

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

FLOW INJECTION ANALYSIS ACCOPPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI
MASSA TANDEM PER LA QUANTIFICAZIONE DEL LATTOSIO NEL LATTE:
VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO

Relatore: Dottor Marco Roverso

Controrelatore: Professoressa Elisabetta Schievano

Laureanda: Zoe Lustro

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. Introduzione.....	8
1.1. Il latte.....	8
1.2. La composizione del latte.....	8
1.2.1. Acqua.....	9
1.2.2. Lipidi.....	10
1.2.3. Proteine.....	10
1.2.4. Carboidrati.....	10
1.2.5. Vitamine.....	11
1.2.6. Minerali.....	11
1.3. Il lattosio.....	12
1.3.1. Utilizzi.....	13
1.3.2. Derivati.....	14
1.4. Intolleranza al lattosio.....	16
1.4.1. Forme di intolleranza al lattosio.....	17
1.4.2. Distribuzione dell'intolleranza al lattosio nel mondo.....	18
1.4.3. Metodi diagnostici e terapia.....	19
1.5. Prodotti <i>Lactose Free</i>	20
1.5.1. Produzione industriale del latte senza lattosio.....	21
1.5.2. Legislazione ed etichettatura.....	26
1.6. Metodi di analisi del lattosio.....	28
2. Scopo della tesi.....	31
3. Tecniche sperimentali e strumentazioni.....	32
3.1. Spettrometria di massa ad alta risoluzione.....	32

3.2. Cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni accoppiata ad un rilevatore ad amperometria pulsata (HPAEC-PAD).....	37
4. Materiali e metodi.....	40
4.1. Condizioni sperimentali.....	40
4.2. Reagenti e standard.....	40
4.3. Preparazione degli standard.....	41
4.3.1. Preparazione degli standard per FIA-MS/MS.....	41
4.3.2. Preparazione degli standard per HPAEC-PAD.....	42
4.4. Preparazione dei campioni.....	42
4.4.1. Preparazione dei campioni per analisi FIA-MS/MS.....	43
4.4.2. Preparazione dei campioni per analisi HPAEC-PAD.....	44
4.5. Parametri strumentali.....	45
4.5.1. Parametri strumentali per analisi FIA-MS/MS.....	45
4.5.2. Parametri strumentali per analisi HPAEC-PAD.....	48
4.6. Software.....	48
5. Risultati e discussione.....	49
5.1. Esperimenti di spettrometria di massa.....	49
5.1.1. Addotto sodiato.....	49
5.1.2. Selettività dei segnali mass spettrometrici.....	51
5.1.3. Standard interno.....	53
5.1.4. Parametri strumentali scelti.....	54
5.2. Estrazione dei campioni per analisi FIA-MS/MS.....	55
5.3. Validazione del metodo.....	57
5.3.1. Selettività.....	58
5.3.2. Linearità.....	58
5.3.3. Limite di rivelabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ).....	60

5.3.4. Precisione.....	62
5.3.5. Effetto matrice (ME%).....	63
5.3.6. Recupero (R%).....	65
5.3.7. Accuratezza (A%).....	69
5.3.8. Differenza tra i valori ottenuti con le diverse calibrazioni.....	70
5.4. Confronto con il metodo HPAEC-PAD.....	72
5.4.1. Analisi HPAEC-PAD.....	72
5.4.2. T-test.....	75
6. Conclusioni.....	77
7. Ringraziamenti.....	78
8. Bibliografia.....	80

ABBREVIAZIONI:

ACN Acetonitrile

AOAC Association of Official Analytical Chemists

AILI Associazione Italiana Latto-Intolleranti

EFSA European Food Safety Authority

EIC Extracted Ion Chromatogram

ESI ElectroSpray Ionization

FIA Flow Injection Analysis

FID Flame Ionization Detector

GC Gas Chromatography

HILIC Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HPAEC High Performance Anion Exchange Chromatography

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HRMS High Performance Mass Spectrometry

IS Internal Standard

ISO International Organization for Standardization

LBT Lactose Breath Test

LOD Limit of Detection

LOQ Limit of Quantification

ME% Matrix Effect %

MS Mass Spectrometry

MS/MS Massa Tandem

NCE Normalized Collision Energy

PAD Pulsed Amperometric Detection

PRM Parallel Reaction Monitoring

R% Recovery %

R² Coefficiente di correlazione

RDA Recommended Dietary Allowances

RID Refractive Index Detector

STD Standard

UHT Ultra High Temperature

1. Introduzione

1.1. Il latte

Prodotto dalle ghiandole mammarie di tutte le femmine di mammifero, il latte è il primo alimento per i mammiferi e come tale fornisce tutta l'energia necessaria per garantire una crescita e uno sviluppo adeguati nel periodo post-natale. Il latte è dunque un fluido complesso, ricco di nutrienti chiave come carboidrati, proteine, grassi, minerali e vitamine che vengono adattati dinamicamente durante il periodo dell'allattamento per soddisfare le specifiche esigenze dei neonati in crescita, e per questo viene spesso definito come "alimento perfetto". Oltre a svolgere un ruolo chiave nel nutrimento e nell'idratazione, il latte fornisce immunoglobuline utili a rafforzare il sistema immunitario di tutti i mammiferi appena nati e contribuisce a stabilire la microflora intestinale essenziale¹.

Per tutti i mammiferi il consumo di latte si interrompe con la fine del periodo di svezzamento, fatta eccezione per l'uomo, che continua ad assumerlo anche in età adulta. È noto che gli esseri umani hanno consumato latte bovino e non bovino (soprattutto di capra e pecora) sin dalla preistoria come parte della loro dieta². La capacità dell'uomo di raccogliere e utilizzare il latte degli altri mammiferi è stata fondamentale per la creazione di società civili e per l'evoluzione dell'allevamento, nonché per lo sviluppo di molti prodotti alimentari lattiero-caseari oggi ampiamente utilizzati³.

Ancora oggi il latte è una delle bevande più consumate (930 milioni di tonnellate prodotte nel 2022⁴) e la sua produzione mondiale è dominata da cinque specie animali: 81% proviene da vacche, 15% da bufale, 2% capre, 1% pecore, 0.5% cammelle⁵. Il latte bovino è dunque il più consumato in tutto il mondo, grazie alla sua ampia disponibilità e ai suoi grandi volumi di produzione. I latti non bovini sono invece di importanza nutrizionale per le popolazioni dei paesi in via di sviluppo, così come nelle aree geografiche in cui il clima non è adatto alla sopravvivenza dei bovini da latte.

1.2. La composizione del latte

A livello di macronutrienti, il latte è tipicamente composto da acqua, proteine, lipidi e carboidrati (Figura 1). A livello di micronutrienti contiene molti composti bioattivi tra cui

vitamine, minerali e oligosaccaridi. La natura precisa e l'abbondanza di questi composti varia in dipendenza dalla specie (Tabella 1), ma anche all'interno della stessa specie la composizione del latte cambia notevolmente a causa di molti fattori, quali: razza, stadio di lattazione, intervallo di mungitura, tipo di alimentazione e clima⁶.

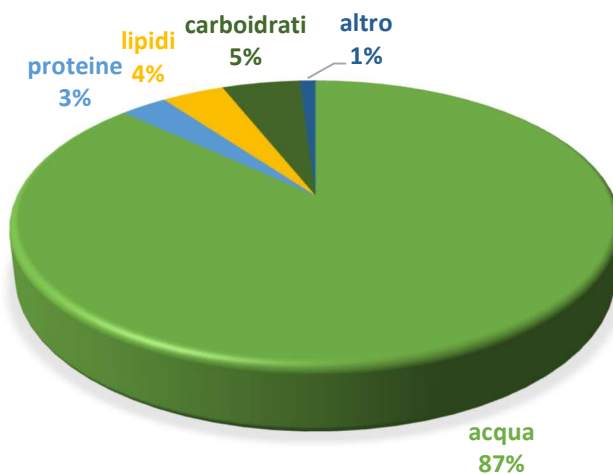


Figura 1: composizione media del latte dei mammiferi

Tabella 1: composizione generale (g/100mL) del latte di differenti femmine di mammifero⁶.

	donna	vacca	bufala	capra	pecora	cammella
Proteine	0.9-1.9	3.0-3.9	2.7-4.7	3.0-5.2	4.5-7.0	2.4-4.2
Grassi	2.1-4.0	3.3-5.4	5.3-9.0	3.0-7.2	5.0-9.0	2.0-6.0
Lattosio	6.3-7.0	4.4-5.6	3.2-4.9	3.2-5.0	4.1-5.9	3.5-5.1
Ceneri	0.2-0.3	0.7-0.8	0.8-0.9	0.7-0.9	0.8-1.0	0.7-0.9

1.2.1. Acqua

L'acqua è il costituente principale del latte (85-87%)³. Oltre a soddisfare il fabbisogno idrico del neonato, l'acqua contenuta nel latte funge da solvente per i sali, il lattosio e le proteine; inoltre controlla la velocità di molte reazioni come l'imbrunimento di Maillard, l'ossidazione dei lipidi, l'attività degli enzimi e la crescita microbica, influenzando così la stabilità del latte e di tutti gli altri prodotti lattiero-caseari⁷.

1.2.2. Lipidi

I lipidi del latte costituiscono la principale fonte di energia per i mammiferi neonati. La maggior parte della frazione grassa secreta dalle ghiandole mammarie è composta da trigliceridi (98%), il resto è costituito prevalentemente da digliceridi (2%), fosfolipidi (1%), colesterolo (<0.5%) e acidi grassi liberi (0.1%). Sono inoltre presenti tracce di idrocarburi, vitamine liposolubili, composti aromatici e altri ingredienti organici introdotti attraverso il mangime degli animali⁸. Tutti questi componenti si organizzano in globuli lipidici: i fosfolipidi, con la loro testa polare, costituiscono la maggior parte della membrana dei globuli, gli altri lipidi si dispongono invece nel nucleo. I grassi sono quindi presenti nel latte come emulsione⁹.

La componente grassa del latte è la più complessa tra quelle che si possono ritrovare in natura; infatti, più di 400 acidi grassi diversi costituiscono i relativi trigliceridi. La quantità e la composizione degli acidi grassi dipendono dal tipo di animale, dallo stadio di lattazione e da fattori legati all'alimentazione. In media il 70% della frazione grassa è costituita da acidi grassi saturi (in particolare palmitico, miristico, stearico, butirrico e capronico) e il 30% da acidi grassi insaturi (soprattutto oleico, linoleico e linolenico)⁸.

1.2.3. Proteine

Il latte viene generalmente considerato un'importante fonte proteica per la dieta umana, fornisce infatti circa 32g di proteine/L. Le proteine del latte possono essere suddivise in due gruppi: le proteine solubili (20%), denominate siero proteine, ricche in amminoacidi a catena ramificata (leucina, isoleucina, valina e lisina), e le proteine insolubili (80%) dette caseine. Queste ultime sono ricche in istidina, metionina e fenilalanina. Entrambi i gruppi sono classificati come proteine di alta qualità considerato il fabbisogno umano di amminoacidi, la digeribilità e la biodisponibilità⁸.

1.2.4. Carboidrati

Il principale carboidrato presente nel latte è il disaccaride riducente lattosio, composto dalle unità galattosio e glucosio unite da un legame glicosidico β -1 \rightarrow 4. Il lattosio funge da pronta

fonte di energia per il neonato, fornisce infatti il 30% delle calorie⁸. Nel latte umano si registra la più alta concentrazione di lattosio rispetto a tutte le altre specie mammifere (Tabella 1), ciò è in linea con le elevate richieste energetiche del cervello umano⁹.

Oltre al lattosio, nel latte sono presenti anche numerosi altri saccaridi liberi come oligosaccaridi, monosaccaridi, ma anche glicoproteine, le cui concentrazioni e proporzioni variano notevolmente tra le specie. Gli oligosaccaridi sono di particolare rilevanza poiché importanti per lo sviluppo del cervello neonatale; essi possono essere lineari o ramificati e contenere da tre a otto unità monomeriche. Inoltre quasi tutti possiedono il lattosio come estremità riducente⁷.

1.2.5. Vitamine

Il profilo vitaminico del latte comprende le vitamine liposolubili A, D, E, e idrosolubili C e complesso B, tutte in quantità sufficienti per consentire il normale mantenimento e la crescita del neonato.

In particolare, la vitamina A (retinolo) risulta importante per la crescita, lo sviluppo e la salute degli occhi. Il suo contenuto nel latte dipende principalmente dalla quantità di grasso (172 µg/100g nel latte intero, 102 µg/100g nel latte scremato, 5 µg/100g nel latte magro) ma anche da fattori come l'alimentazione degli animali e la stagione⁸. Invece, le vitamine del complesso B sono importanti cofattori enzimatici e partecipano a diverse vie metaboliche (produzione di energia dai nutrienti, sintesi ormonale, neurotrasmettitori). Il latte fornisce il 10-15% dell'apporto giornaliero di vitamine B raccomandato per la maggior parte delle persone¹⁰.

1.2.6. Minerali

Il calcio è il microelemento presente in maggior quantità nel latte (in media 1200 mg/L) e si distribuisce tra fase micellare, quando associato a caseine, e fase acquosa, quando legato alle proteine del siero del latte o alle forme inorganiche di sali fosfati¹¹. Oltre al calcio, il latte contribuisce a fornire altri elementi alla dieta umana, elementi fondamentali per le funzioni enzimatiche, per il funzionamento del metabolismo, per la crescita delle ossa, per la riproduzione e per la salute in generale. Il latte bovino, ad esempio, contiene molti minerali essenziali come P, Mg, K e Na, ma anche piccole tracce di Zn, Cu, Fe e Mn (Tabella 2)³.

Tabella 2: lista di alcuni elementi presenti in tracce nel latte determinati mediante ICP-MS. Intervalli di concentrazioni riportati in micromolare³.

	Concentrazione (μM)
Ca	$(26-32) \cdot 10^3$
P	$(19-23) \cdot 10^3$
Mg	$(4-6) \cdot 10^3$
K	$(31-43) \cdot 10^3$
Na	$(17-28) \cdot 10^3$
Zn	15-63
Cu	0.5-10
Fe	1-13
Mn	0.7-5

1.3. Il lattosio

Il lattosio è il principale carboidrato presente nel latte (che ne è anche l'unica fonte naturale conosciuta); esso è un disaccaride riducente con formula bruta $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ derivante dalla condensazione di β -D-galattosio e α o β -D-glucosio mediante legame β -1 \rightarrow 4 glicosidico (Figura 2). Date le possibili forme α o β del glucosio, in soluzione si instaura la mutarotazione tra le forme anomeriche α e β -lattosio, fino al raggiungimento di un equilibrio. Le proporzioni dei due anomeri alla temperatura di 20°C sono: 37.1% α -lattosio e 62.9% β -lattosio, tale rapporto di equilibrio cambia in funzione della temperatura spostandosi al 100% di β -lattosio per temperature superiori ai 93.5°C ¹². Gli isomeri α e β del lattosio hanno proprietà diverse, le più importanti sono la rotazione specifica $[\alpha]_D^{20}$ ($+89^\circ$ e $+35^\circ$ rispettivamente per α e β) e la solubilità (70 e 500 g/L rispettivamente per α e β)⁷.

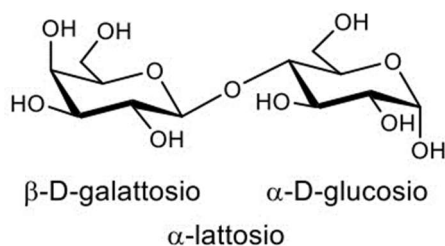


Figura 2: struttura chimica dell' α -lattosio

Il lattosio si presenta come solido bianco solubile in acqua, leggermente dolce al gusto. Quando viene cristallizzato a temperature inferiori ai 93.5°C, si ottiene la forma solida α -lattosio monoidrato, la forma commercialmente più comune del lattosio poiché ha la desiderabile caratteristica di non essere igroscopica. Quando viene cristallizzato a temperature superiori ai 93.5°C si ottiene il solido β -lattosio monoidrato, igroscopico e più dolce rispetto alla forma α . Dalla liofilizzazione dei prodotti a base di latte si ottiene invece il lattosio solido amorfo (contenente una miscela di anomeri α e β), estremamente igroscopico¹².

Dal punto di vista delle proprietà chimiche, il lattosio reagisce in modo molto simile agli altri zuccheri; i principali punti di attacco sono: l'estremità riducente della porzione glucosidica, i gruppi ossidrilici e il legame glicosidico tra il glucosio e il galattosio. Le principali proprietà fisiche del lattosio sono invece schematizzate in Tabella 3.

Infine, come tutti gli zuccheri riducenti, il lattosio può partecipare alla reazione di imbrunimento non enzimatico di Maillard; tale reazione contribuisce positivamente al sapore e al colore di molti alimenti, come ad esempio la crosta del pane e i prodotti fritti. Nel caso dei latticini, invece, è da evitare poiché porta alla produzione di composti dal sapore sgradevole e di polimeri con colorazione marrone⁷.

Tabella 3: proprietà fisiche del lattosio a 298.15 K¹³.

Proprietà	α -lattosio monoidrato	β -lattosio monoidrato
Densità, g/cm ³	1.54	1.59
Entalpia di dissoluzione, J/g	-50.24	-9.62
Entalpia di combustione, J/g	-16.1	-16.5
Calore specifico, J/K·g	1.251	1.193
Entropia di formazione, J/ K·mol	-2453	-2248
Entalpia di formazione, kJ/mol	-2481	-2233
Energia libera di Gibbs, kJ/mol	-1750	-1564
Costante di diffusione in H ₂ O, m ² /s	43·10 ⁻¹¹	/

1.3.1. Utilizzi

A livello industriale il lattosio viene sfruttato per la sintesi di molti prodotti commerciali^{12,14}:

- viene trattato per via enzimatica al fine di ottenere galatto-oligosaccaridi che, grazie alle loro proprietà antinfiammatorie e prebiotiche, possono essere vantaggiosamente aggiunti al latte artificiale per neonati, rendendolo anche più simile al latte materno;
- viene impiegato nella produzione di prodotti lattiero-caseari fermentati dove funge da fonte di carbonio per i batteri lattici che producono acido lattico;
- viene ampiamente utilizzato per la produzione di compresse nell'industria farmaceutica, per la sua bassa igroscopicità;
- viene adoperato per una serie di applicazioni a basso volume nell'industria alimentare, ad esempio come agente agglomerante, o per esaltare il sapore di alcuni alimenti o come diluente per pigmenti, aromi ed enzimi;
- liquidi di scarto ad alto contenuto di lattosio (ad esempio il siero di latte) possono essere miscelati con altri nutrienti per produrre mangimi per animali a basso costo.

1.3.2. Derivati

In Figura 3 sono riportati i principali derivati del lattosio.

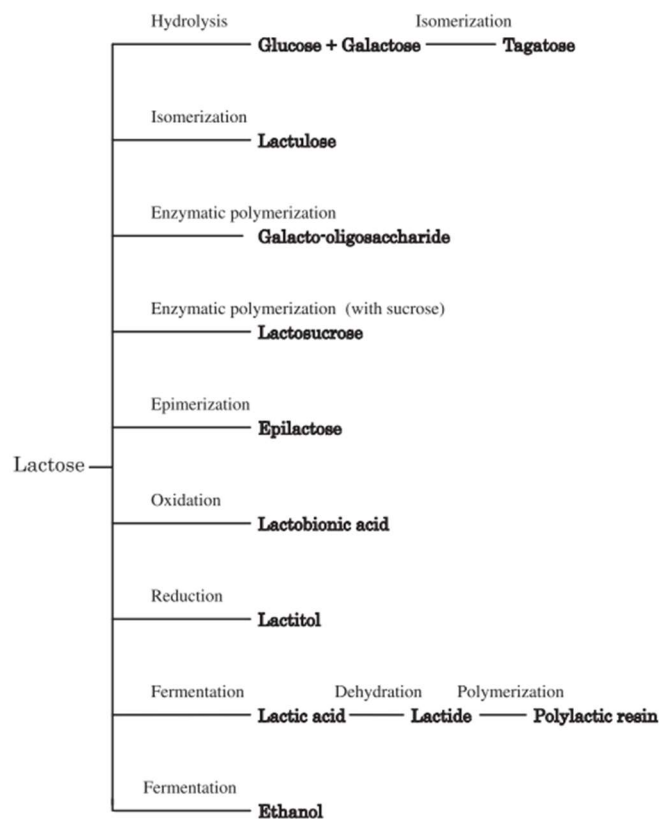


Figura 3: principali derivati del lattosio¹⁵.

Il lattulosio e l'acido lattobionico sono i derivati del lattosio di maggiore interesse per questo lavoro di tesi. Il lattulosio (Figura 4), $C_{12}H_{22}O_{11}$, è un disaccaride formato dalle unità D-galattosio e D-fruttosio che si ottiene dall'isomerizzazione dell'unità glucosidica del lattosio a fruttosio. Tale isomerizzazione è favorita dalle alte temperature, perciò i lattici commerciali che sono stati sottoposti a trattamenti UHT (*Ultra High Temperature*) potrebbero contenere lattulosio¹⁵.

Il lattulosio viene spesso usato come farmaco prebiotico, perché è in grado di inibire lo sviluppo della flora intestinale putrefattiva e creare condizioni favorevoli per la crescita di quello simbiote, come i lactobacilli. Viene anche sfruttato per risolvere problemi legati alla stitichezza o per il trattamento dell'encefalopatia epatica¹⁶.

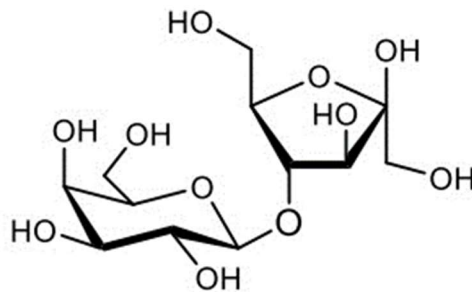


Figura 4: struttura chimica del lattulosio.

Invece, l'acido lattobionico (Figura 5), $C_{12}H_{22}O_{12}$, è un acido aldonico saccaridico formato dalle unità D-galattosio e acido gluconico ottenuto dall'ossidazione del gruppo aldeidico del glucosio contenuto nel lattosio. L'acido lattobionico può essere preparato in piccola scala mediante ossidazione elettrochimica del lattosio e viene spesso usato come bifidus¹⁵.

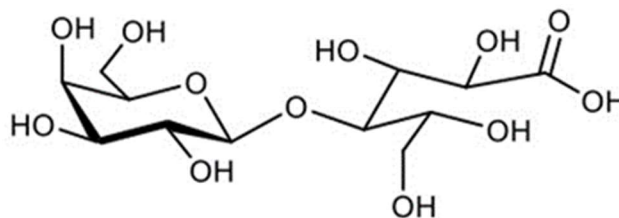


Figura 5: struttura chimica dell'acido lattobionico

1.4. Intolleranza al lattosio

Una volta introdotto mediante la dieta, per poter essere sfruttato dall'organismo umano, il lattosio deve essere idrolizzato nei suoi monosaccaridi costituenti: galattosio e glucosio. Mentre il galattosio è essenziale per la formazione delle strutture nervose, il glucosio rappresenta il substrato energetico primario dell'organismo.

Il processo di idrolisi del lattosio viene catalizzato dall'enzima β -galattosidasi, comunemente chiamato lattasi, presente nella membrana dell'orletto a spazzola degli enterociti dell'intestino tenue. Dato che per i mammiferi neonati l'unica fonte di nutrimento è il latte materno, la presenza della lattasi risulta fondamentale. L'enzima è presente già a partire dall'ottava settimana di gestazione e aumenta progressivamente fino a raggiungere il suo picco massimo alla nascita, restando poi attivo tutto il periodo dell'allattamento¹⁷. Una volta terminato lo svezzamento, l'importanza nutrizionale del lattosio nella dieta viene meno e di conseguenza in alcuni individui di mammiferi adulti la produzione della lattasi diminuisce progressivamente; questo processo è noto come non persistenza della lattasi. Come conseguenza della non persistenza della lattasi, la maggior parte degli esseri umani (circa il 70% della popolazione mondiale) non è in grado di digerire il lattosio durante l'età adulta¹⁸. Il lattosio non digerito passa attraverso l'intestino tenue senza essere assorbito (malassorbimento del lattosio), si accumula quindi nell'intestino crasso dove viene fermentato dalla flora batterica intestinale; ciò comporta un aumento del carico osmotico nonché la produzione di acidi grassi a catena corta e di gas idrogeno, metano e anidride carbonica (Figura 6). Ne derivano numerosi sintomi gastrointestinali: dolori addominali, gonfiore, borborigmi, nausea, diarrea, ma anche sintomi extraintestinali come mal di testa, affaticamento, disfunzione cognitiva, dolore muscolare o articolare, ulcere alla bocca, palpitazioni cardiache, orticaria e aumento della minzione¹⁹. Tali sintomi in alcune persone compaiono dopo aver ingerito ingenti quantità di lattosio, in altre invece anche la minima percentuale di lattosio contenuta negli alimenti può causare l'insorgenza di disturbi. Ciò dipende da diversi fattori, come il grado di carenza dell'enzima lattasi, il tempo di transito intestinale, l'ingestione di lattosio insieme ad altri alimenti e la proliferazione batterica dell'intestino tenue. La sintomatologia è quindi differente da individuo a individuo, con manifestazioni che possono essere di diversa entità ed importanza¹⁷.

Quando il malassorbimento del lattosio è associato ai sintomi di cui sopra, viene indicato come intolleranza al lattosio¹⁹. I sintomi generalmente compaiono quando la percentuale di attività della lattasi è inferiore al 50%. Inoltre alcuni studi hanno suggerito che gli individui

con non persistenza della lattasi possono consumare fino a 12-15 g/giorno di lattosio senza presentare sintomi avversi, soprattutto se il lattosio è combinato con altri alimenti¹⁷.

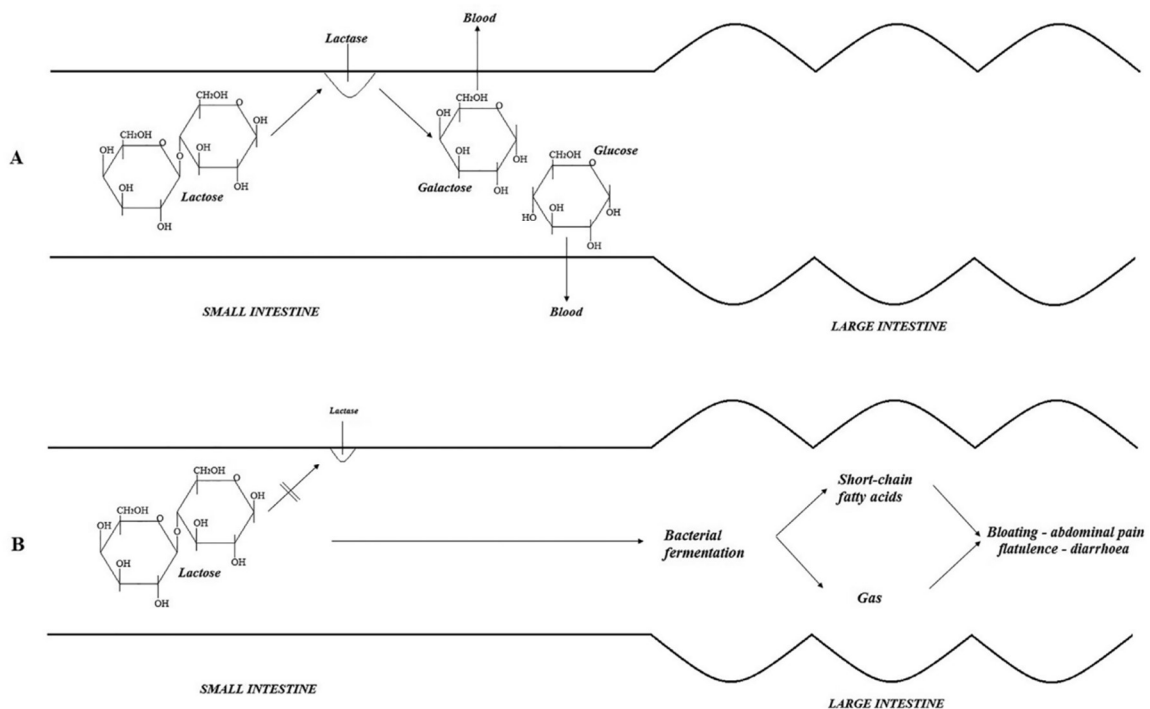


Figura 6: A-normale digestione del lattosio in presenza dell'enzima lattasi; B-assenza o deficienza dell'enzima lattasi che porta all'insorgenza dei sintomi di intolleranza al lattosio¹⁷.

1.4.1. Forme di intolleranza al lattosio

Il deficit di β -galattosidasi è la causa naturale dell'intolleranza al lattosio che può essere: primaria congenita, primaria a esordio tardivo e secondaria.

La forma di intolleranza primaria congenita è estremamente rara (40 casi segnalati²⁰), si manifesta fin dalla nascita (il neonato non appena nutrito con latte materno sviluppa diarrea) e persiste poi per tutta la vita. Questa forma ha origine genetica ed è dovuta a mutazioni del gene che codifica l'enzima lattasi, che quindi non viene prodotto²¹.

L'intolleranza al lattosio primaria a esordio tardivo è invece dovuta alla diminuzione dei livelli di β -galattosidasi nell'intestino tenue dopo lo svezzamento; ciò si verifica a partire dai 2 anni di età, oppure progressivamente nel corso dell'età adulta²².

La forma secondaria è transitoria e si manifesta a seguito di altre patologie, e si risolve nel momento in cui si ha la guarigione dalla malattia responsabile. Le patologie che causano l'ipolattasia secondaria possono essere quelle croniche intestinali, come celiachia e sindrome dell'intestino irritabile, o acute, come per esempio infiammazioni e infezioni

dell'intestino (salmonellosi, colera, enteriti), che possono insorgere anche a seguito di trattamenti chemioterapici o antibiotici²³.

1.4.2. Distribuzione dell'Intolleranza al lattosio nel mondo

L'intolleranza al lattosio è molto comune e colpisce circa due terzi della popolazione adulta mondiale; il restante terzo è invece costituito da persone che sono in grado di produrre l'enzima lattasi per tutta la vita¹⁸.

Pur essendo molto comune, l'intolleranza al lattosio non è omogeneamente distribuita in tutto il mondo: la carenza dell'enzima lattasi colpisce il 50% degli individui adulti in America, il 70% in Asia, il 28% in Europa e quasi il 100% in Africa. La distribuzione varia anche in base all'etnia, e così negli Stati Uniti l'intolleranza al lattosio è pari al 15% tra i bianchi, al 53% tra i messicani e all'80% tra gli afro-americani; invece, in Europa, le percentuali sono ancora più variabili e oscillano tra il 4% in Scandinavia e il 70% nel Sud Italia¹⁷ (Figura 7). Per spiegare queste differenze sono state avanzate diverse ipotesi, una in particolare sottolinea che lo sviluppo preferenziale della persistenza della lattasi si osserva nelle aree in cui i bovini domestici sono stati storicamente importanti e, di conseguenza, dove i latticini hanno giocato un ruolo di primo piano nella dieta, contribuendo così ad una selezione naturale di soggetti capaci di digerire il lattosio. Ciò è particolarmente vero nel nord Europa. Inoltre, bisogna considerare che le grandi migrazioni hanno sicuramente contribuito alla coesistenza di gruppi di persone con diversa tolleranza al lattosio nelle stesse aree, come nel caso degli individui con antenati europei che migrarono in America e in Australia²⁴.

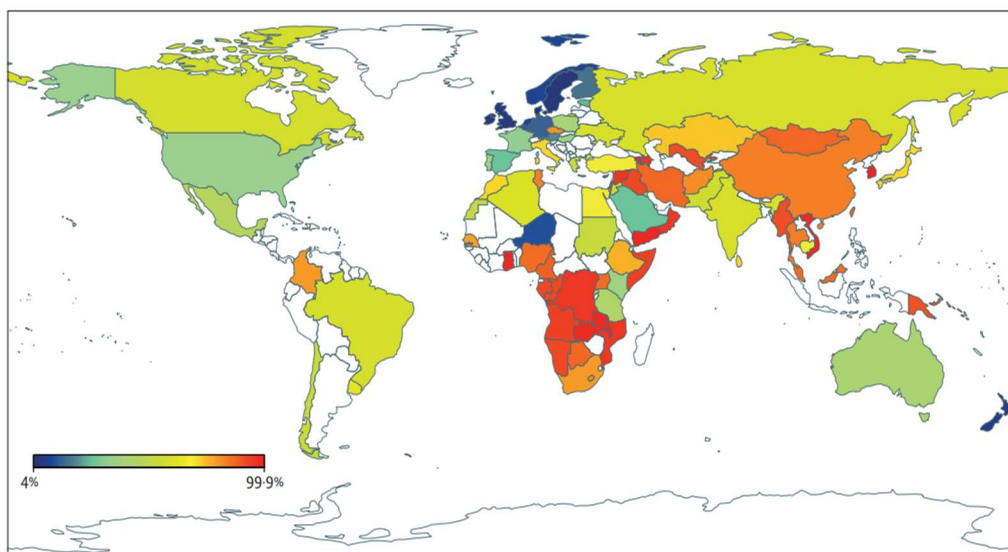


Figura 7: distribuzione percentuale dell'intolleranza al lattosio nel mondo²⁴.

1.4.3. Metodi diagnostici e terapia

Attualmente sono disponibili diversi metodi diagnostici per identificare le persone con intolleranza al lattosio, i più comuni sono:

- **Lactose Breath Test (LBT):** metodo che sfrutta l'aumento della produzione di gas idrogeno nell'intestino dovuta alla fermentazione del lattosio non digerito. Il test prevede la misurazione dell'idrogeno esalato a digiuno, la successiva ingestione di 25-50g di lattosio, e la misurazione dell'idrogeno esalato ogni 15 minuti per le successive 3-6 ore. Tale metodo, nonostante la lunga durata, è il più usato per diagnosticare l'intolleranza al lattosio dati i suoi numerosi vantaggi: non è invasivo, è facile da eseguire ed ha un costo limitato. Presenta però la possibilità di rilevare falsi negativi causati dal transito oro-cecale lento o da tutte quelle condizioni che possono alterare la normale flora batterica intestinale, come il recente uso di antibiotici, di probiotici o l'abuso di lassativi. La possibilità di generare falsi positivi può invece essere dovuta a un'attività fisica eccessiva in prossimità dell'esecuzione del test, il recente uso di farmaci (come aspirina o inibitori della pompa protonica), ma anche il fumo o la recente assunzione di alcuni alimenti, quali fagioli o mais, che provocano un aumento della concentrazione di idrogeno. Considerando tali problemi, risulterebbe utile associare questo metodo ad un'altra tecnica diagnostica¹⁷.
- **Test genico:** valuta il polimorfismo del gene che codifica per la lattasi. Vari studi hanno infatti dimostrato che l'intolleranza al lattosio ha origini genetiche, associabili ad un polimorfismo C/T nella posizione -13910 che si trova a monte del sito di inizio della trascrizione del gene della lattasi. Solo se la variazione è presente in entrambe le copie del gene (genotipo CC), l'individuo è intollerante al lattosio²⁵. Il test genico consiste quindi nell'isolamento del DNA, ottenuto mediante un prelievo di sangue, e nella successiva analisi del polimorfismo C/T-13910. Questo metodo non consente però di individuare la forma di intolleranza al lattosio secondaria, che risulta importante da determinare per intraprendere una terapia adeguata. Pertanto, il test genico può essere eseguito dopo aver accertato la presenza di intolleranza al lattosio con un altro metodo, per escludere o confermare una forma primaria. È invece da preferire come prima scelta se ci sono condizioni che non permettono di eseguire le altre metodiche, ad esempio per i bambini al di sotto dei 6 anni di età¹⁷.
- **Test di tolleranza al lattosio:** la digestione del lattosio provoca un aumento della glicemia, e quindi l'assenza di questo aumento indica un mancato assorbimento del

lattosio. Il test prevede la misurazione della glicemia prima e in seguito all'assunzione di 50g di lattosio, dopo 30, 60 e 120 minuti²⁶. Si verificano però falsi negativi e falsi positivi nel 20% dei soggetti indagati; questi risultati alterati sono imputabili al tempo di svuotamento gastrico e al metabolismo del glucosio, poiché variano da paziente a paziente. Per queste motivazioni, oltre che per la sua bassa sensibilità e specificità, questo tipo di test diagnostico viene eseguito raramente²⁷.

Una volta diagnosticata l'intolleranza al lattosio si procede con la terapia adeguata. In passato, agli individui affetti da ipolattasia veniva richiesto di seguire una dieta priva di lattosio per ridurre le manifestazioni dei sintomi. L'eliminazione di tutti i prodotti lattiero-caseari causava però carenze di micronutrienti, in particolare del calcio, con conseguente compromissione della salute delle ossa. Oggi, considerando anche che molti individui intolleranti possono sopportare fino a 12-15g di lattosio al giorno, non è più raccomandato adottare una dieta completamente priva di lattosio. Fortunatamente nel mercato odierno sono disponibili diversi alimenti e diverse bevande alternative, sia artificiali che naturali, come latte e latticini senza lattosio (sottoposti a idrolisi del lattosio) e prodotti a base vegetale^{17,19}.

Un'altra valida opzione è rappresentata dall'integrazione enzimatica con lattasi esogena ottenuta o da lievito (*Kluyveromyces lactis*) o da funghi (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*). La sua assunzione, sottoforma di capsule o liquido, è prevista ogni volta che si ingeriscono alimenti contenenti lattosio perché il suo ruolo è quello di sostituire la funzione dell'enzima nativo, ovvero la scissione del lattosio in glucosio e galattosio. Il suo utilizzo ha permesso di ottenere un miglioramento delle caratteristiche cliniche dei pazienti intolleranti al lattosio²⁰.

1.5. Prodotti *Lactose Free*

Il parametro RDA (*Recommended Dietary Allowances*) indica il livello medio giornaliero di assunzione di nutrienti sufficiente a soddisfare il fabbisogno nutrizionale degli individui sani in una determinata fascia di età. Una dieta che prevede l'esclusione di tutti i prodotti contenenti lattosio non soddisfa le RDA per le esigenze nutrizionali raccomandate. Fortunatamente, grazie ai recenti sforzi compiuti dai ricercatori per lo sviluppo di tecnologie di rimozione del lattosio, nella maggior parte dei supermercati dei paesi occidentali è oggi

disponibile un'ampia gamma di latti e prodotti lattiero-caseari senza o a ridotto contenuto di lattosio. Questi prodotti sono stati sviluppati in modo tale da essere, dal punto di vista nutrizionale e delle proprietà sensoriali, del tutto paragonabili agli alimenti che contengono lattosio e permettere quindi ai soggetti intolleranti di non andare incontro a carenze nutrizionali²⁸.

Esistono anche degli alimenti naturalmente privi di lattosio. I formaggi stagionati hanno una concentrazione di lattosio molto bassa perché il disaccaride viene convertito in acido lattico dai batteri lattici durante il processo di maturazione dei formaggi. Così, ad esempio, il contenuto di lattosio del Grana Padano DOP, del Parmigiano Reggiano DOP e del Pecorino Romano DOP è inferiore a 10 mg/kg²⁹. Il burro è un ulteriore prodotto lattiero-caseario a basso contenuto di lattosio, infatti, durante la sua produzione, la parte acquosa del latte, insieme alla maggior parte dei componenti idrosolubili, tra cui il lattosio, vengono rimossi³⁰.

1.5.1. Produzione industriale del latte senza lattosio

I metodi comunemente utilizzati per ridurre il contenuto di lattosio nel latte sono di tipo enzimatico: sfruttano l'attività della lattasi neutra per promuovere l'idrolisi del lattosio a glucosio e galattosio. Tali processi enzimatici sono due: processo in batch (pre-idrolisi) e processo a settico (post idrolisi).

Processo in batch (pre-idrolisi): in questo processo la lattasi neutra viene aggiunta ai serbatoi di latte crudo e viene lasciata incubare per circa 24 ore sotto lenta agitazione. Poiché il latte in questa fase non è ancora sterile, tale processo deve essere eseguito in condizioni di refrigerazione (4-8°C) per evitare la crescita microbica. Terminato il periodo di incubazione, il latte viene pastorizzato, omogenizzato e confezionato. L'enzima viene quindi inattivato durante la pastorizzazione/sterilizzazione del latte, perciò non rimane alcuna attività enzimatica residua nel prodotto finale (Figura 8)³¹.

Quando si utilizza il processo batch per produrre il latte senza lattosio è importante considerare una serie di aspetti³⁰:

- gli enzimi utilizzabili in questo processo devono avere attività elevata a pH neutro e alle basse temperature;

- il dosaggio dell'enzima è relativamente elevato perché deve essere sufficiente a garantire il raggiungimento del limite richiesto per l'assenza di lattosio durante il tempo limitato e la bassa temperatura dell'incubazione;
- per risparmiare denaro e risorse, diversi studi hanno sviluppato strategie di immobilizzazione delle lattasi su un supporto solido che consente quindi il riutilizzo dell'enzima ed evita che qualche residuo enzimatico rimanga nel prodotto finale. I progetti di immobilizzazione della lattasi sono illustrati brevemente in Figura 9, tuttavia i costi risparmiati derivanti dal riutilizzo degli enzimi devono essere conteggiati rispetto ai costi, spesso elevati, del supporto e dell'immobilizzazione, di conseguenza tali progetti sono poco utilizzati in ambito industriale;
- lo step di incubazione prevede la conservazione del latte per 24 ore, quindi, poiché la pastorizzazione viene posticipata di un giorno, la qualità del latte deve essere impeccabile per prevenire il deterioramento microbico.

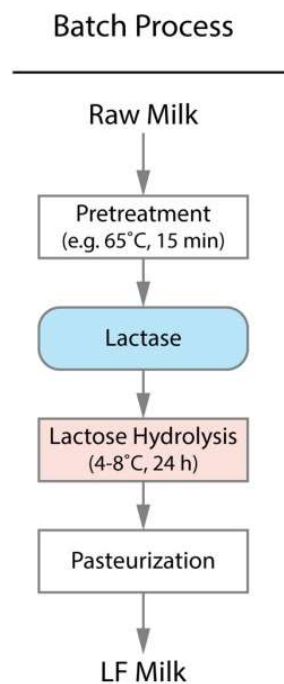


Figura 8: schema a blocchi del processo in batch per la produzione industriale del latte. Lo step di aggiunta della lattasi è evidenziato in azzurro, mentre lo step in cui avviene la reazione di idrolisi del lattosio è mostrato in rosa³¹.

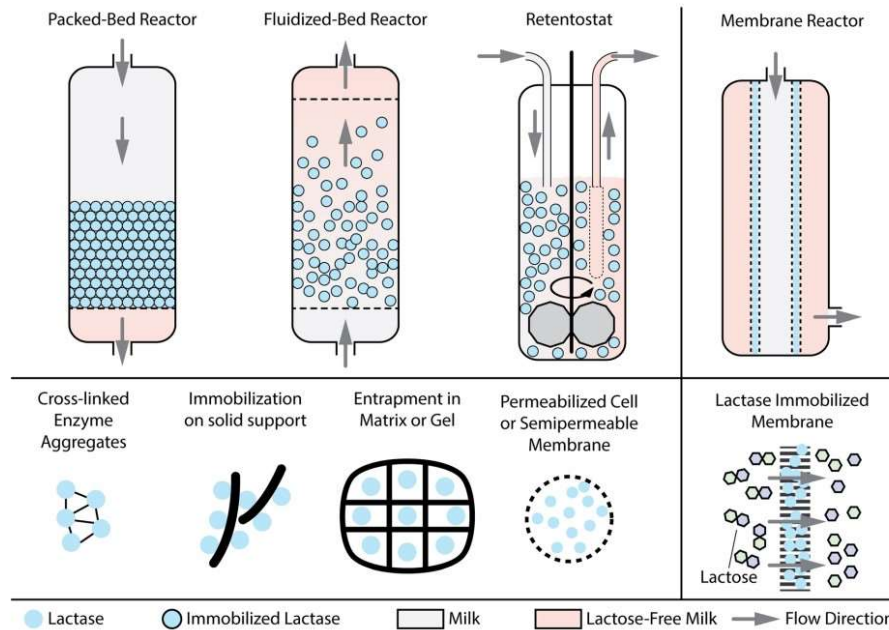


Figura 9: pannello superiore-tipiche configurazioni dei bioreattori che utilizzano lattasi immobilizzata. Pannello inferiore-modalità di immobilizzazione dell'enzima lattasi adatta alla rispettiva configurazione del bioreattore³¹.

Processo asettico (post-idrolisi): in questo processo il latte viene prima sterilizzato utilizzando la procedura UHT e in seguito, subito prima del confezionamento, viene addizionato di un preparato sterile di lattasi. L'idrolisi del lattosio avviene dunque nella confezione finale del latte. Poiché il latte UHT viene spesso tenuto in quarantena per 3 giorni a temperatura ambiente, c'è tempo sufficiente per l'idrolisi completa prima che il latte venga spedito al rivenditore (invece per il latte pastorizzato, per cui non è previsto un periodo di quarantena, non può essere utilizzato il processo asettico) (Figura 10)³¹.

È importante considerare una serie di aspetti quando si utilizza il processo asettico³⁰:

- il dosaggio dell'enzima può essere molto inferiore rispetto al processo batch perché sia il tempo di incubazione, sia la temperatura sono più elevati;
- viene utilizzata lattasi sterile che può essere ottenuta mediante due diverse procedure: nella prima procedura l'enzima lattasi viene pre-sterilizzata dal suo produttore, nella seconda procedura l'enzima non sterile viene sterilizzato mediante un filtro subito prima della sua aggiunta al latte presso il caseificio, questo step richiede attrezzatura dedicata perché devono essere evitate le contaminazioni batteriche;

- l'idrolisi del lattosio nel prodotto finale non viene bloccata e ciò porta ad un'elevata presenza di monosaccaridi nel latte che possono quindi dare più facilmente la reazione di Maillard. Questo si traduce in una maggiore formazione di sapori sgradevoli e di doratura del latte. Per questi motivi il latte UHT senza lattosio ha una durata di conservazione inferiore rispetto al latte UHT normale.

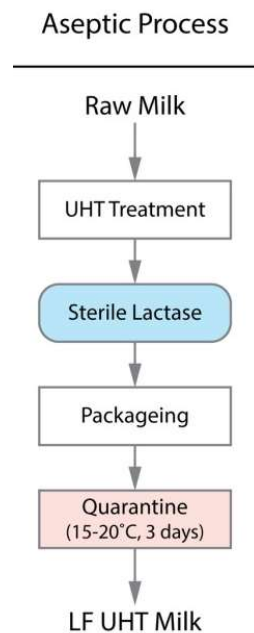


Figura 10: schema a blocchi del processo asettico per la produzione industriale del latte. Lo step di aggiunta della lattasi è evidenziato in azzurro, mentre lo step in cui avviene la reazione di idrolisi del lattosio è mostrato in rosa³¹.

Un effetto “collaterale” dell’utilizzo della lattasi per eliminare il lattosio è il conseguente aumento di dolcezza del latte; infatti, il glucosio e il galattosio generati sono molto più dolci del lattosio (Tabella 4). La maggior dolcezza del latte è particolarmente apprezzata in Asia e in America Latina, risulta invece indesiderata tra i consumatori europei. Pertanto, sono state messe a punto delle nuove strategie per rimuovere circa il 50% del lattosio prima dell’idrolisi enzimatica, così da ottenere un latte senza lattosio con una dolcezza simile a quella del latte normale³¹. Il principale problema della rimozione preventiva del lattosio è la sua separazione dalle proteine, questo può essere ovviato usando metodi di separazione tramite membrana, come: ultrafiltrazione, nanofiltrazione, osmosi inversa ed elettrodialisi²⁹.

Tabella 4: potere dolcificante degli zuccheri saccarosio, glucosio, galattosio e lattosio. Il potere dolcificante di una sostanza è il valore numerico che consente di esprimere la capacità addolcente della stessa. Per convenzione viene attribuito potere dolcificante 1 ad una soluzione di saccarosio al 10%. Il potere dolcificante delle altre sostanze viene quindi espresso come rapporto fra la concentrazione della soluzione di saccarosio al 10% e la concentrazione di una soluzione della sostanza indagata che ha la stessa intensità di dolcezza³².

Zucchero	Potere dolcificante
Saccarosio (riferimento)	1.00
Glucosio	0.75
Galattosio	0.50
Lattosio	0.16

Una volta ottenuto il latte senza lattosio, esso può essere ulteriormente trasformato in yogurt, formaggi, gelato, latte in polvere e tanti altri prodotti senza lattosio, oppure tali prodotti possono essere ottenuti mediante processi specifici. Ad esempio, in Figura 11 vengono brevemente illustrati i processi di produzione di yogurt e gelati senza lattosio.

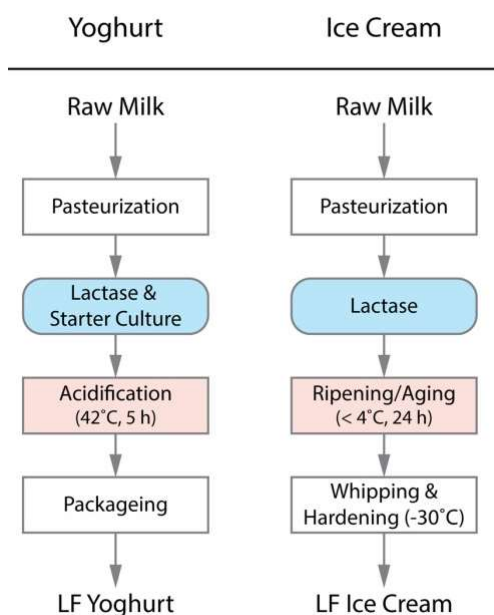


Figura 11: schema a blocchi della produzione industriale di yogurt e gelato senza lattosio. Lo step di aggiunta della lattasi è evidenziato in azzurro, mentre lo step in cui avviene la reazione di idrolisi del lattosio è mostrato in rosa³¹.

1.5.2. Legislazione ed etichettatura

Il primo strumento per fornire informazioni nutrizionali e sanitarie ai consumatori è l'etichetta da porre su tutti i prodotti. Per proteggere i soggetti allergici/intolleranti, la legislazione europea richiede di fornire le informazioni riguardanti gli allergeni sulle etichette degli alimenti. Ai sensi del Regolamento (UE) n. 1169/2011 la presenza di allergeni in un prodotto alimentare deve essere dichiarata nell'elenco degli ingredienti, quindi il latte e i suoi derivati, compreso il lattosio, devono essere riportati, questo consente ai consumatori intolleranti al lattosio di effettuare scelte consapevoli per la loro sicurezza¹⁹.

Allo stesso tempo le norme in materia di etichettatura e di composizione, che indicano l'assenza o la presenza ridotta di lattosio nei prodotti alimentari, non sono attualmente armonizzate a livello dell'Unione Europea. Manca uno specifico valore limite che stabilisca quando un alimento si possa definire "senza lattosio", così come mancano metodi ufficiali per la determinazione del lattosio nei prodotti lattiero-caseari. Solo per gli alimenti per lattanti (bambini fino ai 12 mesi di vita) esiste la Direttiva 2006/141/CE che autorizza l'uso della dichiarazione "senza lattosio" per i prodotti con un contenuto di lattosio inferiore ai 10mg/100kg. Tuttavia, vista l'elevata incidenza dell'intolleranza al lattosio tra la popolazione adulta, per motivi di chiarezza e coerenza bisognerebbe promuovere l'introduzione di norme sull'uso delle diciture che indicano l'assenza di lattosio in tutti i prodotti alimentari, norme che dovrebbero quindi rientrare nel Regolamento (UE) n. 1169/2011 tenendo conto del parere scientifico dell'EFSA (*European Food Safety Authority*) del 10 settembre 2010 sulle soglie relative al lattosio nell'intolleranza al lattosio³³.

In attesa che a livello di Unione Europea venga emanata una norma chiara e condivisa per i prodotti delattosati e vengano adottate misure pertinenti atte ad ammettere tale indicazione sugli alimenti di consumo quotidiano, il Ministero della Salute italiano stabilisce che:

«L'indicazione "senza lattosio" può essere impiegata per latti e prodotti lattiero-caseari con un residuo di lattosio inferiore a 0.1g per 100g o 100mL. I prodotti con tale indicazione devono riportare l'informazione in etichetta sulla specifica soglia residua di lattosio con modalità del tipo "meno di ...". La soglia indicata deve risultare comunque inferiore a 0.1g per 100g o 100mL.

Solo per i latti e i latti fermentati può essere impiegata l'indicazione "a ridotto contenuto di lattosio" se il residuo del disaccaride è inferiore a 0.5g per 100g o 100mL. Sulle etichette di tali prodotti va riportato che il tenore di lattosio è "meno di 0.5g per 100g o 100mL".

Per fornire una informazione precisa ai consumatori sui contenuti dei prodotti delattosati “senza lattosio” o a ridotto tenore di lattosio”, va riportata in etichetta anche una indicazione del tipo “Il prodotto contiene glucosio e galattosio in conseguenza della scissione del lattosio”»³⁴.

Inoltre in Italia, il 30 maggio 2013, nacque l'Associazione Italiana Latto-Intolleranti (AILI) con l'obiettivo di divulgare la corretta conoscenza dell'intolleranza al lattosio. AILI oggi rappresenta e tutela la categoria degli intolleranti al lattosio a livello nazionale, l'associazione ritiene che un prodotto sia:

- **senza lattosio** se contiene nella sua composizione una concentrazione di lattosio inferiore allo 0.01% (= 0.01g/100g =100ppm);
- **a ridotto contenuto di lattosio** se contiene nella sua composizione una concentrazione di lattosio inferiore allo 0.1% (=0.1g/100g =1000ppm);
- **naturalmente privo di lattosio** se non contiene ingredienti lattei al suo interno.

In aggiunta AILI ha contribuito alla creazione del primo marchio di certificazione europeo che identifica e certifica i prodotti senza lattosio o senza latte, denominato Lfree ® (Figura 12). Tale simbolo è stato sviluppato utilizzando un documento tecnico-scientifico che stabilisce standard e valori limite richiesti affinché un prodotto possa essere certificato senza lattosio o senza latte, rappresenta quindi una garanzia per tutti i consumatori intolleranti al lattosio¹⁹.

Anche altri Paesi Europei, come Finlandia, Norvegia, Svezia, Danimarca, Repubblica Ceca e Spagna, hanno adottato i suddetti limiti in attesa che il confronto comunitario porti a regole condivise per l'utilizzo di indicazioni sul contenuto di lattosio negli alimenti³³.

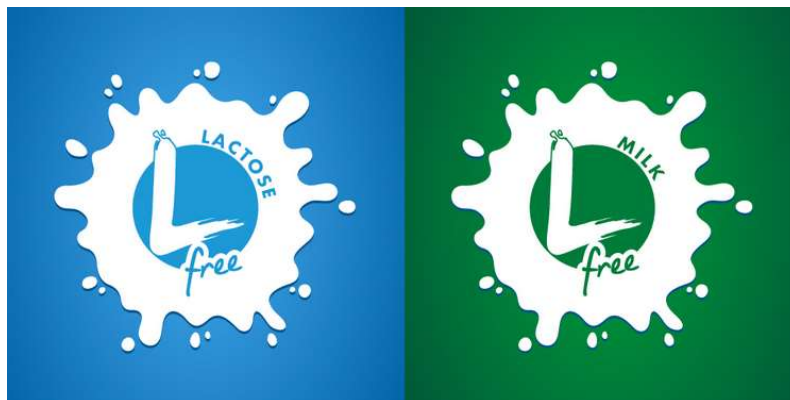


Figura 12: marchio Lfree ® che identifica e certifica i prodotti senza lattosio o senza latte³³.

1.6. Metodi di analisi del lattosio

Vista l'elevata incidenza dell'intolleranza al lattosio, sono al momento di grande e crescente interesse tutti i prodotti lattiero-caseari classificati come *lactose free*. Le industrie alimentari necessitano quindi di metodi di analisi per la determinazione dei livelli di lattosio in matrici alimentari e, considerati i limiti di rivelabilità richiesti, tali metodi devono essere altamente sensibili, accurati e selettivi, ma anche rapidi e semplici in modo tale da poter essere facilmente utilizzati dagli operatori.

Attualmente, a livello internazionale, nessun metodo di analisi è stato riconosciuto e convalidato come standard per la determinazione del lattosio nel latte a basso tenore di lattosio, nonostante le industrie ne abbiano una forte necessità.

Tradizionalmente, per la determinazione del lattosio nel latte, sono state impiegate varie tecniche riconosciute dall'*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) scelte per la loro facile e veloce applicazione e per il loro basso costo, ma che presentano svantaggi non trascurabili come la scarsa selettività e l'alto limite di rivelabilità³⁵. Queste tecniche sono ad esempio la polarimetria¹², la crioscopia³⁶, il rilevamento nel medio infrarosso³⁷ e il pH differenziale³⁸.

Vengono inoltre sfruttati di frequente saggi enzimatici con rivelazione per via spettrofotometrica, questi si basano sull'idrolisi enzimatica del lattosio in glucosio e galattosio seguita poi da tre possibili percorsi biochimici, illustrati in Figura 13, che portano alla produzione di specie rivelabili spettrofotometricamente la cui concentrazione può essere correlata alla concentrazione di lattosio inizialmente presente³⁹. I kit di test enzimatici disponibili sul mercato per la determinazione del lattosio, sono però in generale soggetti ad una serie di problematiche legate alla diversità biologica dei ceppi enzimatici usati e alla non trascurabile manipolazione del campione che deve essere effettuata per ottenere il dato analitico (controllo del dosaggio enzimatico, della temperatura, del pH, della forza ionica), con conseguente elevata incertezza del dato stesso⁴⁰.

Recentemente anche i biosensori hanno riscosso un grande successo, essi sfruttano un enzima altamente specifico e selettivo per il lattosio e sono in grado di tradurre il rilevamento dell'analita in un segnale amperometrico o potenziometrico. Oggi sono disponibili diversi biosensori commerciali per la determinazione del lattosio, tra cui: Lactosens® (DirectSens GmbH), Biomilk® (Biolan), l'analizzatore biochimico YSI (Xylem Inc.) e SpotCheck Plus TM (Hygiena)³⁵.

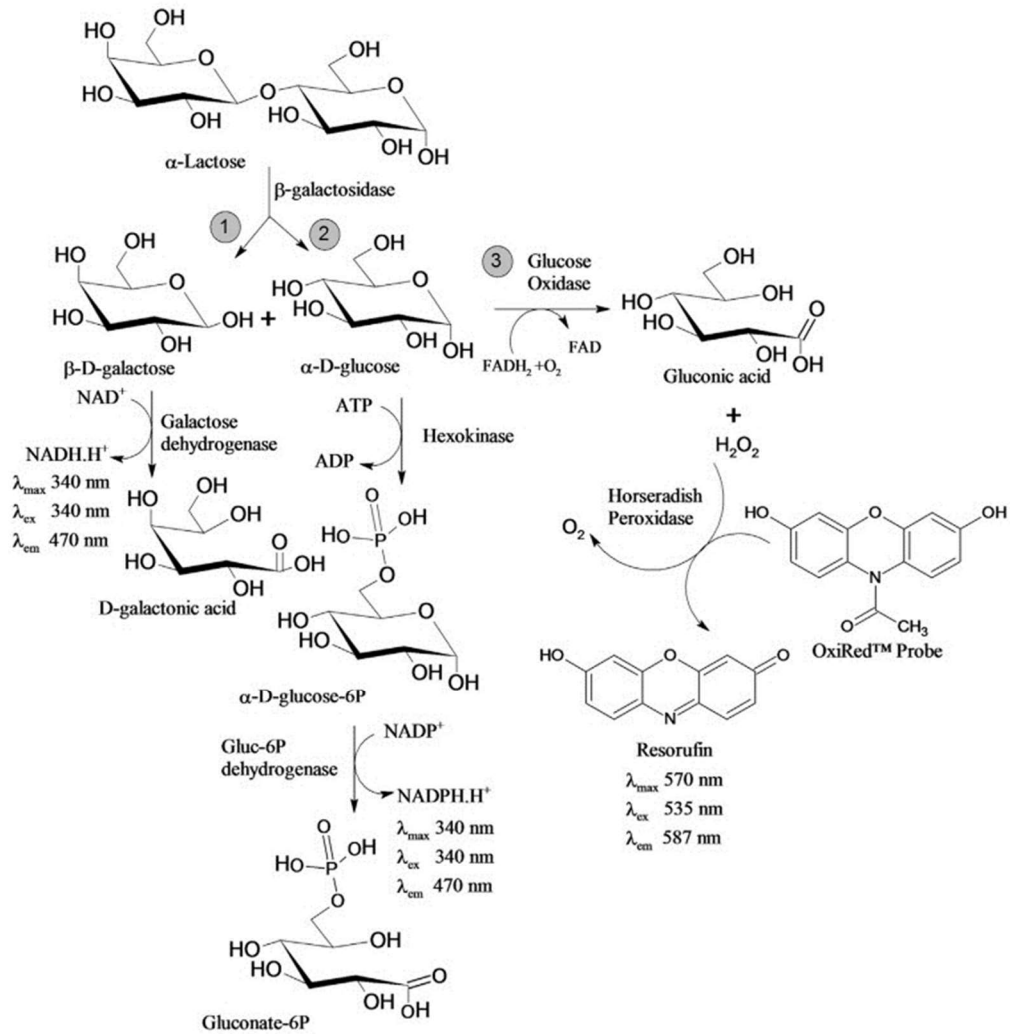


Figura 13: vie biochimiche dei principali kit enzimatici disponibili sul mercato e utilizzabili per quantificare il lattosio nel latte e i suoi derivati³⁹.

La letteratura riporta l'uso della Gas-Cromatografia con rilevazione a ionizzazione di fiamma (GC-FID) e dell'elettroforesi capillare (CE) con rivelazione elettrochimica o spettrofotometrica per la quantificazione del lattosio a bassi livelli nel latte, metodi che permettono di raggiungere limiti di rivelabilità significativamente bassi ma che richiedono step di derivatizzazione del campione lunghi e impegnativi⁴¹.

Inoltre, data la natura polare dell'analita, in letteratura sono presenti molti metodi che ricorrono alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con colonne cromatografiche ad interazione idrofila (HILIC)⁴². L'approccio tradizionale dell'analisi degli zuccheri mediante HPLC è la cromatografia su fase normale con colonne amminiche o ad esclusione ionica, su fase stazionaria divinilbenzene-polistirene reticolato³⁹. L'HPLC viene spesso accoppiata alla spettrometria di massa (MS) o al rilevatore ad indice di rifrazione (RID), che risulta però

sensibile alle variazioni di temperatura e pressione e manca di sensibilità, non è dunque adatto per quantificare le basse concentrazioni di lattosio presenti nei prodotti *lactose free*⁴¹.

La cromatografia a scambio anionico ad elevate prestazioni accoppiata ad un rilevatore amperometrico pulsato (HPAEC-PAD) è, ad oggi, uno dei metodi più adatti per l'analisi dei carboidrati, di conseguenza può essere applicata anche per la determinazione quantitativa del lattosio. L'HPAEC-PAD viene frequentemente utilizzata nei monitoraggi di routine nelle industrie alimentari e nelle applicazioni di ricerca⁴³. Questa tecnica si basa sul fatto che i saccaridi neutri sono acidi deboli, in condizioni alcaline vengono quindi convertiti ad ossianioni rendendo possibile la loro separazione selettiva mediante colonne cromatografiche a scambio anionico⁴⁴. Inoltre il rilevamento elettrochimico è selettivo e sensibile e consente l'analisi di analiti presenti a basse concentrazioni, anche in matrici complesse⁴⁵.

Uno studio condotto da E. Churakova E. et al. (2019)³⁵ ha confrontato le prestazioni della tecnica analitica HPAEC-PAD con quelle di altri nove metodi comunemente utilizzati nelle industrie alimentari (HPLC-RID, 3 metodi enzimatici, crioscopia, 3 biosensori e NMR), dimostrando l'elevata accuratezza, precisione, sensibilità dell'HPAEC-PAD rispetto agli altri metodi testati. Gli autori dello studio affermano che il metodo HPAEC-PAD risulta validato, può dunque essere usato come metodo standard per comparare le performance degli altri metodi analitici impiegati per la determinazione degli zuccheri.

2. Scopo della tesi

La determinazione quantitativa dell'analita lattosio in una matrice alimentare complessa, come il latte, alle concentrazioni richieste dalle necessità delle industrie alimentari, è, dal punto di vista analitico, un'analisi piuttosto lunga e articolata. Prevede uno step di pre-trattamento del campione, per isolare l'analita dalla matrice, e un successivo step di analisi strumentale che può richiedere tempi piuttosto lunghi (30-60 minuti), specialmente nel caso dei metodi cromatografici.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è la validazione di un metodo analitico per la determinazione quantitativa del lattosio in campioni di latte commerciale *lactose free*. Il metodo da validare si basa sulla *Flow Injection Analysis* (FIA) accoppiata alla spettrometria di massa tandem (MS/MS) ad alta risoluzione. Tale metodo, grazie al sistema di rivelazione basato su spettrometria di massa, permette di semplificare la procedura di preparazione del campione e di limitare notevolmente (2 minuti) il tempo necessario all'analisi strumentale, migliorando al contempo l'accuratezza e i limiti di rivelabilità. Per la validazione del metodo sono stati raccolti numerosi dati relativi a campioni con variabile contenuto di grasso, per confermare l'efficacia della quantificazione su matrici eterogenee.

I campioni, oltre che con il metodo FIA-MS/MS, sono stati analizzati anche mediante cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni (HPAEC) accoppiata ad un rivelatore amperometrico pulsato (PAD), per confrontare le prestazioni dei due metodi analitici.

3. Tecniche sperimentali e strumentazioni

3.1. Spettrometria di massa ad alta risoluzione

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che offre performance migliori rispetto ad altre tecniche di analisi, in termini di selettività, sensibilità e limiti di rilevabilità (fino a tre ordini di grandezza inferiori rispetto alle altre tecniche); per questo viene ampiamente utilizzata in vari ambiti di interesse come quello farmaceutico, clinico, alimentare, ambientale e forense.

La spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) è in grado di fornire un elevato numero di informazioni basandosi sulla misurazione accurata dei rapporti massa su carica (m/z) dei vari analiti. Le informazioni che si possono ricavare da uno spettro di massa sono:

- la formula bruta della molecola in esame;
- la composizione isotopica di una sostanza con la corrispettiva abbondanza relativa;
- l'identificazione o la conferma della presenza di determinati analiti nei campioni analizzati;
- informazioni quantitative.

Uno spettrometro di massa (Figura 14) può essere descritto schematicamente analizzando le sue componenti principali:

- Sistema di introduzione del campione. L'iniezione può avvenire mediante un sistema a flusso, come ad esempio un sistema cromatografico, oppure il campione può essere caricato direttamente dall'operatore. Se il campione si trova allo stato liquido o gassoso per la sua iniezione viene sfruttato un sistema di valvole, se invece è allo stato solido viene introdotto mediante sonda, in ogni caso viene iniettato nello strumento in piccole quantità.
- Sorgente di ioni. Le molecole che compongono il campione vengono ionizzate, gli ioni che si generano dipendono dal tipo di sorgente utilizzata. In particolare, la sorgente ESI (*ElectroSpray Ionization*) è la più diffusa; essa consente di attuare la ionizzazione elettrospray che è una tecnica di ionizzazione "soft" (Figura 15). In questa tecnica, la soluzione diluita contenente il campione passa attraverso un capillare di

nebulizzazione, tra questo capillare e un elettrodo cilindrico circostante viene applicata una differenza di potenziale di 3-6kV. Il campo elettrico generato, tra la punta del capillare e l'elettrodo, provoca la formazione del "cono di Taylor", la conseguente nebulizzazione del flusso e quindi la formazione di goccioline cariche. Grazie ad un flusso di gas caldo in controcorrente, si ha l'evaporazione del solvente dalle goccioline cariche, evaporazione che aumenta sempre di più man mano che si avvicinano all'elettrodo. Questo provoca un aumento della densità di carica sulla superficie delle gocce fino al raggiungimento del "limite di Rayleigh" oltre al quale le repulsioni coulombiane diventano eccessivamente elevate e si ha la disgregazione delle goccioline, tale fenomeno prende il nome di "esplosione di Coulomb".

La sorgente ESI generalmente viene impiegata per l'analisi di molecole con elevato peso molecolare e non volatili, ma può essere usata anche per analizzare piccole molecole polari. Questo tipo di ionizzazione porta alla formazione di specie protonate $[M+H]^+$ o deprotonate $[M-H]^-$ dell'analita o di suoi addotti, generalmente con Na^+ , K^+ , Cl^- , $HCOO^-$, o CH_3COO^- .

- Analizzatore di massa. L'analizzatore separa gli ioni generati dalla sorgente in base al loro rapporto m/z sfruttando campi magnetici o elettrici o sfruttando la loro velocità. Esistono vari analizzatori di massa, ma, ai fini di questo lavoro di tesi, solo due sono di rilevanza: il quadrupolo e l'Orbitrap.

Il quadrupolo (Figura 16) è costituito da quattro barre allineate lungo una direzione z alle quali viene applicata una corrente continua, le coppie di barre opposte sono sottoposte ad una tensione dello stesso segno, a questa viene sovrapposta una corrente alternata a radiofrequenza, con uno sfasamento di 180° . Il campo elettrico risultante fa sì che, quando gli ioni entrano nel sistema quadrupolare, percorrano lo spazio lungo z secondo una traiettoria oscillante perché nel tempo si ha un'alterazione periodica del segno della carica delle barre, con conseguente modificazione di repulsione ed attrazione di queste con gli ioni. Regolando il campo elettrico generato dalle barre, si può selezionare il valore m/z desiderato degli ioni che attraverseranno il quadrupolo, gli ioni con m/z inferiore o superiore a quello selezionato saranno costretti a percorrere traiettorie che li porteranno ad impattare con le barre impedendogli di raggiungere il rilevatore. Questo consente di selezionare un particolare ione o di effettuare una scansione di m/z variando il campo elettrico.

L'Orbitrap (Figura 17) è un analizzatore di massa costituito da una trappola ionica elettrostatica che permette di ottenere spettri di massa ad alta risoluzione mediante l'applicazione della trasformata di Fourier alle diverse frequenze delle correnti immagine generate dal moto degli ioni con diverso m/z all'interno della trappola stessa. Questo analizzatore è formato da: un elettrodo fusiforme centrale, capace di generare un gradiente di campo assiale attorno al quale si muovono gli ioni con una traiettoria a spirale, e un elettrodo esterno separato in due parti da un anello isolante di ceramica, tra le quali è posto un amplificatore differenziale che rivela la corrente immagine indotta dagli ioni in movimento.

- Rivelatore. Il rivelatore solitamente è un trasduttore di ioni in grado di associare ad ogni rapporto m/z una corrente. Esso poi invia i dati ad un computer che quantifica i frammenti e restituisce il segnale sottoforma di spettro di massa, registrando gli ioni in proporzione alla loro abbondanza relativa. Nel caso lo spettrometro di massa sia dotato di un Orbitrap come analizzatore di massa, l'Orbitrap stesso funge da rivelatore^{46,47}.



Figura 14: schema a blocchi delle componenti principali che costituiscono uno spettrometro di massa.

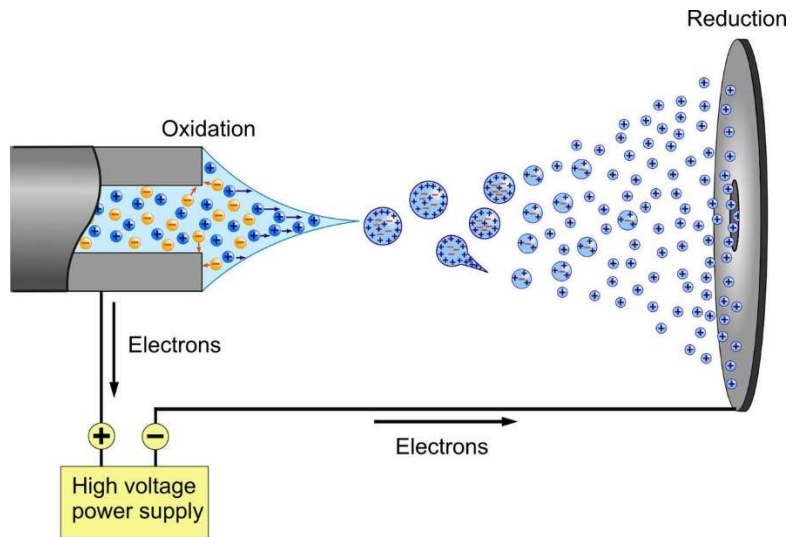


Figura 15: rappresentazione schematica della ionizzazione elettrospray.

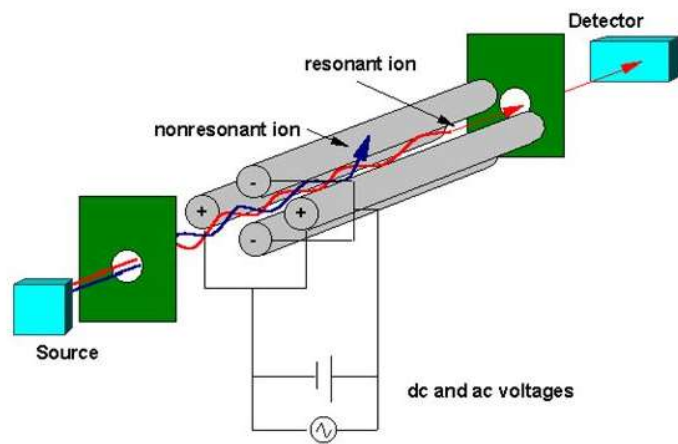


Figura 16: rappresentazione schematica di un quadrupolo.

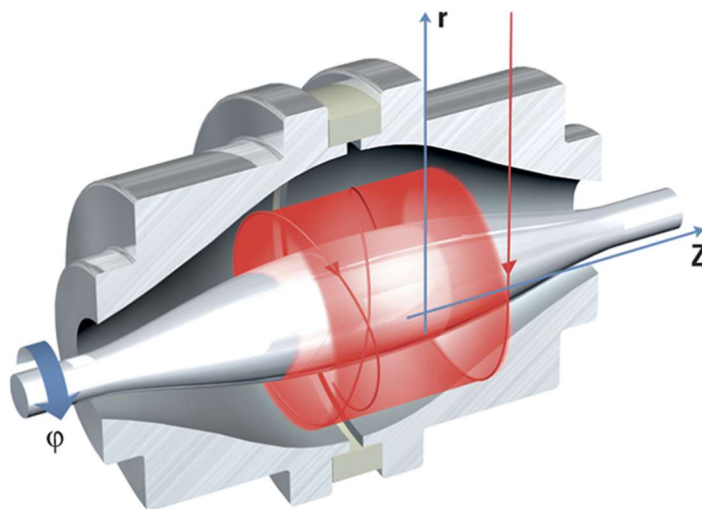


Figura 17: rappresentazione schematica dell'analizzatore di massa Orbitrap.

Lo spettrometro di massa ad alta risoluzione utilizzato in questo lavoro di tesi è il *Thermo Scientific™ Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ mass spectrometer* (Figura 18). Questo strumento è dotato di una sorgente ESI, di un quadrupolo e un Orbitrap come analizzatore di massa. Consente di lavorare sia in modalità fullscan, registrando tutti gli ioni compresi in un range m/z fissato, sia in modalità di massa tandem (MS/MS), acquisendo gli spettri di ioni precursori o di ioni prodotto di specie con un selezionato m/z ⁴⁸.

La spettrometria di massa viene spesso accoppiata a varie tecniche cromatografiche, come la cromatografia liquida o la cromatografia gassosa, poiché, in questo modo, è possibile combinare le potenzialità analitiche di separazione della cromatografia, con le potenzialità di identificazione della spettrometria di massa, ottenendo eccellenti risultati in termini di sensibilità, affidabilità, riproducibilità e selettività. Invece, in questo lavoro di tesi, la parte cromatografica viene eliminata e si sfrutta un'iniezione diretta, *Flow Injection Analysis (FIA)*, che permette di limitare notevolmente i tempi di analisi strumentale. Comunque, nel caso dell'analisi degli zuccheri nel latte, l'assenza di una separazione cromatografica, non va ad inficiare i risultati finali grazie all'accuratezza dell'analizzatore di massa utilizzato.

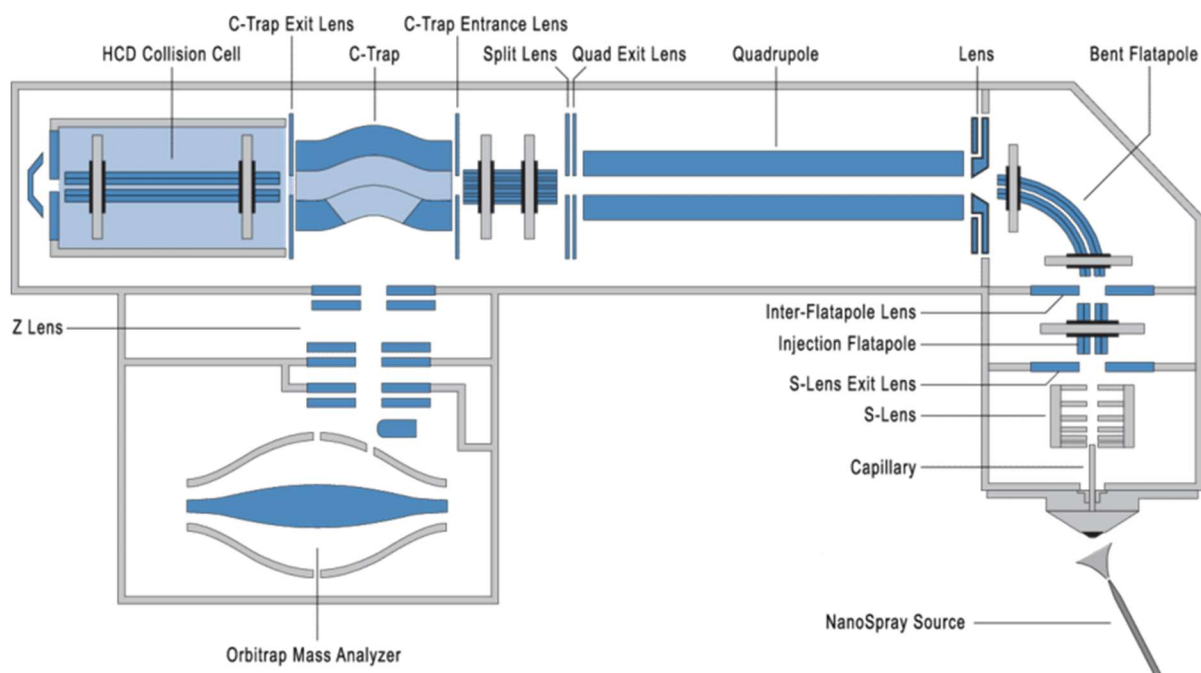


Figura 18: rappresentazione schematica dello strumento *Thermo Scientific™ Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ mass spectrometer*⁴⁸.

3.2. Cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni accoppiata ad un rivelatore ad amperometria pulsata (HPAEC-PAD)

Nel 1959 Frahn e Mills dimostrarono che i gruppi ossidrilici dei carboidrati potevano essere ionizzati in ambiente alcalino. Questa caratteristica non venne però sfruttata nella cromatografia a scambio anionico per l'analisi degli zuccheri fino al 1963⁴⁹.

Oggi la cromatografia a scambio anionico ad elevate prestazioni (HPAEC) viene ampiamente utilizzata per l'analisi dei carboidrati. Come eluenti vengono utilizzate soluzioni alcaline forti. La maggior parte dei carboidrati presenta infatti una leggera acidità a valori di pH elevato, quindi, in queste condizioni i gruppi ossidrilici degli zuccheri vengono convertiti ad ossianioni e ciò rende possibile la loro separazione in forma anionica⁵⁰.

La separazione cromatografica di queste specie viene fortemente influenzata dall'anomerismo e dal grado di polimerizzazione del carboidrato, dal numero di gruppi ossidrilici presenti, dalla loro posizione e accessibilità all'interno della struttura dello zucchero, e, in particolar modo, dal loro valore di pka. I gruppi -OH dei carboidrati presentano infatti piccole differenze di pka (Tabella 5), ciò consente di ottenere poi piccole differenze di interazione tra gli ossianioni e la resina a scambio ionico della colonna cromatografica, e di avere perciò tempi di eluizione differenti. Si ha quindi che il tempo di ritenzione aumenta al diminuire del valore di pka⁴³.

Tabella 5: costanti di dissociazione acida di alcuni comuni carboidrati (in acqua a 25°C)^{51,52}.

Zucchero	pka
Fruttosio	12.03
Glucosio	12.28
Galattosio	12.39
Lattosio	11.98

Le colonne prevalentemente utilizzate per la HPAEC appartengono alla famiglia *Thermo Scientific™ Dionex™ CarboPac™ Columns*. Esse contengono una resina formata da particelle di etilvinilbenzene-divinilbenzene da 4-10µm funzionalizzate con gruppi che permettono lo scambio anionico (Figura 19). Tali colonne sono stabili a pH elevato, hanno

un'eccellente stabilità meccanica (pressioni fino a 4000psi) e permettono un rapido trasporto di massa⁴⁴.

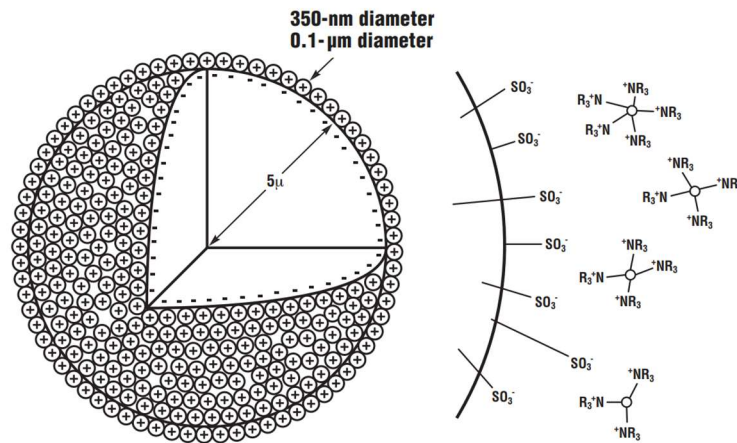


Figura 19: particella di resina pellicolare a scambio anionico⁴⁴.

Quando viene impiegata la tecnica HPAEC è necessario utilizzare un detector che sia compatibile con le condizioni alcaline, per questo si sfrutta la *Pulsed Amperometric Detection* (PAD) che usa un rilevatore elettrochimico con elettrodo lavorante in Au, contro elettrodo in Ti ed elettrodo di riferimento pH-Ag/AgCl. A pH elevati i carboidrati vengono ossidati elettrocataliticamente dalla superficie dell'elettrodo d'oro mediante l'applicazione di un potenziale positivo. La corrente generata è proporzionale alla concentrazione del carboidrato che può quindi essere rilevato e quantificato. Se all'elettrodo venisse applicato un solo valore di potenziale, i prodotti di ossidazione progressivamente avvelenerebbero la sua superficie e nel tempo si avrebbe la perdita di segnale dell'analita. Per ovviare a questo problema si usa una "four-potential waveform" che prevede l'applicazione di una serie di potenziali, alcuni di rilevamento e altri per la pulizia dell'elettrodo, per periodi di tempo determinati (Figura 20). La PAD risulta quindi una tecnica molto potente per la rilevazione dei carboidrati e presenta inoltre l'ulteriore vantaggio di non richiedere step di derivatizzazione del campione⁵³.

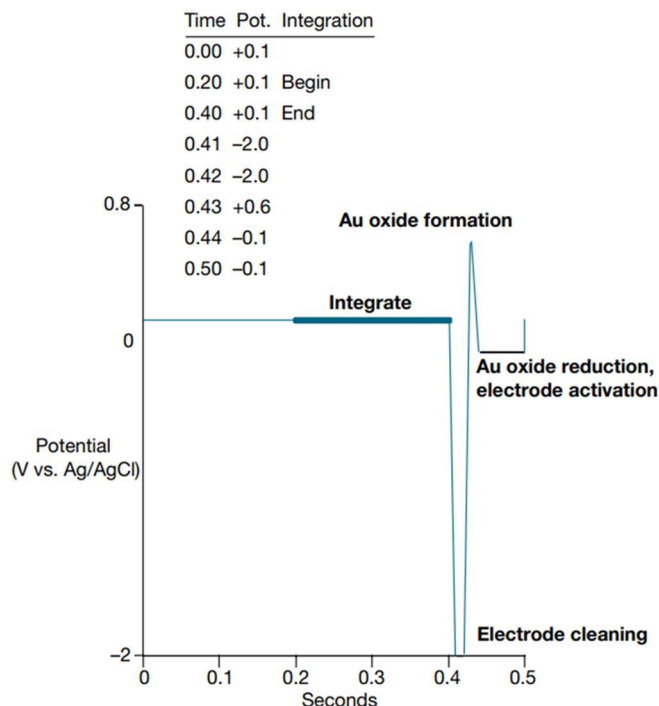


Figura 20: four-potential waveform per la rilevazione amperometrica pulsata dei carboidrati. Potenziali: +0.1V di rilevamento, -0.2V per la pulizia della superficie dell'elettrodo dalle specie ossidate, +0.6V per il ripristino di una piccola quantità di AuO necessaria per mantenere attiva la superficie dell'elettrodo, -0.1V per ridurre AuO ad Au e riportare la superficie dell'elettrodo alla situazione di partenza⁵⁴.

L'HPAEC è una tecnica di analisi estremamente vantaggiosa perché richiede semplici passaggi di preparazione del campione e permette di ottenere separazioni cromatografiche ad alta risoluzione e ad alta selettività sia nella determinazione di mono-oligosaccaridi, che nella determinazione di amminoglicosidi⁵⁵. Il suo accoppiamento con la PAD (rilevamento elettrochimico sensibile e selettivo) consente inoltre di rilevare anche carboidrati presenti a basse concentrazioni (fino a 0.1mg/L) in matrici estremamente complesse⁴⁵.

La tecnica HPAEC-PAD può dunque essere usata per confrontare le prestazioni del metodo analitico FIA-MS/MS, argomento di validazione di questo lavoro di tesi.

4. Materiali e metodi

4.1. Condizioni sperimentali

Per le analisi di validazione del metodo FIA-MS/MS è stato utilizzato lo strumento *Thermo Scientific™ Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ mass spectrometer* dotato di una sorgente ESI, di un quadrupolo e un Orbitrap come analizzatore di massa (Figura 18).

Per l'iniezione dei campioni allo spettrometro di massa, è stato sfruttato il sistema cromatografico *Thermo Scientific™ UHPLC UltiMate 3000* dotato di un compartimento per solventi SRD-3x00, di un sistema di pompe HPG-3400SD e di un autocampionatore WPS-3000.

Per confrontare e validare i risultati ottenuti con il metodo FIA-MS/MS, è stato usato il cromatografo ionico *Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000* dotato di un *Eluent Generator Cartridge* (EGC) e di un sistema di rilevazione *Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000 Electrochemical Detector*. La colonna scelta per le analisi è la *Thermo Scientific™ Dionex™ CarboPac™ PA210-Fast-4μm* poiché particolarmente indicata per le analisi di mono- e disaccaridi in matrici alimentari⁵⁶.

4.2. Reagenti e standard

L'acqua ultrapura utilizzata per le preparazioni è stata purificata mediante un apparecchio *MilliQ Plus* (Millipore, Bedford, MA, USA; resistività 18.2MΩ·cm) e un apparecchio *Purelab® Chorus* (ELGA, High Wycombe, UK; resistività 18.2MΩ·cm). Solventi utilizzati: metanolo *RS Grade* [CAS 67-56-1] per HPLC acquistato da Carlo Erba, acetonitrile *RS Grade* [CAS 75-05-8] per HPLC acquistato da Carlo Erba. Il sodio formiato *RPE Grade* [CAS 67-56-1] per analisi è stato acquistato da Carlo Erba.

Gli standard analitici utilizzati sono:

- D-Lactose Monohydrate [CAS 64044-51-5] (Sigma-Aldrich cod.61339);
- Lactulose [CAS 4618-18-2] (Sigma-Aldrich cod.1356803);
- D-Glucose-¹³C₆ [CAS 110187-42-3] (Sigma Aldrich cod. 389374).

4.3. Preparazione degli standard

4.3.1. Preparazione degli standard per FIA-MS/MS

La soluzione madre di lattosio standard per le analisi FIA-MS/MS, è stata preparata pesando la quantità di standard analitico necessario e portando a volume in matraccio, solubilizzando il solido di partenza con acqua ultrapura. È stato scelto come solvente l'acqua per riuscire ad avere la completa solubilizzazione del solido di partenza in tempi brevi, data l'elevata concentrazione. Il lattosio in acqua degrada facilmente a causa delle contaminazioni batteriche; per questa motivazione tale soluzione madre è stata preparata fresca prima di ogni analisi.

Le soluzioni madre dello standard lattulosio e dello standard interno D-Glucose-¹³C₆ sono state preparate pesando la quantità di standard analitico necessario e portando a volume in matraccio, solubilizzando i solidi di partenza con una soluzione H₂O:CH₃CN (1:1), i dati sono riportati in Tabella 6. La scelta del solvente è stata dettata dal giusto compromesso tra la solubilità degli analiti e la necessità di evitare crescita batterica, e quindi di evitare la compromissione del titolo dello standard preparato. Le soluzioni madre sono state poi conservate in frigorifero a 4°C.

Tabella 6: soluzioni madre degli standard analitici per le analisi FIA-MS/MS.

Nome	Formula	MW (g/mol)	Massa pesata (mg)	Volume (mL)	Concentrazione (mg/L)
D-lactose monohydrate	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O	360.32	526.3	20	25000
Lactulose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	20.0	10	2000
D-Glucose- ¹³C₆	¹³ C ₆ H ₁₂ O ₆	186.11	50.0	10	5000

4.3.2. Preparazione degli standard per HPAEC-PAD

Le soluzioni madre degli standard analitici per le analisi HPAEC-PAD sono state preparate pesando la quantità di standard analitico necessario e portando a volume in matraccio, solubilizzando i solidi di partenza con acqua ultrapura, i dati rappresentativi sono riportati in Tabella 7. Queste soluzioni sono state preparate fresche prima di ogni analisi a causa della rapida degradazione degli zuccheri in assenza di solvente organico.

Tabella 7: soluzioni madre degli standard analitici per le analisi HPAEC-PAD.

Nome	Formula	MW (g/mol)	Massa (mg)	Volume (mL)	Concentrazione (mg/L)
D-lactose monohydrate	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360.32	21.0	10	2000
Lactulose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	20.0	10	2000

4.4. Preparazione dei campioni

I campioni per le analisi sono stati acquistati in esercizi commerciali del comune di Padova. Sono stati acquistati diversi tipi di latte commercialmente disponibili, da diversi produttori, sia delattosati, che a basso contenuto di lattosio e con diverse quantità di grassi. I campioni sono elencati in Tabella 8.

Tabella 8: campioni di latte utilizzati per la validazione del metodo.

Codice campione*	Trattamento termico	Contenuto di grassi	Contenuto di lattosio dichiarato
Campione A	pastorizzato	0.3%	<0.01%
Campione B	UHT	1.5%	<0.01%
Campione C	UHT	1.6%	<0.01%
Campione D	UHT	1.5%	<0.01%
Campione E	UHT	1.6%	<0.01%
Campione F	pastorizzato	intero	<0.01%
Campione G	UHT	1.5%	<0.1%
Campione H	UHT	1.6%	<0.01%
Campione I	UHT	1.0%	<0.1%

*i nomi dei produttori e dei prodotti commerciali sono stati sostituiti con un codice interno identificativo.

4.4.1. Preparazione dei campioni per le analisi FIA-MS/MS

La procedura di pretrattamento dei campioni per le analisi FIA-MS/MS, prevede l'estrazione con acetonitrile (ACN) utilizzando un rapporto campione-soluzione estraente di 1:10. Successivamente il campione deve essere diluito 1:50 con una soluzione di H₂O:CH₃OH (2:1) 1mM HCOONa (buffer).

Per la quantificazione dell'analita, sono state eseguite delle calibrazioni esterne (in assenza di matrice) analizzando soluzioni di lattosio e lattulosio standard a differenti concentrazioni: 0.01, 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/L. Le soluzioni standard sono state preparate a partire dalle soluzioni madre di lattosio e lattulosio standard a 2000 mg/L (solvente H₂O:CH₃CN 1:1) ed effettuando diluizioni successive.

Oltre alle calibrazioni esterne, per valutare i parametri analitici richiesti per la validazione del metodo, quali ad esempio effetto matrice, recupero e accuratezza, sono state effettuate le calibrazioni per aggiunte standard di due serie di campioni: serie P (contaminazione con le soluzioni standard prima del pretrattamento del campione) e serie D (contaminazione con le soluzioni standard dopo la procedura di pretrattamento del campione). Ad ogni serie sono stati aggiunti lo standard interno (IS) D-Glucose-¹³C₆ e concentrazioni crescenti di standard di lattosio (STD): 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/L. In Figura 21 è riportato un *flowchart* che illustra le varie procedure di preparazione dei campioni.

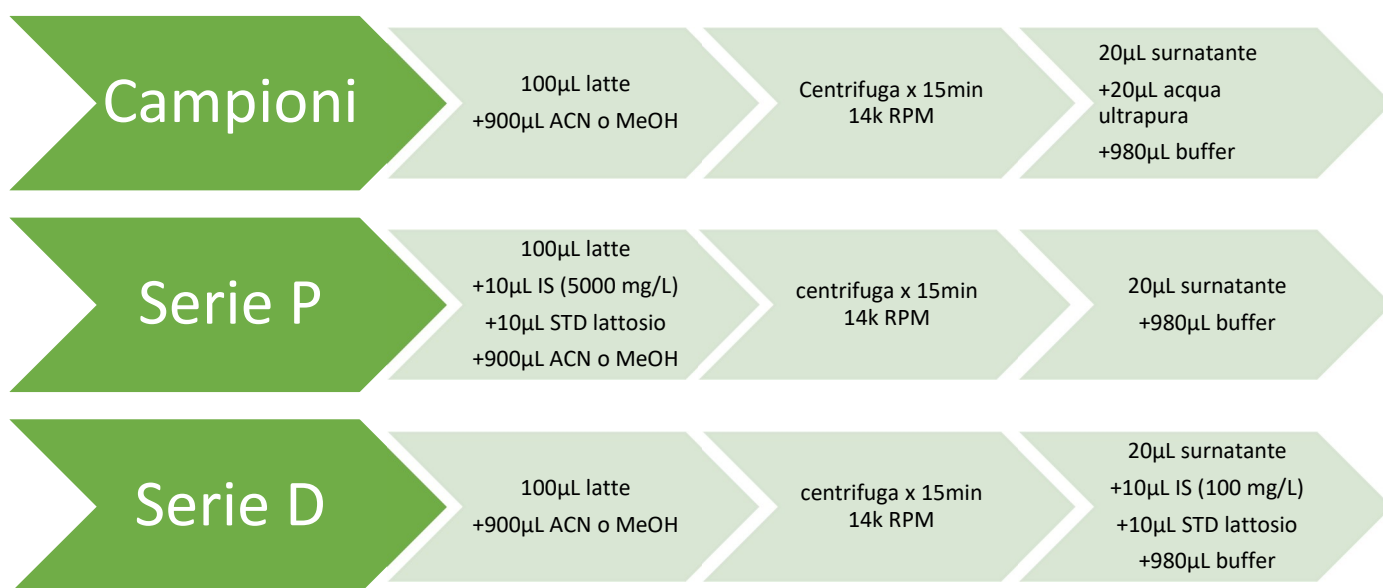


Figura 21: flowchart illustrativo delle procedure di preparazioni dei campioni per analisi FIA-MS/MS. Campioni: procedura di pretrattamento dei campioni per la quantificazione del lattosio mediante calibrazione esterna. Serie P: aggiunta degli standard prima del pretrattamento del campione, i 10µL di STD vengono prelevati da soluzioni madre, preparate a partire dalla madre a 25000mg/L mediante diluizioni successive, a 25000, 12500, 5000, 2500, 1250 mg/L per avere, rispettivamente nel campione finale, concentrazioni di STD pari a 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 mg/L; i 10µL di IS vengono prelevati dalla madre a 5000 mg/L per avere, nel campione finale concentrazione di IS pari a 1 mg/L. Serie D: aggiunta degli standard dopo la procedura di pretrattamento del campione, i 10µL di STD vengono prelevati da soluzioni madre, preparate a partire dalla madre a 2500 mg/L mediante diluizioni successive, a 500, 250, 100, 50, 25 mg/L per avere, rispettivamente nel campione finale, concentrazioni di STD pari a 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 mg/L; i 10µL di IS vengono prelevati dalla madre a 100 mg/L per avere, nel campione finale concentrazione di IS pari a 1 mg/L.

4.4.2. Preparazione dei campioni per le analisi HPAEC-PAD

La procedura di pretrattamento dei campioni per le analisi HPAEC-PAD, prevede la centrifugazione preventiva di 1mL di latte per 15min a 14k RPM, al fine di far precipitare la componente grassa. Successivamente 500µL di surnatante vengono diluiti con acqua ultrapura in matraccio, fattore di diluizione 1:50, ne vango prelevati 2mL, inseriti in un tubo

da ultrafiltrazione (VectaSpin™ 3, 20k MWCO cellulose triacetate) e sottoposti a centrifugazione per 40 min a 4.5k RPM.

Per la quantificazione dell'analita, sono state eseguite delle calibrazioni esterne analizzando soluzioni di lattosio e lattulosio standard a differenti concentrazioni: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 mg/L. Le soluzioni standard sono state preparate a partire dalle soluzioni madre di lattosio e lattulosio standard a 2000 mg/L (solvente acqua ultrapura) ed effettuando diluizioni successive.

Oltre alla calibrazione esterna, per valutare un eventuale effetto matrice residuo dopo la procedura di pretrattamento dei campioni, è stata eseguita una calibrazione per aggiunte standard per alcuni campioni. In questo caso, a 90µL di campione pretrattato, sono stati aggiunti 5µL di standard di lattosio e 5µL di standard di lattulosio, a concentrazioni crescenti: 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mg/L.

4.5. Parametri strumentali

4.5.1. Parametri strumentali per analisi FIA-MS/MS

Le soluzioni di eluenti, contenenti il modificante sodio formiato, sono state preparate fresche prima di ogni analisi, in Tabella 9 sono indicati i parametri cromatografici del metodo usato.

I parametri principali della sorgente di ionizzazione elettrospray sono invece riportati in Tabella 10.

I dati sono stati acquisiti in modalità di ionizzazione positiva effettuando due esperimenti mass-spettrometrici in parallelo: fullscan e massa-tandem. In Tabella 11 sono riportati i parametri del metodo utilizzato.

Per la calibrazione dello spettrometro di massa è stata utilizzata la soluzione di calibrazione *Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution* fornita da Thermo Scientific.

Tabella 9: parametri cromatografici del metodo usato.

Eluenti	Pompa C (67%): H ₂ O 1mM HCOONa Pompa B (33%): CH ₃ OH 1mM HCOONa
Flusso	0.100 mL/min
Volume prelievo	5µL
Temperatura vano campioni	5°C

Tabella 10: parametri principali della sorgente di ionizzazione elettrospray.

Ionization mode	Positive
Spray voltage	3.5 kV
Capillary temperature	280°C
Sheath gas flow rate	20 L/min
Aux. gas flow rate	10 L/min
Aux. gas temperature	200°C
Sweep gas flow rate	0 L/min
RF level	60

Tabella 11: parametri Q Exactive™ Orbitrap utilizzati.

Esperimento	Parametro	Valore
Fullscan (Full MS)	Method duration	2 min
	Ionization mode	Positive
	Resolution	17500
	ACG target	$3 \cdot 10^6$
	Maximum IT	200 ms
	Scan range	100-500 <i>m/z</i>
	Spectrum data type	Centroid
	Lock mass	No
Massa tandem (MS/MS)	Method duration	2 min
	Ionization mode	Positive
	Resolution	17500
	ACG target	$1 \cdot 10^5$
	Maximum IT	200 ms
	Loop count	2
	Isolation window	4.0 <i>m/z</i>
	Isolation offset	1.5 <i>m/z</i>
	Scan range	100-500 <i>m/z</i>
	Spectrum data	Centroid
	Inclusion list	365.1054 (Lactose) 209.0733 (IS)
	Normalized Collision Energy (NCE)	40

4.5.2. Parametri strumentali per analisi HPAEC-PAD

I parametri cromatografici del metodo HPAEC-PAD ottimizzato sono elencati in Tabella 12.

Tabella 12: parametri cromatografici del metodo HPAEC-PAD ottimizzato.

Eluente	MilliQ 12 mM KOH
pH misurato	12.10
Flusso	0.200 mL/min
Volume prelievo	2.5 μ L
Temperatura vano colonna	25°C
Temperatura vano campioni	5°C
Pressione	3660 psi

4.6. Software

Le analisi strumentali e le elaborazioni dei dati sono state effettuate con l'ausilio dei software:

- *Thermo Scientific™ Xcalibur 4.3 Qual Browser*, per le analisi condotte con lo strumento *Thermo Scientific™ Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ mass spectrometer*;
- *Dionex™ Chromelion 7.2.10* per le analisi condotte con lo strumento *Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000*.
- *Microsoft™ Office Excel* per l'elaborazione dei dati.

5. Risultati e discussione

5.1. Esperimenti di spettrometria di massa

5.1.1. Addotto con sodio

In letteratura sono riportati metodi analitici per la determinazione degli zuccheri basati su tecniche HPLC-MS/MS che lavorano sia in modalità di ionizzazione positiva che in modalità negativa^{57,58}. In questo lavoro di tesi, le analisi sono state condotte in modalità di ionizzazione positiva. In questa modalità, nello spettro di massa di una soluzione standard di lattosio in acqua/metanolo 2:1, senza l'aggiunta di buffer, sono presenti i segnali a m/z 343.1242 (teorico m/z 343.1235) relativo allo ione protonato dell'analita $[M+H]^+$, m/z 365.1063 (teorico m/z 365.1054) relativo all'addotto del lattosio con il sodio $[M+Na]^+$, e m/z 360.1509 (teorico m/z 360.1500) relativo all'addotto del lattosio con lo ione ammonio $[M+NH_4]^+$, (Figura 22). La specie predominante, e della quale è quindi favorita la formazione nelle condizioni utilizzate, è l'addotto con il sodio $[M+Na]^+$, mentre le altre specie identificate hanno in generale un'abbondanza relativa inferiore al 15%.

Registrando lo spettro MS/MS dell'addotto sodiato (Figura 23) si vedono numerosi ioni frammento significativi con rapporto segnale/rumore molto superiore al limite di rivelazione: m/z 365.1044 (teorico m/z 365.1054 $[M+Na]^+$), m/z 347.0938 (teorico m/z 347.0949 $[M+Na-H_2O]^+$), m/z 305.0834 (teorico m/z 305.0843 $[M+Na-C_2H_4O_2]^+$), m/z 203.0521 (teorico m/z 203.0526 $[C_6H_{12}O_6+Na]^+$) e m/z 185.0416 (teorico m/z 185.0420 $[C_6H_{12}O_6+Na-H_2O]^+$)⁵⁹. L'addotto sodiato può quindi essere sfruttato per un'analisi qualitativa perché genera ioni frammento informativi delle caratteristiche strutturali del lattosio.

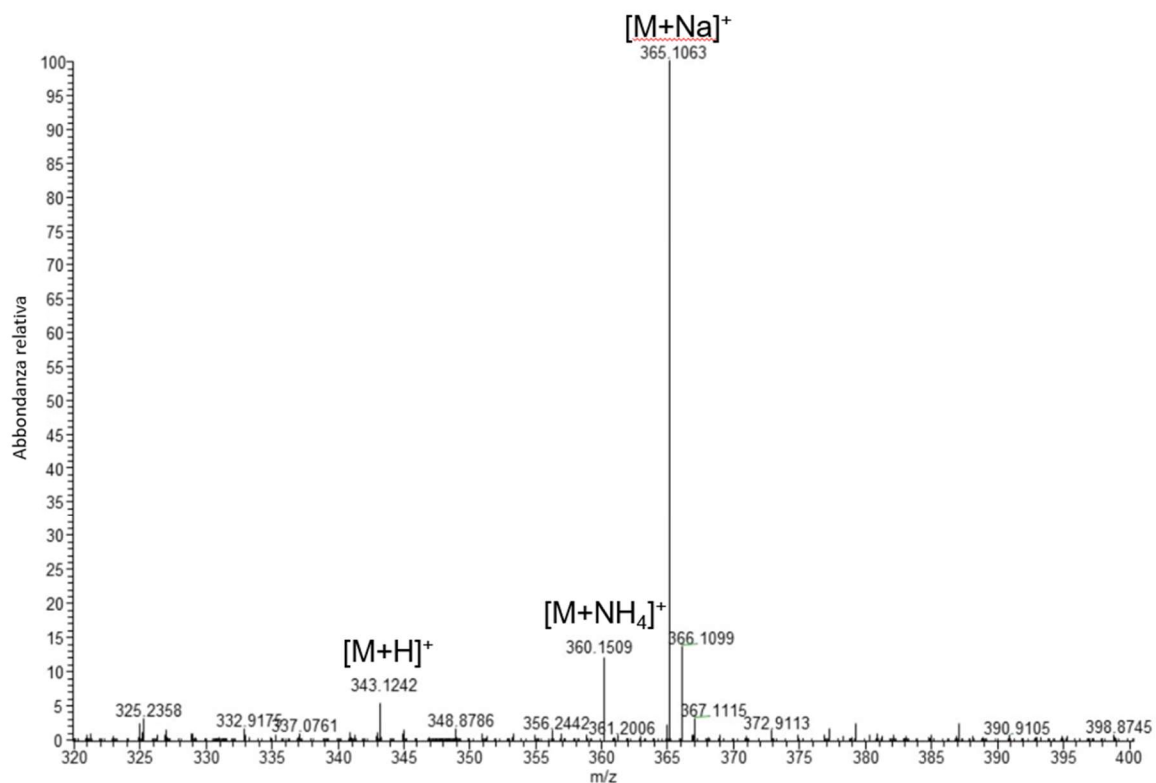


Figura 22: spettro di massa acquisito in modalità ESI positiva, fullscan, di una soluzione standard di lattosio in $H_2O:CH_3OH$ (2:1).

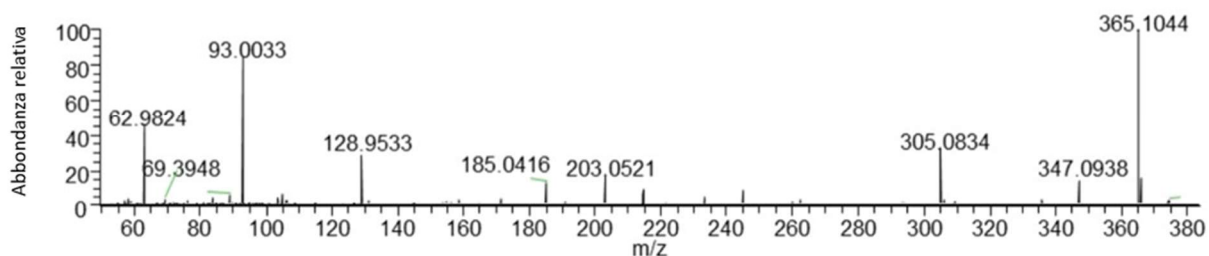


Figura 23: spettro di massa acquisito in modalità ESI positiva, NCE 40, MS-tandem selezionando lo ione relativo all'addotto sodiato (m/z 365.1054), di una soluzione standard di lattosio a 5 mg/L in $H_2O:CH_3OH$ (2:1).

Considerando che nel latte, oltre al sodio, sono presenti molti altri elementi chimici (Tabella 2), per favorire la formazione dell'addotto sodiato ed eliminare la formazione di altri possibili addotti (in particolare $[M+K]^+$), si aggiunge 1.0 mM di sodio formiato ($HCOONa$) alle fasi eluenti. Il modificante sodio formiato favorisce la formazione e la stabilità della concentrazione dell'addotto $[M+Na]^+$, ne incrementa la risposta di ionizzazione elettrospray, ne aumenta il segnale in rivelazione e permette inoltre di migliorare la riproducibilità del dato in prove ripetute. Questo è fondamentale per l'analisi quantitativa, al fine di avere dati precisi

ed evitare interferenze a livello quantitativo relative alla speciazione degli analiti nelle condizioni di ionizzazione utilizzate.

Le fasi eluenti utilizzate sono dunque: 67% H₂O 1.0 mM HCOONa, 33% CH₃OH 1.0 mM HCOONa.

5.1.2. Selettività dei segnali mass spettrometrici

La presenza di segnali diagnostici, che si riferiscono allo ione molecolare e agli ioni frammento prodotti in modalità MS-tandem, a tempi di ritenzione comparabili con quelli di una soluzione standard, garantiscono l'identificazione degli analiti negli esperimenti HPLC-MS/MS. Nel metodo qui validato, che prevede un'analisi FIA, priva quindi di uno step di separazione cromatografica, l'importanza di ottenere segnali diagnostici per l'analita mediante spettrometria di massa tandem è fondamentale, poiché il tempo di ritenzione non è un dato disponibile.

Da studi condotti sulla frammentazione del lattosio in presenza dei suoi possibili interferenti nella matrice latte, risulta che, grazie all'elevata risoluzione dell'analizzatore di massa utilizzato, solo i composti isobari del lattosio possono interferire con l'analisi. Gli isobari del lattosio possono essere altri disaccaridi o isomeri del lattosio stesso presenti nel latte. La presenza di questi composti risulta comunque trascurabile, fatta eccezione per il lattulosio. Il lattulosio, come descritto nella parte introduttiva (sezione 1.3.2.), è un disaccaride formato dalle unità D-galattosio e D-fruttosio che si ottiene dall'isomerizzazione, spesso favorita alle alte temperature, dell'unità glucosidica del lattosio a fruttosio¹⁵.

Con la tipologia di strumento utilizzato, è possibile misurare in modo accurato il valore di m/z sia dei segnali molecolari relativi alla ionizzazione degli analiti presenti nel campione, sia dei relativi frammenti generati in modalità MS-tandem. Dunque, sia le soluzioni standard prima, che i campioni poi, sono stati analizzati mediante FIA acquisendo i dati, oltre che in modalità *fullscan*, anche in modalità *Parallel Reaction Monitoring* (PRM), ovvero selezionando il *parent ion* di interesse e registrandone gli spettri di frammentazione con un esperimento di massa-tandem, al fine di identificare le frammentazioni caratteristiche dei due analiti in esame.

In questi esperimenti sono stati registrati gli spettri di massa tandem ponendo la finestra di collisione del quadrupolo a m/z 365.1 ± 2.0 e utilizzando una *Normalized Collision Energy*

(NCE) pari a 40. Il valore di NCE scelto permette di ottenere un ottimo compromesso tra l'intensità relativa dell'addotto sodiato e la formazione di segnali diagnostici in frammentazione, così da garantire un limite di rivelabilità sufficiente per la quantificazione del lattosio anche in campioni di latte *lactose free*.

In Figura 24 e Figura 25 sono riportati gli spettri MS/MS di soluzioni standard di lattosio e lattulosio acquisiti con NCE 40; essi mostrano frammentazioni simili, ma si può notare che il frammento ionico a m/z 305.0830 è assente nello spettro del lattulosio e risulta dunque specifico per l'analita lattosio. Il frammento ionico a m/z 317.0852 è invece assente nello spettro del lattosio, e risulta quindi specifico per il lattulosio. La presenza di frammenti diagnostici specifici per l'analita assicura un'ottima selettività del metodo analitico utilizzato. Durante gli esperimenti di quantificazione, la selettività può essere verificata confrontando le concentrazioni di lattosio ottenute dalle rette di calibrazione costruite con i segnali relativi al *parent ion* (m/z 365.1054) acquisiti in *fullscan*, e quelle ottenute dai segnali relativi al frammento diagnostico (m/z 305.0830) acquisiti in modalità PRM. Se i valori di concentrazione che si ottengono sono differenti, indicano la presenza di un interferente nella quantificazione, a carico di un isobaro del *parent ion*, ovvero il lattulosio. In presenza di lattulosio la quantificazione deve quindi essere eseguita utilizzando le rette di calibrazione ottenute dai segnali, registrati in modalità PRM, del frammento diagnostico.

Inoltre, in modalità MS/MS è possibile abbattere il rumore strumentale, permettendo un miglioramento del rapporto segnale/rumore e quindi le performance analitiche generali in termini di precisione, sensibilità e limite di quantificazione.

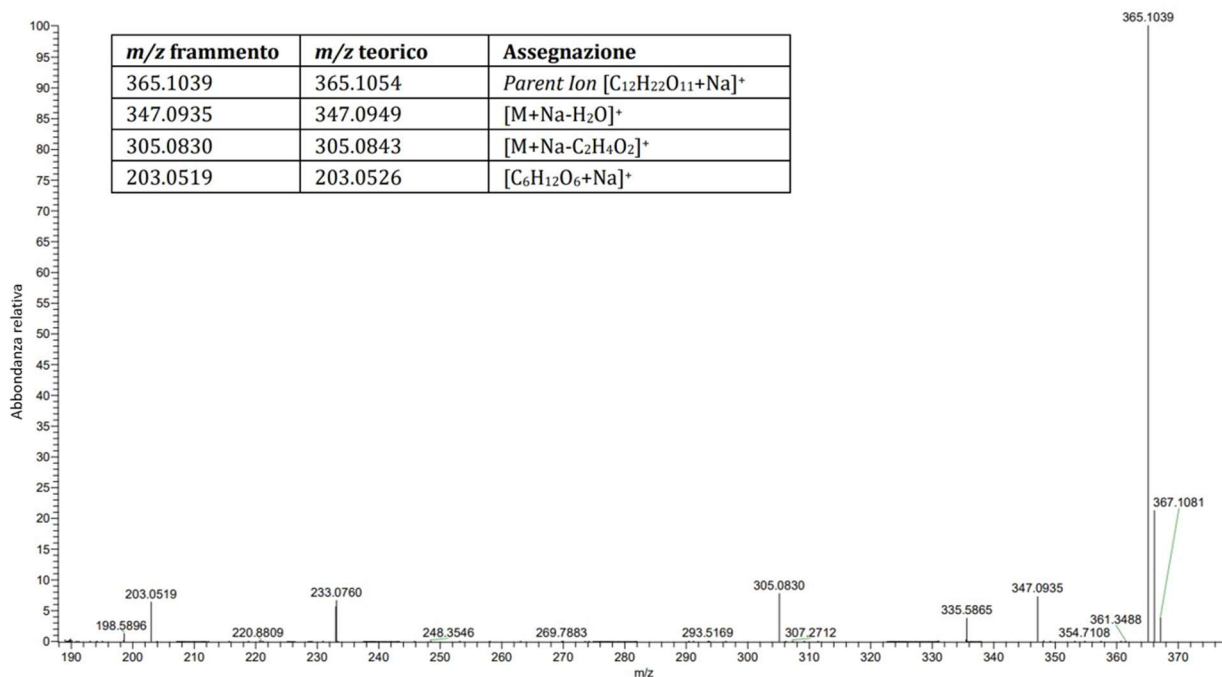


Figura 24: spettro MS/MS di una soluzione standard di lattosio registrato utilizzando NCE 40. Ione precursore selezionato: *m/z* 365.1054 $[M+Na]^+$.

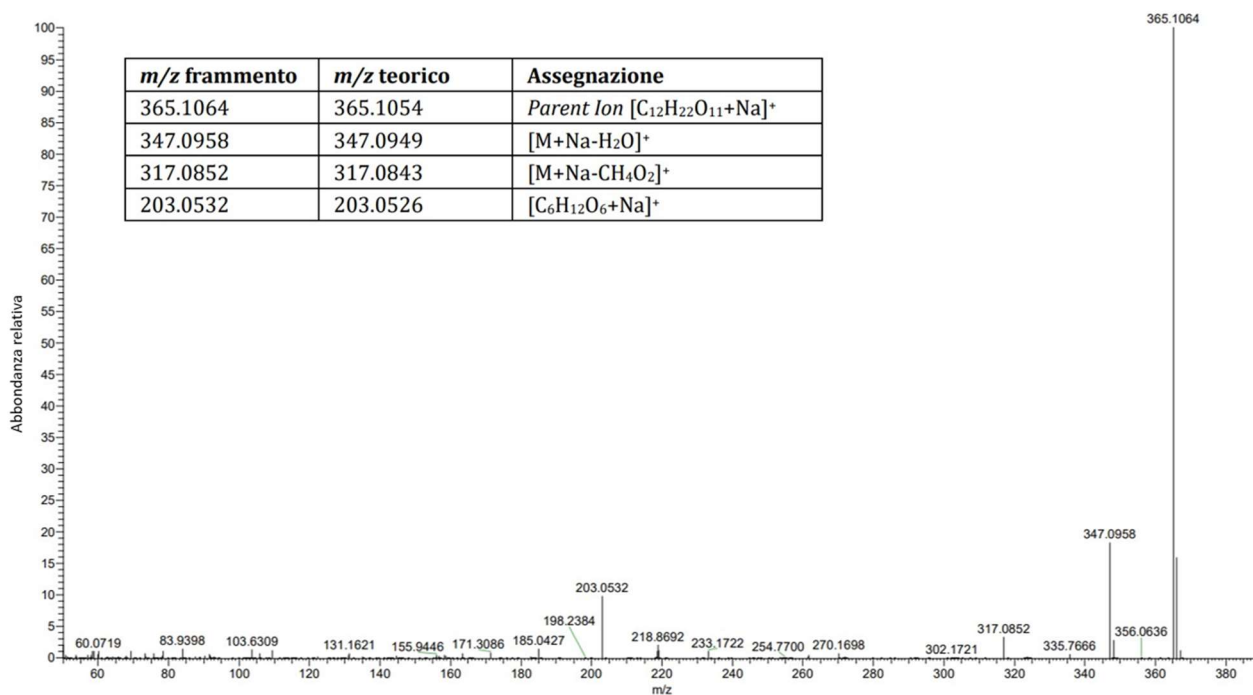


Figura 25: spettro MS/MS di una soluzione standard di lattulosio registrato utilizzando NCE 40. Ione precursore selezionato: *m/z* 365.1054 $[M+Na]^+$.

5.1.3. Standard interno

L'utilizzo di uno standard interno (IS), nel caso specifico relativamente ad analisi MS, garantisce una miglior esattezza e precisione dell'analisi. Lo standard interno viene aggiunto

a concentrazione costante a tutte le soluzioni standard e ai campioni. Poiché esso è sempre presente in quantità costante, anche il segnale da lui generato dovrebbe a sua volta essere costante. La normalizzazione del segnale dell'analita con il segnale dello standard interno può quindi essere usata per eliminare eventuali errori generati dalle fluttuazioni di volume iniettato o da variazioni nell'efficienza di ionizzazione elettrospray durante le varie analisi. Inoltre, lo standard interno compensa, previa verifica e validazione del metodo, gli errori derivanti dall'eventuale perdita di analita durante le fasi di pretrattamento del campione⁶⁰.

Generalmente uno standard interno, oltre ad essere sufficientemente puro e avere un titolo di purezza noto, deve essere dal punto di vista chimico sufficientemente diverso dall'analita in esame, in modo da poter essere determinato nel medesimo esperimento senza interferire nella quantificazione dell'analita; deve però avere un comportamento analogo all'analita, in modo che il suo recupero rifletta quello dell'analita stesso.

In spettrometria di massa, la scelta dello standard interno spesso ricade su standard contenenti isotopi marcati; essi riproducono fedelmente le caratteristiche di ionizzazione dell'analita, ma possono essere rivelati in modo specifico rispetto al segnale della specie di interesse, poiché possiedono un peso molecolare differente, e quindi un differente m/z .

Lo standard interno utilizzato nel presente lavoro di tesi è il D-Glucosio-¹³C₆: la presenza di sei atomi di carbonio marcati ¹³C lo rende rivelabile in modo specifico rispetto ai possibili interferenti derivanti dall'idrolisi del lattosio, come specie [¹³C₆H₁₂O₆+Na]⁺ e m/z 209.0733.

5.1.4. Parametri strumentali scelti

Il metodo utilizzato in questo lavoro di tesi prevede un'analisi in iniezione diretta. In questa modalità, è possibile ottenere, anche senza un sistema di separazione cromatografica, un picco pseudo-gaussiano integrabile, selettivo e con buon rapporto segnale/rumore, al fine di riuscire a quantificare l'analita.

Per integrare correttamente l'area del picco ottenuto con gli algoritmi messi a disposizione dai software di elaborazione dati, il picco che si ottiene da un'analisi in FIA dovrebbe avere la forma di una gaussiana; sperimentalmente però i picchi sono spesso soggetti ad allargamenti o asimmetria. Studi approfonditi hanno determinato le regole alla base dei processi di dispersione, che affermano che la larghezza della banda è determinata prevalentemente dalla diffusione longitudinale⁶¹.

Importanti parametri, quali flusso, volume di iniezione, eluenti ed eventuali buffer aggiunti, devono quindi essere scelti con cura al fine di non compromettere le performance strumentali in termini di sensibilità, limite di rivelabilità e robustezza. I parametri utilizzati, ottimizzati in un precedente lavoro di tesi, sono flusso 0.100 mL/min e volume di iniezione 5 μ L.

Uno dei principali punti di forza dell'analisi in FIA è la durata dell'analisi. Con i parametri utilizzati (sezione 4.5.1.) è possibile ridurre la durata di una corsa a soli due minuti e ottenere un *Extracted Ion Chromatogram* (EIC) integrabile per il segnale corrispondente all'addotto sodiato del lattosio (Figura 26), riuscendo a distinguere anche l'eventuale presenza di lattulosio in modalità PRM; l'analita lattosio può dunque essere quantificato correttamente, previa acquisizione di una retta di taratura.

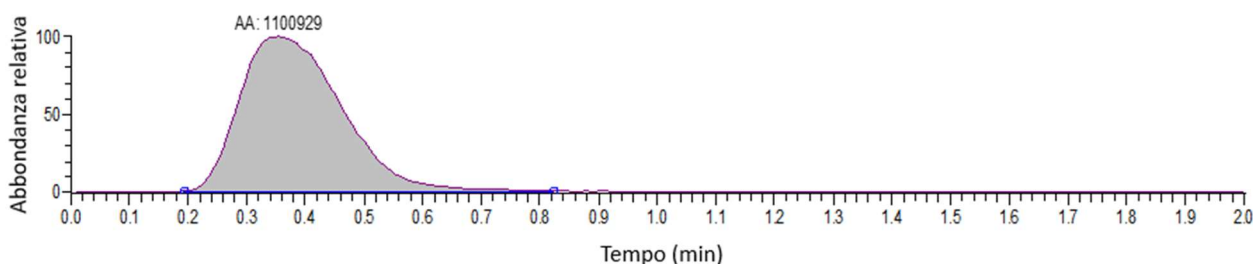


Figura 26: EIC dell'addotto sodiato registrato in modalità ESI positiva, massa-tandem, NCE 40.

5.2. Estrazione dei campioni per analisi FIA-MS/MS

Di norma, le analisi strumentali prevedono uno step preliminare di pretrattamento del campione che ha come scopo primario quello di rimuovere i componenti interferenti della matrice. Il pretrattamento del campione può essere usato anche per aumentare la concentrazione dell'analita, e quindi diminuire il limite di rivelazione associato al metodo, e, se necessario, per convertire l'analita in una forma più adatta per la separazione e il successivo rilevamento⁶². Il pretrattamento del campione varia da analita ad analita e dipende dal tipo di analisi che si vuole effettuare; spesso prevede una serie di passaggi dispendiosi in termini di tempo, e che influiscono in modo significativo sulle performance analitiche finali⁶³.

Il metodo per la determinazione del lattosio testato in questo lavoro di tesi, che non prevede una separazione cromatografica ma un'analisi in FIA, risulta più critico in termini di possibile

coeluizione e conseguente competizione tra il lattosio e gli altri componenti della matrice nel processo di ionizzazione elettrospray. Nei metodi basati su ESI-MS, è infatti usuale riscontrare un effetto matrice ESI che consiste nell'alterazione (soppressione o aumento) del segnale di ionizzazione elettrospray dovuta appunto alla co-presenza dei composti della matrice. L'effetto matrice deve quindi essere valutato in modo approfondito, sia nella fase di preparazione del campione, sia relativamente al metodo di ionizzazione.

Solitamente, la sostanziale riduzione dell'effetto matrice, si ottiene ottimizzando le procedure di estrazione e purificazione del campione, riducendo la composizione chimica del campione di partenza, ma mantenendo gli analiti quanto più possibili inalterati, sia chimicamente che quantitativamente. La letteratura riporta numerosi metodi di analisi del lattosio in matrici biologiche, la maggior parte dei quali prevede una preparazione del campione lunga e complessa. Preparazioni di questo tipo si basano sulla precipitazione delle proteine del latte (soprattutto caseine) al loro punto isoelettrico sfruttando aggiunte successive di soluzioni tampone, con seguenti passaggi di centrifugazione e filtrazione. Ad esempio, vengono frequentemente utilizzate le soluzioni Carrez: una soluzione acquosa di potassio esacianoferrato (III) (Carrez I) per la precipitazione delle proteine, e una soluzione acquosa di acetato di zinco (Carrez II) per rimuovere l'eccesso di esacianoferrato introdotto con la prima soluzione^{64,65}. È evidente che il metodo Carrez comporti una manipolazione del campione non trascurabile e una conseguente possibilità di introdurre incertezza nel dato analitico finale. Inoltre, con lo spettrometro di massa utilizzato, il pretrattamento del campione con soluzioni Carrez non è applicabile, a causa della presenza di sali non volatili che si accumulerebbero in sorgente causando problemi nella rivelazione degli analiti e nella robustezza del metodo.

Altre vie prevedono di far avvenire la precipitazione delle proteine del latte aggiungendo al campione una porzione di solvente organico. Considerando inoltre l'elevata polarità del lattosio, risulta conveniente scegliere un solvente organico sufficientemente polare, in modo tale che possa al contempo estrarre il lattosio e denaturare la parte proteica del campione, causandone la conseguente precipitazione.

Studi comparativi eseguiti da Garballo-Rubio A. et al. (2018)⁵⁷, mostrano come le procedure basate sulla precipitazione delle proteine al punto isoelettrico possano presentare problemi di riproducibilità, e come invece i metodi di estrazione basati sull'utilizzo di un solvente organico portino a recuperi quantitativi e con deviazioni standard relative (RDS%) molto ridotte per il lattosio.

La procedura di preparazione del campione utilizzata in questo lavoro di tesi, si basa sul lavoro di Garbalo-Rubio⁵⁷ e prevede: estrazione del lattosio con solvente organico, centrifugazione per depositare completamente le proteine denaturate, infine è prevista la diluizione di una porzione di surnatante, come precedentemente illustrato in Figura 21. Tale procedura prevede l'utilizzo di acetonitrile come solvente per l'estrazione, ma, visti alcuni problemi riscontrati in termini di recupero dell'analita (vedere in seguito sezione 5.3.6.), si è deciso di effettuare alcune prove di estrazione anche con solvente metanolo. In seguito verranno discusse le criticità trovate con il solvente acetonitrile, in termini di effetto matrice e recupero.

5.3. Validazione del metodo

L'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO) definisce la validazione di un metodo come la conferma, mediante esame e fornitura di prove oggettive, che i requisiti per un uso specifico del metodo siano soddisfatti. Questa definizione implica che deve essere effettuata un'indagine dettagliata che fornisca prove concrete che un metodo analitico, se applicato correttamente, produca risultati idonei allo scopo⁶⁶.

I criteri chiave per la valutazione di un metodo analitico sono: selettività, linearità, intervallo di linearità, limite di rilevamento (LOD), limite di quantificazione (LOQ), accuratezza, precisione; inoltre spesso risulta conveniente valutare l'effetto matrice (ME%) e il recupero (R%).

Al fine di valutare tutti i criteri sopra elencati, sono state effettuate tre differenti rette di taratura: una calibrazione esterna (in assenza di matrice) e due calibrazioni per aggiunte standard, una in cui le aggiunte di standard di lattosio e standard interno vengono effettuate all'inizio, prima della procedura di estrazione del campione (serie P, prima) e una in cui gli standard vengono aggiunti alla fine, in seguito al pretrattamento del campione (serie D, dopo). Per realizzare le rette di taratura, le soluzioni standard e i campioni sono stati preparati come illustrato in Figura 21.

5.3.1. Selettività

La selettività è la capacità di un metodo analitico di non risentire della presenza di interferenti, o di altri componenti diversi dall'analita in esame. La selettività del metodo utilizzato è garantita dalla presenza, negli spettri registrati in modalità PRM, di segnali diagnostici di frammentazione specifica per il lattosio (m/z 305.0830) e per il suo principale interferente, l'isobaro lattulosio (m/z 317.0852), come dimostrato precedentemente (sezione 5.1.2).

In tutti i campioni di latte analizzati non è stata riscontrata la presenza di lattulosio, fatta eccezione per il latte I.

5.3.2. Linearità

La linearità del metodo si valuta considerando il valore del coefficiente di correlazione R^2 , che indica quanto il modello di regressione utilizzato permette di descrivere la relazione tra la risposta strumentale (segnale misurato) e la quantità di sostanza analizzata. Un metodo analitico lineare è desiderabile perché semplifica l'interpretazione dei risultati e permette di ottenere stime accurate della concentrazione dell'analita di interesse nella matrice di campionamento. Attraverso la costruzione di curve di taratura, è possibile valutare il range dinamico lineare di risposta di uno strumento.

In tutte le analisi effettuate, l'interpolazione con funzione lineare dei risultati sperimentali ottenuti, considerando anche matrici con diverse caratteristiche in termine di composizione lipidica, ha fornito valori di $R^2 > 0.995$, confermando la linearità del metodo.

Come esempio, in Figura 27, Figura 28 e Figura 29 sono riportate le tre rette di taratura (calibrazione esterna, serie P e serie D) per il campione F.

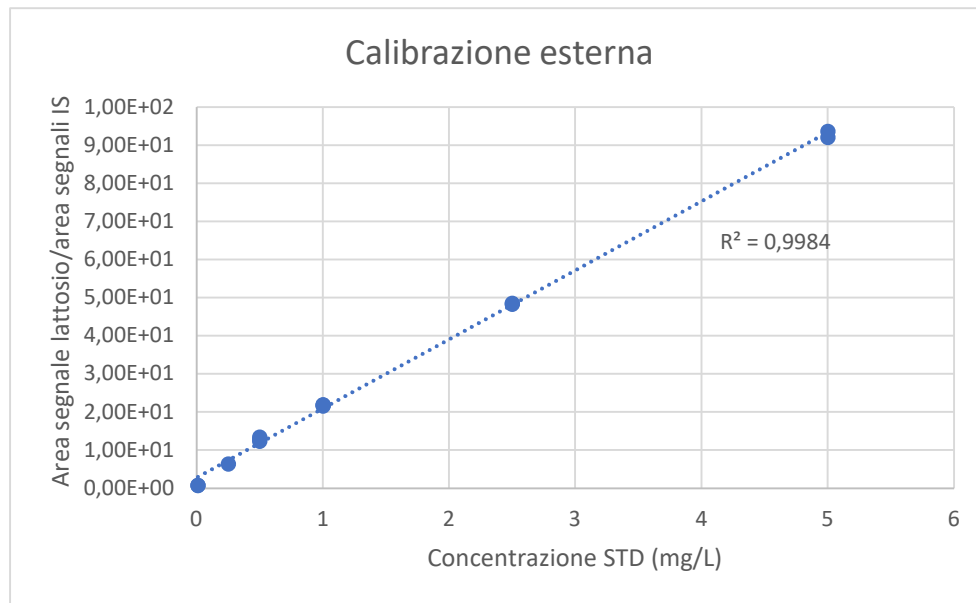


Figura 27: retta di calibrazione esterna. Per tutti i punti $RDS% < 20\%$ ($n=3$).

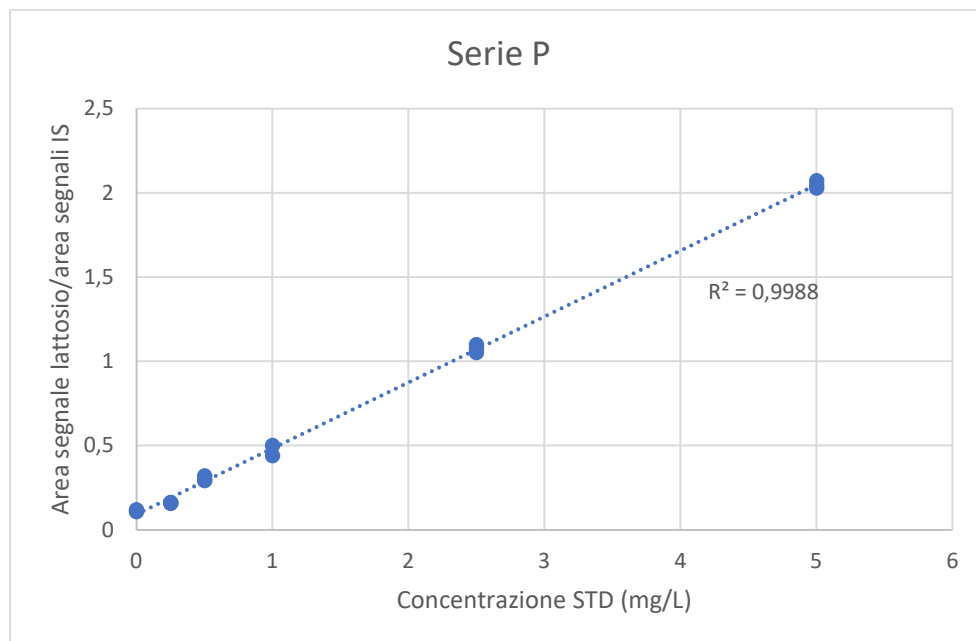


Figura 28: retta di calibrazione per aggiunte standard serie P effettuata per il campione F estratto con acetonitrile. Per tutti i punti $RDS% < 20\%$ ($n=3$).

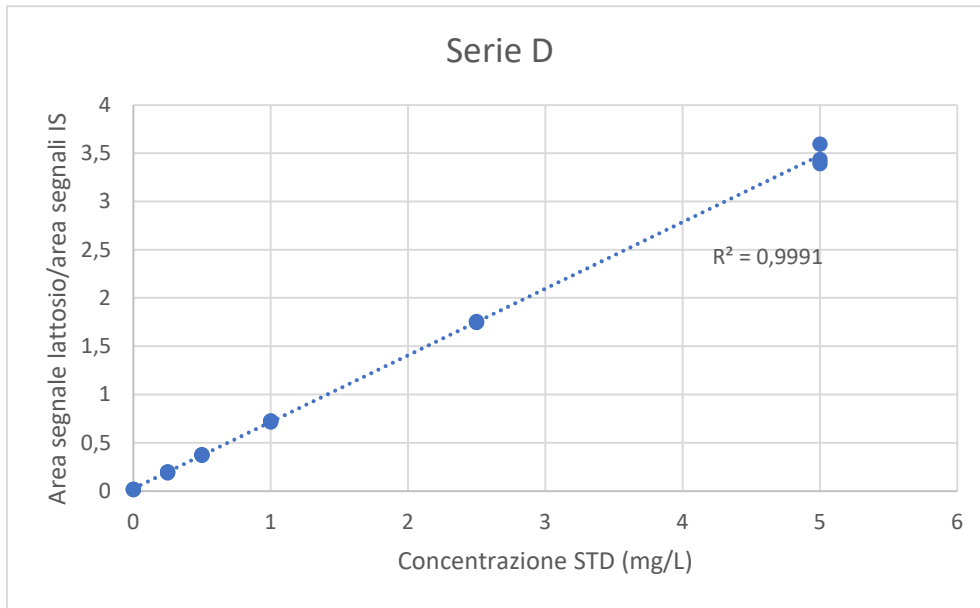


Figura 29: retta di calibrazione per aggiunte standard serie D effettuata per il campione F estratto con acetonitrile. Per tutti i punti $RDS < 20\%$ ($n=3$).

5.3.3. Limite di rivelabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ)

Il limite di rivelabilità (LOD) rappresenta la minima concentrazione di analita che si può ragionevolmente sempre determinare con il metodo in esame. Un metodo analitico, soprattutto se volto all'analisi di una sostanza presente a bassa concentrazione nei campioni considerati, come nel caso di questo lavoro di tesi, dovrebbe avere un LOD basso.

Seguendo le linee guida ISO, la IUPAC definisce il limite di rivelabilità come⁶⁷:

$$LOD = t_{\alpha, \nu} \cdot s^B + t_{\beta, \nu} \cdot s^A \quad \text{Equazione 1}$$

Con t coefficiente di Student a 1 coda per un grado di fiducia del 95%, ν numero di gradi di libertà, s^B deviazione standard del bianco e s^A deviazione standard dell'analita. Assumendo che le deviazioni standard del bianco e dell'analita siano confrontabili, e ponendo α e β pari a 0.05, l'equazione si riduce a:

$$LOD = 2 \cdot t_{\alpha, \nu} \cdot s^B \quad \text{Equazione 2}$$

In realtà, l'equazione precedente si discosta dalla formula più diffusa in letteratura per il calcolo del LOD, che si basa sul segnale strumentale corrispondente al limite di rivelabilità (y_{LOD})⁶⁸:

$$y_{LOD} = \bar{y}_{\text{senza analita}} \cdot 3 \cdot s^{\text{senza analita}} \quad \text{Equazione 3}$$

Dove 3 è il valore approssimato della t di Student a una coda per un grado di fiducia del 95% e moltiplicato per due ($1.645 \cdot 2 = 3.29$ arrotondato a 3), in questo modo l'errore di falso positivo è trascurabile mentre quello di falso negativo è pari al 5%, quindi accettabile. Se l'analita ha una concentrazione tale da dare mediamente un segnale pari al limite dato dall'Equazione 3, esso sarà al 95% dei casi diverso dal segnale in assenza di analita, per cui la sua presenza sarà confermata. Tale limite rappresenta il segnale strumentale corrispondente al LOD.

Se per la quantificazione dell'analita si effettua una retta di calibrazione esterna, la retta stessa fornisce tutte le informazioni per convertire il segnale del LOD nella concentrazione di analita. Il valore di $\bar{y}_{\text{senza analita}}$ corrisponde all'intercetta a della retta, poiché questa rappresenta il segnale strumentale mediamente ottenibile in assenza di analita. La grandezza $s^{\text{senza analita}}$ può invece essere data dalla deviazione standard di a , o meglio, tenendo conto che anche l'incertezza sulla pendenza ha effetto sull'intercetta, dalla deviazione standard degli scarti tra i punti e la retta ($s_{x/y}$):

$$LOD = a \cdot 3s_{x/y} \quad \text{Equazione 4}$$

Considerando:

$$\bar{x}_{camp} = \frac{\bar{y}_{camp} - a}{b} \quad \text{Equazione 5}$$

Dove \bar{y}_{camp} è la media dei segnali strumentali del campione e \bar{x}_{camp} la concentrazione di analita nel campione ricavata sperimentalmente.

Con l'Equazione 5 si può relazionare y_{LOD} con il corrispondente valore di x (il LOD):

$$y_{LOD} = a + b \cdot LOD \quad \text{Equazione 6}$$

Da cui si ricava:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{x/y}}{b} \quad \text{Equazione 7}$$

L'Equazione 7 è quella utilizzata in questo lavoro di tesi per il calcolo del LOD. Essa mostra un motivo per cui la sensibilità (b) dei metodi analitici dovrebbe essere elevata: LOD e b sono grandezze anticorrelate tra loro, per cui un metodo con elevata sensibilità ha solitamente anche un basso, e quindi ottimo, LOD.

Il motivo per cui esistono diverse definizioni di LOD, è che nessuna è pienamente soddisfacente. Ad esempio l'equazione x ha il difetto di dipendere da come è stata condotta la calibrazione esterna, in quanto il valore $s_{x/y}$ può variare in base alle concentrazioni degli standard analizzati e al loro numero; idealmente invece, il LOD dovrebbe dipendere solo dal metodo usato e dalla natura del campione e dell'analita.

Invece, il limite di quantificazione (LOQ) è un multiplo del limite di rivelabilità ad una concentrazione dell'analita che può essere ragionevolmente determinata con accettabile accuratezza e precisione; esso viene dunque calcolato dalla seguente equazione:

$$LOQ = \frac{10}{3} \cdot LOD \quad \text{Equazione 8}$$

I LOD e LOQ, calcolati per il metodo, in esame sono riportati in Tabella 13.

Tabella 13: limite di determinazione e di quantificazione dell'analita lattosio in campioni di latte delattosato mediante il metodo FIA-MS/MS.

	mg/L
LOD	0.1
LOQ	0.3

5.3.4. Precisione

La precisione indica la bontà dell'accordo tra i risultati di misurazioni indipendenti e successive dello stesso misurando, ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specificate, esprime quindi gli errori casuali. Il calcolo della deviazione standard relativa (RDS%) permette di valutare la precisione del metodo analitico utilizzato:

$$RDS\% = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Equazione 9}$$

Con s_x deviazione standard calcolata sui valori di x ottenuti da misure ripetute e \bar{x} valore medio delle misure ripetute.

Con il metodo utilizzato, la precisione strumentale relativa alla rivelazione dell'analita di interesse, è sufficientemente buona, poiché i valori di RDS%, calcolati su misure ripetute in

triplicato per le varie concentrazioni esplorate con le rette di taratura, sono risultati tutti inferiori al 20%. Tali valori, tenendo conto della variabilità strumentale, sono considerati accettabili, in relazione alla tipologia di strumentazione utilizzata.

A titolo di esempio, in Tabella 14 sono riportati i valori di RDS% calcolati per le rette di taratura ottenute per il campione A, trattato sia con acetonitrile che con metanolo.

Tabella 14: valori di RDS% calcolati sulle misure ripetute per ogni punto di calibrazione effettuato per il campione A, estratto sia con acetonitrile che con metanolo.

Concentrazione STD (mg/L)	ESTERNA	SERIE P (ACN)	SERIE D (ACN)	SERIE P (MeOH)	SERIE D (MeOH)
0.25	2%	20%	2%	19%	3%
0.5	4%	11%	1%	11%	5%
1	1%	16%	2%	12%	4%
2.5	1%	9%	3%	7%	3%
5	2%	17%	4%	9%	2%

5.3.5. Effetto matrice (ME%)

L'effetto matrice (EM%) è la variazione del segnale strumentale causata da tutti i componenti presenti nel campione escluso l'analita stesso. Affinché un metodo analitico possa essere considerato valido, deve prevedere una procedura di pretrattamento del campione che porti alla sostanziale eliminazione dell'effetto matrice, in modo tale da massimizzare la selettività del metodo stesso (vedere paragrafo 5.2.).

Per valutare l'effetto matrice, in questo lavoro di tesi è stato effettuato il confronto tra la retta di calibrazione esterna e la retta di calibrazione per aggiunte standard serie D, in quanto, in quest'ultima, le aggiunte standard vengono eseguite alla fine del processo di pretrattamento del campione, dunque sarà solo la matrice ad incidere sulla misura sperimentale, non anche l'estrazione. A rigore, per valutare l'effetto matrice, bisognerebbe calcolare il rapporto tra le aree sperimentali di ogni punto della retta di calibrazione esterna e ogni punto della retta di

calibrazione per aggiunte standard serie D. In realtà statisticamente, per considerare il contributo totale delle concentrazioni sull'effetto matrice, è possibile effettuare il calcolo dal rapporto delle pendenze (*b*) delle due rette di taratura:

$$ME\% = \frac{b \text{ calibrazione esterna}}{b \text{ serie D}} \cdot 100 \quad \text{Equazione 10}$$

Valori di ME% compresi tra nell'intervallo 80-120% sono considerati accettabili e indicano l'assenza di effetto matrice o comunque un effetto matrice che non interferisce in modo significativo con i risultati analitici, considerando anche i valori di precisione ottenuti. Come si può vedere dai risultati riportati in Tabella 15, tutti i campioni analizzati presentano valori di effetto matrice buoni, ad eccezione del latte I. Il campione I è un latte parzialmente scremato, come lo sono i campioni B, C, D, E, G, H, che pure presentano ottimi valori di EM%, i relativamente bassi valori trovati per il latte I sono dunque da imputare ad errori casuali.

Inoltre, dai dati riportati in Tabella 15 si evince che non ci sono differenze significative tra i due solventi utilizzati per l'estrazione dei campioni: sia acetonitrile che metanolo possono dunque essere impiegati per la precipitazione delle proteine inizialmente presenti in matrice.

Tabella 15: valori di ME% calcolati per tutti i campioni di latte analizzati, con entrambi i solventi utilizzati per le prove di estrazione.

CAMPIONE	ACN	MeOH
A	92%	93%
B	98%	92%
C	82%	/
D	81%	/
E	86%	/
F	83%	/
G	102%	/
H	130%	126%
I	62%	77%

Considerando i valori di EM% trovati, e quindi l'assenza di effetto matrice, si potrebbe utilizzare la retta di calibrazione esterna per la quantificazione del lattosio. Come descritto nella prossima sezione, sono però stati riscontrati dei problemi di recupero, che quindi costringono ad impiegare una retta di taratura per aggiunte standard per la corretta quantificazione dell'analita. Però la calibrazione per aggiunte standard, purché efficace, richiede tempi di preparazione del campione e di analisi che sono difficilmente compatibili con la routine ordinaria e pertanto si riserva il suo utilizzo in casi limitati quando non sia presente un metodo alternativo.

5.3.6. Recupero (R%)

In chimica analitica, il termine recupero (R%) si riferisce alla frazione di analita d'interesse che è inizialmente presente nel campione in esame (o viene aggiunta), che viene correttamente estratta e presentata alla misurazione.

In questo lavoro di tesi il recupero è stato calcolato dal rapporto delle pendenze (*b*) della retta di calibrazione per aggiunte standard serie P e la retta di calibrazione per aggiunte standard serie D in base all'Equazione 11, considerando quindi il contributo statistico di tutte le concentrazioni indagate sul recupero.

$$R\% = \frac{b \text{ serie } P}{b \text{ serie } D} \cdot 100$$

Equazione 11

I valori di R% calcolati per tutti i campioni analizzati sono riportati in Tabella 16. Come si può vedere, con il solvente acetonitrile si ottengono recuperi bassi e non accettabili, ad eccezione dei campioni B e H. I lattini B e H sono entrambi parzialmente scremati, come la maggior parte degli altri campioni, non è quindi stato possibile trovare una correlazione tra i valori di recupero ottenuti in funzione del tipo di matrice.

Considerati i bassi recuperi ottenuti con il solvente acetonitrile, sono state eseguite, per alcuni campioni, delle prove di estrazione con un altro solvente, il metanolo. Con esso si ottengono ottimi recuperi, intorno al 100%, per tutti i campioni analizzati.

Tabella 16: valori di R% calcolati per tutti i campioni di latte analizzati, con entrambi i solventi utilizzati per le prove di estrazione.

CAMPIONE	ACN	MeOH
A	41%	99%
B	71%	92%
C	54%	/
D	39%	/
E	40%	/
F	56%	/
G	31%	/
H	92%	85%
I	55%	96%

Entrambi i solventi sono adeguati per la rimozione delle proteine dalla matrice latte, come confermato dagli ottimi EM% precedentemente riportati in Tabella 15. Ma, mentre l'estrazione del campione con acetonitrile porta a perdite significative di analita, con il metanolo questo problema non si presenta.

Acetonitrile e metanolo sono ambedue polari, l'acetonitrile ha però una polarità più elevata ($\mu_{\text{CH}_3\text{CN}}=3.9 \text{ D}$, $\mu_{\text{CH}_3\text{OH}}= 1.9 \text{ D}$)^{69,70} e ciò probabilmente gli permette di competere maggiormente con le interazioni deboli che caratterizzano la struttura tridimensionale delle proteine, portando ad una loro più rapida denaturazione. Infatti, non appena l'acetonitrile viene aggiunto ai campioni di latte, durante la procedura di pretrattamento, si nota l'immediata precipitazione di solido bianco, le proteine appunto. Invece con il metanolo la precipitazione risulta più lenta (Figura 30).

È possibile che la rapida denaturazione delle proteine porti ad una perdita di analita. Nella veloce precipitazione causata dall'acetonitrile è infatti probabile che le proteine intrappolino, e, di conseguenza sottraggano dalla fase acquosa, parte del lattosio presente, facendolo precipitare con esse. La più lenta precipitazione ottenuta con il metanolo, permette invece

di estrarre correttamente tutto il lattosio. I valori di concentrazione ottenuti e riportati in Tabella 18 e Tabella 19 riportate in seguito (sezione 5.3.8.), sembrano sostenere questa ipotesi. Infatti, nei campioni estratti con metanolo, è stata sempre trovata una concentrazione di lattosio superiore rispetto a quella ottenuta per gli stessi campioni ma trattati con acetonitrile. Oppure, la maggior concentrazione di lattosio rivelata nei campioni trattati con metanolo, potrebbe essere dovuta alla capacità di questo solvente di rompere delle strutture presenti nel latte, come ad esempio i globuli lipidici, che potrebbero aver intrappolato una quantità di lattosio durante la loro formazione. Queste sono tutte ipotesi che potrebbero essere verificate da lavori futuri.



Figura 30: confronto tra estrazione effettuata con solvente acetonitrile e con solvente metanolo.

Quando l'estrazione del campione viene effettuata con acetonitrile, anche lo standard interno subisce problemi di recupero, ma in modo differente rispetto all'analita. Il recupero medio per lo standard interno è del 30%. Poiché dai dati della calibrazione per aggiunte standard serie P si evince che lo standard interno e l'analita lattosio, aggiunti inizialmente, vengono recuperati diversamente, le pendenze delle rette P e D sono differenti (Figura 31), ciò comporta che i valori di concentrazioni ricavati con le due curve di taratura per aggiunte standard, non possono essere confrontati. Invece, se si utilizza il metanolo per la procedura di estrazione, questo problema non si verifica: sia lo standard interno che il lattosio vengono recuperati correttamente, di conseguenza le pendenze delle rette delle tre curve di taratura

sono statisticamente uguali (Figura 32) e i tre valori di concentrazione ottenuti possono essere confrontati.

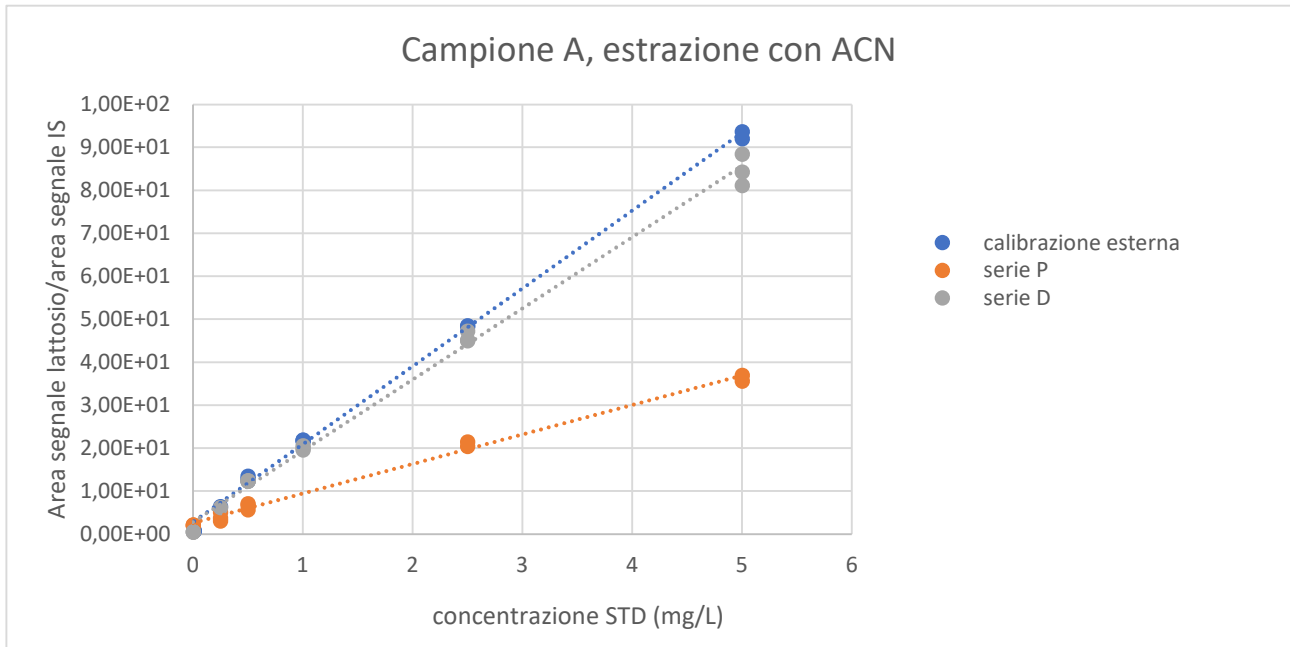


Figura 31: rette di taratura ottenute per il campione A estratto con acetonitrile. Per tutti i punti $RDS\% < 20\%$ ($n=3$).

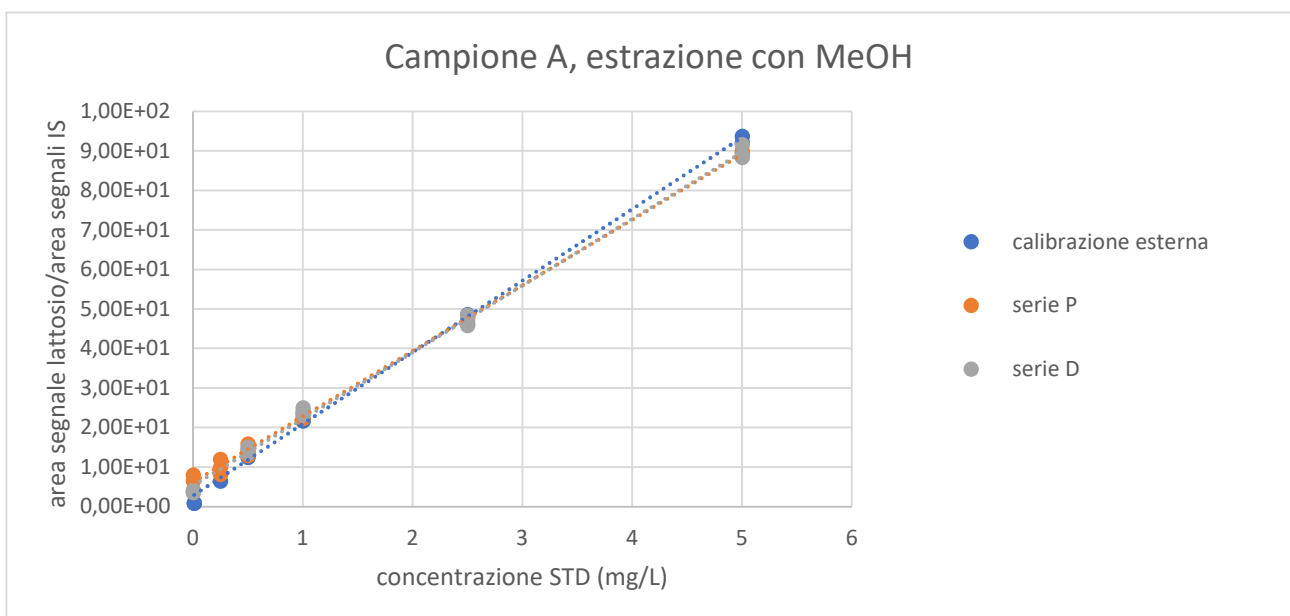


Figura 32: rette di taratura ottenute per il campione A estratto con metanolo. Per tutti i punti $RDS\% < 20\%$ ($n=3$).

5.3.7. Accuratezza (A%)

L'accuratezza di un metodo analitico si riferisce alla capacità del metodo di fornire risultati che sono vicini al valore vero o al valore di riferimento noto di una misura. L'accuratezza è dunque una caratteristica fondamentale del metodo analitico, essenziale per garantire la validità dei dati ottenuti. Per quanto concerne la concentrazione di lattosio nei latti *lactose free*, non c'è un valore vero a cui la misura deve tendere, c'è però un valore limite dichiarato in etichetta (lattosio < 0.01% o < 0.1%).

Nel presente lavoro di tesi l'accuratezza del metodo è stata valutata dal rapporto tra le pendenze (*b*) della retta di calibrazione per aggiunte standard serie P e la retta di calibrazione esterna, secondo la seguente Equazione 12:

$$A\% = \frac{b \text{ serie P}}{b \text{ calibrazione esterna}} \cdot 100 \quad \text{Equazione 12}$$

I valori di A% ottenuti per tutti i campioni sono riportati in Tabella 17. Si può notare che l'accuratezza è sempre bassa e non accettabile per tutti i campioni, fatta eccezione per il latte H, quando sono stati estratti con acetonitrile, è invece ottima se per l'estrazione è stato usato il metanolo. Solo il metodo che prevede l'estrazione con acetonitrile è dunque accurato.

Tabella 17: valori di A% calcolati per tutti i campioni di latte analizzati, con entrambi i solventi utilizzati per le prove di estrazione.

CAMPIONE	ACN	MeOH
A	38%	92%
B	69%	121%
C	44%	
D	32%	
E	33%	
F	47%	
G	32%	
H	121%	108%
I	34%	74%

5.3.8. Differenza tra i valori ottenuti con le diverse calibrazioni

Analisi dei campioni ottenuti mediante estrazione con acetonitrile

Per i campioni estratti con acetonitrile, si notano delle grandi differenze tra i valori di concentrazione ricavati con la retta di calibrazione per aggiunte standard serie P, e i valori di concentrazione ricavati con la serie D e con la retta esterna, i cui valori sono invece comparabili (Tabella 18). La causa di questa differenza può essere trovata nella perdita di analita dovuta al basso fattore di recupero, riscontrato confrontando le pendenze come descritto in precedenza (sezione 5.3.6.) La differenza di valori di concentrazione ottenuti è più evidente se la normalizzazione delle aree dei segnali non viene applicata, ma anche nel caso in cui sia seguita la procedura di normalizzazione la differenza è significativa, infatti, come evidenziato in precedenza, anche lo standard interno subisce problemi di recupero, ma in modo diverso rispetto al lattosio e pertanto non è in grado di compensare l'effetto del recupero.

Poiché lo standard interno e l'analita lattosio vengono recuperati diversamente, le pendenze delle rette di calibrazione per le serie P ottenute tramite normalizzazione dipendono anche dal rapporto tra i fattori di recupero per i due analiti:

$$\frac{S^L}{S^{IS}} \propto \frac{C^{L,post}}{C^{IS,post}} = \frac{C^{L,pre}}{C^{IS,post}} \times \frac{X^L}{X^{IS}} \quad \text{Equazione 13}$$

Dove S^{IS} , $C^{IS,post}$, $C^{IS,pre}$ sono rispettivamente i valori di area del segnale ottenuto allo spettro di massa per lo standard interno, la sua concentrazione nel campione prima e dopo la procedura di separazione; allo stesso modo S^L , $C^{L,post}$, $C^{L,pre}$ sono rispettivamente i valori di area del segnale ottenuto allo spettro di massa per il lattosio (L), la sua concentrazione nel campione prima e dopo la procedura di separazione. X^L , X^{IS} rappresentano la frazione molare di lattosio e glucosio che vengono recuperate con successo dopo la separazione delle proteine con acetonitrile.

L'Equazione 13 evidenzia come il rapporto dei segnali che andremo ad ottenere per ogni aggiunta dipenderà anche da X^L/X^{IS} . I valori ottenuti con le serie P quindi, nonostante siano più vicini al valore vero di concentrazione del campione, saranno soggetti a un errore dovuto al diverso recupero presente per analita e standard interno.

Tabella 18: valori di concentrazione in mg/L ottenuti, mediante retta di calibrazione esterna e rette di calibrazione per aggiunte standard serie P e D, per l'analita lattosio, estratto con acetonitrile, nei campioni di latte analizzato.

CAMPIONE	CALIBRAZIONE ESTERNA	SERIE P	SERIE D
A	57±2	197±47	109±35
B	53±5	245±62	65±2
C	26±7	117±35	13±2
D	32±7	122±17	14±4
E	23±3	96±12	14±4
F	63±6	146±13	25±7
G	30±4	157±16	13±2
H	328±33	254±24	208±42
I	404±2	644±27	392±27

Possiamo quindi concludere che, per quanto riguarda l'estrazione con l'acetonitrile, anche se sia lo standard di lattosio che lo standard interno vengono aggiunti prima dell'estrazione, il valore ottenuto sulla concentrazione finale mediante il metodo della normalizzazione, non è affidabile in quanto i due zuccheri vengono estratti in modo diverso dalla procedura di pretrattamento del campione.

Analisi dei campioni ottenuti mediante estrazione con metanolo

I risultati ottenuti a seguito di separazione della componente proteica mediante precipitazione con metanolo, sono tra loro comparabili (Tabella 19), come dimostrato dal T-test statistico effettuato, questo è sintomo del fatto che i fattori di recupero dell'analita e dello standard interno sono elevati per queste serie (Tabella 16). La comparabilità dei risultati, può essere interpretata come una conferma della robustezza e della riproducibilità del metodo utilizzato. In conclusione, i fattori di recupero elevati, indicati dalla comparabilità dei risultati dopo la separazione proteica con metanolo, suggeriscono che la procedura è efficace nel preservare le quantità relative di analita e standard interno.

Il metodo di analisi da preferire tra i due è dunque quello in cui la procedura di pretrattamento del campione viene condotta con metanolo.

Tabella 19: valori di concentrazione in mg/L ottenuti, mediante retta di calibrazione esterna e rette di calibrazione per aggiunte standard serie P e D, per l'analita lattosio, estratto con metanolo, nei campioni di latte analizzato.

CAMPIONE	CALIBRAZIONE ESTERNA	SERIE P	SERIE D
A	193±5	202±25	196±31
B	389±47	464±60	488±41
H	312±33	358±11	256±32
I	329±6	887±20	456±29

5.4. Confronto con il metodo HPAEC-PAD

La cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni con rivelamento amperometrico pulsato (HPAEC-PAD), è una tecnica ampiamente validata per la determinazione degli zuccheri in matrici biologiche³⁵. Il metodo si basa sulla conversione, in condizioni alcaline, dei carboidrati in ossianioni e sulla loro successiva separazione cromatografica con colonne che possiedono una fase stazionaria ionica, come precedentemente illustrato al paragrafo 3.2.

In questo lavoro di tesi, i campioni di latte A, B, C, D, F, oltre che con il metodo FIA-MS/MS, sono stati analizzati anche mediante HPAEC-PAD, al fine di confrontare le prestazioni dei due metodi analitici.

5.4.1. Analisi HPAEC-PAD

Per di riuscire a separare cromatograficamente i due isomeri lattosio e lattulosio, si è cercato di ottimizzare i parametri strumentali del cromatografo ionico utilizzato. In particolare sono state eseguite numerose prove variando:

- la concentrazione di idrossido di sodio presente nell'eluente in un range da 8 a 100mM;
- la temperatura della colonna nell'intervallo da 20 a 30°C;
- il flusso: 0.100mL/min o 0.200mL/min.

I tentativi effettuati hanno portato alla selezione dei seguenti parametri: eluente acqua ultrapura 12mM KOH, temperatura della colonna 25°C e flusso 0.200 mL/min. Tali parametri consentono di ottenere un'ottima separazione dei picchi cromatografici di lattosio e lattulosio (Figura 33) permettendo quindi una loro corretta integrazione. Anche gli altri zuccheri presenti nei campioni di latte vengono adeguatamente separati dalla colonna cromatografica utilizzata (Figura 34), volendo sarebbe dunque possibile effettuare un'analisi quantitativa di tutti i carboidrati.

La procedura di pretrattamento del campione scelta si basa sul lavoro di Churakova, E. et al. (2019)³⁵, prevede un primo passaggio di centrifugazione, una successiva diluizione del surnatante, uno step di ultrafiltrazione e un'ulteriore centrifugazione. La procedura richiede circa un'ora di tempo, ma è stata scelta per i suoi semplici passaggi.

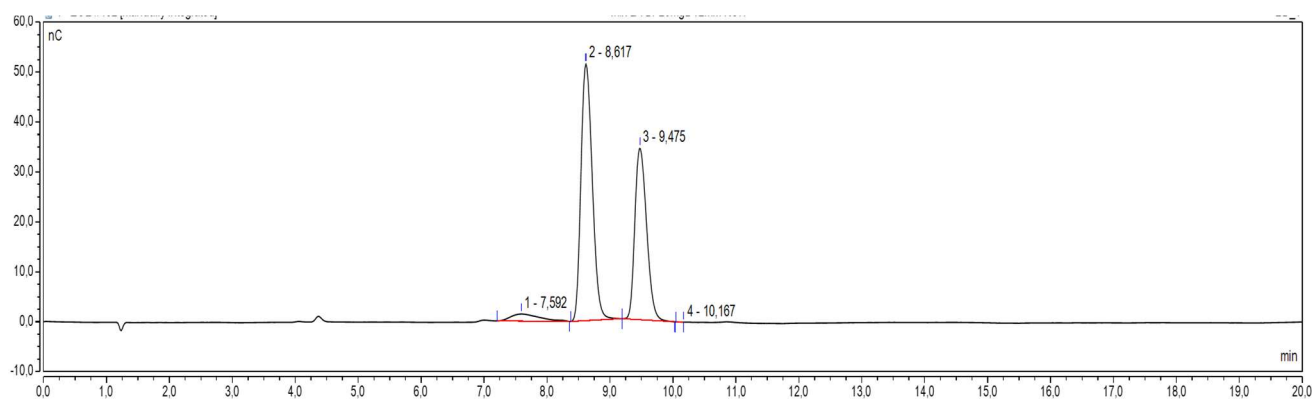


Figura 33: cromatogramma di una soluzione mix di standard di lattosio (picco 2, tempo di ritenzione 8.617) e lattulosio (picco 3, tempo di ritenzione 9.475) a 20mg/L, registrato utilizzando acqua ultrapura 12mM KOH come eluente, temperatura colonna 25°C, flusso 0.200mL/min.

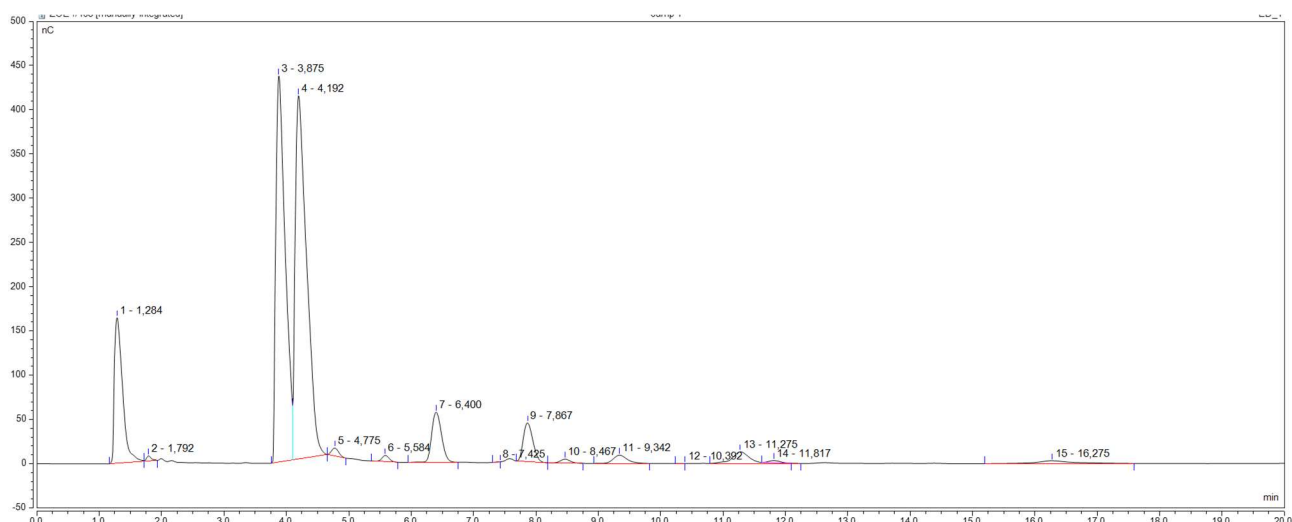


Figura 34: cromatogramma registrato per il campione B mediante HPAEC-PAD, eluente acqua ultrapura 12mM KOH, temperatura della colonna 25°C, flusso 0.200 mL/min. Il picco 10 (tempo di ritenzione 8.467) identifica il lattosio.

Al fine della quantificazione, sono state eseguite delle calibrazioni esterne analizzando soluzioni standard sia di lattosio che di lattulosio a varie concentrazioni. Inoltre, per verificare l'assenza di effetto matrice, e quindi verificare se fosse possibile quantificare la concentrazione di analita lattosio direttamente dalle rette esterne, per i campioni A e D sono state eseguite anche delle calibrazioni per aggiunte standard. Le concentrazioni di lattosio ottenute per i campioni A e D con le due differenti rette di taratura sono riportate in Tabella 20. Le concentrazioni risultano comparabili e confermano la possibilità di utilizzare la calibrazione esterna per la quantificazione.

A titolo di esempio, in Figura 35 viene riportata la retta di calibrazione esterna per il lattosio e in Figura 36 la retta di calibrazione per aggiunte standard eseguita per il campione A.

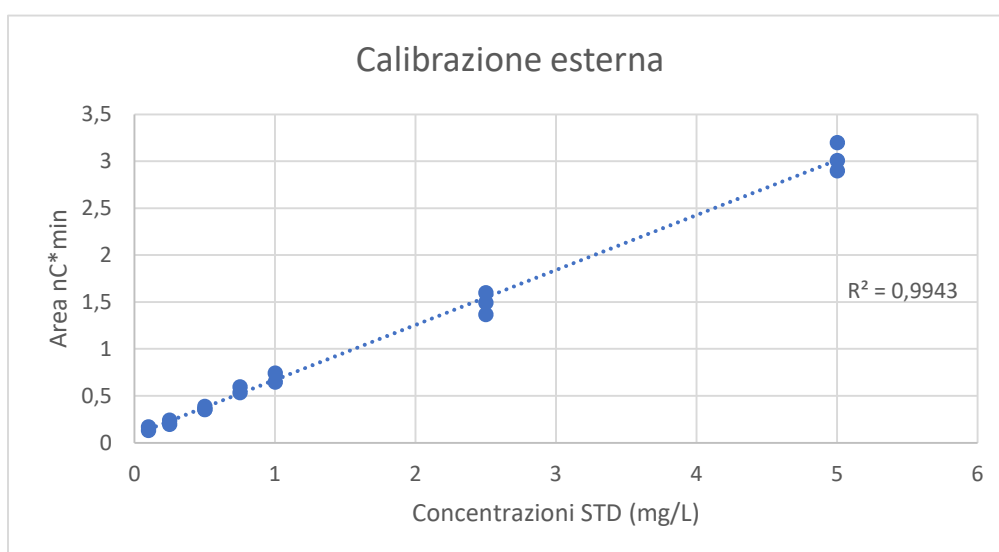


Figura 35: calibrazione esterna per il lattosio eseguita mediante HPAEC-PAD. Per tutti i punti RDS% < 20% (n=3).

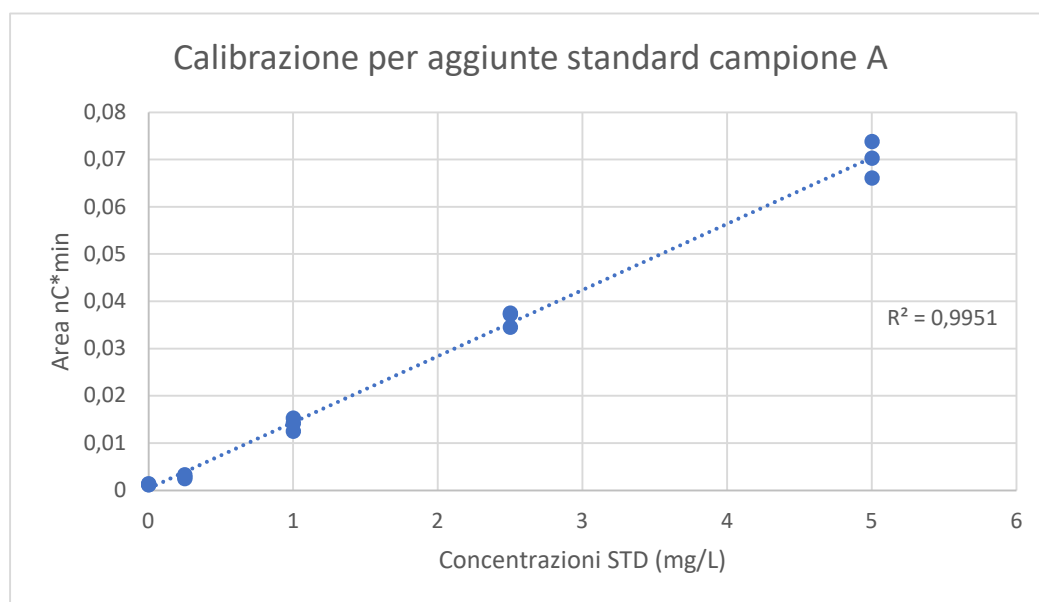


Figura 36: calibrazione per aggiunte standard eseguita mediante HPAEC-PAD per il campione A. tutti i punti RDS%<20% (n=3).

Tabella 20: concentrazioni (mg/L) di lattosio ottenute mediante calibrazione esterna e calibrazione per aggiunte standard con il metodo HPAEC-PAD.

CAMPIONI	CALIBRAZIONE ESTERNA	CALIBRAZIONE PER AGGIUNTE STANDARD
A	128±4	113±2
B	202±5	/
C	98±3	/
D	215±5	220±2
F	123±4	/

5.4.2. T-test

Per confrontare le concentrazioni di lattosio ottenute mediante analisi FIA-MS/MS e quelle ottenute mediante analisi HPAEC-PAD, è stato eseguito un T-test.

Il T-test è un test statistico frequentemente utilizzato in chimica analitica per confrontare i risultati ottenuti con due diverse tecniche. In questo test, il valore critico da calcolare è la grandezza t , definita come:

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{(s_{\bar{x}_A}^2 + s_{\bar{x}_B}^2)}}$$

Equazione 14

Dove \bar{x}_A è la concentrazione media dell'analita nel campione da analizzare ricavata dalla retta per aggiunte standard (in questo caso serie P del metodo FIA-MS/MS per i campioni C, D, F e invece serie D per i campioni A e B), e \bar{x}_B è la concentrazione media dello stesso analita ma ricavata mediante la retta di calibrazione esterna (in questo caso quella effettuata con il metodo HPAEC-PAD). I parametri $s_{\bar{x}_A}^2$ e $s_{\bar{x}_B}^2$ sono le deviazioni standard sulle concentrazioni dell'analita ricavate rispettivamente con la calibrazione per aggiunte standard e la calibrazione esterna.

Il valore di t che si ottiene, deve essere poi confrontato con i valori tabulati delle t di Student sulla base dei gradi di libertà (v) calcolati con la seguente equazione:

$$v = \frac{(s_{\bar{x}_A}^2 + s_{\bar{x}_B}^2)^2}{s_{\bar{x}_A}^4 + s_{\bar{x}_B}^4}$$

Equazione 15

Se il valore critico trovato per t è minore di quello tabulato, si può affermare che non ci sono differenze di natura sistematica tra le concentrazioni calcolate con i due metodi.

Il T-test effettuato ha evidenziato la presenza di un errore sistematico. Questo risultato era prevedibile per i latti C, D, F, poiché per essi, per il confronto dei metodi, sono state utilizzate le concentrazioni ricavate con la retta di calibrazione per aggiunte standard serie P riferita ai campioni trattati con acetonitrile, valori di concentrazione che, come discusso in precedenza, sono soggetti ad un errore dovuto al diverso recupero che si ha per l'analita e lo standard interno. Per i campioni A e B invece, per i quali è stato possibile effettuare il T-test considerando i valori di concentrazione ottenuti con le rette di calibrazione per aggiunte standard serie D riferite ai campioni pretrattati con metanolo, ci si aspettava un maggior riscontro tra le concentrazioni trovate (confronto Tabella 19 e Tabella 20).

In generale, il metodo basato su FIA-MS/MS fornisce concentrazioni di lattosio statisticamente più alte rispetto al metodo HPAEC-PAD, ciò indica appunto la presenza di un errore sistematico in uno dei due casi. Il metodo HPAEC-PAD è un metodo riportato in vari lavori di letteratura, prima dell'analisi strumentale, il metodo prevede un passaggio di diluizione e il successivo trattamento del campione con un filtro ad esclusione dimensionale. Quest'ultimo sfrutta l'azione di una membrana polimerica per la separazione delle proteine

del latte dal siero. Si può ipotizzare, dunque, che la membrana possa adsorbire analita sottraendolo all'analisi o che l'accumularsi delle proteine sulla membrana possa in qualche modo ostacolare il passaggio del lattosio nel filtrato, portando a successivi problemi di quantificazione dell'analita al momento dell'analisi.

Dal confronto tra i valori di concentrazione ottenuti, si nota inoltre che il metodo basato su analisi FIA-MS/MS ed estrazione con metanolo, in generale, fornisce concentrazioni di lattosio statisticamente maggiori sia rispetto al metodo FIA-MS/MS ed estrazione con acetonitrile, sia al metodo HPAEC-PAD. La ragione profonda di questo comportamento non è stata indagata, ma come accennato in precedenza può essere collegata ad errori sistematici dovuti alla fase preparativa, mentre si escludono errori sistematici legati al metodo di analisi, poiché le concentrazioni sono confrontabili tra i risultati ottenuti con metodo della calibrazione esterna e metodo delle aggiunte standard, sia considerando la serie P che la serie D, per quanto concerne i campioni estratti con metanolo. Una possibile ipotesi, comunque da verificare e per il momento totalmente speculativa, consiste nel considerare la possibilità che il trattamento con metanolo permetta di liberare lattosio da componenti nel latte che non sono accessibili all'acetonitrile. Possibili risposte potrebbero essere ottenute in futuro confrontando i dati ottenuti per lo stesso campione di latte con altri metodi di quantificazione validati, come quelli enzimatici.

6. Conclusioni

La fase di validazione del metodo analitico basato su analisi FIA-MS/MS, ha messo in luce il ruolo fondamentale della corretta preparazione del campione di latte per eseguire in modo adeguato questo tipo di analisi.

La procedura di estrazione basata sulla precipitazione delle proteine con acetonitrile ha evidenziato la presenza di problemi legati al recupero dell'analita lattosio e dello standard interno utilizzato, tali da non permettere una corretta quantificazione dell'analita stesso. Invece, il metodo estrattivo basato sull'utilizzo del metanolo, risulta validato in quanto ha fornito valori ottimali relativamente a recuperi (mediamente del 93%), effetto matrice (mediamente del 97%) e accuratezza (mediamente del 99%). Questo permette di affermare, considerata anche la precisione, che la quantificazione dell'analita è possibile mediante l'utilizzo di una retta di calibrazione esterna, evitando quindi il dispendio di tempo e risorse necessario nel caso del metodo delle aggiunte standard.

Lavori futuri potrebbero concentrarsi sullo studio di quanto la polarità e le altre caratteristiche del solvente influiscano sulla corretta estrazione del lattosio, sarebbe infatti interessante testare la procedura di preparazione del campione per analisi FIA-MS/MS con un'ampia gamma di solventi.

Un'ultima considerazione è relativa alle concentrazioni di lattosio trovate nei campioni di latte analizzato. Sono stati selezionati latti commerciali, di varie marche e con diverso contenuto lipidico che dichiarano in etichetta di avere contenuto di lattosio <0.01% ovvero <100 mg/L (campioni A, B, C, D, E, F, H) o contenuto di lattosio <0.1% ovvero <1000 mg/L (campioni G, I). Per tutti i campioni con contenuto di lattosio inferiore allo 0.01% analizzati, le concentrazioni trovate sono maggiori rispetto al limite riportato in etichetta, in alcuni casi la differenza è poco significativa, in altri invece no. I latti G e I sono invece risultati in linea con quanto riportato in etichetta. A riguardo sarebbe importante valutare quali siano i metodi utilizzati dalle aziende produttrici per misurare la concentrazione di lattosio nei loro prodotti e metterli in relazione con quelli sviluppati e testati nel presente lavoro di tesi, anche questo è un lavoro che potrà essere sviluppato in futuro.

7. Ringraziamenti

Ringrazio la Professoressa Bogialli per avermi accolta nel suo gruppo di ricerca. Ringrazio il mio relatore, Marco, per la sua risata così fragorosa e sincera che contagia tutti quelli che gli stanno attorno, per il suo modo di porsi con noi studenti che permette di creare un clima amichevole e di collaborazione reciproca in laboratorio e per avermi spiegato la teoria che sta dietro agli strumenti. Ringrazio la Professoressa Schievano per le stimolanti domande fatte durante gli incontri di aggiornamento tesi. Ringrazio Alessandra, per la sua gentilezza, per avermi accolta nel suo ufficio, per avermi chiesto ogni giorno "come va?", per avermi aiutata con il rilevatore elettrochimico e per i numerosi racconti sulle sue esperienze di vita, accademica e non, molto incoraggianti. Ringrazio Silvia per l'infinita pazienza, per la disponibilità, per le tante spiegazioni. Ringrazio Samuele per la compagnia e per le risate, per avermi messo ansia, per avermi assecondato nella preparazione degli esperimenti per bambini, ma lo ringrazio soprattutto perché, al contrario di altri con cui ho lavorato, non mi ha mai detto "faccio io che tu non sai fare" o "faccio io che sei troppo lenta", mi ha lasciato fare anche se commettevo errori, ripetendomi le frasi "ricordati che qui puoi anche sbagliare" o "prima si impara a fare le cose fatte bene, poi a farle veloce", questo mi ha permesso di migliorare molto. Ringrazio Andrea V. per la puzza di vongole, per la compagnia, per gli scherzi, per le sedute psicologiche, per le visite ai musei, per il supporto tecnico, per le caramelle Polo, per il tè e i biscotti, per gli aperitivi mancati e per le etichette sulla schiena. Ringrazio Chiara per gli spuntini, per aver condiviso il tavolo con me, per avermi portata a Torino, per essere brava in matematica, per tutte le vials scritte e per i giretti al distributore dell'acqua per vedere se erano arrivati nuovi libri. Ringrazio Juliette per avermi fatto da guida turistica in giro per Padova, per la sua solarità, per la sua voce squillante, per i suoi racconti sulla Francia. Ringrazio Irene e Giorgio per le relazioni, per gli appunti, per i consigli sugli esami. Ringrazio Teresa, Lisa, Annarosa, Sara per esserci fin dalle superiori, per i fantastici ritrovi, per essere pazze almeno quanto me, per non giudicare, per il supporto in tutti i momenti del bisogno, perché anche per loro non sono importanti i voti, e per tantissime altre cose ma soprattutto per l'amicizia. Ringrazio Elisa per esserci da sempre anche se ora ci vediamo poco, per pensarla esattamente al contrario di me sull'università, per le sue paranoie e i suoi audio da 5 minuti. Ringrazio le mie fantastiche zie per l'amore e l'interessamento costante. Ringrazio anche tutti gli altri parenti, zii, nonni e cugini vari, ma in particolare mio cugino Lorenzo per avermi rubato la camera in un momento critico, quale il periodo della tesi, e mia sorella Eva per aver, sbuffando, condiviso la sua. Ringrazio i miei

genitori per avermi permesso di fare l'università, per l'amore che sempre mi danno nonostante le idee differenti dalle mie, e soprattutto per aver sopportato i miei estremi nervosismi prima degli esami. E per ultimo ringrazio la persona più importante della mia vita, il mio Andre, senza il quale mai sarei arrivata a questo punto, lo ringrazio per il supporto sempre e comunque, per le innumerevoli spiegazioni e delucidazioni, chimiche e non, per risolvere sempre tutti i miei problemi, per la gioia che mi dona sempre, per la sua presenza così familiare e rassicurante, per la sua eleganza, per la sua infinita gentilezza nei miei confronti, per apprezzarmi così come sono, per spronarmi a fare sempre meglio, per credere in me sempre, insomma grazie veramente per ogni cosa.

8. Bibliografia

- ¹ Murphy, K.; Curley, D.; O’Callaghan, T. F.; O’Shea, C.; Dempsey, E. M.; O’Toole, P. W.; Ross, R. P.; Ryan, C. A.; Stanton, C. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 40597
- ² Dunne J.; Evershed R.P.; Salque M.; Cramp L.; Bruni S.; Ryan K.; Biagetti S.; di Lerna S. *Nature* **2012**, *486*, 390–94
- ³ Foroutan A.; Guo A.C.; Vazquez-Fresno R.; Lipfert M.; Zhang L.; Badran J.H.; Budinski Z.; Mandal R.; Ametaj B.N.; Wishart D.S., *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 4897-4914
- ⁴ Food and Agriculture Organization of the United Nations, Dairy Market Review, **2022**
- ⁵ <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/>. Accessed September 22, 2023
- ⁶ Roy D.; Ye A.; Moughan P.J.; Singh H. *Frontiers in Nutrition*, **2020**, *7*, 577759
- ⁷ Fox, P.F. *Milk: an overview*; Elsevier Inc., **2009**
- ⁸ Pereira P.C. *Nutrition*, **2014**, *30*, 619-627
- ⁹ Andreas N.J.; Kampmann B.; Le-Doare K.M. *Early Human Development*, **2015**, *91*, 629-635
- ¹⁰ Insel P.; Turner E.; Ross D. *Nutrition 2nd ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers*, **2003**
- ¹¹ Gaucheron F. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2011**, *30*, 400S-409S
- ¹² Portnoy M.; Barbano D.M. *J. Dairy Sci.*, **2021**, *104*, 8314-8325
- ¹³ Holsinger, V.H. *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, water, salt and vitamins*, 2nd edn., Chapman & Hall, London, **1997**
- ¹⁴ Fox P.F. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, Springer Science, **2009**
- ¹⁵ Seki N.; Saito H. *International Dairy Journal*, **2012**, *22*, 110-115
- ¹⁶ Rentschler, E.; Kuschel, B.; Krewinkel, M.; Claassen, W.; Gluck, C.; Jiang, B.; Mu, W. M.; Stressler, T.; Fischer, L. *Food Anal. Method*, **2016**, *9*, 2210-2222
- ¹⁷ Catanzaro R.; Sciuto M.; Marotta F. *Nutrition Research*, **2021**, *89*, 23-34
- ¹⁸ Anguita-Ruiz A.; Aguilera C.M.; Gil A. *Nutrients*, **2020**, *12*, 2689
- ¹⁹ Facioni M.S.; Raspini B.; Pivari F.; Dogliotti E.; Cena H. *J. Transl Med*, **2020**, *18*, 260
- ²⁰ Deng Y.; Misselwitz B.; Dai N.; Fox M. *Nutrients*, **2015**, *7*, 8020-8045
- ²¹ Savilahti, E.; Launiala, K.; Kuitunen, P. *Arch Dis Child*, **1983**, *58*, 246
- ²² Parker A.M.; Watson R.R. *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*, Chapter 16, Elsevier Inc., **2017**
- ²³ Micic, D.; Rao, V.L.; Rubin D.T. *JAMA Clinical Review & Education*, **2019**, *322*, 1600-1601
- ²⁴ Storhaug C.L.; Fosse S.K.; Fadnes L.T. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, **2017**, *2*, 738–746
- ²⁵ Ingram, C. J.; Mulcare, C. A.; Itan, Y.; Thomas, M. G.; Swallow, D. M. *Hum Genet*, **2009**, *124*, 579-591

-
- ²⁶ Swagerty D.L.; JR M.D.; M.P.H.; Walling A.D.; M.D.; Klein R.M. *Am Fam Physician*, **2002**, *65*, 1845-1850
- ²⁷ Domínguez-Jiménez J.L.; Fernández-Suárez A.; Ruiz-Tajuelos S.; Puente-Gutiérrez J.J.; Cerezo-Ruiz A. *Rev. Esp Enferm Dig*, **2014**, *106*, 381-385
- ²⁸ Suri S.; Kumar V.; Prasad R.; Tanwar B.; Goyal A.; Kaur S.; Gat Y.; Kumar A.; Kaur J.; Singh D. *J. Nutrition Intermediary Metabolism*, **2019**, *15*, 27-34
- ²⁹ Li A.; Zheng J.; Han X.; Yang S.; Cheng S.; Zhao J.; Zhou W.; Lu Y. *Foods*, **2023**, *12*, 2553
- ³⁰ Dekker P.J.T.; Koenders D.; Bruins M.J. *Nutrients*, **2019**, *11*, 551
- ³¹ Dorau R.; Jensen P.R.; Solem C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2021**, *105*, 4943-4955
- ³² Goraieb, K.; Alexandre, T.L.; Bueno M.I. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, *595*, 170-175
- ³³ <https://www.associazioneaili.it/> Accessed October 17, 2023
- ³⁴ https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=4465&area=Alimenti%20particolari%20e%20integratori&menu=dietetici Accessed October 17, 2023
- ³⁵ Churakova, E.; Peri, K.; Vis, J.S.; Smith, D.W.; Beam, J.M.; Vijverberg M.P.; Stor, M.C.; Winter, R.T. *International Dairy Journal*, **2019**, *96*, 126-131
- ³⁶ Nijpels, H.H.; Evers, P.H.; Novak, G.; Ramet, J.P. *Journal of Food Science*, **1980**, *45*, 1684-1687
- ³⁷ Sasic, S.; Ozaki, Y. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1, 64-71
- ³⁸ Luzzana, M.; Agnallini, D.; Cremonesi, P.; Caramenti, G.; De Vita, S. *Le Lait*, **2003**, *83*, 5, 409-416
- ³⁹ Trani, A.; Gambacorta, G.; Loizzo, P.; Cassone A.; Fasciano C.; Zambrini A.V.; Faccia M. *Food Chemistry*, **2017**, *233*, 385-390
- ⁴⁰ Bisswanger, H. *Perspectives in Science*, **2014**, *1*, 41-55
- ⁴¹ Kurzyna-Szklarek, M.; Cybulska, J.; Zdunek, A. *Food Chemistry* **2022**, *394*, 133466
- ⁴² Han, B.; Park, J.W.; Kang, M.; Kim, B.; Jeong, J.S.; Kwon, O.S.; Son, J. *Journal of Chromatography B* **2020**, *1160*, 122370
- ⁴³ Corradini, C.; Cavazza, A.; Bignardi, C. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2012**, *13*, 487564
- ⁴⁴ Rohrer, J. *Thermo Fisher Scientific* **2013**, technical note
- ⁴⁵ van Scheppingen, W.B.; van Hilten, P.H.; Vijverberg, M.P.; Duchateau A.L.L. *Journal of Chromatography B* **2017**, *1060*, 395-399
- ⁴⁶ Gross, J.H. *Spettrometria di massa* EdiSES edizioni S.r.l., **2016**
- ⁴⁷ Holler, F.J.; Skoog, D.A.; Crouch S.R. *Chimica Analitica strumentale*, II edizione, EdiSES, **2009**
- ⁴⁸ <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/PS-63912-LC-MS-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-PS63912-EN.pdf> Accessed November 2, 2023
- ⁴⁹ Lee, Y.C. *Analytical Biochemistry*, **1990**, *189*, 151-162

-
- ⁵⁰ Tedesco, R.; Barbaro, E.; Zangrando R.; Rizzoli, A.; Malagnini, V.; Gambaro, A.; Fontana, P.; Capodaglio, G. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**, *412*, 5217-5227
- ⁵¹ Speight, J.G. *Lange's Handbook of Chemistry*, VI Edition, McGRAW-HILL, **2004**
- ⁵² Lee, Y.H.; Lin, T.I. *Journal of Chromatography B*, **1996**, *681*, 87-97
- ⁵³ Rohrer, J. *Thermo Fisher Scientific* **2013**, technical note 21
- ⁵⁴ Rohrer, J. *Thermo Fisher Scientific* **2021**, technical note 70671
- ⁵⁵ Rohrer, J. *Carbohydrate Analysis by Modern Liquid Phase Separation Techniques*, chapter 4, Elsevier, **2021**
- ⁵⁶ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/088956> Accessed November 4, 2023
- ⁵⁷ Garballo-Rubio, A.; Soto-Chinchilla, J.; Moreno, A.; Zafra-Gomez, A. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2018**, *66*, 39-45
- ⁵⁸ Gabbanini, S.; Lucchi, E.; Guidugli, F.; Matera, R.; Valgimigli, L. *J Mass Spectrom*, **2010**, *45*, 1012
- ⁵⁹ Suzuki, K.; Tobe, A.; Adachi, S.; Daikoku, S.; Hasegawa, Y.; Shioiri, Y.; Kobayashi, M.; Kanie, O. *Org Biomol Chem*, **2009**, *7*, 4726
- ⁶⁰ Bronsema, K.J.; Bischoff, R.; van de Merbel, N. *Journal of Chromatography B*, **2012**, *893-894*, 1-14
- ⁶¹ Watson, D. G. *Analisi farmaceutica*; 3rd ed.; Edra Masson, **2014**
- ⁶² Smith, R.M. *Journal of Chromatography A*, **2003**, *1-2*, 3-27
- ⁶³ Moldoveanu, S. C.; David, V. *Journal of Chromatography Library*; Elsevier, **2002**
- ⁶⁴ Aggrawal, M.; Rohrer, J. *Thermo Fisher Scientific* **2018**, application note 72780
- ⁶⁵ Monti, L.; Negri, S.; Meucci, A.; Stroppa, A.; Galli, A.; Contarini, G. *Food Chemistry*, **2017**, *220*, 18-24
- ⁶⁶ Araujo, P. *Journal of Chromatography B*, **2009**, *877*, 2224-2234
- ⁶⁷ Currie, L. A. *Analytica Chimica Acta*, **1999**, *391*, 127
- ⁶⁸ Miller, J.N. *Analyst*, **1991**, *116*, 3
- ⁶⁹ Steiner, P.A.; Gordy, W. *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1996**, *21*, 291-301
- ⁷⁰ Yu, H.; Geerke, D.P.; Liu, H.; van Gunsteren, W.F. *J Comput Chem*, **2006**, *27*, 1494-1504