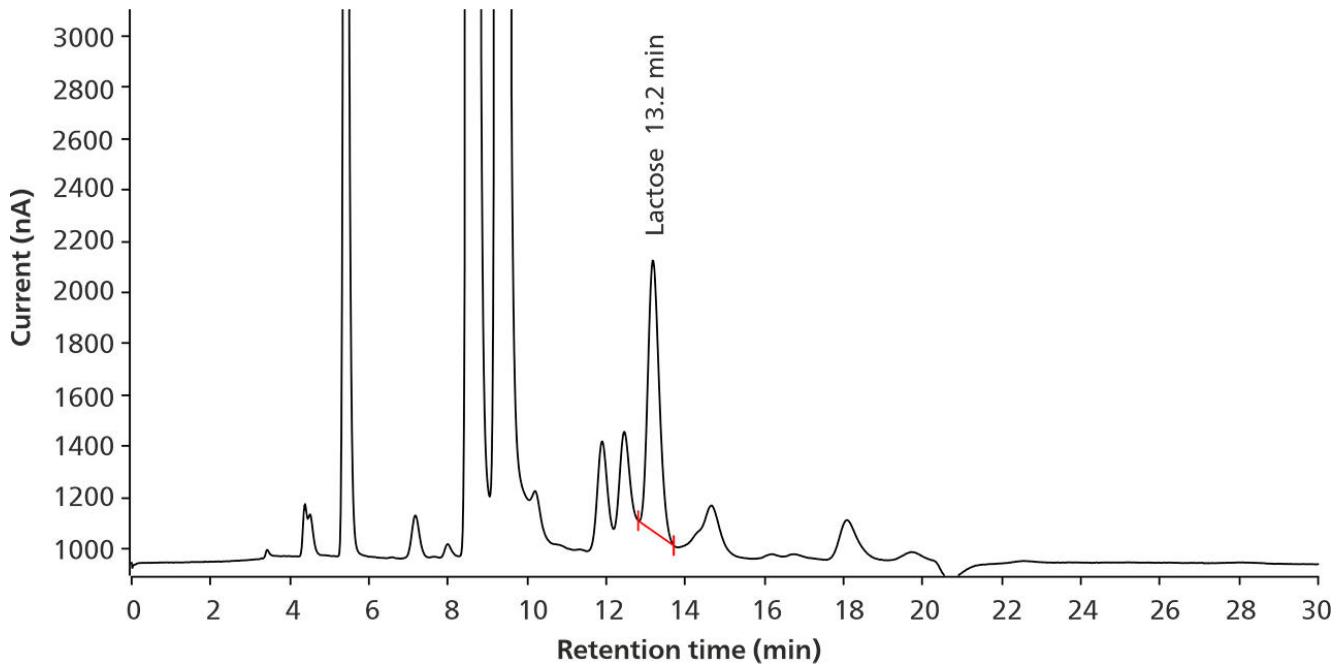


Figura 3. Lattosio espresso come lattosio monoidrato (fattore di conversione 1,05 per il lattosio in lattosio monoidrato) in muva ML-2312 (obiettivo 217 ± 45 g/ 100 g).

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

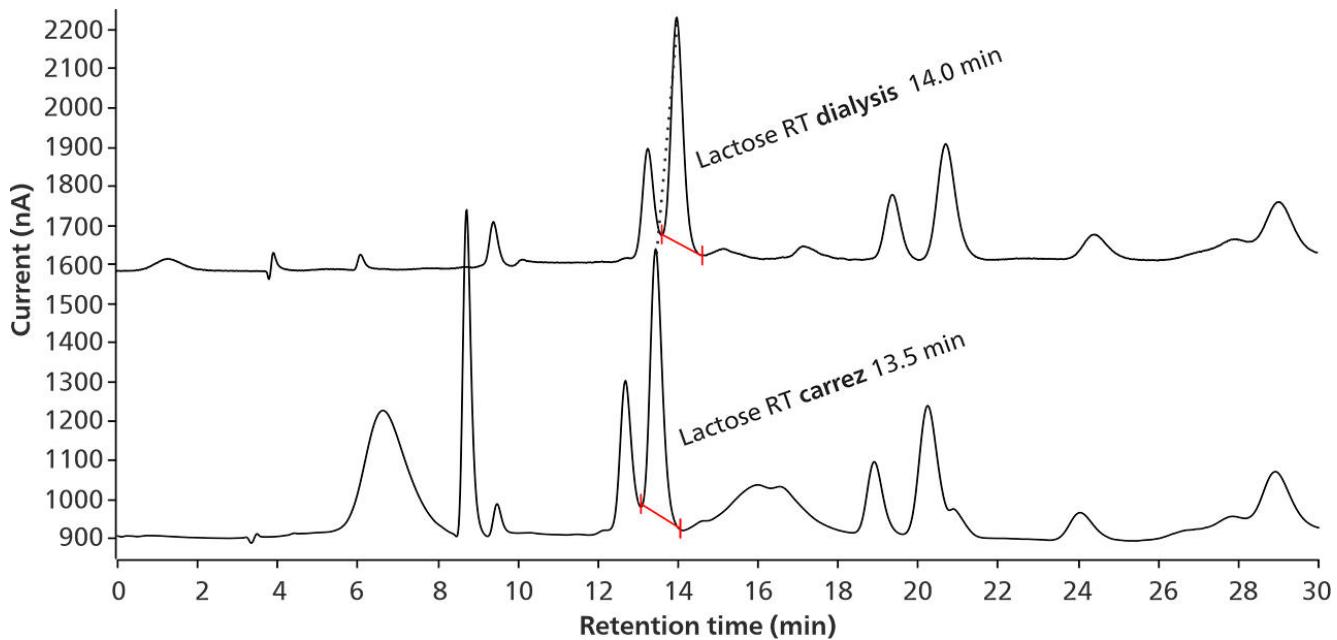


Figura 4. Lattosio espresso come lattosio monoidrato (fattore di conversione 1,05 per il lattosio in lattosio monoidrato) in Bimuno tutti i giorni (Nutrizione digestiva mirata).

R_R (mg/ 100 g) (RSD_R %)	R_{Var} (mg/ 100 g) (RSD_{Var} %)	R_S (%)	R
$13009 \pm 288 (2,2)^*$	$13125 \pm 484 (3,9)^*$	$99 \pm 6^*$	1,9*
$11795 \pm 130 (1,1)$	$11807 \pm 465 (3,9)$	99 ± 5	1,6

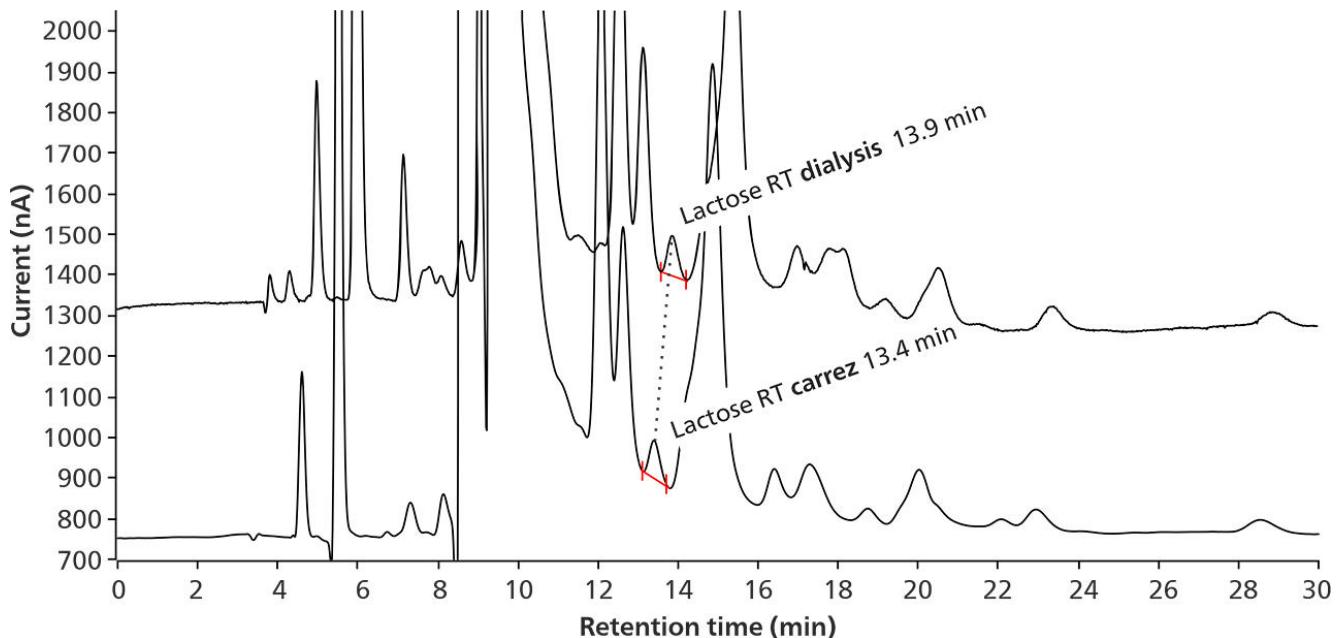


Figura 5. Lattosio espresso come lattosio monoidrato (fattore di conversione 1,05 per il lattosio in lattosio monoidrato) in Yogurt, senza, Coop, senza lattosio.

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

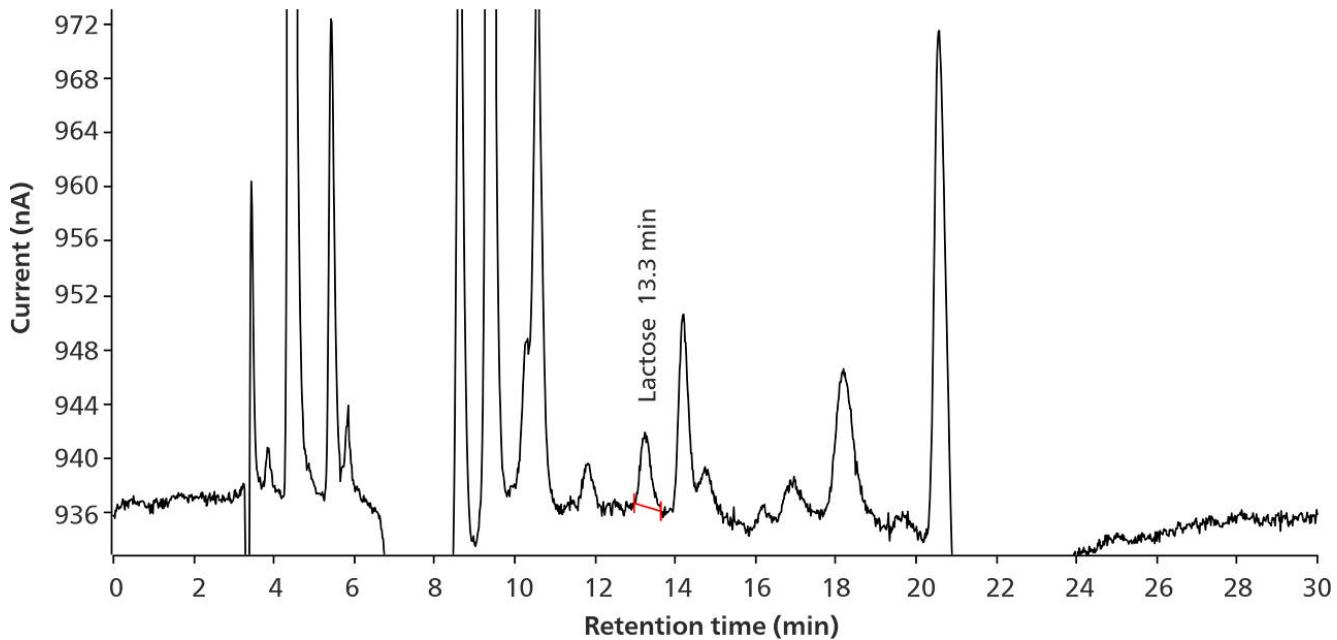


Figura 6. Lattosio espresso come lattosio monoidrato (fattore di conversione 1,05 per il lattosio in lattosio monoidrato) in Burro, aha, Spar, senza lattosio.

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

CONCLUSIONE

La validità secondo i criteri per un singolo test di laboratorio AOAC mostra l'appropriata affidabilità, sensibilità e consistenza del metodo IC-PAD descritto per la determinazione del lattosio nei prodotti lattiero-caseari a basso contenuto di lattosio e senza lattosio. L'analisi comparativa per la preparazione del campione con precipitazione Carrez e la dialisi in linea Metrohm ha mostrato un'eccellente conformità. La dialisi in linea Metrohm è consigliata come alternativa

efficiente in termini di tempo alle precipitazioni di Carrez. I sistemi Metrohm IC sono caratterizzati da un elevato grado di flessibilità: i sistemi possono essere aggiornati, ad esempio, per integrare ulteriormente la diluizione, consentendo anche la calibrazione in linea e la diluizione intelligente. Qualsiasi automazione rende il metodo ancora più semplice e adatto per analisi di routine e ad alto rendimento.

RIFERIMENTI

1. Muehlhoff, E.; Bennett, A.; McMahon, D. *Latte e prodotti lattiero-caseari nella nutrizione umana*; FAO: Roma, 2013.
2. Monti, L.; Negri, S.; Meucci, A.; Stroppa, A.; Galli, A.; Contarini, G. Determinazione di lattosio, galattosio e glucosio in formaggi a pasta dura naturalmente "senza lattosio": validazione del metodo HPAEC-PAD. *Chimica alimentare* 2017, 220, 18–24.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.185>.
3. Bayless, T. M.; Marrone, E.; Paige, D. M. Non persistenza della lattasi e intolleranza al lattosio. *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. Gestione nutrizionale dell'intolleranza al lattosio: l'importanza della dieta e dell'etichettatura degli alimenti. *Giornale di medicina traslazionale* 2020, 18 (1), 260.
<https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>.

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



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.



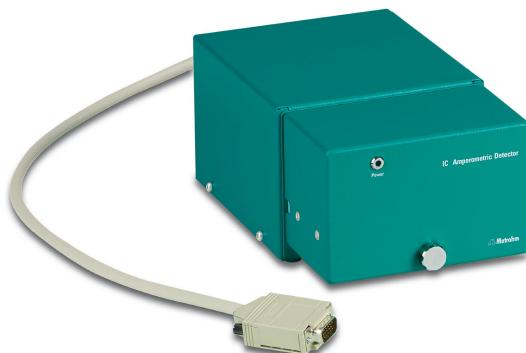
Equipaggiamento IC cella Wall-Jet: Carb (Au, Pd)

Equipaggiamento composto da cella Wall-Jet con accessori supplementari. Per l'analisi dei carboidrati con un elettrodo da lavoro in oro e uno di riferimento Pd.



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.



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.



Equipaggiamento IC: ultrafiltrazione in linea 2 - modalità pull

Kit di accessori per ultrafiltrazione in linea 2 - modalità pull. Per l'utilizzo con lo strumento 858 Professional Sample Processor/919 IC Autosampler plus.



930 Compact IC Flex Oven/Deg

Il 930 Compact IC Flex Oven/Deg è l'intelligente strumento Compact-IC con **forno della colonna, senza soppressione** e con **Degasser** incorporato. Lo strumento può essere impiegato con qualsiasi metodo di separazione e di rilevamento.

Campi d'impiego tipici:

- Determinazione di anioni e cationi senza soppressione con rilevamento della conduttività
- Applicazioni semplici con rilevamento UV/VIS o amperometrico