Application Note AN-RS-051

Detección rápida de adulterantes ilegales en suplementos dietéticos con Raman

Interrogatorio de «miel para hombres» mediante espectroscopia Raman

A menudo anunciados como medicinas alternativas, los suplementos dietéticos se clasifican como alimentos tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos. Por ello, estos productos no se someten a las mismas pruebas, controles de calidad, etiquetado ni regulación que los productos farmacéuticos. Esto motiva a algunos fabricantes a exagerar los efectos de un suplemento mediante la adulteración ilegal con sustancias no declaradas, como fármacos, análogos o aditivos no autorizados. Esta práctica proporciona resultados rápidos y aumenta las ventas, pero también puede provocar complicaciones de salud por efectos secundarios e intoxicación aguda. Por ejemplo, los suplementos para el rendimiento sexual y deportivo suelen contener cafeína, esteroides, hormonas y fármacos no declarados para tratar la impotencia. Desde un aumento de la agresividad hasta un infarto y una sobredosis, los efectos secundarios resultantes pueden ser graves. Uno de estos productos, la «miel picante» o «miel para hombres», es un suplemento dietético de fácil acceso que promete a sus usuarios energía y vitalidad. Las soluciones SERS de Metrohm ofrecen una forma rápida, sensible y portátil de analizar estos suplementos in situ, sin interferencias de la matriz de muestra.

INTRODUCCIÓN

El análisis de suplementos dietéticos suele ser largo, costoso y depende de técnicas de laboratorio como HPLC y GC-MS. Se necesitan métodos rápidos in situ para analizar el panorama de suplementos. La dispersión Raman mejorada en superficie (SERS) cumple estos requisitos: es fácil de usar, altamente sensible, rápida, económica y portátil. SERS utiliza sustratos de nanopartículas para amplificar la senal Raman y producir un espectro de huellas dactilares de analitos de muy baja concentración. Los sustratos P-SERS de Metrohm (prácticas pruebas de un solo uso con nanopartículas impresas en tiras de papel) son ideales para detectar diversos materiales traza de forma rápida y rentable.

PRUEBA DE CONCEPTO

Una publicación de la Universidad e Investigación de Wageningen detalló un estudio exhaustivo sobre el desarrollo de un método basado en SERS para la detección rápida de adulterantes ilegales en suplementos dietéticos [1]. El grupo del Prof. van Ruth realizó estudios SERS con el objetivo de proporcionar un método de cribado cualitativo para la detección de adulterantes ilegales en suplementos dietéticos.

Detección y cribado cualitativo

Se examinaron veintitrés adulterantes farmacéuticamente activos para determinar su actividad SERS. Once de estos analitos dieron senales muy positivas al analizarlos con sustratos de plata P-SERS y el Analizador Metrohm Instant SERS (MISA). Estos se incluyeron en una biblioteca de referencia personalizada de adulterantes utilizada para el cribado de muestras experimentales. Los analitos activos y su estado actual en formulaciones de suplementos dietéticos, según lo establecido por la Comisión Europea (CE), se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Adulterantes activos en SERS, su tipo y estado actual de EC en formulaciones de suplementos dietéticos según lo establecido por la Comisión Europea, y un resumen de los resultados que incluye el índice de calidad de aciertos (HQI) que indica el nivel de correlación entre los espectros de la muestra y la biblioteca y el límite de identificación (LOI) para cada adulterante.

Analito	Tipo de suplemento	Estado CE	HQI	LOI (% w/w)
Acetildenafilo	Disfunción eréctil	Prohibida	0.79–0.99	0.1
Clorhidrato de fluoxetina	Pérdida de peso	Prohibida	0.71–0.83	5.0
Sildenafil homo	Disfunción eréctil	Prohibida	0.79–0.99	0.1
Melatonina	Sleep regulation	Permitido	0.79–0.93	5.0
Fenetilamina	Energía	Prohibida	0.81–0.94	0.5
Piperina	Pérdida de peso	Permitido	0.70–0.92	2.5
Citrato de sildenafil	Disfunción eréctil	Prohibida	0.79–0.99	0.1
Sinefrina	Pérdida de peso	Permitido	0.70–0.81	5.0
Tiosildenafil	Disfunción eréctil	Prohibida	0.60–0.99	0.1
Vardenafilo HCl	Disfunción eréctil	Prohibida	0.81–0.95	0.1
Vinpocetina	Soporte de memoria	Permitido	0.61–0.98	0.5

Interferencia de excipientes

La insensibilidad única de SERS a numerosos excipientes es una ventaja crucial de esta técnica. Se formuló cuidadosamente una mezcla de excipientes comunes para representar el material de relleno utilizado en los suplementos comerciales. Este relleno consistió en celulosa microcristalina (95,0 % p/p), estearato de magnesio (3,0 % p/p), dióxido de silicio (1,0 % p/p), hidroxipropilmetilcelulosa (0,5 % p/p) y óxido de titanio (0,5 % p/p); cada uno de los cuales se evaluó para determinar la actividad de SERS. Se confirmó que estos excipientes mostraron una actividad de SERS baja o nula y no se esperaba que interfirieran en la detección de los adulterantes objetivo.

Límite de identificación (LOI)

Para estimar el rango de detectabilidad de cada adulterante, se mezclaron diferentes concentraciones con la mezcla de excipientes (0,1-50,0 % p/p). Cada muestra adulterada artificialmente se procesó de la siguiente manera: se pesaron 10 mg de cada muestra en un tubo Eppendorf y se diluyeron con 100 µL de etanol. Cada muestra se agitó en vórtex y se centrifugó; a continuación, se vertieron 10 µL del sobrenadante sobre la tira de plata P-SERS, se secó durante 15 minutos y se analizó.

ADULTERACIÓN DE SUPLEMENTOS DIETÉTICOS

Se seleccionaron dieciocho suplementos comerciales diferentes, incluyendo nueve para la pérdida de peso y el estilo de vida, y nueve para la mejora sexual y deportiva, y se analizaron para determinar su actividad SERS. Se adulteraron en un rango de 0,1 % a 5,0 % p/p. El etanol, utilizado para extraer la muestra diana sin disolver la matriz, se agitó en un pequeno vial con la muestra; posteriormente, el sobrenadante se aplicó directamente a una tira P-SERS. Tras el secado, se inició el análisis instrumental. El software MISA Cal genera un resultado en segundos, acompanado de un Índice de Calidad de Aciertos (HQI) que indica el nivel de correlación entre la muestra y los espectros de la biblioteca. El LOI de cada adulterante indica la concentración más baja a la que el HQI > 0,70 (Tabla 1).

RESULTADOS

SERS fue altamente eficaz en la detección de todos los adulterantes objetivo para la mejora sexual y deportiva (es decir, acetildenafilo, homosildenafilo, citrato de sildenafil, tiosildenafilo y clorhidrato de vardenafilo), con altas puntuaciones de coincidencia (0,79-0,99), incluso en el nivel de concentración más bajo probado (LOI del 0,1 % p/p). Esto indica una detección exitosa de algunos de los productos farmacéuticos más conocidos en el mercado (Viagra® para sildenafil y Levitra® para vardenafilo) y sus análogos no aprobados muy por debajo de las dosis terapéuticas activas. SERS también fue capaz de detectar los analitos de pérdida de peso y estilo de vida vinpocetina y fenetilamina con un LOI del 0,5 % p/p, piperina con un LOI del 2,5 % p/p, y melatonina, clorhidrato de fluoxetina y sinefrina con un LOI del 5,0 % p/p.

APLICACIÓN EN EL MUNDO REAL

La «miel caliente» o «miel para hombres» es un suplemento dietético fácil de conseguir que promete potencia y vitalidad. Sin embargo, la FDA advierte que estos productos de miel pueden contener fármacos no revelados para la disfunción eréctil, como sildenafil y tadalafil, en cantidades activas [2].

Metrohm Nederland utilizó MISA para analizar muestras de miel incautadas y demostrar la utilidad de las soluciones SERS de Metrohm en la lucha contra la adulteración ilegal. Una parte esencial de esta aplicación es la prueba de múltiples sustratos SERS para optimizar la senal objetivo. Si bien el grupo del profesor Saskia se centró principalmente en las tiras P-SERS de plata por su comodidad, el grupo de Metrohm también analizó tiras P-SERS de oro, además de soluciones coloidales de oro y plata.

Preparación de muestras

Se proporcionaron cuatro muestras de miel, cada una con concentraciones conocidas de sildenafil y tadalafil, confirmadas mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) (Tabla 2).

Para preparar las muestras para el análisis SERS, una porción de cada muestra se disolvió en 1 mmol/L de hidróxido de sodio y se agitó con cloruro de sodio y alcohol isopropílico (IPA). Tras la separación, la fracción orgánica se aplicó directamente a sustratos de P-SERS y coloides de SERS (Figura 1).

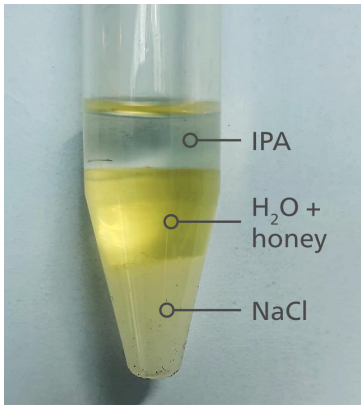

Figure 1. Un procedimiento simple de extracción con solvente resultó eficaz para trasladar las sustancias objetivo a una capa orgánica (IPA) para aislarlas de la matriz de miel.

Table 2. Se incautaron muestras de miel que fueron analizadas en laboratorio y se demostró que contenían cantidades no declaradas de los conocidos medicamentos para la disfunción eréctil sildenafil y tadalafil.

Muestra	Analito	Concentración
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

RESULTADOS

Sildenafil

Las muestras de miel 1 y 2 se analizaron fácilmente con tiras P-SERS de plata (Ag) y solución coloidal de nanopartículas (NP) de oro (Au); esto es característico de sustancias con alta actividad Raman y que se unen bien a los sustratos SERS. Los espectros de las muestras 1 y 2 se muestran en la Figura 2, en comparación con los espectros de referencia de sildenafil de Metrohm.

Obsérvese que la miel en sí no contribuye significativamente al espectro, incluso con una preparación mínima de la muestra. Las similitudes son evidentes, y el software MISA Cal relaciona correctamente la sustancia con tres espectros de referencia diferentes de sildenafil con puntuaciones HQI muy altas (Figura 3). La evidencia de contaminación por sildenafil es particularmente sólida, ya que la muestra de miel no solo coincide con una biblioteca SERS personalizada, sino que su espectro también coincide con el de sildenafil de la biblioteca ilícita más amplia de Metrohm.

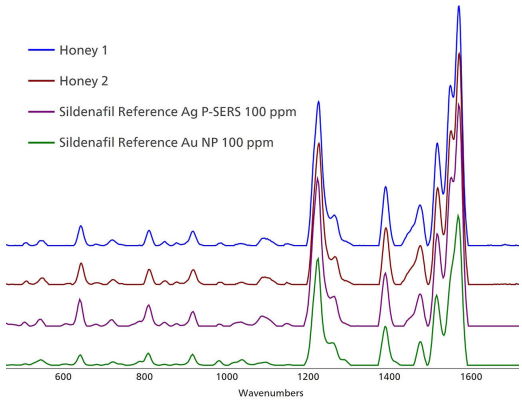

Figure 2. Un procedimiento simple de extracción con solvente resultó eficaz para trasladar las sustancias objetivo a una capa orgánica (IPA) para aislarlas de la matriz de miel.

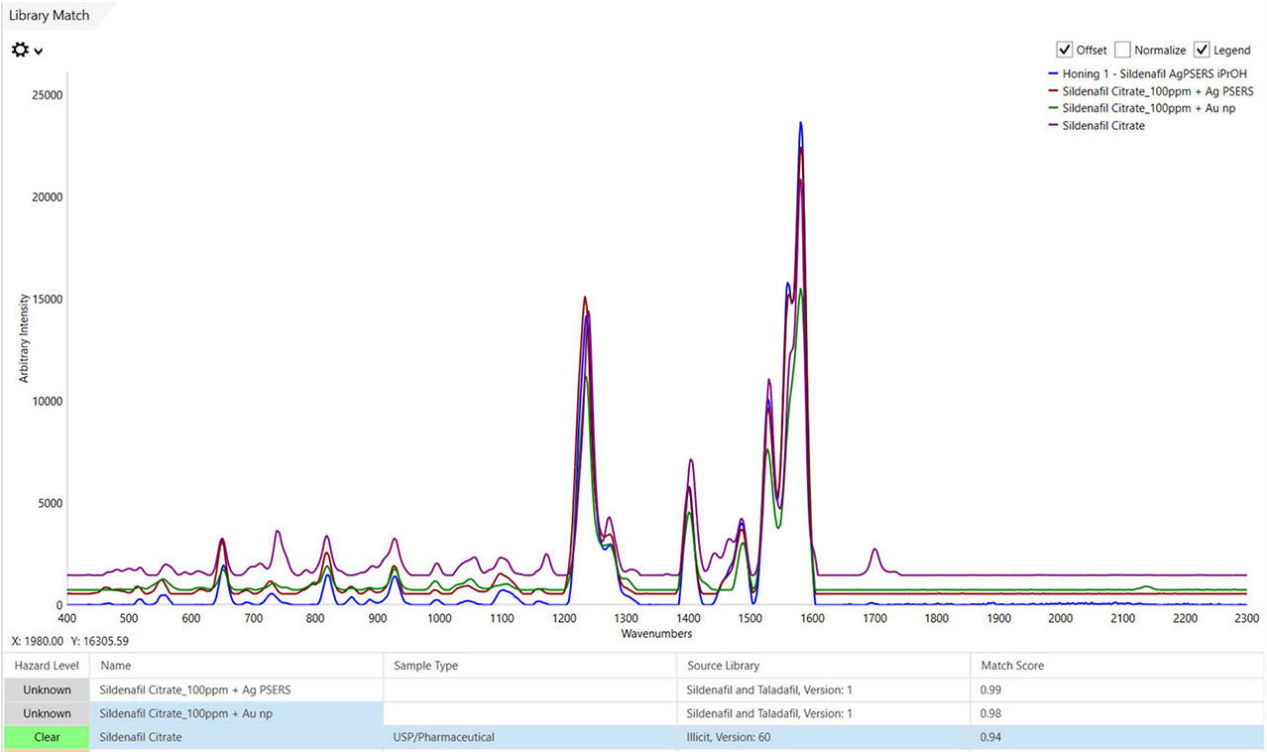

Figure 3. Coincidencias de la biblioteca entre la muestra de miel 1 (azul) y los espectros de Ag P-SERS (rojo) y Au NP SERS (verde), además de un espectro de sildenafilo de la Biblioteca Ilícita de Metrohm (morado). Obsérvense los altísimos valores de HQI obtenidos para todas las coincidencias de sildenafilo (los valores de HQI más cercanos a 1 indican una correlación muy fuerte entre el espectro de la muestra y los espectros de la biblioteca).

Tadalafil

Los sustratos P-SERS de plata y oro proporcionaron una débil amplificación de la senal SERS para el tadalafilo, por lo que se analizó una solución coloidal de nanopartículas de oro, que proporcionó una buena senal SERS (Figura 4).

Al utilizar la solución de nanopartículas de oro para analizar las muestras de miel 3 y 4, ambas se compararon favorablemente con un espectro de referencia de tadalafilo y se identificaron correctamente como portadoras de tadalafilo. La muestra 3 se muestra a continuación en la Figura 5 con la alta confianza que proporciona una puntuación HQI elevada mediante rutinas de comparación de bibliotecas en el software MISA Cal.

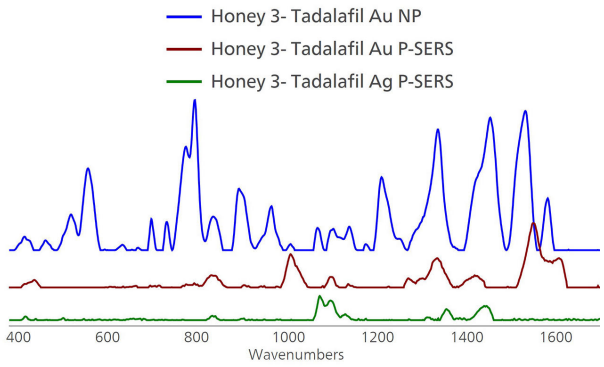

Figure 4. De los tres sustratos SERS probados, incluidos Au NP, Au P-SERS y Ag P-SERS, solo la solución Au NP (en azul) proporcionó un buen espectro SERS de tadalafil.

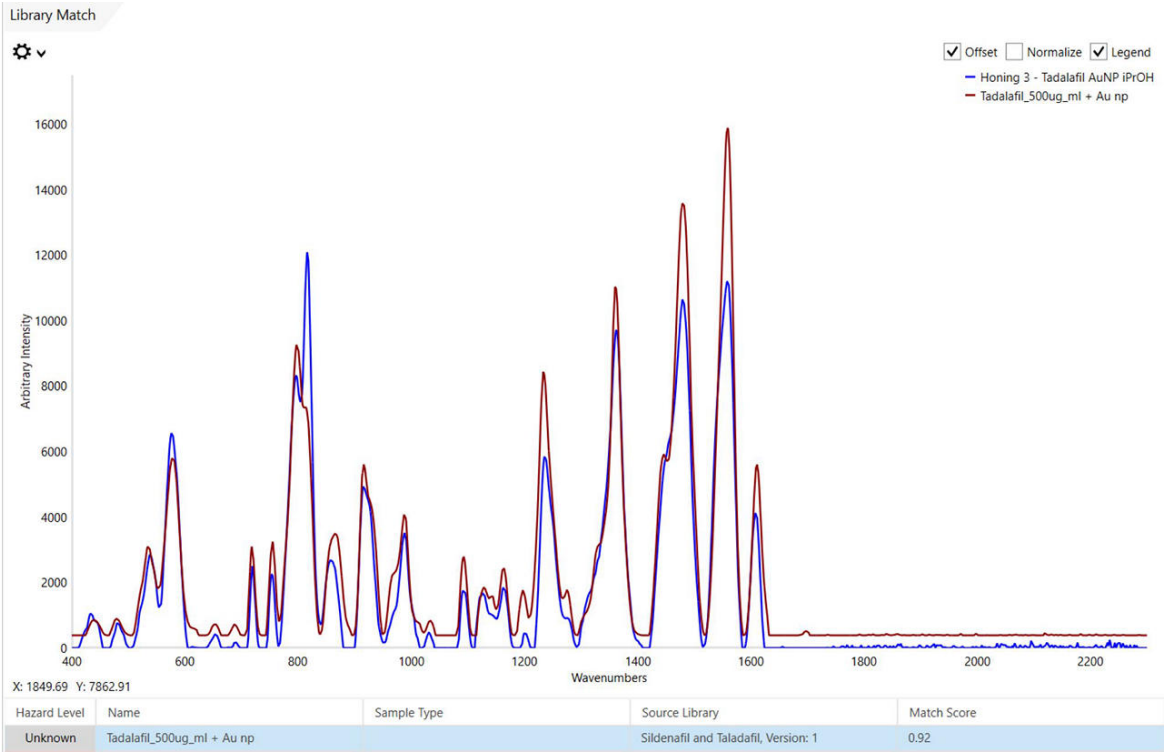

Figure 5. Espectro de la muestra de miel 3 tras una extracción y análisis sencillos con solución coloidal de oro NP y MISA. El espectro de esta muestra de miel (azul) se superpone al espectro de referencia SERS de tadalafilo (rojo), con el que se comparó.

La senal de la muestra 4 es claramente más débil que la de la muestra 3 (Figura 6). Esto concuerda con la menor concentración conocida de tadalafilo en la muestra.

En las cuatro muestras de miel, la presencia de sildenafil o tadalafilo se confirma mediante análisis SERS. El tiempo promedio de preparación de la muestra es de 10 minutos por muestra, la mayor parte de los cuales se necesitan para disolver la miel en la solución de NaOH. El método MISA solo requiere un máximo de 10 segundos para la medición de la muestra.

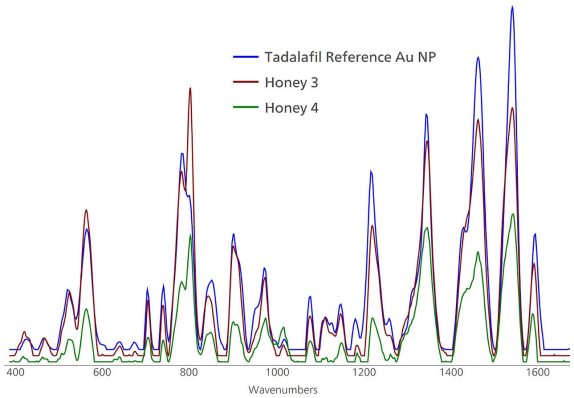

Figure 6. TLa presencia de tadalafilo no declarado en la miel se confirma mediante una comparación favorable de muestras de miel con un espectro de referencia NP SERS de tadalafilo oro.

CONCLUSIÓN

La herramienta analítica SERS está ganando popularidad gracias a su alta sensibilidad, bajo coste y capacidad para proporcionar un método rápido y portátil para la detección de trazas in situ. La detección de adulterantes ilegales ya no requiere técnicas de laboratorio de alto coste, como la cromatografía de gases o líquidos y la espectrometría de masas. Entre las valiosas características de las soluciones SERS de Metrohm se incluyen:

- Alta selectividad para los adulterantes objetivo
- Ausencia de interferencias de la matriz
- Simplicidad tanto del pretratamiento como del análisis de la muestra

AUTORES

Dra. Melissa J. Gelwicks, especialista en contenidos de Metrohm
Prof. Ruth van Saskia, profesora de integridad de la cadena de suministro de alimentos en la University College Dublin
Dennis Zijderveld, director de productos de espectroscopía de Metrohm
Martijn van der Plas, ingeniero de soporte de aplicaciones de Metrohm en espectroscopía
Dr. Wei W. Yu, director de producto Metrohm SERS

REFERENCES

1. Rizzo, S.; Weesepoel, Y.; Erasmus, S.; Sinkeldam, J.; Piccinelli, A. L.; Ruth, S. van. Un método de cribado multianalito para la detección rápida de adulterantes ilícitos en suplementos dietéticos mediante un analizador SERS portátil. Heliyon **2023**, *9* (8). DOI:10.1016/j.heliyon.2023.e18509
2. *Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA). Productos a base de miel contaminados con un ingrediente activo ocultos.*. https://www.fda.gov/consumers/health-fraud-scams/tainted-honey-based-products-hidden-active-drug-ingredients (accedido2025-07-09).

CONTACT

Metrohm Argentina S.A.
Avda. Regimiento de Patricios 1456
1266 Buenos Aires
info@metrohm.com.ar

CONFIGURACIÓN

MISA Advanced

El paquete MISA Advanced es un paquete completo con el que el usuario puede efectuar análisis SERS usando las soluciones de nanopartículas y las tiras P-SERS de Metrohm.

Este paquete MISA Advanced incluye un accesorio para el vial MISA, un accesorio P-SERS, un patrón de calibración ASTM, un minicable USB, una fuente de alimentación USB y el software MISA CAL para el manejo del aparato MISA. También se incluye un robusto maletín protector para guardar con seguridad el aparato y sus accesorios.