



Application Note AN-RS-051

Rilevamento rapido di adulteranti illegali negli integratori alimentari con Raman

Interrogazione del «miele per uomini» con spettroscopia Raman

Spesso pubblicizzati come medicine alternative, gli integratori alimentari sono in realtà classificati come alimenti sia nell'Unione Europea che negli Stati Uniti. Pertanto, questi prodotti non sono sottoposti agli stessi test, controlli di qualità, etichettatura o regolamentazione dei prodotti farmaceutici. Questo spinge alcuni produttori a gonfiare gli effetti di un integratore attraverso adulterazioni illegali con sostanze non dichiarate come farmaci, analoghi o additivi non autorizzati. Questa pratica fornisce risultati rapidi e aumenta le vendite, ma può anche portare a complicazioni per la salute dovute a effetti collaterali e intossicazione acuta. Ad esempio, gli

integratori per le prestazioni sessuali e sportive contengono comunemente caffeina, steroidi, ormoni e farmaci per il trattamento dell'impotenza non dichiarati. Dall'aumento dell'aggressività all'infarto e al sovradosaggio, gli effetti collaterali che ne derivano possono essere gravi. Uno di questi prodotti, il "miele caldo" o "miele per uomini", è un integratore alimentare facilmente reperibile che promette ai suoi utilizzatori potenza e vitalità. Le soluzioni SERS di Metrohm offrono un modo rapido, sensibile e portatile per analizzare tali integratori in loco, senza interferenze con la matrice del campione.

INTRODUZIONE

L'analisi degli integratori alimentari è tradizionalmente dispendiosa in termini di tempo, costosa e dipendente da tecniche di laboratorio come HPLC e GC-MS. Sono necessari metodi rapidi in loco per esaminare il panorama degli integratori. La diffusione Raman potenziata dalla superficie (SERS) soddisfa questi requisiti; è facile da usare, altamente sensibile, veloce, economica e portatile. La SERS utilizza substrati di nanoparticelle per amplificare il segnale Raman e produrre uno spettro di impronte digitali di analiti a livelli molto bassi. I substrati P-SERS di Metrohm – pratici test monouso con nanoparticelle stampate su strisce di carta – sono ideali per rilevare diversi materiali in tracce in modo rapido ed economico.

PROVA DI CONCETTO

Una pubblicazione della Wageningen University & Research ha dettagliato uno studio approfondito sullo sviluppo di un metodo basato su SERS per il rilevamento rapido di adulteranti illegali negli



integratori alimentari [1]. Il gruppo del Prof. van Ruth ha condotto studi SERS con l'obiettivo di fornire un metodo di screening qualitativo per il rilevamento di adulteranti illeciti negli integratori alimentari.

Screening e rilevamento qualitativi

Sono stati esaminati ventitré adulteranti farmaceuticamente attivi per l'attività SERS. Undici di questi analiti hanno fornito segnali molto buoni quando testati con substrati P-SERS in argento e con l'analizzatore Metrohm Instant SERS (MISA). Questi sono stati inclusi in una libreria di riferimento

personalizzata di adulteranti utilizzata per lo screening di campioni sperimentali. Gli analiti attivi e il loro stato attuale nelle formulazioni di integratori alimentari, come stabilito dalla Commissione Europea (CE), sono elencati nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Adulteranti attivi SERS, il loro tipo e l'attuale stato di EC nelle formulazioni degli integratori alimentari come stabilito dalla Commissione Europea, e un riepilogo dei risultati, incluso l'Hit Quality Index (HQI) che indica il livello di correlazione tra gli spettri del campione e della libreria e il limite di identificazione (LOI) per ciascun adulterante.

Analyte	Supplement Type	EC Status	HQI	LOI (% w/w)
Acetildenafilil	Erectile dysfunction	Forbidden	0.79–0.99	0.1
Fluoxetine HCl	Weight loss	Forbidden	0.71–0.83	5.0
Homo sildenafilil	Erectile dysfunction	Forbidden	0.79–0.99	0.1
Melatonin	Sleep regulation	Allowed	0.79–0.93	5.0
Phenethylamine	Energy	Forbidden	0.81–0.94	0.5
Piperin	Weight loss	Allowed	0.70–0.92	2.5
Sildenafil citrate	Erectile dysfunction	Forbidden	0.79–0.99	0.1
Synephrine	Weight loss	Allowed	0.70–0.81	5.0
Thiosildenafilil	Erectile dysfunction	Forbidden	0.60–0.99	0.1
Vardenafil HCl	Erectile dysfunction	Forbidden	0.81–0.95	0.1
Vinpocetine	Memory support	Allowed	0.61–0.98	0.5

Interferenza da eccipienti

L'insensibilità unica del SERS a molti eccipienti rappresenta un vantaggio cruciale di questa tecnica. Una miscela di eccipienti comuni è stata accuratamente formulata per rappresentare il materiale di riempimento utilizzato negli integratori commerciali. Questo riempitivo era costituito da cellulosa microcristallina (95,0% p/p), stearato di

magnesio (3,0% p/p), biossido di silicio (1,0% p/p), idrossipropilmetilcellulosa (0,5% p/p) e ossido di titanio (0,5% p/p), ciascuno dei quali è stato valutato per l'attività SERS. È stata confermata l'assenza/bassa attività SERS di questi e non si prevedeva che interferissero con il rilevamento degli adulteranti target.

Limite di identificazione (LOI)

Per stimare l'intervallo di rilevabilità di ciascun adulterante, diverse concentrazioni sono state miscelate con la miscela di eccipienti (0,1-50,0% p/p). Ogni campione adulterato artificialmente è stato trattato come segue: 10 mg di ciascun campione sono

stati pesati in una provetta Eppendorf e diluiti con 100 µL di etanolo. Ogni campione è stato agitato e centrifugato, quindi 10 µL del surnatante sono stati gocciolati sulla striscia P-SERS argentata, essiccati per 15 minuti e analizzati.

ADULTERAZIONE DEGLI INTEGRATORI ALIMENTARI

Diciotto diversi integratori commerciali, tra cui nove per la perdita di peso e lo stile di vita e nove per il miglioramento della sessualità e dello sport, sono stati reperiti, testati per l'attività SERS e adulterati in un intervallo compreso tra lo 0,1% e il 5,0% p/p. L'etanolo, utilizzato per estrarre il target senza dissolvere la matrice, è stato semplicemente agitato in una piccola fiala con il campione, quindi il surnatante

è stato applicato direttamente su una striscia P-SERS. Dopo l'essiccazione, è iniziata l'analisi strumentale. Il software MISA Cal produce un risultato in pochi secondi, accompagnato da un indice di qualità (Hit Quality Index, HQI) che indica il livello di correlazione tra il campione e gli spettri della libreria. Il LOI per ciascun adulterante indica la concentrazione minima alla quale l'HQI è > 0,70 (Tabella 1).

RISULTATI

Il SERS si è dimostrato altamente efficace nel rilevare tutti gli adulteranti target per il potenziamento sessuale e sportivo (ovvero acetildenafil, homo sildenafil, sildenafil citrato, tiosildenafil e vardenafil HCl), con punteggi di corrispondenza elevati (0,79-0,99), anche al livello di concentrazione più basso testato (LOI dello 0,1% p/p). Ciò indica il rilevamento riuscito di alcuni dei prodotti farmaceutici più noti sul

mercato (Viagra® per il sildenafil e Levitra® per il vardenafil) e dei loro analoghi non approvati ben al di sotto delle dosi terapeutiche attive. Il SERS è stato anche in grado di rilevare gli analiti per la perdita di peso e lo stile di vita vinpocetina e fenetilamina con un LOI dello 0,5% p/p, piperina con un LOI del 2,5% p/p e melatonina, fluoxetina HCl e sinefrina con un LOI del 5,0% p/p.

APPLICAZIONE NEL MONDO REALE

Il "miele caldo" o "miele per uomini" è un integratore alimentare facilmente reperibile che promette potenza e vitalità. Tuttavia, la FDA avverte che tali prodotti a base di miele potrebbero contenere farmaci non dichiarati per la disfunzione erettile, tra cui sildenafil e tadalafil, in quantità attive [2].

Metrohm Nederland ha utilizzato MISA per testare campioni di miele sequestrati e illustrare l'utilità delle

soluzioni SERS di Metrohm nella lotta contro l'adulterazione illegale. Una parte essenziale di questa applicazione è il test di più substrati SERS per ottimizzare il segnale target. Mentre il gruppo del Prof. Saskia si è concentrato principalmente sulle strisce P-SERS in argento per la loro praticità, il gruppo Metrohm ha testato anche strisce P-SERS in oro, oltre a soluzioni colloidali di oro e argento.

Preparazione del campione

Sono stati forniti quattro campioni di miele, ciascuno con concentrazioni note di sildenafil e tadalafil confermate da GC-MS (Tabella 2).

Per preparare i campioni per l'analisi SERS, una porzione di ciascun campione è stata semplicemente sciolta in 1 mmol/L di idrossido di sodio, quindi agitata con cloruro di sodio e alcol isopropilico (IPA). Dopo la separazione, la frazione organica è stata applicata direttamente ai substrati P-SERS e colloidali SERS. (Figura 1).

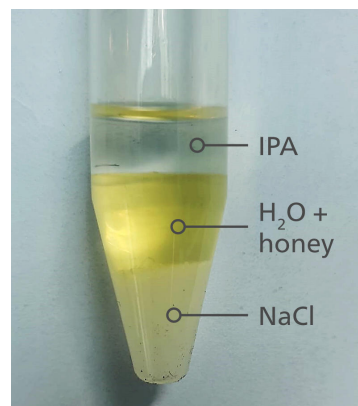


Figure 1. Una semplice procedura di estrazione con solvente si è dimostrata efficace nel trasferire le sostanze target in uno strato organico (IPA) per isolarle dalla matrice del miele.

Tabella 2. Sono stati sequestrati campioni di miele che sono stati analizzati in laboratorio e dai quali è emerso che contenevano quantità non dichiarate di sildenafil e tadalafil, noti farmaci contro la disfunzione erettile.

Campione	Analita	Concentrazione
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

RISULTATI

Sildenafil

I campioni di miele 1 e 2 sono stati facilmente analizzati sia con strisce P-SERS in argento (Ag) che con soluzione colloidale (NP) di nanoparticelle d'oro (Au); questa è una caratteristica delle sostanze che sono sia fortemente Raman-attive sia che si legano bene ai substrati SERS. Gli spettri dei campioni 1 e 2 sono mostrati nella **Figura 2**, confrontati con gli spettri di riferimento del sildenafil di Metrohm.

Si noti che il miele in sé non contribuisce in modo significativo allo spettro, anche dopo una preparazione minima del campione. Le somiglianze sono evidenti e il software MISA Cal associa correttamente la sostanza a tre diversi spettri di riferimento del sildenafil con punteggi HQI molto elevati (**Figura 3**). In questo caso, la prova di contaminazione da sildenafil è particolarmente forte, perché non solo il campione di miele corrisponde a una libreria SERS personalizzata, ma lo spettro corrisponde anche al sildenafil della più ampia Illicit Library di Metrohm.

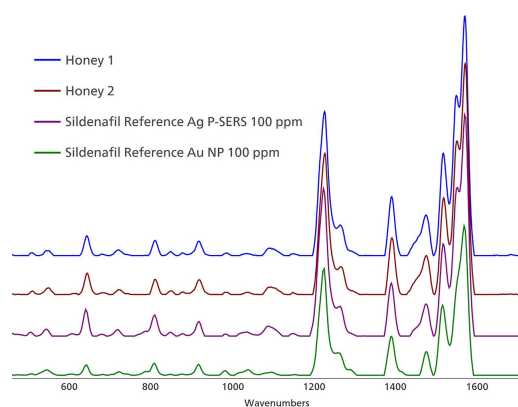


Figure 2. Una semplice procedura di estrazione con solvente si è dimostrata efficace nel trasferire le sostanze target in uno strato organico (IPA) per isolarle dalla matrice del miele.



Figure 3. Corrispondenze di libreria tra il campione di miele 1 (blu) e gli spettri Ag P-SERS (rosso) e Au NP SERS (verde), oltre a uno spettro di sildenafil dalla Illicit Library di Metrohm (viola). Si noti l'elevatissimo valore di HQI raggiunto per tutte le corrispondenze di sildenafil (i valori di HQI più vicini a 1 indicano una correlazione molto forte tra lo spettro del campione e gli spettri della libreria).

Tadalafil

Sia i substrati P-SERS in argento che in oro hanno fornito un debole potenziamento SERS per il tadalafil, quindi è stata testata una soluzione colloidale di nanoparticelle d'oro e si è scoperto che fornisce un buon segnale SERS (**Figura 4**).

Quando la soluzione di NP d'oro è stata utilizzata per analizzare i campioni di miele 3 e 4, entrambi hanno ottenuto risultati favorevoli rispetto a uno spettro di riferimento per il tadalafil ed entrambi i campioni sono stati correttamente identificati come contenenti tadalafil. Il campione 3 è mostrato di seguito nella **Figura 5**, con la buona confidenza fornita da un punteggio HQI elevato attraverso le routine di abbinamento delle librerie nel software MISA Cal.

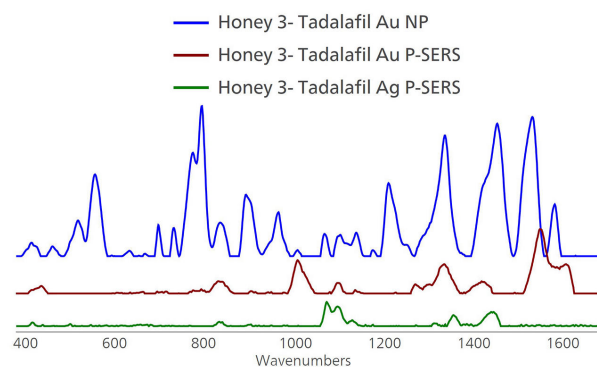


Figure 4. Dei tre substrati SERS testati, tra cui Au NP, Au P-SERS e Ag P-SERS, solo la soluzione Au NP (in blu) ha fornito un buon spettro SERS del tadalafil.



Figure 5. Lo spettro del campione di miele 3 dopo una semplice estrazione e analisi con soluzione colloidale di NP d'oro e MISA. Questo spettro del campione di miele (blu) è sovrapposto allo spettro SERS di riferimento del tadalafil (rosso) con cui è stato confrontato.

Il segnale del campione 4 è chiaramente più debole di quello del campione 3 (**Figure 6**). Ciò è coerente con la minore concentrazione nota di tadalafil nel campione.

In tutti e quattro i campioni di miele, la presenza di sildenafil e/o tadalafil è confermata dall'analisi SERS. Il tempo di preparazione del campione è in media di 10 minuti per campione, la maggior parte dei quali necessari per sciogliere il miele nella soluzione di NaOH. Il MISA richiede solo un massimo di 10 secondi per la misurazione del campione.

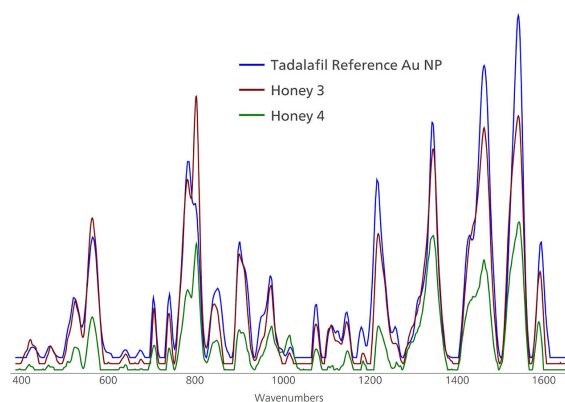


Figure 6. La presenza di tadalafil non dichiarato nel miele è confermata dal confronto favorevole di campioni di miele con uno spettro di riferimento NP SERS del tadalafil gold.

CONCLUSIONE

La tecnologia SERS sta diventando sempre più popolare come strumento analitico grazie alla sua elevata sensibilità, al basso costo e alla capacità di fornire un metodo rapido e portatile per la rilevazione di tracce in situ. La rilevazione di adulteranti illegali non richiede più tecniche di laboratorio ad alto impiego di risorse come la cromatografia gassosa o liquida e la spettrometria di massa. Le caratteristiche preziose delle soluzioni SERS di Metrohm includono:

- elevata selettività per gli adulteranti target
- assenza di interferenza della matrice
- semplicità sia del pretrattamento che dell'analisi del campione

- analisi a basso costo che evita la spesa di attrezzature di laboratorio, materiali di consumo e personale altamente qualificato

Come dimostrato da ricerche interne ed esterne, la tecnologia SERS consente l'identificazione del target in presenza degli eccipienti previsti con una minima elaborazione del campione. In definitiva, questo può contribuire a proteggere i consumatori ignari da adulteranti nocivi.

Metrohm desidera ringraziare la professoressa Saskia van Ruth per la sua collaborazione e il suo supporto nella stesura e nella revisione di questo articolo.



AUTORI

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

RIFERIMENTI

1. Rizzo, S.; Weesepeol, 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 Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



MISA Advanced

Metrohm Instant SERS Analyzer (MISA) è un sistema di analisi portatile ad alte prestazioni che consente di rilevare/identificare rapidamente sostanze illegali, additivi alimentari e impurità negli alimenti a livello di tracce. MISA dispone di uno spettrografo ad alta efficienza dotato della tecnologia unica Orbital-Raster-Scan (ORS) di Metrohm. Si caratterizza per un ingombro minimo e la lunga durata della batteria, caratteristiche che lo rendono perfetto per eseguire prove sul posto o per applicazioni di laboratorio mobili. MISA prevede diversi accessori laser di classe 1 per garantire la flessibilità nel campionamento. L'analizzatore funziona tramite Bluetooth o collegamento USB.

MISA Advanced è un pacchetto completo che consente all'utente di eseguire analisi SERS con le soluzioni di nanoparticelle di Metrohm e le strisce P-SERS.

Il pacchetto MISA Advanced contiene un accessorio per fiale MISA, un accessorio P-SERS, uno standard di calibrazione ASTM, un minicavo USB, un alimentatore USB e il software MISA Cal per il funzionamento dello strumento MISA. Viene fornito con in dotazione una robusta valigetta per lo stoccaggio sicuro dello strumento e dei relativi accessori.