DOI: 10.64302/joshusc.v35n2.1429

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI SIBUTRAMINE VÀ ORLISTAT PHA TRỘN TRÁI PHÉP TRONG THỰC PHẨM GIẢM CÂN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

Ngô Thị Thanh Xuân[1,2,*], Huỳnh Thị Túy Ngọc[1,2], Nguyễn Quang Mẫn[3]
Vũ Tùng Dương[4], Nguyễn Hải Phong[2], Đinh Quang Khiếu[2]

[1]Trung tâm Kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm thành phố Huế

[2]Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

[3]Khoa Cơ bản, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

[4]Trường Sĩ quan Lục quân 2 (Đại học Nguyễn Huệ)

*Email: thanhxuanknh@gmail.com

Ngày nhận bài: 5/6/2026; ngày hoàn thành phản biện: 21/8/2026; ngày duyệt đăng: 01/9/2026

TÓM TẮT

Tình trạng pha trộn trái phép dược chất vào thực phẩm hỗ trợ giảm cân nhằm trục lợi đang diễn biến phức tạp, gây rủi ro lớn cho sức khỏe người tiêu dùng. Nghiên cứu này tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò dãy điốt quang (HPLC-DAD) phục vụ mục tiêu giám sát và định lượng đồng thời sibutramine (SIB) và orlistat (ORL). Quá trình phân tích sử dụng cột C18, pha động là dung dịch acid phosphoric pH 3,0 và acetonitrile (ACN) với chương trình rửa giải gradient, tốc độ dòng 0,5 mL/phút. Phương pháp được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn của ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) và Dược điển Việt Nam V về tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính ($R^2 > 0,999$), độ chụm (RSD < 3%) và độ đúng (độ thu hồi 98,16% đến 101,66% cho SIB và 99,20% đến 102,09% cho ORL). Áp dụng phương pháp đã thẩm định để khảo sát 71 mẫu chế phẩm giảm cân trên thị trường, kết quả phát hiện 40 mẫu (chiếm 56,3%) vi phạm do chứa dược chất không công bố, trong đó có 8 mẫu (chiếm 20,0%) phối hợp đồng thời cả hai hoạt chất. Phương pháp có độ tin cậy cao, quy trình xử lý mẫu đơn giản, đáp ứng tốt yêu cầu kiểm nghiệm thường quy và hậu kiểm thị trường.

Từ khóa: Sibutramine, Orlistat, pha trộn trái phép, HPLC, kiểm nghiệm thực phẩm.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, các sản phẩm thực phẩm hỗ trợ giảm cân được quảng bá rộng rãi với cam kết hiệu quả nhanh, dẫn đến tình trạng lạm dụng và pha trộn trái phép các dược chất cấm. Trong đó, SIB và ORL là hai hoạt chất thường bị phát hiện nhất. SIB, một chất ức chế tái hấp thu chất dẫn truyền thần kinh trung ương, đã bị đình chỉ lưu hành trên toàn thế giới từ năm 2011 do làm tăng nguy cơ đột quỵ và đau thắt ngực. Bên cạnh đó, ORL dù được phép sử dụng trong điều trị béo phì dưới sự chỉ định của bác sĩ, nhưng việc tự ý đưa vào thực phẩm mà không kiểm soát liều lượng và không công bố trên nhãn là hành vi vi phạm pháp luật.

Trong công tác kiểm nghiệm, việc phát hiện các dược chất cấm hoặc không công bố đóng vai trò quan trọng nhằm bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Yêu cầu cấp thiết hiện nay là phải có quy trình phân tích nhanh, chính xác, trang thiết bị phù hợp để sàng lọc và định lượng các chất pha trộn trái phép trên nhiều nền mẫu phức tạp như viên nén, viên nang, trà, cà phê, thạch hay kẹo giảm cân. Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu này tập trung vào các mục tiêu:

- Thiết lập điều kiện sắc ký tối ưu để định lượng đồng thời SIB và ORL.

- Thẩm định phương pháp theo các tiêu chuẩn kỹ thuật hiện hành.

- Đánh giá thực trạng pha trộn dược chất trái phép trên các mẫu lưu thông thực tế trên thị trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Hóa chất

Dung môi, hóa chất: Acetonitrile, methanol (đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC - Merck, Đức); Kali dihydrogen phosphat (KH_2PO_4, đạt tiêu chuẩn phân tích - Merck, Đức); Acid phosphoric (H_3PO_4, đạt tiêu chuẩn phân tích - Merck, Đức); Nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn tinh khiết dùng cho HPLC.

Chất chuẩn: Sibutramine hydrochloride ($C_{17}H_{26}ClN$, Glentham, hàm lượng tính theo chế phẩm khan: 99,46%, độ ẩm: 5,7%, số lô: 033SMU), Orlistat ($C_{29}H_{53}NO_5$, Sigma, hàm lượng: 99,0%, số lô: LRAD4435).

2.2. Thiết bị

Hệ thống HPLC đầu dò DAD (Shimadzu), cột sắc ký pha đảo C18 (Inertsil ODS-3 (250 × 4,6 mm; 5 μm), GL Sciences, Nhật Bản).

2.3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu thử: 71 sản phẩm hỗ trợ giảm cân được thu thập trên thị trường, được lựa chọn nhằm đảm bảo tính đại diện cho các dạng nền mẫu phức tạp khác nhau bao gồm: viên nén, viên nang, trà, cà phê, thạch, và kẹo giảm cân. Mẫu được thu thập ngẫu nhiên, mã hóa và bảo quản ở điều kiện khô mát (độ ẩm < 75%, nhiệt độ < 30^{o}C), tránh ánh sáng trực tiếp.

- Mẫu nền trắng: mẫu thực phẩm giảm cân thực tế đã được kiểm nghiệm khẳng định hoàn toàn không chứa hoạt chất sibutramine và orlistat để phục vụ cho các thí nghiệm thẩm định (thử độ thu hồi và tính đặc hiệu).

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu

**Chuẩn bị các dung dịch:*

- Mẫu trắng (dung môi pha mẫu): Hỗn hợp dung môi acetonitrile - dung dịch H_3PO_4 pH 3,0 (tỷ lệ 80:20, v/v).

- Dung dịch chuẩn gốc: Các dung dịch chuẩn gốc của SIB và ORL được chuẩn bị riêng rẽ trong hỗn hợp dung môi pha mẫu.

- Dung dịch chuẩn hỗn hợp làm việc: Pha dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm 6 mức nồng độ chứa đồng thời cả hai chất SIB và ORL trong dung môi pha mẫu, với các cặp nồng độ tương ứng (SIB / ORL) lần lượt là: 1,0/5,0; 2,0/10,0; 5,0/25,0; 10,0/50,0; 20,0/100,0 và 50,0/200,0 μg/mL.

*Điều kiện sắc ký:

Tiến hành khảo sát và tối ưu hóa các thông số sắc ký dựa trên tài liệu tham khảo [6] và điều kiện thực tế về thiết bị, hóa chất, dung môi tại phòng thí nghiệm. Các yếu tố khảo sát bao gồm: bước sóng phát hiện tối ưu cho từng chất và t thành phần pha động để đạt được độ phân giải (Rs) tốt nhất giữa các pic.

* Thẩm định phương pháp

Phương pháp định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH Q2 (R1, R2) [7, 8] và Dược điển Việt Nam V [1], bao gồm các chỉ tiêu sau:

- Tính tương thích hệ thống: Đánh giá qua độ lặp lại của thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết.

- Độ đặc hiệu: Khả năng phân tách hoạt chất khỏi các tạp chất và tá dược.

- Độ đúng và độ chụm: Đánh giá thông qua độ thu hồi và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%).

- Khoảng tuyến tính: Thiết lập đường chuẩn trong khoảng nồng độ dự kiến.

- Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ): dựa trên việc khảo sát tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) tại các mức nồng độ thấp, với ngưỡng S/N ≥ 3 cho LOD

và S/N ≥ 10 cho LOQ.

*Xử lý số liệu

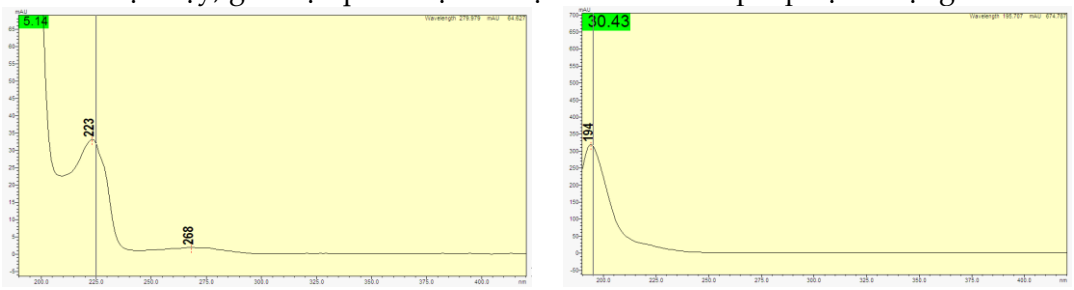
Sử dụng các hàm thống kê trong Microsoft Excel để tính toán và xử lý các kết quả thực nghiệm. Các thông số cần báo cáo bao gồm giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

3.1.1. Lựa chọn bước sóng phát hiện

Kết quả khảo sát phổ hấp thụ tử ngoại - khả kiến (UV-Vis) của các dung dịch chuẩn đơn chất trong vùng bước sóng 190–400 nm cho thấy bước sóng hấp thụ cực đại (λmax) của SIB là 223 nm, trong khi của ORL là 194 nm (Hình 1). Để tối ưu hóa quy trình phân tích đồng thời, đầu dò DAD được thiết lập quét đa bước sóng. Trong đó, bước sóng 210 nm được chọn làm bước sóng giám sát chung trên sắc ký đồ hiển thị, còn việc tính toán diện tích pic định lượng được thực hiện tại bước sóng hấp thụ cực đại riêng biệt của từng chất (223 nm đối với SIB và 194 nm đối với ORL) nhằm đảm bảo tối đa độ nhạy, giới hạn phát hiện và độ chính xác của phép định lượng.



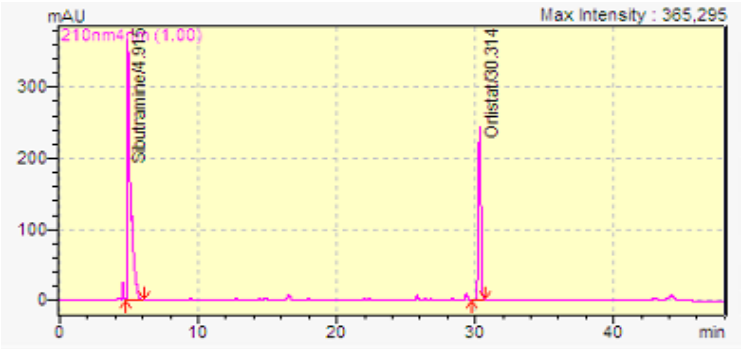
Hình 1. Phổ UV Dung dịch chuẩn đơn chất của SIB và ORL

3.1.2. Lựa chọn pha động

Đầu tiên, chúng tôi khảo sát một số pha động đơn giản không chứa dung dịch đệm muối như MeOH - H_2O, MeOH - acid phosphoric 0,1%, ACN - H_2O và ACN - đệm phosphat. Kết quả khảo sát cho thấy, các hệ pha động có sử dụng MeOH trong quá trình phân tích đều cho áp suất cao trên 3000 psi, áp suất ổn định cột có thể lên tới 3500 - 4000 psi, không phù hợp với hệ thống HPLC hiện có.

Pha động ACN - H_2O cho áp suất thấp và ổn định hơn tuy nhiên khả năng tách chưa đạt yêu cầu, pic của SIB vẫn bị dính với pic phía trước và cả 2 chất đều có đỉnh chưa cân xứng, tín hiệu đường nền bị hạ. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục khảo sát hệ pha động ACN - acid phosphoric. Qua quá trình tối ưu hóa, chúng tôi lựa chọn được hệ pha động gồm ACN - acid phosphoric pH 3,0, tốc độ dòng 0,5 mL/phút, chương trình

pha động theo Bảng 1. Sắc ký đồ thu được (Hình 2) cho thấy SIB và ORL được rửa giải trong khoảng 5,2 phút và 30,7 phút, pic của 2 chất tách hoàn toàn khỏi nền mẫu, đạt yêu cầu về hệ số đối xứng (Rs hoặc Tf) và số đĩa lý thuyết (N).



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn phân tích theo chương trình pha động đã lựa chọn

Qua quá trình khảo sát, chúng tôi đã lựa chọn điều kiện sắc ký sau:
- Cột sắc ký: C18- Inertsil ODS-3 (250 × 4,6 mm; 5 µm), GL Sciences, Nhật Bản)

- Pha động: acetonitrile - dung dịch H_3PO_4 pH 3,0

Bảng 1. Chương trình pha động

Thời gian (phút)	**Pha động**	
	% A (acetonitril)	***% B (dung dịch H_3PO_4 pH 3,0)***
0 - 5	65,0	35,0
5 - 15	85,0	15,0
15 - 35	85,0	15,0
35 - 40	65,0	35,0
40 - 48	65,0	35,0

- Tốc độ dòng: 0,5ml/phút

- Thể tích tiêm: 20 µL

- Bước sóng phát hiện: SIB 223 nm và ORL 194 nm.

3.2. Thẩm định phương pháp phân tích

Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký tại bước sóng 210 nm cho thấy tín hiệu đáp ứng của ORL thấp hơn đáng kể so với SIB (tỷ lệ diện tích pic khoảng 1:5). Vì vậy, để đảm bảo độ nhạy và sự cân đối về cường độ tín hiệu giữa hai chất trên sắc ký đồ, dung dịch chuẩn ORL được chuẩn bị với nồng độ cao gấp 5 lần so với SIB. Sau khi thiết lập nồng độ phù hợp, các thông số thẩm định của phương pháp tiếp tục được tiến hành đánh giá.

3.2.1. Tính tương thích hệ thống

Tiến hành phân tích lặp lại 6 lần mẫu chuẩn hỗn hợp có nồng độ của SIB 20µg/mL và ORL 100µg/mL. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

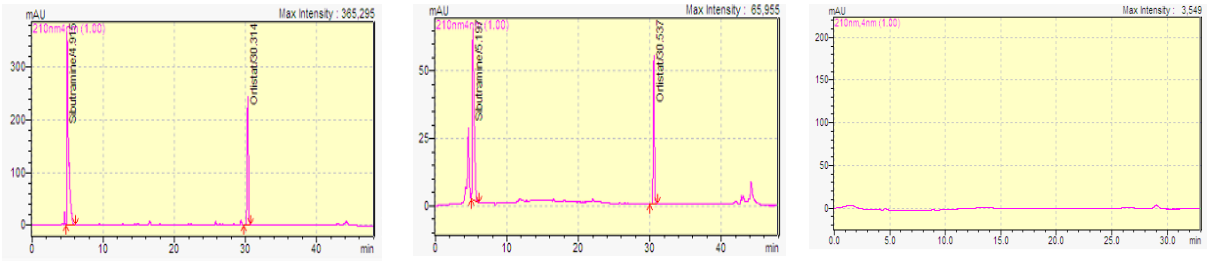
Bảng 2. Tính tương thích của hệ thống sắc ký

	SIB				ORL			
STT	**t_R (phút)**	**S_{pic} (µV.s)**	**T_f**	**N**	**t_R (phút)**	**S_{pic} (µV.s)**	**T_f**	**N**
1	5,23	1556546	1,579	21609,4	30,19	3008088	1,095	16032,8
2	5,22	1555519	1,621	21358,7	30,19	3013760	1,093	16074,4
3	5,22	1558776	1,615	21303,8	30,18	3008169	1,091	16030,4
4	5,21	1558056	1,590	21867,7	30,26	3034574	1,085	16891,9
5	5,21	1550251	1,557	22618,9	30,43	3066558	1,034	16355,1
6	5,20	1589938	1,605	22203,7	30,54	3041037	1,023	16148,2
TB	5,21	1561514	1,595	21827,0	30,30	3028698	1,070	16255,5
RSD(%)	0,17	0,912			0,49	0,766		

Kết quả cho thấy: Độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S_{pic}) của SIB và ORL trong 6 lần tiêm đều trong khoảng cho phép (< 2%), hệ số đối xứng (Tf) lần lượt là 1,595 và 1,070 (nằm trong khoảng 0,8 – 1,8 theo USP (United States Pharmacopeia); số đĩa lý thuyết (N) cao. Như vậy, hệ thống phù hợp và đảm bảo ổn định cho phép phân tích định lượng.

3.2.2. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, dung dịch chuẩn hỗn hợp, mẫu nền trắng (mẫu thực phẩm hỗ trợ giảm cân không chứa hoạt chất) và mẫu nền trắng được thêm chuẩn (với nồng độ SIB 10 µg/mL và ORL 50 µg/mL) theo các điều kiện sắc ký đã tối ưu, thu được sắc ký đồ như Hình 3.



(a) (b) (c)

Hình 3. Sắc ký đồ các mẫu: mẫu chuẩn (a), mẫu nền trắng thêm chuẩn (b), mẫu nền trắng (c).

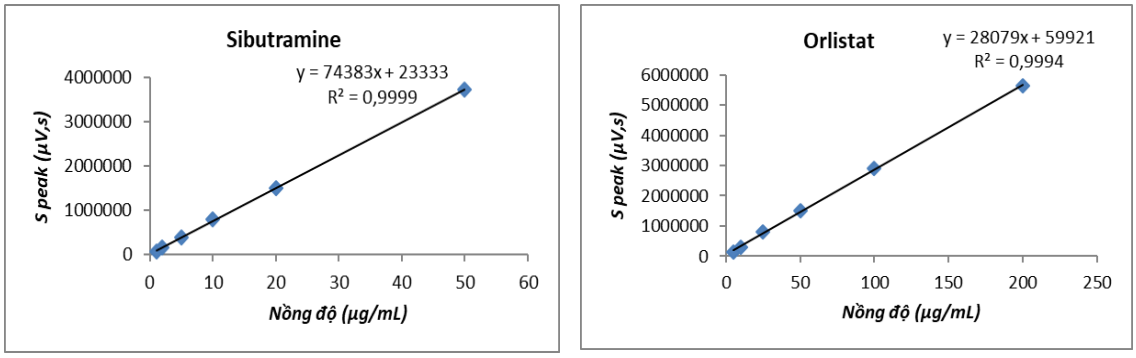
Kết quả cho thấy: trên sắc ký đồ của mẫu nền trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian tương ứng với pic của các chất chuẩn, sắc ký đồ của mẫu chuẩn, mẫu nền trắng thêm chuẩn có pic SIB và ORL ở thời gian lưu khoảng 5,1 và 30,7 phút, hình dạng phổ của pic SIB và ORL trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch chuẩn tại thời gian lưu trên cũng phù hợp, điều này chứng tỏ phương pháp có tính đặc hiệu cao.

3.2.3. Khoảng tuyến tính

Kết quả thiết lập đường chuẩn cho thấy sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic (y) và nồng độ chất phân tích (x) trong khoảng khảo sát.

Bảng 3. Mối liên quan giữa nồng độ SIB và ORL với diện tích pic

TT	SIB		ORL	
	Nồng độ (µg/mL)	S_{pic} *(µV,s)*	*Nồng độ (µg/mL)*	S_{pic} *(µV,s)*
1	1,0	85470	5,0	146367
2	2,0	172428	10,0	284228
3	5,0	383636	25,0	821884
4	10,0	799721	50,0	1520729
5	20,0	1504460	100,0	2890126
6	50,0	3739955	200,0	5647085
	y = 74383x+23333 R^2 = 0,9999		y = 28079x+59921 R^2 = 0,9994	



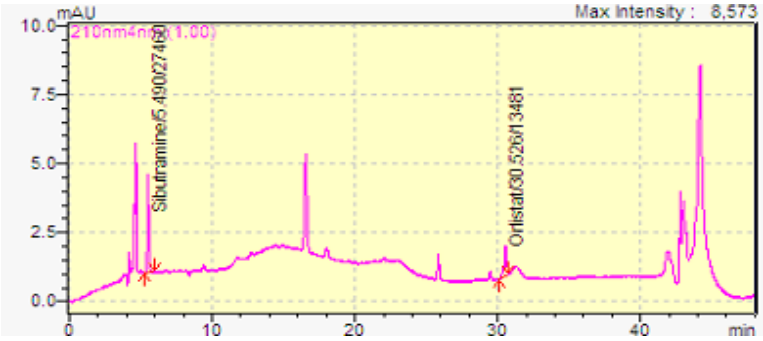
(a) (b)

Hình 4. Đường chuẩn của SIB (a) và ORL (b)

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ chất phân tích trong khoảng nồng độ khảo sát với hệ số tương quan R^2 của SIB là 0,9999, của ORL là 0,9994.

3.2.4. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng:

Việc xác lập giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp được thực hiện dựa trên việc khảo sát tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) qua chuỗi các mức nồng độ giảm dần thêm vào mẫu nền trắng, với ngưỡng S/N ≥ 3 cho LOD và S/N ≥ 10 cho LOQ. Kết quả khảo sát thực tế cho thấy: đối với SIB, tại nồng độ 1,0 µg/g thu được S/N = 7,7 nên được chọn làm LOD; LOQ được thiết lập ở mức 3,0 µg/g (S/N ≈ 23,1). Đối với ORL, tại nồng độ 2,0 µg/g ghi nhận S/N = 4,5 nên được chọn làm LOD; LOQ tương ứng là 6,0 µg/g (S/N ≈ 13,5). Quá trình khảo sát bổ sung ở các chuỗi nồng độ thấp hơn xác nhận không có mức nồng độ nào khác thỏa mãn điều kiện kỹ thuật, khẳng định tính đúng đắn và chặt chẽ của các giá trị giới hạn đã thiết lập.



Hình 5. Sắc đồ của dung dịch mẫu nền trắng thêm chuẩn tại LOD

3.2.5. Độ chụm (Độ lặp lại và độ chụm trung gian)

-Độ lặp lại: Do Kiểm nghiệm viên 1 (KNV1) thực hiện trên 6 mẫu độc lập, tiêm lần lượt 6 mẫu thêm chuẩn cùng nồng độ vào hệ thống sắc ký.

- Độ chụm trung gian: Do Kiểm nghiệm viên 2 (KNV2) thực hiện trên 6 mẫu độc lập vào một ngày khác.

Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chụm trung gian

KNV	STT	SIB				ORL			
		C (µg/mL) lý thuyết	S pic (µV,s)	C (µg/mL) thực tế	(%) So với hàm lượng lý thuyết	C (µg/mL) lý thuyết	S pic (µV,s)	C (µg/mL) thực tế	(%) So với hàm lượng lý thuyết
KNV1	1	50,0	773159	50,59	101,18	250,0	1531635	255,88	102,35
	2		763102	50,20	100,04		1530247	256,08	102,43
	3		760995	48,89	97,77		1535012	251,79	100,72
	4		760822	50,67	101,34		1534448	260,95	104,38
	5		759471	49,46	98,92		1535126	255,29	102,11
	6		761328	49,72	99,43		1535086	255,98	102,39
	TB			49,90	99,78			255,99	102,40
	RSD (%)				1,37				1,14

KNV2	1	50,0	762168	49,22	98,44	250,0	1531911	259,78	103,91
	2		760167	49,41	98,82		1534028	261,86	104,75
	3		761172	48,50	97,00		1539965	257,73	103,09
	4		760463	48,83	97,65		1531840	258,28	103,31
	5		761724	49,52	99,03		1534448	261,94	104,78
	6		762157	48,56	97,11		1531911	256,27	102,51
TB				49,01	98,01			259,31	103,72
RSD (%)					0,89				0,89

Kết quả cho thấy, RSD(%) đều ≤ 2%. Như vậy, độ chụm của phương pháp và độ chụm trung gian đạt yêu cầu.

3.2.6. Độ đúng

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng phương pháp thêm chuẩn trên mẫu thử có chứa sẵn hoạt chất ở 3 mức nồng độ xấp xỉ 80%, 100% và 120% so với nồng độ ban đầu.

Mỗi mẫu được chuẩn bị độc lập và tiêm lặp lại 3 lần trên hệ thống HPLC. Độ thu hồi (%) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) của độ thu hồi được tính toán dựa trên lượng chuẩn tìm lại được sau khi trừ đi hàm lượng nền ban đầu so với lượng chuẩn đã thêm vào. Kết quả chi tiết được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

Mẫu		**SIB**				**ORL**			
Mẫu thử		Nồng độ SIB ban đầu: 47,78 (µg/mL)				Nồng độ ORL ban đầu: 225,87 (µg/mL)			
		NĐ chuẩn thêm vào (µg/mL)	***S_{pic} dd thử thêm chuẩn (µV.s)***	***NĐ chuẩn thu hồi (µg/mL)***	***Độ thu hồi (%)***	***NĐ chuẩn thêm vào (µg/mL)***	***S_{pic} dd thử thêm chuẩn (µV.s)***	***NĐ chuẩn thu hồi (µg/mL)***	***Độ thu hồi (%)***
80%	1	40,0	1378568	39,26	98,16	200,0	2724978	204,99	102,09
	2		1397007	39,97	99,93		2723326	202,27	101,13
	3		1395813	39,35	98,38		2724009	199,62	99,81
	TB				98,82				101,15
	SD				0,98				1,14
	RSD (%)				0,99				1,13
100%	1	50,0	1556546	50,82	101,66	250,0	3014443	254,87	101,95
	2		1555519	49,77	99,55		3014234	249,86	99,94
	3		1558776	49,32	98,65		3022858	247,99	99,20
	TB				99,95				100,36
	SD				1,53				1,43

	RSD (%)				1,53				1,42
120%	1	60,0	1710070	59,33	98,89	300,0	3358205	306,47	102,06
	2		1707516	59,83	99,72		3323146	303,92	101,30
	3		1710997	59,29	98,81		3317520	299,07	99,69
	TB				99,14				101,05
	SD				0,51				1,25
	RSD (%)				0,51				1,24

Kết quả cho thấy tỷ lệ thu hồi tại các mức nồng độ khảo sát đều nằm trong khoảng 98,0 % đến 102,0 % với RSD không quá 2,0 % (Độ lệch chuẩn (SD) thu được qua các mức nồng độ nằm trong khoảng 0,51 - 1,53 (đối với SIB) và 1,25 - 1,43 (đối với ORL). Các dữ liệu này khẳng định phương pháp có độ đúng đạt yêu cầu theo quy định hiện hành [2,3,7,8]. Căn cứ vào giá trị SD này, các kết quả độ thu hồi trung bình được quy chuẩn làm tròn đến 02 chữ số sau dấu phẩy thập phân.

3.2.7. Áp dụng phân tích mẫu thực tế.

Phương pháp đã thẩm định được áp dụng để khảo sát hàm lượng SIB và ORL trong 71 sản phẩm hỗ trợ giảm cân được thu mua trên thị trường. Để đảm bảo tính bảo mật thông tin và khách quan trong quá trình phân tích, tên các mẫu sản phẩm khảo sát trong nghiên cứu này được mã hóa dưới dạng ký hiệu từ LA01 đến LA71.

- Dung dịch mẫu thử: Nghiền mịn, đồng nhất mẫu, cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu (hoặc lấy chính xác 0,5 ml nếu mẫu dạng lỏng) chế phẩm cho vào bình định mức dung tích 25,0 ml, thêm khoảng 15 ml hỗn hợp dung môi CAN - H_3PO_4 pH 3,0 (80:20, v/v), lắc xoáy để trộn đều, lắc siêu âm khoảng 30 phút và định mức bằng hỗn hợp dung môi CAN - H_3PO_4 pH 3,0 (80:20, v/v). Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm vào hệ thống HPLC.

- Dựa vào phương trình đường chuẩn hồi quy tuyến tính đã xây dựng ($y = ax + b$) và diện tích của pic SIB/ ORL trên sắc ký đồ của dung dịch thử để tính hàm lượng SIB/ORL có trong mẫu thử:

+ Hàm lượng SIB/ORL có trong mẫu thử ban đầu được tính theo công thức:

$$C\ (\mu g/g \text{ hoặc } \mu g/mL) = \frac{(S - b) \times V \times F}{a \times m}$$

Trong đó:

S: diện tích của pic SIB/ ORL của dung dịch thử.

V: thể tích bình định mức đã sử dụng để hòa tan mẫu (25,0 ml).

F: độ pha loãng mẫu (nếu không pha loãng thì F = 1).

a, b: hệ số của phương trình đường chuẩn tương ứng ($y = ax + b$)

m: khối lượng mẫu (g) hoặc thể tích mẫu (ml) thực tế đã cân/đong.

Kết quả thu được được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng các mẫu

STT	Mẫu	Hàm lượng ORL (μg/g)	Hàm lượng SIB (μg/g)
1	LA01	645,17	KPH
2	LA02	742,55	KPH
3	LA03	851,09	KPH
4	LA04	KPH	KPH
5	LA05	457,11	KPH
6	LA06	1.082,44	679,38
7	LA07	1.393,16	981,02
8	LA08	KPH	KPH
9	LA09	324,27	395,50
10	LA10	1.730,58	KPH
11	LA11	1.207,16	745,38
12	LA12	KPH	KPH
13	LA13	2.574,32	KPH
14	LA14	262,86	KPH
15	LA15	448,59	KPH
16	LA16	3.019,15	KPH
17	LA17	KPH	KPH
18	LA18	361,79	683,41
19	LA19	1.702,04	941,66
20	LA20	2.569,58	1.114,92
21	LA21	2.909,01	KPH
22	LA22	867,73	KPH
23	LA23	337,19	KPH
24	LA24	KPH	KPH
25	LA25	336,49	KPH
26	LA26	1.035,22	KPH
27	LA27	KPH	KPH
28	LA28	1.980,64	2.092,97
29	LA29	316,59	KPH
30	LA30	726,58	KPH
31	LA31	KPH	KPH
32	LA32	KPH	KPH
33	LA33	KPH	KPH
34	LA34	KPH	KPH
35	LA35	KPH	53.817,98
36	LA36	KPH	19.130,65

37	LA37	KPH	47.770,70
38	LA38	KPH	52.971,10
39	LA39	KPH	53.735,25
40	LA40	KPH	KPH
41	LA41	KPH	KPH
42	LA42	KPH	KPH
43	LA43	KPH	KPH
44	LA44	KPH	KPH
45	LA45	KPH	KPH
46	LA46	KPH	KPH
47	LA47	KPH	105.191,07
48	LA48	KPH	36.318,03
49	LA49	KPH	20.707,11
50	LA50	KPH	KPH
51	LA51	KPH	36.023,34
52	LA52	KPH	KPH
53	LA53	KPH	KPH
54	LA54	KPH	KPH
55	LA55	KPH	10.756,26
56	LA56	KPH	37.220,22
57	LA57	KPH	KPH
58	LA58	KPH	KPH
59	LA59	KPH	KPH
60	LA60	KPH	39.812,04
61	LA61	KPH	KPH
62	LA62	KPH	66.998,02
63	LA63	KPH	29.604,05
64	LA64	KPH	24.866,32
65	LA65	KPH	KPH
66	LA66	KPH	KPH
67	LA67	KPH	KPH
68	LA68	KPH	KPH
69	LA69	KPH	KPH
70	LA70	KPH	6.340,21
71	LA71	KPH	KPH

(KPH: Không phát hiện, nghĩa là dưới ngưỡng phát hiện LOD của phương pháp)

3.3. Thảo luận:

Các thông số sắc ký cơ bản được định hướng tham khảo từ các nghiên cứu trước [4, 5, 6]. Hệ dung môi gradient gồm acetonitrile và dung dịch H_3PO_4 pH 3,0 (tỷ lệ 80:20, v/v) trên cột Inertsil ODS-3 đã tách hoàn toàn hai chất với các pic sắc ký đối xứng, sắc nét. Việc lựa chọn bước sóng phát hiện ở 210 nm giúp tối ưu hóa độ nhạy

đồng thời loại bỏ hiệu quả tín hiệu nhiễu nền từ các thành phần phức tạp trong thực phẩm. Kết quả phân tích mẫu trắng và mẫu thực tế xác nhận không có pic tạp xuất hiện tại thời gian lưu tương ứng của SIB và ORL.

Bên cạnh đó, các giới hạn phát hiện (LOD) và định lượng (LOQ) trong nghiên cứu này được xác định dựa trên tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N) trực tiếp từ mẫu thực tế, qua đó đã phản ánh toàn diện ảnh hưởng của hiện tượng nhiễu nền trong phân tích mẫu thực phẩm. Trái lại, phần lớn các giá trị LOD/LOQ trong các tài liệu tham khảo [4, 5, 6] thường được khảo sát trên dung dịch chuẩn tinh khiết trong hệ dung môi sạch. Do sự khác biệt về bản chất nền mẫu và điều kiện khảo sát, nhóm tác giả không tiến hành so sánh trực tiếp các giá trị LOD/LOQ giữa nghiên cứu này với các công bố trước.

Kết quả thu được từ 71 mẫu khảo sát đã phác họa một thực trạng phức tạp về tình trạng lạm dụng hoạt chất cấm trong các chế phẩm hỗ trợ giảm cân. Tỷ lệ mẫu dương tính với các chất phân tích mục tiêu lên tới 40/71 mẫu vi phạm, chiếm 56,3%, phản ánh sự thiếu hụt trong kiểm soát chất lượng của các sản phẩm lưu thông trên thị trường.

Điểm đáng chú ý trong nghiên cứu này là sự hiện diện đồng thời của sibutramine (nhóm ức chế tái hấp thu monoamine trung ương) và orlistat (nhóm ức chế không hồi phục lipase đường tiêu hóa) trong 20,0% số mẫu vi phạm. Đây là sự phối hợp nhằm cộng hưởng cơ chế gây chán ăn và ngăn chặn hấp thu lipid. Tuy nhiên, dưới góc độ dược lâm sàng, sự hiệp đồng này làm gia tăng áp lực lên hệ thống tuần hoàn và gây rối loạn chuyển hóa vitamin tan trong dầu, dẫn đến các phản ứng có hại của thuốc (ADRs) khó tiên lượng.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công quy trình định lượng đồng thời sibutramine và orlistat bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối đầu dò dãy diode (HPLC-DAD). Các thông số thẩm định bao gồm độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ chụm, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) đều đạt yêu cầu theo các hướng dẫn hiện hành, khẳng định phương pháp hoàn toàn phù hợp để áp dụng cho công tác kiểm nghiệm thường quy.

Qua kiểm nghiệm thực tế 71 mẫu thực phẩm giảm cân đang lưu thông, kết quả ghi nhận 40 mẫu dương tính với chất cấm, chiếm tỷ lệ 56,3%. Đáng chú ý, 20,0% số mẫu vi phạm có hiện tượng pha trộn đồng thời cả hai hoạt chất với hàm lượng lớn. Việc lưu hành các sản phẩm chứa hoạt chất bị thu hồi như sibutramine trực tiếp đe dọa an toàn sức khỏe người sử dụng.

Phương pháp đề xuất không chỉ cung cấp một công cụ phân tích tin cậy và chính xác, mà còn đưa ra những dẫn chứng thực tiễn quan trọng, hỗ trợ đắc lực cho các cơ quan quản lý trong công tác giám sát chất lượng sản phẩm, kiểm soát tình trạng pha trộn trái phép và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Hội đồng Dược điển Việt Nam, *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, 2017.

[2]. AOAC International, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 21st ed., AOAC International, Arlington, VA, 2019.

[3]. World Health Organization, *Quality control methods for herbal materials*, World Health Organization, Geneva, 2011.

[4]. Nagarajan, K., Bhardwaj, S., Kamboj, S., Khatter, B., Method development and validation of orlistat by using RP-HPLC, *Curr. Pharm. Anal.*, 21(4), 313–322, 2025.

[5]. Bindaiya, S., Argal, A., Stability indicating assay of orlistat and its degradation products by HPLC, *Bull. Pharm. Res.*, 3(2), 44–50, 2013.

[6]. Yu, Z., Wei, Q., Fan, Q., Wan, C., A simple and convenient method for simultaneous determination of four major species of illegal additives in slimming health food, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 33(4), 452–461, 2010. https://doi.org/10.1080/10826070903574220

[7]. ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, International Council for Harmonisation, Geneva, 2021.

[8]. ICH, *Guideline on Validation of Analytical Procedures Q2(R2)*, International Council for Harmonisation, Geneva, 2022.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SIBUTRAMINE AND ORLISTAT AS ADULTERANTS IN WEIGHT-LOSS PRODUCTS

Ngo Thi Thanh Xuan[1,2]*, Huynh Thi Tuy Ngoc [1,2], Nguyen Quang Man[3], Nguyen Hai Phong[2], Dinh Quang Khieu[2]

[1]Drug, cosmetic and food quality control Center of Hue City

[2]University of Sciences, Hue University

[3]Faculty of Basic Sciences, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

*Email: thanhxuanknh@gmail.com

ABSTRACT

The illegal adulteration of weight-loss products with synthetic drugs poses a significant public health risk. This study developed and validated an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of sibutramine and orlistat in various dietary supplement matrices. Analysis was performed on a C18 column, using a gradient mobile phase of acetonitrile and phosphoric acid solution (pH 3.0) at a flow rate of 0.5 mL/min. The method was validated for specificity, linearity, precision, and accuracy according to ICH guidelines. Calibration curves showed excellent linearity ($R^2 > 0.999$) for both analytes. Recovery rates ranged from 98.16% to 101.66% for SIB and from 99.20% to 102.09% for ORL, with all RSD values below 3%. Screening of 71 commercial samples revealed a 56.3% violation rate (40/71 samples), including 8 samples (20.0%) containing a co-formulation of two active ingredients, at concentrations exceeding therapeutic levels. The method is robust, straightforward, and highly effective for routine market surveillance and regulatory enforcement.

Keywords: Sibutramine, Orlistat, Adulteration, HPLC, Method validation.