

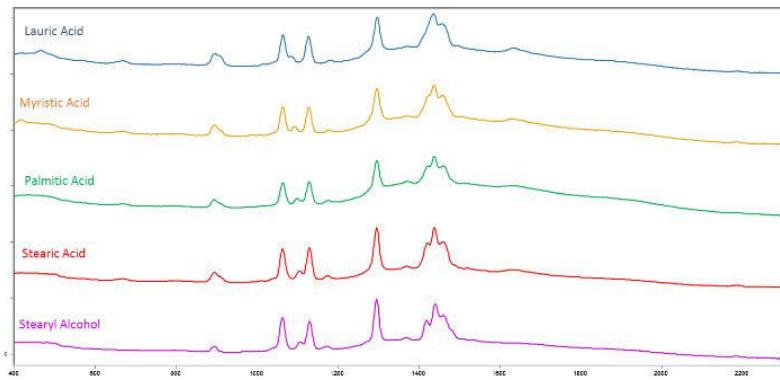
# Überprüfung von Fettsäuren in funktionellen Lebensmitteln und Kosmetika

Diese Application Note beschreibt den Einsatz des Metrohm Instant Raman Analyzers Mira P zur Identifizierung und Verifizierung von Fettsäuren, wie sie auch in Kosmetika oder Nutraceutika vorkommen. Nutraceutika sind aus Lebensmitteln hergestellte Produkte, die neben dem grundlegenden Nährwert einen zusätzlichen Gesundheitsnutzen versprechen. Da sich die Gesundheitsbranche in Richtung natürlicher homöopathischer Behandlungen bewegt, berichten viele neue Produkte über die Vorteile einer Nahrungsergänzung mit Vitaminen und Fettsäuren, wie z. B. Öle, die Vitamin E enthalten, aber den LDL-

Cholesterinspiegel (das "schlechte" Cholesterin) nicht erhöhen. Einige Nutraceutika werden von der FDA reguliert, andere nicht. Unabhängig davon ist es für die Hersteller wichtig, dass ihre Produkte den internen und externen Vorschriften entsprechen. Die Bestimmung der Identität und Reinheit der Inhaltsstoffe ist für die Produktqualität von entscheidender Bedeutung, und die Überprüfung der Inhaltsstoffe vor Beginn des Herstellungsprozesses verhindert kostspielige Zeitverzögerungen und minderwertige Produktqualität.

Fettsäuren müssen während des Produktionsprozesses überprüft werden. Ähnlichkeiten bei Fettsäuren können die Identifizierung der genauen Fettsäure durch Pearson-Korrelationsalgorithmen erschweren; die Überprüfung des p-Wertes stellt jedoch sicher, dass das richtige Material in der Produktion verwendet wird. MIRA P ist ein tragbares Raman-Spektrometer für die schnelle, zerstörungsfreie Identifizierung und Überprüfung von Proben. Zur Identifizierung von Proben wird ein Spektrum der Probe gemessen und mit vorhandenen Spektren in einer Bibliothek korreliert. Das Ergebnis wird dann mit einer Pearson-Korrelation angezeigt. Die Verifizierung von Proben erfolgt mit einem Trainingssatz von Spektren, der die akzeptierte Variabilität zwischen verschiedenen Proben desselben Materials enthält. Der Trainingssatz wird mit der Hauptkomponentenanalyse (PCA)

analysiert und als prozentuale Wahrscheinlichkeit angegeben, dass die gemessene Probe innerhalb eines vom Bediener festgelegten Vertrauensniveaus liegt. In der Regel wird für die Materialverifizierung ein Konfidenzniveau von 95 % verwendet. Während sowohl die Identifizierung aus einer Bibliothek als auch die Verifizierung mit einem Trainingssatz nützlich sind, kann die Verifizierung sehr kleine Unterschiede zwischen den Proben erkennen. Die in dieser Application Note behandelten Fettsäuren und Fettalkohole sind Laurinsäure ( $C_{11}H_{23}CO_2H$ ), Myristinsäure ( $C_{13}H_{27}CO_2H$ ), Palmitinsäure ( $C_{15}H_{31}CO_2H$ ), Stearinsäure ( $C_{17}H_{35}CO_2H$ ) und Stearylalkohol ( $C_{17}H_{37}OH$ ). **Abbildung 1** zeigt die Spektren dieser Materialien und die spektralen Ähnlichkeiten, was die Schwierigkeit der Unterscheidung allein durch Korrelation verdeutlicht.



**Abbildung 1.** Raman-Spektren der in dieser Application Note behandelten Fettsäuren und Fettalkohole

## DURCHFÜHRUNG

### Erstellung einer Operating Procedure (OP)

Wählen Sie in der MiraCal-Software die Registerkarte „Operating Procedures“ und erstellen Sie eine neue OP „Fettsäuren“. Die Parameter sind auf Laserleistung 5, Mittelwert von 1 und automatische Integrationszeit

eingestellt. Nehmen Sie mit der OP ein Spektrum von jeder Probe auf, benennen Sie jede Probe sorgfältig und synchronisieren Sie die Daten mit der Datenbank der MiraCal-Software.

### Erstellen und Testen der Fettsäurebibliothek

Aus den Proben, die mit der OP „Fettsäuren“ gespeichert wurden, kann die Fettsäurebibliothek erstellt werden. Wählen Sie die Registerkarte Bibliotheken und benennen Sie die neue Bibliothek „Fettsäurebibliothek“. Aus den Proben, die mit der OP „Fettsäuren“ gesammelt wurden, wird eine neue Bibliothek erstellt und gespeichert. Erstellen Sie nun eine neue OP mit dem Namen „Library Testing“ und setzen Sie die Parameter auf Laserleistung 5,

Durchschnitt 1 und automatische Integrationszeit. Aktivieren Sie auf der Registerkarte „Auswertungen“ das Kontrollkästchen „Identifizierung“ und wählen Sie die „Fettsäurebibliothek“ aus. Speichern Sie die OP „Library Testing“ und synchronisieren Sie sie mit Ihrem System. Das System kann nun verwendet werden, um Proben mit der „Fettsäurebibliothek“ abzugleichen. Ein Beispiel für die Übereinstimmungsergebnisse für jede Fettsäureprobe ist in **Tabelle 1** dargestellt.

## **Erstellen und Testen des Fettsäure-Trainings-Sets mit p-value**

Wählen Sie die OP „Fettsäuren“, die im vorherigen Experiment erstellt wurde, und nehmen Sie ~20 Spektren von jeder im Experiment verwendeten Fettsäureprobe auf. Sobald Sie fertig sind, verbinden Sie das Gerät mit der MiraCal-Software und synchronisieren die Daten mit der Datenbank. Der nächste Schritt besteht darin, für jede Probe ein Trainingssatz zu erstellen. Wählen Sie die Registerkarte Trainingssätze in der Software und erstellen Sie neue Trainingssätze für jedes Material, indem Sie den Namen der Probe als Namen des Trainingssatzes eingeben und die ~20 Spektren hinzufügen, die im vorherigen Schritt gesammelt wurden. Sobald alle 5 Trainingssätze erstellt und gespeichert wurden, besteht der nächste Schritt darin, neue OPs zu

erstellen, die den einzelnen Trainingssätzen entsprechen. Alle fünf OPs haben dieselben Erfassungsparameter: automatische Integration, Laserleistung 5 und Mittelwert auf 1 gesetzt. Aktivieren Sie auf der Registerkarte „Auswertung“ der OP das Kontrollkästchen „Überprüfung“ für jede OP und fügen Sie den entsprechenden Trainingssatz hinzu, indem Sie auf die Schaltfläche „Trainingssatz“ klicken.

Sobald dies abgeschlossen ist, speichern Sie jede OP und synchronisieren Sie die Software-Datenbank, um die OPs dem System hinzuzufügen. Messen Sie nun ein Spektrum von jeder Probe mit jeder OP. Die Pass/Fail-Ergebnisse sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

## **ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

Wie wir bereits gesehen haben, lässt sich mit einem einfachen Bibliotheksabgleich (Pearson-Korrelation) nicht immer das richtige Material ermitteln, wenn andere ähnliche Materialien in der Bibliothek vorhanden sind. Die Übereinstimmungswerte

ähnlicher Materialien können sich nur um 0,01-0,03 Hit Quality Index (HQI) unterscheiden, was schwierig zu interpretieren ist und das Vertrauen in die Analyse verringert (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1.** Pearson-Korrelationswerte zwischen verschiedenen Fettsäuren und Fettalkoholen, die in der Application Note getestet wurden.

Probe	Pearson-Korrelationswert	Probenübereinstimmung
Palmitic acid	1,00	Palmitinsäure
	0,98	Myristinsäure
	0,98	Stearinsäure
Starylalkohol	1,00	Starylalkohol
	0,97	Stearinsäure
	0,93	Palmitinsäure
Laurinsäure	1,00	Laurinsäure
	0,98	Myristinsäure
	0,95	Palmitinsäure
Myristinsäure	1,00	Myristinsäure
	0,98	Palmitinsäure
	0,98	Laurinsäure
Stearinsäure	1,00	Stearinsäure
	0,97	Palmitinsäure
	0,95	Starylalkohol

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Verifizierung wird die Probe mit dem ausgewählten Trainingsset verglichen, und wenn die Probe in dieses Trainingsset fällt, gibt es ein positives Ergebnis ("Pass"). Liegt die Probe außerhalb des Trainingssatzes, gibt es ein negatives Ergebnis ("Fail"). Durch die Erstellung von Verifizierungsmodellen für jede der Fettsäureproben und den Test jedes Modells gegen jede Probe können wir feststellen, dass das

Gerät immer in der Lage ist, die richtige Probe zu bestätigen und Proben, die ähnlich, aber anders sind, abzulehnen. Außerdem ist das Verifizierungsergebnis leicht zu interpretieren (**Tabelle 2**). So wird beispielsweise Palmitinsäure mit einer Wahrscheinlichkeit von 33,1 % bestätigt, was innerhalb des festgelegten 95 %-Konfidenzintervalls liegt.

S	TRAINING SETS				
	<i>Palmitic Acid</i>	<i>Stearyl Alcohol</i>	<i>Lauric Acid</i>	<i>Myristic Acid</i>	<i>Stearic Acid</i>
<i>Palmitic Acid</i>	PASS 0.331	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
<i>Stearyl Alcohol</i>	FAIL 0.000	PASS 0.628	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000
<i>Lauric Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.127	FAIL 0.000	FAIL 0.000
<i>Myristic Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.494	FAIL 0.000
<i>Stearic Acid</i>	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	FAIL 0.000	PASS 0.365

**Tabelle 2.** Bestehende und nicht bestandene Ergebnisse verschiedener Proben im Vergleich zum Trainingssatz

## FAZIT

Die Identifizierung ist nützlich bei der Identifizierung von Proben, die große Unterschiede in den Spektren aufweisen, und die Verifizierung ist nützlich bei der Untersuchung von Proben mit ähnlichen spektralen Merkmalen. Bei unbekannten Proben wird die Korrelation verwendet, um eine Bibliothek mit bekannten Materialien zu durchsuchen und zu versuchen, die unbekannte Probe zu identifizieren.

Wenn eine Probe als authentisch bestätigt werden muss, ist die Verifizierung der Probe mit dem p-Wert am besten geeignet. Die Ergebnisse "Bestanden" und "Nicht bestanden" der Verifizierung geben eine zuverlässigere Bestätigung, um was es sich bei der Probe handelt, wohingegen bei der Identifizierung das Potenzial für hohe Übereinstimmungswerte bei Proben besteht, die einander sehr ähnlich sind.

## CONTACT

Metrohm Deutschland  
In den Birken 3  
70794 Filderstadt

info@metrohm.de

## KONFIGURATION



### MIRA P Advanced

Der Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P ist ein leistungsstarkes Raman-Handspektrometer, das für eine schnelle zerstörungsfreie Bestimmung und Verifizierung verschiedenster Materialien, z. B. pharmazeutische Wirkstoffe und Arzneimittelträger, eingesetzt werden kann. Trotz seiner geringen Grösse ist der MIRA P sehr robust und verfügt über eine hocheffiziente Spektrographkonstruktion, die mit unserer einzigartigen Orbital-Raster-Scan-Technologie (ORS) ausgestattet ist. MIRA P erfüllt die FDA-Vorschriften 21 CFR Part 11.

Das Advanced Package umfasst eine Aufsatzzlinse, mit der Materialien direkt oder in ihren Gebinden analysiert werden können (Laserklasse 3b), sowie einen Vial-Halter-Aufsatz zur Analyse von Proben, die sich in Glasvials befinden (Laserklasse 1).



### MIRA P Basic

Der Metrohm Instant Raman Analyzer (MIRA) P ist ein leistungsstarkes, tragbares Raman-Spektrometer, das für die schnelle, zerstörungsfreie Bestimmung und Verifizierung verschiedener Materialtypen, wie pharmazeutische Wirkstoffe und Hilfsstoffe, eingesetzt wird. Trotz der geringen Größe des Geräts verfügt das MIRA P über ein robustes Design und einen hocheffizienten Spektrographen, der mit unserer einzigartigen Orbital-Raster-Scan (ORS)-Technologie ausgestattet ist. Das MIRA P erfüllt die Richtlinien der FDA 21 CFR Part 11 vollständig.

Das MIRA P Basic-Paket ermöglicht es dem Benutzer, das MIRA P an seine Bedürfnisse anzupassen. Das MIRA Basic-Paket ist ein Starter-Paket, das die für den Betrieb des MIRA P erforderlichen Grundkomponenten enthält.

Das Basispaket enthält das MIRA Kalibrier-/Verifizierungszubehör, die USP-Bibliothek und den LWD-Aufsatz für Analysen in Flaschen oder Beuteln. Betrieb der Laserschutzklasse 3B.



### MIRA P Flex

Das MIRA P Flex Package erlaubt es dem Benutzer, MIRA P an seine Bedürfnisse anzupassen. Das Flex Package umfasst alle Grundkomponenten für den Betrieb des MIRA P ohne Aufsätze zur Probennahme. Für den Betrieb wird mindestens ein Aufsatz zur Probennahme benötigt. Das MIRA P Flex Package beinhaltet die USP-Bibliothek, Zubehör für die Kalibrierung/Verifizierung, und ein USB-Kabel. Betrieb mit Klasse 3B.