Application Note AN-RS-051

Schneller Nachweis von illegalen Verfälschungen in Nahrungsergänzungsmitteln mit Raman

Analytik von "Honey for Men" mit Raman-Spektroskopie

Nahrungsergänzungsmittel, die oft als alternative Arzneimittel beworben werden, sind sowohl in der Europäischen Union als auch in den Vereinigten Staaten als Lebensmittel eingestuft. Als solche unterliegen diese Produkte nicht denselben Tests, Qualitätskontrollen, Kennzeichnungen oder Vorschriften wie Arzneimittel. Dies veranlasst einige Hersteller, die Wirkung eines Nahrungsergänzungsmittels durch illegale Verfälschung mit nicht deklarierten Substanzen wie Arzneimitteln, Analoga oder nicht zugelassenen Zusatzstoffen aufzublähen. Diese Praxis liefert schnelle Ergebnisse und steigert den Umsatz, kann aber auch zu gesundheitlichen Komplikationen durch Nebenwirkungen und akute Vergiftungen führen. So enthalten beispielsweise Nahrungsergänzungsmittel für die sexuelle und sportliche Leistungsfähigkeit häufig nicht deklariertes Koffein, Steroide, Hormone und Arzneimittel zur Behandlung von Impotenz. Von gesteigerter Aggressivität bis hin zu Herzinfarkt und Überdosierung können die daraus resultierenden Nebenwirkungen gravierend sein. Eines dieser Produkte, "Hot Honey" oder "Honey for Men", ist ein einfach zu beschaffendes Nahrungsergänzungsmittel, das seinen Benutzern Kraft und Vitalität verspricht. Die SERS-Lösungen von Metrohm bieten eine schnelle, empfindliche und tragbare Möglichkeit, solche Nahrungsergänzungsmittel vor Ort und ohne Beeinträchtigung durch die Probenmatrix zu analysieren.

EINFÜHRUNG

Die Analyse von Nahrungsergänzungsmitteln ist traditionell zeitaufwändig, kostspielig und abhängig von laborgestützten Verfahren wie HPLC und GC-MS. Es werden schnelle Vor-Ort-Methoden benötigt, um die Landschaft der Nahrungsergänzungsmittel zu erfassen. Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) erfüllt diese Anforderungen; sie ist einfach zu handhaben, hochempfindlich, schnell, kostengünstig und tragbar. SERS nutzt Nanopartikelsubstrate, um das Raman-Signal zu verstärken und ein Fingerabdruck-Spektrum von sehr schwachen Analyten zu erzeugen. Die P-SERS-Substrate von Metrohm - praktische Einwegtests mit auf Papierstreifen gedruckten Nanopartikeln - sind ideal für den schnellen und kostengünstigen Nachweis verschiedener Spurenstoffe.

KONZEPTNACHWEIS

In einer Veröffentlichung der Wageningen University & Research wird eine umfassende Studie über die Entwicklung einer SERS-basierten Methode zum schnellen Nachweis von illegalen Verfälschungen in Nahrungsergänzungsmitteln vorgestellt [1]. Die Gruppe von Prof. van Ruth führte SERS-Studien mit dem Ziel durch, eine qualitative Screening-Methode zum Nachweis illegaler Verfälschungen in Nahrungsergänzungsmitteln zu entwickeln.

Qualitatives Screening und Nachweis

23 pharmazeutisch aktive Verfälschungsmittel wurden auf ihre SERS-Aktivität untersucht. Elf dieser Analyten lieferten sehr gute Signale, wenn sie mit Silber-P-SERS-Substraten und dem Metrohm Instant SERS Analyzer (MISA) getestet wurden. Diese wurden in eine kundenspezifische Referenzbibliothek von Verfälschungsmitteln aufgenommen, die für das Screening von Versuchsproben verwendet wird. Die aktiven Analyten und ihr aktueller Status in Nahrungsergänzungsmitteln, wie von der Europäischen Kommission (EC) festgelegt, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. SERS-aktive Verfälschungsmittel, ihre Art und ihr aktueller EG-Status in Nahrungsergänzungsmitteln, wie von der Europäischen Kommission festgelegt, sowie eine Zusammenfassung der Ergebnisse einschließlich des Hit Quality Index (HQI), der den Grad der Korrelation zwischen Proben- und Bibliotheksspektren angibt, und der Identifikationsgrenze (LOI) für jedes Verfälschungsmittel.

Analyt	Supplement Type	EC Status	HQI	LOI (% w/w)
Acetildenafil	Erektile Dysfunktion	Verboten	0.79–0.99	0.1
Fluoxetin HCl	Gewichtsverlust	Verboten	0.71–0.83	5.0
Homo Sildenafil	Erektile Dysfunktion	Verboten	0.79–0.99	0.1
Melatonin	Schlafregulierung	Erlaubt	0.79–0.93	5.0
Phenethylamin	Energie	Verboten	0.81–0.94	0.5
Piperin	Gewichtsverlust	Erlaubt	0.70–0.92	2.5
Sildenafil-Zitrat	Erektile Dysfunktion	Verboten	0.79–0.99	0.1
Synephrin	Gewichtsverlust	Erlaubt	0.70–0.81	5.0
Thiosildenafil	Erektile Dysfunktion	Verboten	0.60–0.99	0.1
Vardenafil HCl	Erektile Dysfunktion	Verboten	0.81–0.95	0.1
Vinpocetin	Gedächtnisunterstützung	Erlaubt	0.61–0.98	0.5

Beeinflussung durch Hilfsstoffe

Die einzigartige Unempfindlichkeit von SERS gegenüber vielen Hilfsstoffen ist ein entscheidender Vorteil dieser Technik. Eine Mischung gängiger Hilfsstoffe wurde sorgfältig formuliert, um das in marktüblichen Nahrungsergänzungsmitteln verwendete Füllmaterial zu repräsentieren. Dieser Füllstoff bestand aus mikrokristalliner Cellulose (95,0 % G/G), Magnesiumstearat (3,0 % G/G), Siliziumdioxid (1,0 % G/G), Hydroxypropylmethylcellulose (0,5 % G/G) und Titanoxid (0,5 % G/G), die jeweils auf ihre SERS-Aktivität untersucht wurden. Es wurde bestätigt, dass diese Stoffe eine geringe/keine SERS-Aktivität aufweisen und die Erkennung der Zielverfälschungen nicht beeinträchtigen dürften.

Grenze der Identifizierung (LOI)

Um den Nachweisbarkeitsbereich jedes Verfälschers abzuschätzen, wurden verschiedene Konzentrationen mit der Hilfsstoffmischung gemischt (0,1-50,0 % w/w). Jede künstlich verfälschte Probe wurde wie folgt verarbeitet: Von jeder Probe wurden 10 mg in ein Eppendorf-Röhrchen eingewogen und mit 100 µl Ethanol verdünnt. Jede Probe wurde geschüttelt und zentrifugiert, dann wurden 10 µl des Überstandes auf den Silber-P-SERS-Streifen getropft, 15 Minuten lang getrocknet und analysiert.

VERFÄLSCHUNG VON NAHRUNGSERGÄNZUNGSMITTELN

18 verschiedene kommerzielle Nahrungsergänzungsmittel, darunter neun Präparate zum Abnehmen und für den Lebensstil sowie neun Präparate zur Verbesserung der Potenz und des Sports, wurden beschafft, auf ihre SERS-Aktivität getestet und im Bereich von 0,1 % bis 5,0 % (w/w) verfälscht. Ethanol, das zur Extraktion des Targets verwendet wird, ohne die Matrix aufzulösen, wurde einfach in einem kleinen Fläschchen mit der Probe geschüttelt, dann wurde der Überstand direkt auf einen P-SERS-Streifen aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde mit der instrumentellen Analyse begonnen. Die MISA Cal-Software liefert innerhalb von Sekunden ein Ergebnis, begleitet von einem Hit Quality Index (HQI), der den Grad der Übereinstimmung zwischen Proben- und Bibliotheksspektren angibt. Der LOI für jedes Verfälschungsmittel gibt die niedrigste Konzentration an, bei der der HQI > 0,70 ist (Tabelle 1).

ERGEBNISSE

SERS war sehr effektiv bei der Erkennung aller Verfälschungen von Potenz- und Sportmitteln (d. h. Acetildenafil, Homo-Sildenafil, Sildenafil-Zitrat, Thiosildenafil und Vardenafil HCl), mit hohen Übereinstimmungswerten (0,79-0,99), selbst bei der niedrigsten getesteten Konzentration (LOI von 0,1 % w/w). Dies zeigt, dass einige der bekanntesten pharmazeutischen Produkte auf dem Markt (Viagra® für Sildenafil und Levitra® für Vardenafil) sowie deren nicht zugelassene Analoga weit unterhalb der aktiven therapeutischen Dosis erfolgreich nachgewiesen werden konnten. SERS war auch in der Lage, die Analyten Vinpocetin und Phenethylamin zur Gewichtsreduktion und für den gesunden Lebensstil mit einem LOI von 0,5 % w/w, Piperin mit einem LOI von 2,5 % w/w und Melatonin, Fluoxetin HCl und Synephrin mit einem LOI von 5,0 % w/w nachzuweisen.

APPLIKATIONEN IN DER PRAXIS

"Hot Honey" oder "Honey for Men" ist ein leicht zu beschaffendes Nahrungsergänzungsmittel, das Kraft und Vitalität verspricht. Die FDA warnt jedoch, dass solche Honigprodukte möglicherweise nicht angegebene Arzneimittel für erektile Dysfunktion, einschließlich Sildenafil und Tadalafil, in aktiven Mengen enthalten [2].

Metrohm Niederlande nutzte MISA, um beschlagnahmte Honigproben zu testen und den Nutzen der SERS-Lösungen von Metrohm im Kampf gegen illegale Verfälschungen zu verdeutlichen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Anwendung ist das Testen mehrerer SERS-Substrate zur Optimierung des Zielsignals. Während sich die Gruppe von Prof. Saskia aufgrund der einfachen Handhabung hauptsächlich auf Silber-P-SERS-Streifen konzentrierte, testete die Metrohm-Gruppe neben Gold- und Silberkolloidlösungen auch Gold-P-SERS-Streifen.

Vorbereitung der Probe

Es wurden vier Honigproben zur Verfügung gestellt, die jeweils bekannte Konzentrationen von Sildenafil und Tadalafil enthielten, die durch GC-MS bestätigt wurden (Tabelle 2).

Um die Proben für die SERS-Analyse vorzubereiten, wurde ein Teil jeder Probe einfach in 1 mmol/L Natriumhydroxid gelöst und dann mit Natriumchlorid und Isopropylalkohol (IPA) geschüttelt. Nach der Trennung wurde die organische Fraktion direkt auf P-SERS- und Kolloid-SERS-Substrate aufgetragen (Abbildung 1).

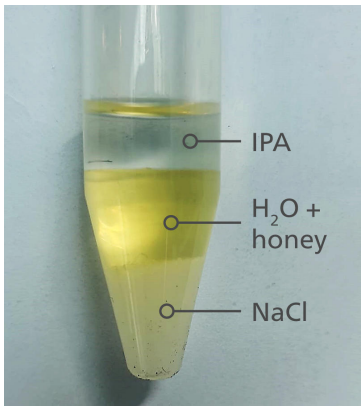

Abbildung 1. Ein einfaches Lösungsmittelextraktionsverfahren erwies sich als wirksam, um die Zielsubstanzen in eine organische Schicht (IPA) zu überführen und sie so von der Honigmatrix zu isolieren.

Tabelle 2. Beschlagnahmte Honigproben, die im Labor getestet wurden und nicht deklarierte Mengen der bekannten Potenzmittel Sildenafil und Tadalafil enthielten.

Probe	Analyt	Konzentration
1	Sildenafil	20–50 mg/15 g
2	Sildenafil	20–50 mg/15 g
3	Tadalafil	50 mg/10 g
4	Tadalafil	20–50 mg/15 g

ERGEBNISSE

Sildenafil

Die Honigproben 1 und 2 ließen sich sowohl mit Silber (Ag) P-SERS-Streifen als auch mit Gold (Au) Nanopartikel-Kolloidlösung (NP) problemlos analysieren; dies ist charakteristisch für Substanzen, die sowohl stark Raman-aktiv sind als auch gut mit SERS-Substraten binden. Die Spektren der Proben 1 und 2 sind in Abbildung 2 im Vergleich zu den Referenzspektren von Sildenafil von Metrohm dargestellt.

Man beachte, dass Honig selbst nach einer minimalen Probenvorbereitung nicht wesentlich zum Spektrum beiträgt. Die Ähnlichkeiten sind offensichtlich, und die MISA Cal-Software ordnet die Substanz korrekt drei verschiedenen Referenzspektren von Sildenafil mit sehr hohen HQI-Werten zu (Abbildung 3). Die Beweise für eine Sildenafil-Kontamination sind hier besonders stark, da nicht nur die Honigprobe mit einer kundenspezifischen SERS-Bibliothek übereinstimmt, sondern das Spektrum auch mit Sildenafil aus der größeren Illicit Library von Metrohm übereinstimmt.

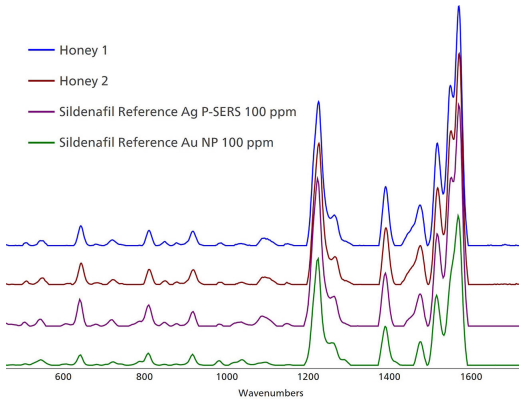

Abbildung 2. Ein einfaches Lösungsmittelextraktionsverfahren erwies sich als wirksam, um die Zielsubstanzen in eine organische Schicht (IPA) zu überführen und sie so von der Honigmatrix zu isolieren.

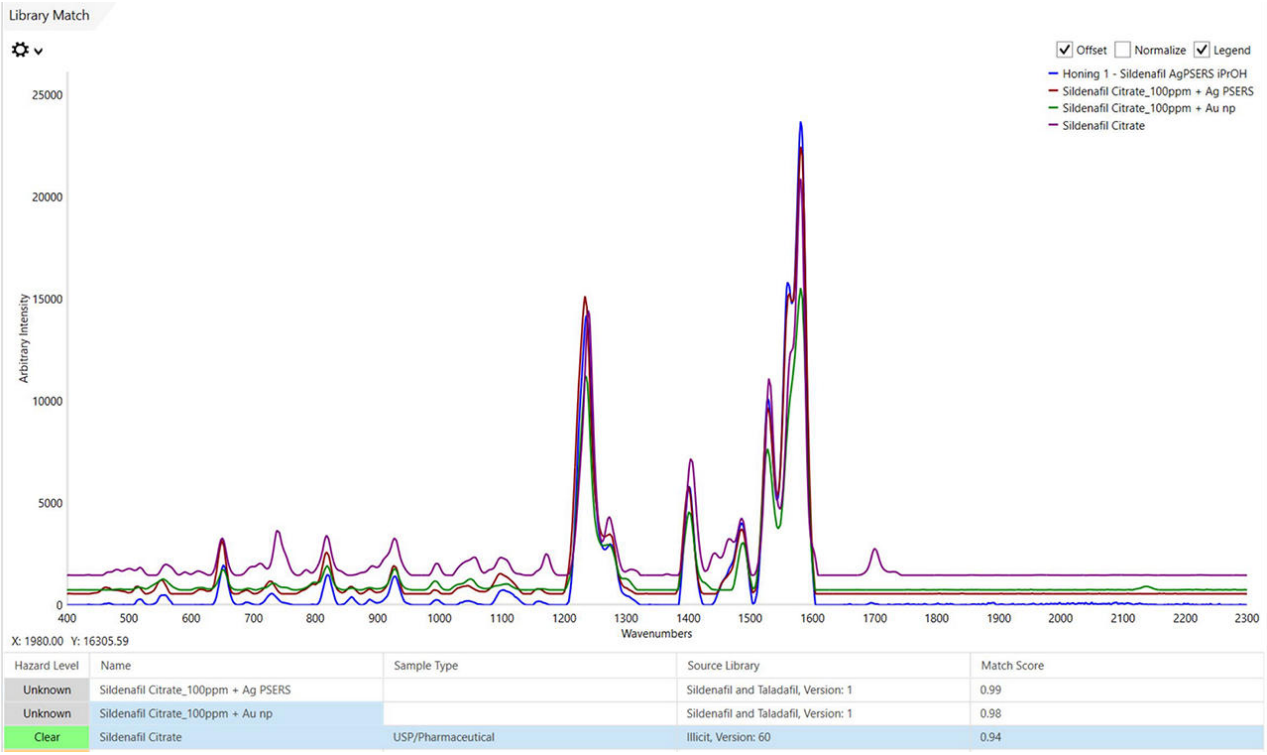

Abbildung 3. Bibliotheksübereinstimmungen zwischen Honigprobe 1 (blau) und Ag P-SERS- (rot) und Au NP SERS-Spektren (grün) sowie einem Sildenafil-Spektrum aus der Illicit Library von Metrohm (lila). Beachten Sie die sehr hohen HQI-Werte, die für alle Sildenafil-Übereinstimmungen erzielt wurden (HQI-Werte nahe bei 1 zeigen eine sehr starke Korrelation des Probenspektrums mit den Bibliotheksspektren an).

Tadalafil

Sowohl Silber- als auch Gold-P-SERS-Substrate lieferten eine schwache SERS-Verstärkung für Tadalafil, so dass eine Goldnanopartikel-Kolloidlösung getestet wurde, die ein gutes SERS-Signal lieferte (Abbildung 4).

Als die Gold-NP-Lösung zur Analyse der Honigproben 3 und 4 verwendet wurde, wurden beide mit einem Tadalafil-Referenzspektrum verglichen und beide Proben wurden korrekt als Tadalafil enthaltend identifiziert. Probe 3 ist unten in Abbildung 5 dargestellt und zeigt die hohe Sicherheit, die durch einen hohen HQI-Score durch die Bibliotheksabgleichsroutinen in der MISA Cal-Software gegeben ist.

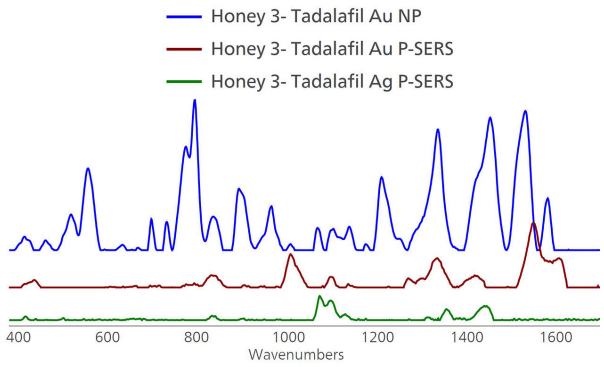

Abbildung 4. Von den drei getesteten SERS-Substraten, einschließlich Au NP, Au P-SERS und Ag P-SERS, lieferte nur die Au NP-Lösung (in blau) ein gutes SERS-Spektrum von Tadalafil.

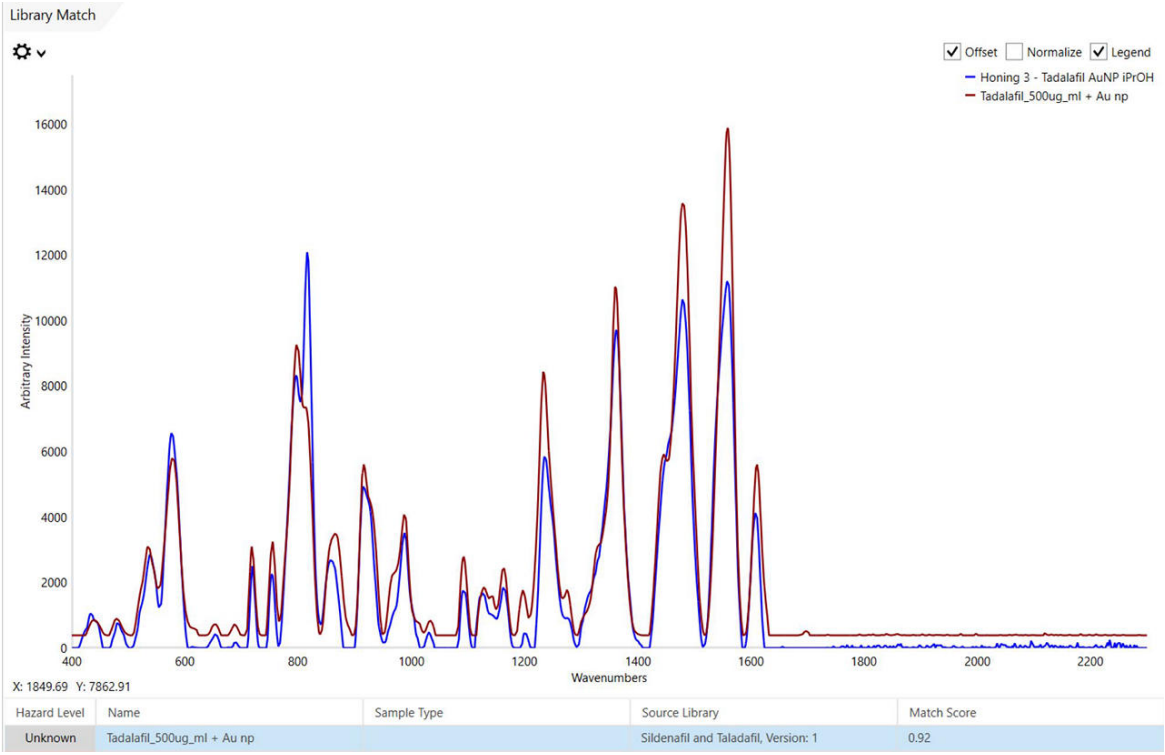

Abbildung 5. Das Spektrum der Honigprobe 3 nach einer einfachen Extraktion und Analyse mit Gold-NP-Kolloidlösung und MISA. Das Spektrum dieser Honigprobe (blau) ist mit dem Referenz-SERS-Spektrum von Tadalafil (rot) überlagert, mit dem es abgeglichen wurde.

Das Signal von Probe 4 ist deutlich schwächer als das von Probe 3 (Abbildung 6). Dies steht im Einklang mit der geringeren bekannten Konzentration von Tadalafil in der Probe.

In allen vier Honigproben wird das Vorhandensein von Sildenafil und/oder Tadalafil durch die SERS-Analyse bestätigt. Die Probenvorbereitung dauert im Durchschnitt 10 Minuten pro Probe, wobei der größte Teil davon für das Auflösen des Honigs in der NaOH-Lösung benötigt wird. MISA benötigt nur maximal 10 Sekunden für die Probenmessung.

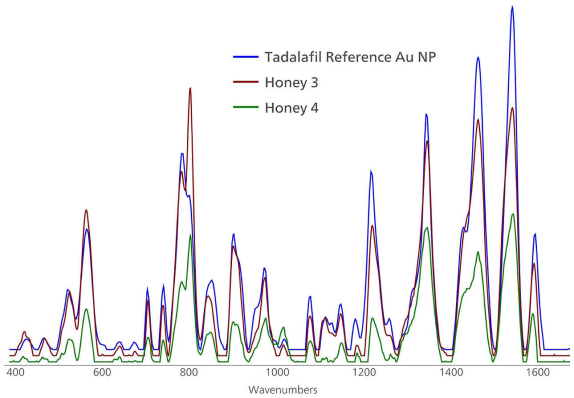

Abbildung 6. Das Vorhandensein von nicht deklariertem Tadalafil in Honig wird durch einen günstigen Vergleich von Honigproben mit einem Tadalafil-Gold-NP-SERS-Referenzspektrum bestätigt.

FAZIT

SERS erfreut sich als Analyseinstrument zunehmender Beliebtheit, da es hochempfindlich und kostengünstig ist und eine schnelle, tragbare Methode für den In-situ-Spuren-Nachweis bietet. Der Nachweis von illegalen Verfälschungen erfordert nicht mehr aufwändige Labortechniken wie Gas- oder Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie. Zu den wertvollen Merkmalen der SERS-Lösungen von Metrohm gehören:

- hohe Selektivität für Zielverfälschungen
- Fehlen von Matrixinterferenzen
- Einfachheit der Probenvorbehandlung und -analyse
- kostengünstige Analyse, die die Kosten für Laborausrüstung, Verbrauchsmaterialien und hochqualifiziertes Personal vermeidet

Wie externe und interne Forschungsarbeiten gezeigt haben, ermöglicht SERS die Identifizierung von Zielsubstanzen in Anwesenheit von erwarteten Hilfsstoffen bei sehr geringer Probenverarbeitung. Letztlich kann dies dazu beitragen, ahnungslose Verbraucher vor schädlichen Verfälschungen zu schützen.

Metrohm bedankt sich bei Professor Saskia van Ruth für ihre Mitarbeit und Unterstützung bei der Erstellung und Bearbeitung dieses Artikels.

AUTOREN

Dr. Melissa J. Gelwicks, Metrohm Content Specialist
Prof. Ruth van Saskia, Professor of Food Supply Chain Integrity at University College Dublin
Dennis Zijderveld, Metrohm Product Manager Spectroscopy
Martijn van der Plas, Metrohm Application Support Engineer Spectroscopy
Dr. Wei W. Yu, Metrohm SERS Product Manager

REFERENZEN

1. Rizzo, S.; Weesepoel, Y.; Erasmus, S.; Sinkeldam, J.; Piccinelli, A. L.; Ruth, S. van. A Multi-Analyte Screening Method for the Rapid Detection of Illicit Adulterants in Dietary Supplements Using a Portable SERS Analyzer. *Heliyon* **2023**, *9* (8). DOI:10.1016/j.heliyon.2023.e18509
2. U.S. Food & Drug Administration. *Tainted Honey-based Products with Hidden Active Drug Ingredients*. https://www.fda.gov/consumers/health-fraud-scams/tainted-honey-based-products-hidden-active-drug-ingredients (accessed 2025-07-09).

CONTACT

Metrohm Inula
Shuttleworthstraße 25
1210 Wien
office@metrohm.at

KONFIGURATION

MISA Advanced

Das MISA Advanced-Paket ist ein Komplettpaket, das es dem Anwender ermöglicht, SERS-Analysen mit Metrohms Nanopartikellösungen und P-SERS-Streifen durchzuführen.

Das MISA Advanced-Paket enthält einen MISA Vialaufsatz, einen P-SERS-Aufsatz, einen ASTM-Kalibrierstandard, ein USB-Minikabel, ein USB-Netzteil und die MISA Cal Software zum Betrieb des MISA Geräts. Ein robuster Schutzkoffer zur sicheren Aufbewahrung des Geräts und des Zubehörs wird ebenfalls mitgeliefert.