

Xác định sibutramin có mặt trái phép trong thực phẩm chức năng giảm béo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Lê Đình Chi¹, Lê Thị Hồng Hào^{2*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

²Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia

Ngày nhận bài 20.1.2015, ngày gửi phản biện 20.1.2015, ngày nhận phản biện 24.2.2015, ngày chấp nhận đăng 27.3.2015

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được phát triển cho việc xác định sibutramin trong các sản phẩm giảm cân tự nhiên dưới dạng viên nang cứng và viên nang mềm. Hệ thống HPLC với cột C18, nhiệt độ cột được đặt ở 30°C trong khi phân tích, detector sử dụng PDA $\lambda = 225$ nm, tốc độ dòng 1,0 ml/min với pha động gồm acetonitrile và dung dịch đệm kali dihydrophosphate 0,05M có pH = 4,0 (thành phần của pha động được thay đổi theo chương trình gradient), thể tích bơm mẫu 50 μ l. Phương pháp đã được xác nhận đầy đủ giá trị sử dụng và được dùng để xác định sibutramine trong 34 sản phẩm giảm cân bán trên thị trường. Kết quả cho thấy, có 11 sản phẩm có sibutramine ở hàm lượng từ 11,0 mg đến 34,6 mg cho dạng viên nang.

Từ khóa: HPLC, phương pháp xác định, sibutramin, thực phẩm giảm cân.

Chỉ số phân loại 2.10

DETERMINATION OF SIBUTRAMINE ILLEGALLY PRESENTED IN WEIGHT LOSS PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Summary

A simple reversed-phase HPLC method has been developed for the determination of sibutramine in natural slimming products under forms of hard capsules and soft capsules. For chromatography system, the method has used a C18 column maintained at 30°C during analysis, a PDA detector set at 225 nm, a flow rate of 1.0 ml per minute with mobile phase consisting of acetonitrile and a 0.05M solution of potassium dihydrophosphate with pH adjusted to 4.0 (the composition of mobile phase has been controlled by a gradient program), and an injection volume of 50 μ l. The method has fully validated the using and used values to detect the illegal presence of sibutramine in 34 slimming products, of which 11 products contain sibutramine at levels varying from 11.0 mg to 34.6 mg per capsule.

Keywords: determination, HPLC, sibutramine, slimming.

Classification number 2.10

Đặt vấn đề

Béo phì hiện đang là một vấn đề mang tính toàn cầu, gây ảnh hưởng không tốt tới sức khỏe, làm tăng nguy cơ mắc các bệnh lý nghiêm trọng như tiểu đường, tim mạch. Báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới năm 2008 ghi nhận khoảng 1,4 tỷ người trưởng thành có độ tuổi trên 20 được xếp vào lớp thừa cân, trong số đó hơn 200 triệu nam giới và gần 300 triệu phụ nữ đã béo phì [1]. Chính vì vậy, nhu cầu giảm béo cũng theo đó mà tăng lên. Phương pháp điều trị giảm béo chính là ăn kiêng kết hợp hoạt động thể lực và thuốc điều trị béo phì cũng được sử dụng để tăng cường tác dụng. Tuy nhiên, tất cả các thuốc điều trị giảm béo đều có những tác dụng phụ đi kèm, đòi hỏi sự theo dõi sát sao của bác sĩ điều trị khi kê đơn, song vẫn có những trường hợp tác dụng phụ của thuốc nghiêm trọng đến mức phải thu hồi khỏi thị trường, như trường hợp của sibutramin. Hoạt chất này bắt đầu được sử dụng điều trị giảm cân từ năm 1998 và bị thu hồi khỏi thị trường tại châu Âu từ tháng 1.2010 [2], bị bổ sung chống chỉ định tại Mỹ từ tháng 8.2010 do

* Tác giả chính: Tel: 0904248167; Email: lethihonghao@yahoo.com

tác dụng phụ nghiêm trọng về tim mạch [3]. Tại Việt Nam, cho tới nay chưa có nghiên cứu nào được thực hiện về tình trạng lạm dụng trái phép sibutramin trong thực phẩm chức năng giảm béo, song với tình hình thực tế trên thế giới, đây là một nguy cơ nhiều khả năng sẽ xảy ra. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng một phương pháp để phân tích phát hiện sibutramin có mặt trái phép trong thực phẩm chức năng sử dụng HPLC, nhằm đưa ra một công cụ phân tích phù hợp cho việc góp phần giám sát, đánh giá mức độ an toàn của thực phẩm chức năng giảm béo đang lưu hành trên thị trường nước ta.

Thực nghiệm

Hóa chất

Chất đối chiếu sibutramin hydroclorid monohydrate mã số MFCD04039806 của Hãng Sigma - Adrich (Mỹ), methanol (MeOH), acetonitril (MeCN), ethanol, aceton, KH_2PO_4 loại LiChrosolv dùng cho HPLC của Hãng Merck (Đức), nước cất 2 lần được lọc qua thiết bị lọc màng siêu sạch Millipore.

Thiết bị và dụng cụ

Hệ thống HPLC Shimadzu LC 20AD trang bị detector PDA của Hãng Shimadzu (Nhật Bản), cột sắc ký C_{18} Symmetry Waters (250×4,6 mm; 5 μm), tiền cột C_{18} Symmetry Waters (20×3,9 mm; 5 μm), cân phân tích có độ chính xác 0,00001 g của Hãng Mettler Toledo (Thụy Sĩ), máy đo pH Meter 744 của Hãng Metrohm (Thụy Sĩ), máy ly tâm Hermle Z383K của Hãng Hermle (Đức) và các dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm.

Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu nghiên cứu gồm 34 mẫu thực phẩm chức năng giảm béo được thu thập trên thị trường và mã hóa (27 mẫu nang cứng từ NC01 đến NC27, 7 mẫu nang mềm từ NM01 đến NM07).

Kết quả và bàn luận

Khảo sát các điều kiện tối ưu để phân tích sibutramin bằng HPLC

Để tìm được điều kiện sắc ký tối ưu cho việc phân tích sibutramin trong các mẫu thực phẩm chức năng giảm béo, chúng tôi đã khảo sát bước sóng tối ưu để ghi sắc ký đồ cho detector, thành phần pha động, chương trình gradient dung môi, tốc độ dòng pha động. Kết quả các điều kiện sắc ký được sử dụng chính thức để phát hiện sibutramin trong các mẫu thực phẩm chức năng được trình bày ở bảng 1, riêng

chương trình gradient dung môi được trình bày tại bảng 2.

Bảng 1: điều kiện sắc ký được lựa chọn sau khi khảo sát tối ưu hóa

STT	Thông số sắc ký
1	Thể tích tiêm mẫu: 50 μl
2	Cột sắc ký: C_{18} Symmetry Waters (250×4,6 mm; 5 μm) sử dụng cùng tiền cột C_{18} Symmetry Waters (20×3,9 mm; 5 μm)
3	Nhiệt độ cột: 30°C
4	Pha động: Acetonitril - dung dịch KH_2PO_4 0,05M, pH 4,0 (thành phần thay đổi theo chương trình gradient dung môi)
5	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
6	Bước sóng ghi sắc ký đồ: 225 nm
7	Dung dịch chuẩn sibutramin: được chuẩn bị trong methanol, khoảng nồng độ từ 1-200 ppm.

Bảng 2: chương trình gradient dung môi pha động

Thời gian (phút)	Tỷ lệ pha động (%)	
	Dung dịch KH_2PO_4 0,05M, (pH = 4,0)	Acetonitril
0,1	80	20
1	80	20
3	60	40
11	50	50
12	50	50
13	80	20
17	80	20

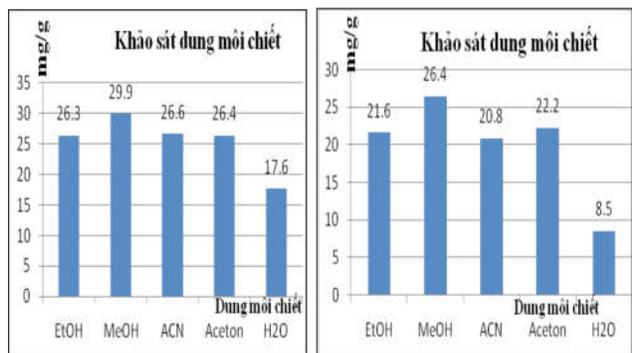
Khảo sát quy trình xử lý mẫu

Để khảo sát quy trình chiết sibutramin tiến hành khảo sát dung môi chiết, thời gian chiết (đối với cả viên nang cứng và viên nang mềm), khảo sát điều kiện loại béo (với viên nang mềm), cụ thể như sau:

Khảo sát dung môi chiết: để khảo sát chiết sibutramin ra khỏi nền mẫu bằng các dung môi khác nhau như: nước, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), aceton và acetonitril (ACN) với hai dạng bào chế, mỗi loại sử dụng một mẫu đại diện như sau: viên nang cứng (mã số mẫu NC07) và viên nang mềm (mã số mẫu NM07). Các mẫu này qua khảo sát sơ bộ được biết có chứa sibutramin trái phép cần được khảo sát để đánh giá hiệu quả chiết tách của 5 loại dung môi trên.

Mẫu sau khi được trộn đều đem đi cân khoảng 0,5 g cho vào ống ly tâm 50 ml, thêm chính xác 20 ml dung môi chiết, sau đó rung siêu âm 15 phút và ly tâm 6000 vòng/phút trong 5 phút. Lấy phần dịch trong phía trên lọc qua màng lọc 0,22 μm và được

phân tích trên hệ thống HPLC với detector PDA, kết quả thể hiện trong hình 1 và hình 2.



Hình 1: biểu đồ biểu diễn hiệu quả chiết sibutramin trong mẫu viên nang cứng

Hình 2: biểu đồ biểu diễn hiệu quả chiết sibutramin trong mẫu viên nang mềm

Qua khảo sát thực nghiệm cho thấy, ở cả viên nang cứng và viên nang mềm khi chiết bằng dung môi methanol cho hiệu quả chiết sibutramin ra khỏi mẫu là cao nhất. Hơn nữa, trong quá trình chiết với methanol, mẫu cũng trong nhất và ít cặn nhất.

Khảo sát thời gian chiết mẫu: cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu trắng sau khi đã được đồng nhất cho vào ống ly tâm 50 ml, thêm một lượng chuẩn xác định rồi lắc đều và để yên khoảng 30 phút. Sau đó thêm 15 ml methanol, đậy kín nắp, lắc đều, đem rung siêu âm. Đem ly tâm và gạn lấy lớp dịch trong phía trên. Chiết lại lần hai với 10 ml methanol. Gộp dịch chiết và định mức đủ 25 ml. Lọc lấy dịch và phân tích trên hệ thống HPLC. Tiến hành khảo sát tại các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả thu được được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3: kết quả khảo sát thời gian chiết mẫu

STT	1	2	3	4	5
Thời gian (phút)	5	10	15	20	25
Diện tích pic thu được (số đo digital trên tích phân kế)	831703	923391	979067	1029493	1033827

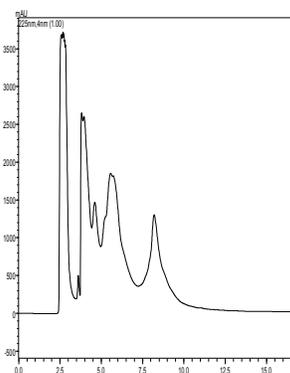
Kết quả khảo sát cho thấy, khoảng thời gian từ 20 phút đến 25 phút cho hiệu quả chiết tốt nhất, khoảng thời gian từ 5 phút đến 15 phút cho hiệu quả chiết kém hơn. Tuy nhiên, nếu thời gian chiết mẫu từ 25 phút sẽ không làm tăng hiệu quả chiết, mà thậm chí có thể bị nhiễu tạp chất chiết cùng. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn thời gian rung siêu âm để chiết chất phân tích sibutramin trong thực phẩm

chức năng giảm béo là 20 phút. Tuy nhiên, với viên nang mềm, do có chứa hàm lượng chất béo cao nên nếu không loại chất béo trước, pic dễ bị ảnh hưởng bởi nền, dẫn đến kết quả không chính xác. Do đó, chúng tôi đã tiến hành bổ sung thêm công đoạn loại chất béo với viên nang mềm trước khi phân tích HPLC.

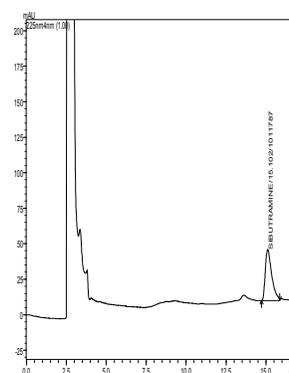
Khảo sát quy trình loại béo trong mẫu thực phẩm chức năng: các dạng thực phẩm chức năng viên nang mềm chứa rất nhiều chất béo, cần được loại bỏ để làm sạch mẫu. Chúng tôi lựa chọn quy trình xử lý mẫu giống như với viên nang cứng và có khảo sát thêm một số điều kiện loại chất béo. Kết quả thực nghiệm thu được thể hiện trong bảng 4 và hình 3, hình 4.

Bảng 4: kết quả khảo sát dung môi loại chất béo

TT	Dung môi	n-Hexan	Diethyl ether	n-Hexan (trong môi trường HCl)	Diethyl ether (trong môi trường HCl)
	Diện tích pic thu được (số đo digital trên tích phân kế)	837711	857146	1024595	1038394



Hình 3: sắc ký đồ mẫu trắng thực phẩm chức năng nang mềm chưa loại chất béo

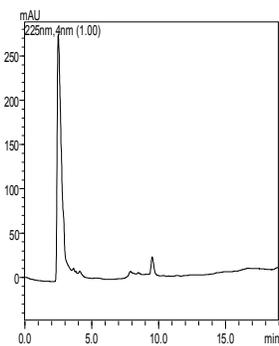


Hình 4: sắc ký đồ mẫu trắng thực phẩm chức năng nang mềm thêm chuẩn 200 µg/ml loại chất béo bằng n-hexan (H⁺)

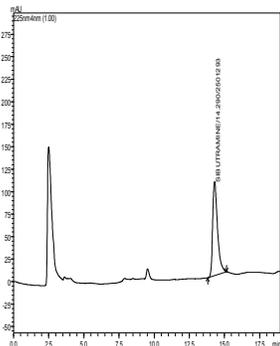
Kết quả ở bảng 4, hình 3 và hình 4 cho thấy, khi loại chất béo bằng dung môi hữu cơ (n-hexan và diethyl ether) kết hợp với axit hóa dung dịch chiết mẫu (bằng axit HCl) sẽ cho hiệu quả chiết tốt hơn nhiều so với khi chỉ loại béo bằng dung môi hữu cơ. Điều này có thể giải thích do sibutramin có gốc N nên mang tính kiềm yếu. Vì vậy, trong môi trường axit thì chất phân tích sibutramin tồn tại dưới dạng muối hydrochlorua, hầu như không tan trong các dung môi hữu cơ loại chất béo. Với hiệu quả tương đương nhau nên chúng tôi lựa chọn dung môi n-hexan để loại chất béo (vì dung môi diethyl ether có mùi khó chịu, độc hơn, dễ bay hơi và dễ cháy nổ hơn).

Thẩm định quy trình phân tích

Độ đặc hiệu: để đánh giá độ đặc hiệu của quy trình phân tích và xử lý mẫu, chúng tôi đã tiến hành phân tích trong điều kiện lựa chọn và khảo sát tối ưu đã trình bày ở phần trên. Với mẫu thực phẩm chức năng không chứa sibutramin, trên sắc ký đồ không xuất hiện pic nào có cùng thời gian lưu với pic của sibutramin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn sibutramin (hình 5). Đồng thời, trên sắc ký đồ của mẫu thực phẩm chức năng thêm chuẩn sibutramin xuất hiện pic sibutramin được tách riêng rẽ (hình 6). Như vậy, quy trình đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu khi phân tích sibutramin.

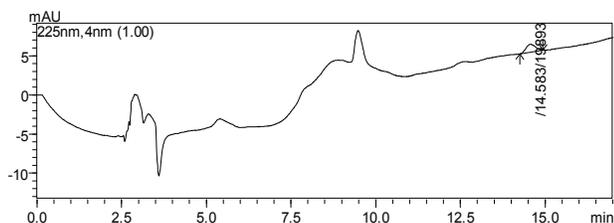


Hình 5: sắc ký đồ của dung dịch mẫu trắng thực phẩm chức năng giảm béo



Hình 6: sắc ký đồ của dung dịch mẫu trắng thực phẩm chức năng thêm chuẩn sibutramin 200 µg/ml

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): để xác định LOD, người ta pha loãng dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc nhiều lần bằng dung dịch methanol cho đến khi không còn thu được đáp ứng pic của sibutramin trên sắc ký đồ. Kết quả thực nghiệm cho thấy, ở mức nồng độ sibutramin là 0,2 µg/ml, sắc ký đồ cho pic sibutramin cao khoảng gấp 3 lần (hình 7) dao động đường nền và ở mức nồng độ 0,5 µg/ml pic sibutramin cao gấp khoảng 10 lần dao động đường nền. Như vậy, phương pháp đã xây dựng đạt giới hạn phát hiện (LOD) là 10 µg/g, còn giới hạn định lượng (LOQ) là 25 µg/g.



Hình 7: sắc ký đồ của dung dịch mẫu trắng thực phẩm chức năng thêm chuẩn sibutramin 0,2 µg/ml

Độ đúng của phương pháp: độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng cách thêm chuẩn sibutramin vào nền mẫu thực phẩm giảm béo không chứa sibutramin qua đánh giá sơ bộ và xác định tỷ lệ (%) thu hồi của chuẩn sibutramin khi xử lý mẫu và phân tích theo quy trình đã xây dựng. Độ đúng của phương pháp được thẩm định trên một nền mẫu nang mềm NM01 và một nền mẫu nang cứng NC01. Các mẫu được thêm chuẩn ở mức 10 µg/ml (0,5 mg/g). Kết quả phân tích với nền mẫu nang mềm có độ thu hồi R(%) = 93,1-99,9% và với nền mẫu nang cứng có độ thu hồi R(%) = 97,9-106%. Theo AOAC, tại mức nồng độ 100 ng/ml-10 µg/ml, độ thu hồi của phương pháp phải đạt là 80-110% [4]. Từ bảng kết quả trên ta thấy, sibutramin có hiệu suất thu hồi đều nằm trong giới hạn cho phép. Như vậy, phương pháp có độ thu hồi đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích sibutramin trong viên nang.

Độ lặp lại của phương pháp: khảo sát trên một nền mẫu nang cứng (NC07) và một nền mẫu nang mềm (NM07) có phát hiện sibutramin. Xử lý mẫu và tiêm mẫu vào hệ thống HPLC ở các điều kiện đã chọn. Độ lặp lại của phương pháp được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn và độ lệch chuẩn tương đối. Kết quả phân tích với nền mẫu nang mềm (hàm lượng trung bình 44,6 mg/g) có độ lặp lại RSD(%): 3,2% và với nền mẫu nang cứng (hàm lượng trung bình 32,7 mg/g) có độ lặp lại RSD(%): 2,6%. Theo AOAC, tại mức nồng độ 100 µg/ml, độ lặp tối đa chấp nhận có giá trị RSD(%) là 5,3, còn tại mức 0,1% thì giá trị tối đa của RSD(%) là 3,7 [4]. Như vậy, phương pháp có độ lặp đạt yêu cầu của AOAC khi phân tích sibutramin trong viên nang mềm và viên nang cứng.

Ứng dụng phân tích sibutramin trong thực phẩm chức năng giảm béo

Chúng tôi đã tiến hành thu thập ngẫu nhiên 34 sản phẩm thực phẩm chức năng giảm béo trên thị trường. Mẫu được xử lý theo quy trình phân tích và xác định hàm lượng sibutramine theo phương pháp đã tối ưu trên, kết quả thu được cho các mẫu phát hiện có chứa sibutramin được liệt kê ở bảng 5.

Bảng 5: kết quả phân tích sibutramine trong một số mẫu thực phẩm chức năng giảm béo có chứa sibutramin

STT	Mã hóa	Tên mẫu	Tình trạng mẫu, nhà sản xuất	Hàm lượng sibutramin (mg/g)
3	NC02	Nang cứng	Trong lọ nhựa, không rõ xuất xứ	22,0
5	NM02	Nang mềm	Nguyên lọ, không rõ nguồn gốc	27,4
7	NM03	Viên nang	Lọ nhựa, không nhãn mác	41,6
8	NC05	Best slim	Nguyên lọ 40 viên, số lô 108200	35,0
9	NC06	Nang cứng	Trong lọ nhựa, không rõ xuất xứ	56,4
12	NC07	Viên nang giảm béo	Nguyên lọ, không nhãn mác	53,2
14	NM07	Nang mềm	Trong lọ nhựa, không xuất xứ	29,0
15	NC08	Viên nang giảm béo Phục Linh	Nguyên hộp 36 viên, số lô 20120901	39,2
21	NC14	Thực phẩm chức năng không nhãn mác	Lọ nhựa, không nhãn mác	39,4
27	NC20	Perfect Slim USA	Trong túi nilon, không nhãn mác	69,2
33	NC25	Viên giảm cân ô mai	Nguyên lọ, số lô 140618 - NSX: 18.6.2014 - HSD: 17.6.2016	48,8

Từ bảng kết quả trên nhận thấy, trong 34 mẫu phân tích được đánh giá phát hiện 11 mẫu (32%) chứa chất cấm sibutramin với hàm lượng từ 22,0-69,2 mg/g. Các mẫu dương tính tập trung chủ yếu ở dạng viên nang cứng, không có nhãn mác và xuất xứ.

Kết luận

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên cột C18 kết hợp với xử lý mẫu bằng cách chiết sibutramin trực tiếp từ nền mẫu thực phẩm chức năng bằng methanol, chúng tôi đã xây dựng được một quy trình phân tích sibutramin có giới hạn phát hiện (LOD) là 10 µg/g, còn giới hạn định lượng (LOQ) là 25 µg/g; độ thu hồi (R%): 93,1-99,9% và với nền mẫu nang cứng có độ thu hồi R(%): 97,9-106%; độ lặp lại nền mẫu nang mềm RSD(%): 3,2% và mẫu nang cứng có độ lặp lại RSD(%): 2,6%.

Ứng dụng quy trình trên cho 34 mẫu thực phẩm chức năng giảm béo thu mua ngẫu nhiên trên thị trường, kết quả cho thấy, có tới 11 mẫu (32%) chứa chất cấm sibutramin với hàm lượng từ 22,0-69,2 mg/g. Như vậy, có thể thấy việc đưa trái phép chất cấm vào thực phẩm chức năng để tạo ra hiệu quả lừa dối người tiêu dùng là tương đối phổ biến, kể cả với những thực phẩm chức năng công bố chỉ chứa thành phần có nguồn gốc tự nhiên, và nguy cơ này càng cao với những thực phẩm chức năng trôi nổi không rõ nguồn gốc, xuất xứ (trong 6 mẫu không rõ nguồn gốc có đến 5 mẫu phát hiện thấy sibutramin, tương đương 83%). Hiện tượng này cho thấy, việc quản lý thực phẩm chức năng nói chung và thực phẩm chức năng giảm béo nói riêng cần được thực hiện nghiêm ngặt hơn; đồng thời, người tiêu dùng cần cảnh giác, cân nhắc cẩn thận khi sử dụng thực phẩm chức năng, nhất là những thực phẩm chức năng không được phân phối qua kênh chính thức, không có nguồn gốc và xuất xứ rõ ràng.

Tài liệu tham khảo

- [1] World Health Organization (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>).
- [2] European Medicines Agency (EMA), EMA recommends suspension of marketing authorizations for sibutramin (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Pressrelease/2010/01/WC500069995.pdf).
- [3] US Food and drug administration (<http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/safetyalertsforhumanmedicalproducts/ucm228830.htm>).
- [4] Gaithersburg M.D (2012), "Guidelines for standard method performance requirements", *Official Methods of Analysis*, Appendix F, AOAC INTERNATIONAL.