

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI SIBUTRAMINE VÀ PHENOLPHTHALEIN TRỘN TRÁI PHÉP TRONG THỰC PHẨM CHỨC NĂNG GIẢM CÂN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC-PDA

*Nguyễn Thái Ngọc Mai, Nguyễn Thị Ngọc Vân**

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

**Email: nguyenthingocvanct@gmail.com*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Sibutramine và phenolphthalein là hai chất thường xuyên được trộn trái phép trong các sản phẩm thực phẩm chức năng giảm cân. Tuy nhiên, chúng đã bị loại khỏi thị trường do sibutramin gây tác dụng phụ nghiêm trọng lên tim mạch, phenolphthalein được phát hiện là chất gây ung thư và cũng được coi là nguyên nhân gây ra những thay đổi trong DNA. **Mục tiêu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời sibutramine và phenolphthalein trong thực phẩm chức năng giảm cân bằng phương pháp HPLC đồng thời ứng dụng quy trình để phân tích sibutramine và phenolphthalein trong một số mẫu thực phẩm chức năng giảm cân thu thập trên thị trường. **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu thực phẩm chức năng mua trên thị trường được xây dựng và thẩm định quy trình theo hướng dẫn của AOAC. **Kết quả:** điều kiện sắc ký: cột Restek C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), pha động: acid formic 0,1%/acetonitril – methanol – ammonium acetate 0,2%/methanol – nước (40:60), chế độ rửa giải gradient; quy trình được thẩm định với độ thu hồi của phương pháp từ 91,87 – 96,46% và RSD trong khoảng 1,48 – 4,11%, giá trị LOD và LOQ lần lượt là 0,33 mg/kg và 1 mg/kg. **Kết luận:** Quy trình định lượng đồng thời sibutramine và

phenolphthalein trong thực phẩm chức năng giảm cân đã được xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu, phương pháp đã ứng dụng thành công trên 10 mẫu thực phẩm chức năng giảm cân trên thị trường.

Từ khóa: sibutramin, phenolphthalein, thực phẩm chức năng giảm cân, HPLC-PDA.

ABSTRACT

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SIBUTRAMINE AND PHENOLPHTHALEIN IN NATURAL WEIGHT LOSS SUPPLEMENTS BY HPLC-PDA

Nguyen Thai Ngoc Mai, Nguyen Thi Ngoc Van*

Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Sibutramine and phenolphthalein are two substances that are frequently illegally mixed in weight loss supplements. However, they were removed from the market due to the serious cardiovascular side effects of sibutramine, phenolphthalein found to be a carcinogen and also considered the cause of changes in DNA. **Objectives:** Determination and validation simultaneous sibutramine and phenolphthalein in weight loss supplements by HPLC and applying the procedure to analyze sibutramine and phenolphthalein in some weight loss supplement samples collected in market. **Materials and Methods:** sibutramine and phenolphthalein in weight loss supplements, the method was validated under AOAC guidance. **Results:** Chromatography condition: Restek C₁₈ column (250mm x 4,6mm; 5µm) with a gradient mode using formic acid 0,1%/acetonitrile – methanol – ammonium acetate 0,2%/methanol – water (40:60) as mobile phase. The recovery of method ranged 91.87 – 96.46% and RSD is from 1.48 – 4.11%, the LOD and LOQ were 0.33 mg/kg - 1 mg/kg, respectively. **Conclusion:** The results of the study showed that the proposed HPLC-PDA methods precise and accurate. The method was helpful for identification and quantification of the prohibited substances in weight loss supplements in the market.

Keywords: sibutramine, phenolphthalein, slimming dietary supplements, HPLC-PDA.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (World Health Organization – WHO), tình trạng béo phì trên thế giới đã tăng gần gấp ba lần kể từ năm 1975 [9]. Với tình trạng thừa cân và béo phì tăng cao trong cuộc sống bận rộn hiện nay thì thay vì thực hiện chế độ ăn uống và tập luyện lành mạnh, nhiều người lại tìm đến những sản phẩm giảm cân với mong muốn giảm được cân nặng một cách nhanh chóng. Một mặt, tuy việc sản xuất, kinh doanh, xuất nhập khẩu các sản phẩm thuốc giảm cân dưới dạng thực phẩm chức năng đang phát triển nhanh, mạnh và ngày càng đa dạng nhưng nước ta nói chung và Bộ Y tế nói riêng chưa thực sự đưa ra chính sách quản lý nghiêm cũng như những quy định cụ thể đối với loại mặt hàng này. Các loại thuốc giảm cân này chủ yếu là ở dạng uống, có ảnh hưởng trực tiếp đến bên trong cơ thể và sức khỏe của con người. Ngoài ra, các sản phẩm làm đẹp trên thị trường là những sản phẩm vì mục đích thu được lợi nhuận cao nên khó tránh khỏi một số nhà sản xuất muốn đẩy mạnh tiêu thụ, có thể trộn trái phép các hoạt chất tân dược hoặc một số chất cấm vào các sản phẩm thuốc giảm cân được ghi là có nguồn gốc thảo dược để chúng tạo ra hiệu quả nhanh chóng hơn. Theo FDA và nhiều bài báo của các tác giả được công bố, các chất thường được trộn vào các sản phẩm giảm cân trên là sibutramine và phenolphthalein, là những chất có thể gây ra tác dụng phụ cực kỳ nghiêm trọng cho sức khỏe con người, thậm chí là có thể dẫn đến tử vong [6], [8], [9]. Do đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời sibutramine và phenolphthalein có trong thực phẩm chức năng giảm cân bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

- Chất chuẩn sibutramine hydroclorid monohydrat (HPC): Lot: 794648; độ tinh khiết $\geq 99,9\%$ (HPLC). Chất chuẩn phenolphthalein (LGC): Lot: W1016520; độ tinh khiết $\geq 99,82\%$ (HPLC). Chất chuẩn clenbuterol (LGC): Lot: G1023427; độ tinh khiết 97,08% (HPLC).

- Methanol, acetonitrile, nước cất đạt chuẩn HPLC (Merck). Acid formic, ammonium acetate, NaCl, MgSO₄ khan, dung dịch ammoniac 25% (Fisher).

2.2. Thiết bị

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Shimadzu (LC 20AD) gồm hệ thống tiêm mẫu tự động, bơm, lò cột và trang bị đầu dò PDA, cột Restek C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và các thiết bị khác

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu phân tích

Hỗn hợp chuẩn gốc: Cân chính xác 10mg sibutramine, phenolphthalein hòa tan trong bình định mức 10mL với methanol, lắc kỹ, bổ sung dung môi đến vạch, thu được dung dịch hỗn hợp chuẩn gốc có nồng độ mỗi chất chuẩn là 1000 μ g/mL.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,5g mẫu thử chiết 2 lần, mỗi lần với 5mL MeOH, siêu âm trong 10 phút. Gộp dịch chiết đem đi thổi khô dung môi. Tiến hành loại tạp phân cực bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng. Tiếp tục loại tạp kém phân cực bằng cách lắc với hexan. Cuối cùng lọc vào vial rồi tiêm vào hệ thống sắc ký.

Khảo sát điều kiện sắc ký: Các điều kiện sắc ký cố định như cột sắc ký Restek C₁₈ (4,6 x 250mm; 5 μ m), thể tích tiêm 20 μ L và tốc độ dòng 1mL/phút. Tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký bao gồm chương trình rửa giải, bước sóng phát hiện, thành phần và tỉ lệ pha động để lựa chọn điều kiện sắc ký tối ưu.

2.4. Nội dung nghiên cứu

Xây dựng và thẩm định quy trình phân tích

Thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của AOAC bao gồm các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác và độ đúng [3].

Ứng dụng

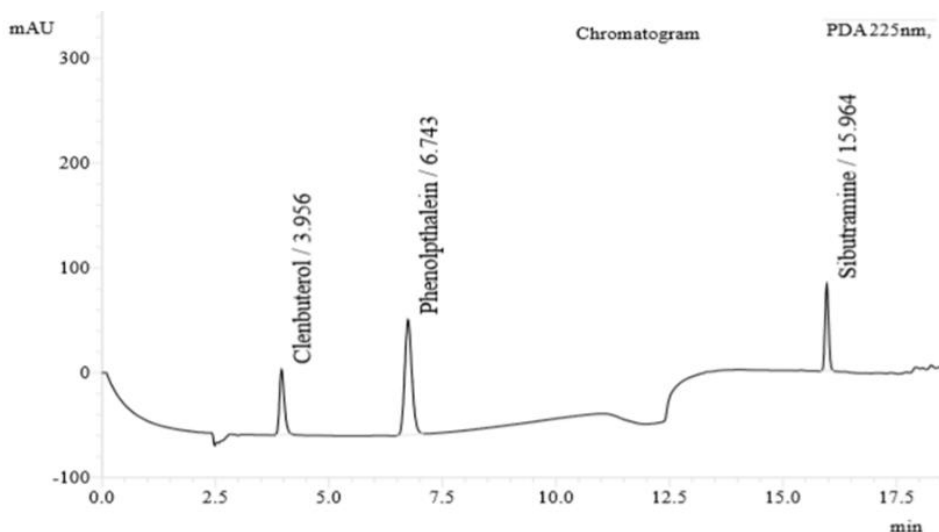
Định lượng sibutramin và phenolphthalein trên 10 mẫu thực phẩm chức năng giảm cân trên thị trường.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát, lựa chọn điều kiện sắc ký

Bảng 1. Điều kiện sắc ký

Cột sắc ký	Restek C18 (4,6 x 250mm; 0,5 μ m)			
Pha động A	Acetonitrile/0,1% formic acid			
Pha động B	Methanol			
Pha động C	Methanol – water (40:60)/0,2% ammonium acetate			
Chương trình gradient	Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)	Pha động C (%)
	1	0	30	70
	5,5	0	10	90
	6	25	35	40
	13	25	65	10
	19	90	10	0
Tốc độ dòng	1 mL/phút			
Thể tích tiêm	20 μ L			
Nhiệt độ cột	30°C			
Bước sóng phát hiện	225nm			



Hình 1: Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn sibutramine, phenolphthalein và nội chuẩn ở điều kiện sắc ký lựa chọn

3.2. Kết quả thẩm định quy trình phân tích

Tính tương thích hệ thống

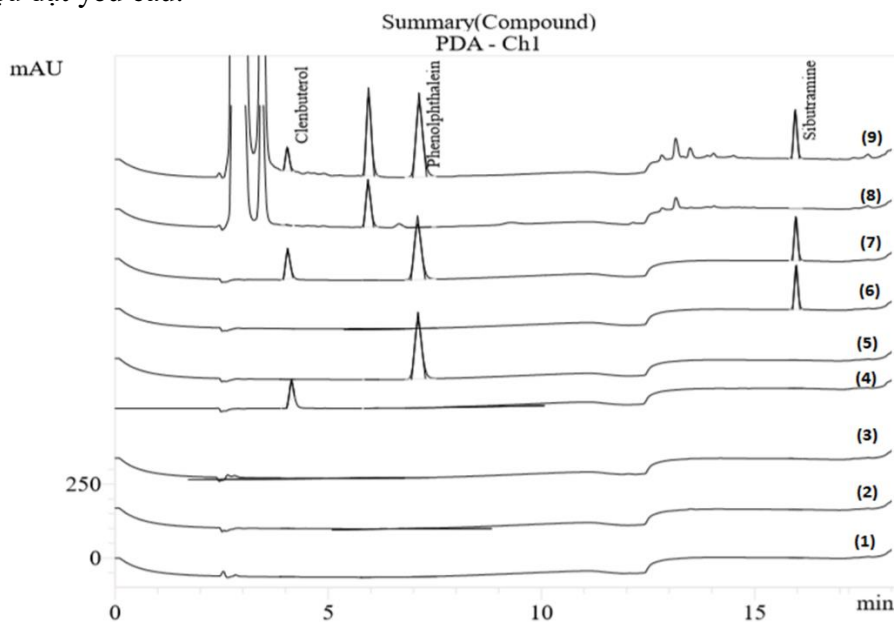
Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần mẫu hỗn hợp chuẩn siburamine và phenolphthalein nồng độ 20ppm và nội chuẩn nồng độ 20ppm với điều kiện HPLC đã chọn. Kết quả cho thấy RSD thời gian lưu và diện tích đỉnh thấp (< 2%) và RSD của tỉ lệ diện tích pic của các chất phân tích và nội chuẩn đáp ứng yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC (RSD < 15%).

Bảng 2. Tính tương thích hệ thống

		Thời gian lưu (t_R)	Diện tích đỉnh (S)	Hệ số bất đối (A_s)	Độ phân giải (R_s)	Hệ số dung lượng (k')	Số đĩa lý thuyết (N)
Phenolphthalein	TB	6,74	1206546	1,145	11,053	2,744	8056
	SD	0,004	1177	0,001	0,102	0,002	14,919
	RSD%	0,05	0,1	0,11	0,92	0,07	0,19
Sibutramine	TB	15,94	442991	1,137	39,776	7,856	154326
	SD	0,012	5106	0,01	0,05	0,007	1365
	RSD%	0,08	1,15	0,84	0,13	0,09	0,88

Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu chuẩn, mẫu trắng, mẫu thử giả lập, mẫu dung môi hòa tan, mẫu dung môi pha động, mẫu dung môi chiết. Kết quả phân tích được trình bày trong hình 2 cho thấy ở sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu dung môi hòa tan, mẫu dung môi pha động, mẫu dung môi chiết không xuất hiện pic trùng thời gian lưu với các chất cần phân tích so với sắc ký đồ của hỗn hợp các chất chuẩn. Trên sắc ký đồ của mẫu thử thêm chuẩn có xuất hiện các pic có thời gian lưu trùng với các chất phân tích trong mẫu chuẩn. Như vậy phương pháp có tính đặc hiệu đạt yêu cầu.



Hình 2: Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu

(1: Dung môi pha động; 2: Dung môi hòa tan; 3: Dung môi chiết; 4: Mẫu chuẩn clenbuterol; 5: Mẫu chuẩn phenolphthalein; 6: Mẫu chuẩn sibutramine; 7: Mẫu hỗn hợp chuẩn; 8: Mẫu trắng; 9: Mẫu thử thêm chuẩn)

Tính tuyến tính

Tiến hành phân tích 8 mẫu thử giả lập có nồng độ từ 1 – 80ppm, nồng độ nội chuẩn cố định là 20ppm với điều kiện HPLC đã chọn. Xây dựng phương trình hồi quy thể hiện mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của phenolphthalein và sibutramine.

LOD và LOQ

LOD và LOQ được xác định dựa vào giá trị số tín hiệu/ nhiễu (S/N) tại nồng độ thấp nhất mà S/N lần lượt 3 và 10.

Bảng 3. Kết quả thẩm định tính tuyến tính, LOD và LOQ

	Phương trình hồi qui	R ²	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Phenolphthalein	y = 146066x - 122622	0,9989	0,33	1
Sibutramine	y = 41104x - 10455	0,9999	0,33	1

Kết quả thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ 1-80 ppm có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của các chất phân tích với hệ số tương quan R² > 0,995. LOD và LOQ của hai chất cần phân tích giá trị tương đối thấp (0,33 - 1 ppm).

Độ đúng và độ chính xác

Thêm vào mẫu trắng một lượng xác định hỗn chuẩn sibutramine và phenolphthalein tương ứng với ba mức nồng độ 4ppm, 8ppm, 12ppm. Độ đúng được xác định dựa trên % lượng chất thu hồi so với lượng chuẩn đã thêm vào. Ở mỗi nồng độ được phân tích lặp lại 6 lần mỗi ngày, trong 3 ngày liên tiếp.

Bảng 4. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác

Chất phân tích	Độ thu hồi (%)			Độ chính xác (8ppm) (n = 6)	
	4ppm	8ppm	12ppm	Trong ngày RSD %	Liên ngày RSD %
Phenolphthalein	93,55	96,46	93,97	1,48	2,46
Sibutramine	91,87	94,43	92,02	2,24	3,10

Độ thu hồi trong khoảng 91,87 – 96,46%. RSD% của các phân tích trong ngày và liên ngày đều thấp. Như vậy, phương pháp đã xây dựng có độ thu hồi và độ chính xác đạt yêu cầu theo quy định AOAC.

3.3. Ứng dụng quy trình định lượng các sibutramine và phenolphthalein trong một số thực phẩm chức năng thực tế trên thị trường

Quy trình phân tích sau khi thẩm định đạt yêu cầu được ứng dụng để định lượng 2 chất cấm trong 10 mẫu thực phẩm chức năng giảm cân. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả định lượng sibutramine và phenolphthalein trong một số sản phẩm

Chất phân tích	Số lượng mẫu nhiễm	Khoảng nồng độ nhiễm (mg/kg)
Phenolphthalein	4	21,07 – 16349,46
Sibutramine	8	17,51 – 14460,69

Kết quả từ bảng 4 cho thấy phenolphthalein có trong 4/10 mẫu, sibutramine phát hiện trong 8/10 mẫu với khoảng nồng độ từ 17,51 – 16349,46 mg/kg.

IV. BÀN LUẬN

Thực phẩm chức năng là một nền mẫu phức tạp, các chất cấm trộn trái phép ở nồng độ rất nhỏ nên việc lựa chọn quy trình xử lý mẫu và thiết bị phân tích phải đòi hỏi có khả năng làm sạch mẫu, phân tích đồng thời các chất phân tích với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Dịch chiết được loại tạp phân cực bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng và dùng dung môi hữu cơ

để loại tạp kém phân cực. Kết quả cho thấy phương pháp xử lý mẫu tuy đơn giản nhưng cho hiệu suất thu hồi khá cao, độ lặp lại ổn định. Chuẩn nội dùng trong nghiên cứu clenbuterol đáp ứng yêu cầu phân tích do có tính chất tương tự chất phân tích nên loại bỏ được ảnh hưởng tới quá trình xử lý và phân tích mẫu. Trên thế giới và Việt Nam đã có rất nhiều nghiên cứu đưa ra các phương pháp xác định riêng hoặc đồng thời sibutramine và phenolphthalein với nhiều kỹ thuật phân tích khác nhau như: Sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) [3]; Sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS/MS) [7]; Sắc ký lỏng siêu cao áp (UHPLC-DAD) [10]; Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [1], [2], [4], [8]. Tuy nhiên, nghiên cứu này lựa chọn HPLC là kỹ thuật phổ biến, thường quy, có độ chính xác cao để phân tích sibutramine và phenolphthalein trong thực phẩm chức năng giảm cân. Phương pháp đã xây dựng có khả năng định tính và định lượng được đồng thời 2 chất nghiên cứu với LOD và LOQ trong khoảng từ 0,33 - 1 ppm. So sánh với các nghiên cứu đã công bố của tác giả Ma Wei và cộng sự, giá trị LOD của phương pháp xây dựng thấp hơn chứng tỏ quy trình đạt độ nhạy cao hơn [8]. Tình trạng các sản phẩm thực phẩm chức năng giảm cân lưu hành trên thị trường Việt Nam nhiễm chất cấm khá nhiều và ở nồng độ cao, so với các nghiên cứu đã công bố trước đó thì hàm lượng chất cấm được trộn cao hơn gấp nhiều lần [2], [10].

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp HPLC - PDA để xây dựng quy trình định lượng đồng thời sibutramine và phenolphthalein trộn trái phép trong thực phẩm chức năng giảm cân. Phương pháp đáp ứng yêu cầu phân tích chất trộn trái phép với độ chọn lọc cao, khoảng tuyến tính với hệ số tương quan cao, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, đạt độ đúng và độ chính xác. Phương pháp đã ứng dụng xác định các chất sibutramine và phenolphthalein trộn trái phép trong một số mẫu thực phẩm chức năng giảm cân trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Chi, Lê Thị Hồng Hào (2015), “Xác định sibutramine có mặt trái phép trong thực phẩm chức năng giảm béo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 4B, tr 60-64.
2. Nguyễn Tiên Luyến (2014), *Xác định chất cấm Sibutramine trong thực phẩm chức năng giảm béo bằng phương pháp HPLC*, Luận văn thạc sĩ khoa học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Hà Nội.
3. AOAC International (2012), “Appendix K: Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals”, *AOAC Official Methods of Analysis*, pp 1-14.
4. FDA (2018), Tainted Weight Loss Products [Internet], 11/21/2018 [accessed 12/29/2018], Available from: URL: <https://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/MedicationHealthFraud/ucm234592.htm>
5. Ma Wei, Wang Hai-bo *et al.* (2010), “Simultaneous Determination of Phenolphthalein and Sibutramine Illegally Added to Weight Loss Functional Foods”, *FOOD SCIENCE*, 31(4), pp. 156-160.
6. Yun J, Choi J *et al* (2018),” Detection of Synthetic Anti-Obesity Drugs, Designer Analogues and Weight- Loss Ingredients as Adulterants in Slimming Foods from 2015 to 2017”, *J Chromatogr*, 9(1), pp 396.

7. Robert Ancuceanu, Mihaela Dinu, Corina Arama (2013), “Weight loss food supplements: Adulteration and multiple quality issues in two products of Chinese origin”, *Farmacia*, 61(1), pp 28-44.
8. Kevin Tran, Douglas Monroe *et al* (2015), “Method Validation for the Analysis of Multiple Weight Loss Drugs in Dietary Supplement Materials by LC-MS/MS”, *Journal of Regulatory Science*, 2, pp 15–19.
9. Ebtisam AR Alabdoolo, Preetha J Shetty *et al* (2017), “Detection of Illicit Substances in Slimming Products Available in UAE”, *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 4(1), pp 1-5.
10. WHO (2020), Obesity and overweight, [Internet], 04/01/2018 [accessed 09/09/2020]. Available from: URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Ngày nhận bài: 30/08/2020 - Ngày duyệt đăng: 08/09/2020
