

# **ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI TRIAMCINOLON ACETONID, NYSTATIN VÀ CLOTRIMAZOL TRONG KEM BÔI DA ULTRACOMB BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC**

HÀ DIỆU LY, ĐỖ TRƯỜNG THANH MINH  
Viện Kiểm nghiệm thuốc - Thành phố Hồ Chí Minh

## **1. Đặt vấn đề**

Clotrimazol là thuốc chống nấm phổ rộng được dùng điều trị các trường hợp bệnh ngoài da do nhiễm các loài nấm gây bệnh khác nhau và cũng có tác dụng trên *Trichomonas*, *Staphylococcus* và *Bacteroides*.

Nystatin có tác dụng chống bội nhiễm *Candida albicans* đường tiêu hóa trong quá trình điều trị kháng sinh. Chỉ định dự phòng và điều trị nhiễm nấm *Candida* ở da và niêm mạc (miệng, đường tiêu hóa, âm đạo).

Triamcinolon là glucocorticoid tổng hợp có fluor, được dùng dưới dạng alcol hoặc este để bôi ngoài chống viêm, chống dị ứng.

Hiện nay trên thị trường có một số chế phẩm có chứa cả 03 hoạt chất trên ở dạng kem bôi da nhưng chưa có phương pháp công bố định lượng đồng thời cả ba hoạt chất này.

Trong bài viết này, chúng tôi xin giới thiệu kết quả nghiên cứu định lượng đồng thời triamcinolon acetonid, nystatin và clotrimazol bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao trên cột pha đảo đầu dò UV.

## **2. Thực nghiệm**

### **2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất**

#### **2.1.1. Thiết bị và dụng cụ**

Được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP.

Hệ thống sắc ký lỏng LC-20A series, Shimadzu với detector DAD.

- Cột Inersil RP 8 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m).

Cân phân tích Mettler Toledo độ chính xác 0,01 mg.

- Các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

#### **2.1.2. Hoá chất, chất chuẩn**

Acetonitril loại dùng cho HPLC.

Methanol loại dùng cho HPLC.

Diamoni hydrophosphat loại PA.

Acid phosphoric loại PA.

Chất chuẩn: triamcinolon acetonid (99,94%), nystatin (5605,7 IU/mg), clotrimazol (98,82%) của Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM.

#### **2.1.3. Đối tượng nghiên cứu**

Kem bôi da ultracomb (triamcinolon acetonid 0,1%, nystatin 100.000 IU, clotrimazol 1% trong 1g kem) của công ty cổ phần dược Minh Hải sản xuất.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Điều kiện sắc ký:**

- Cột: Inersil RP 8 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)

- Detector UV: 254 nm

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

- Thể tích tiêm: 20  $\mu$ l

Pha động: Methanol – dung dịch đệm diamoni hydrophosphat pH 7,0.

Dung dịch đệm diamoni hydrophosphat pH 7,0: Hòa tan 6,6 g diamoni hydrophosphat trong 1000 ml nước, điều chỉnh đến pH = 7,0  $\pm$  0,2 bằng acid phosphoric.

Chương trình gradient dung môi:

| Thời gian (phút) | Dung dịch đệm pH 7,0 (Pha A) | Methanol (Pha B)    | Ghi chú             |
|------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| 0 - 8            | 35                           | 65                  | Đẳng dòng           |
| 8 - 15           | 35 $\rightarrow$ 5           | 65 $\rightarrow$ 95 | Gradient tuyến tính |
| 15 - 20          | 5 $\rightarrow$ 50           | 95 $\rightarrow$ 50 | Gradient tuyến tính |
| 20 - 25          | 35                           | 65                  | Đẳng dòng           |

#### **2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu**

Dung dịch chuẩn gốc triamcinolon acetonid: Cân chính xác khoảng 25,0 mg triamcinolon acetonid chuẩn vào bình định mức 10 ml và thêm methanol vừa đủ 10 ml.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 25,0 mg clotrimazol chuẩn và khoảng 44,6 mg nystatin chuẩn (tương ứng 250.000 IU) cho vào bình định mức

100 ml, thêm 80 ml methanol, lắc đều. Thêm chính xác 1 ml dung dịch chuẩn gốc triamcinolon acetonid và thêm methanol vừa đủ 100 ml. Siêu âm đến tan hoàn toàn và lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.

**Dung dịch thử:** Cân chính xác khoảng 2,5 g kem (chứa tương ứng khoảng 2,5 mg triamcinolon acetonid, 250.000 IU nystatin và 25 mg clotrimazol) cho vào trong cốc có mỏ 100 ml, thêm 50 ml methanol, lắc và để trên cách thủy 60°C trong 10 phút, thỉnh thoảng khuấy, lắc đều, chuyển vào bình định mức 100 ml. Tráng cốc 3 lần, mỗi lần bằng 15 ml methanol, chuyển dịch tráng vào bình định mức trên, thêm methanol đến vạch. Ngâm bình định mức chứa mẫu trong nước đá 20 phút, ly tâm. Lấy phần dịch trong và lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chọn lựa điều kiện sắc ký

Chúng tôi đã khảo sát điều kiện sắc ký như trên, tiến hành lặp lại nhiều lần trong ngày và trong các ngày khác nhau, sắc ký đồ thu được của dung dịch chuẩn (hình 1) và dung dịch thử (hình 2) tách rõ ràng, hệ số phân giải lớn hơn 2, hệ số đối xứng từ 0,8 - 1,2. Như vậy việc lựa chọn các điều kiện sắc ký là phù hợp.

3.2. Đánh giá phương pháp

3.2.1. Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ các hoạt chất triamcinolon acetonid: 0,024 mg/ml; nystatin: 2.500 IU/ml; clotrimazol: 0,26 mg/ml. Tính tương thích của hệ thống được trình bày ở bảng 1.

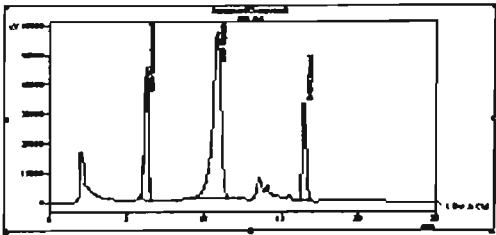
Bảng 1. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc ký

| STT | Các thông số                                                | Triamcinolon acetonid | Nystatin | Clotrimazol |
|-----|-------------------------------------------------------------|-----------------------|----------|-------------|
| 1   | Thời gian lưu trung bình (phút)                             | 6,26                  | 10,85    | 16,41       |
| 2   | RSD của thời gian lưu (%)                                   | 0,16                  | 0,26     | 0,30        |
| 3   | RSD của diện tích pic (%)                                   | 0,01                  | 0,06     | 0,20        |
| 4   | Hệ số bất đối (T)                                           | 0,90                  | 0,81     | 1,20        |
| 5   | Độ phân giải giữa các pic triamcinolon acetonid và nystatin | 6,5                   |          |             |
| 6   | Độ phân giải giữa các pic nystatin và clotrimazol           | 8,0                   |          |             |

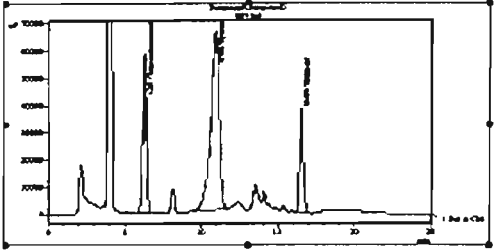
Các số liệu thu được cho thấy hệ thống sắc ký trên phù hợp cho việc định tính và định lượng đồng thời triamcinolon acetonid, nystatin và clotrimazol.

3.2.2. Khảo sát tính đặc hiệu

Các pic thu được trong dung dịch thử có thời gian lưu và phổ UV tương ứng với các pic của triamcinolon acetonid, nystatin và clotrimazol trong dung dịch chuẩn.



Hình 1. Sắc ký đồ định lượng đồng thời triamcinolon acetonid, nystatin và clotrimazol trong dung dịch chuẩn (triamcinolon acetonid:  $t_R$  = 6,27 phút; nystatin:  $t_R$  = 10,86 phút; clotrimazol:  $t_R$  = 16,46 phút)



Hình 2. Sắc ký đồ định lượng đồng thời triamcinolon acetonid, nystatin và clotrimazol trong dung dịch thử (triamcinolon acetonid:  $t_R$  = 6,28 phút; nystatin:  $t_R$  = 10,90 phút; clotrimazol:  $t_R$  = 16,49 phút)

3.2.3. Khảo sát khoảng tuyến tính

Khảo sát với 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp với nồng độ triamcinolon acetonid từ 5 µg - 50 µg/ml; nystatin từ 500 IU – 5.000 IU/ml; clotrimazol từ 10 µg - 400 µg/ml. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

| Dung dịch             |                                                                                | 1      | 2       | 3       | 4       | 5       |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Triamcinolon acetonid | Nồng độ µg/ml                                                                  | 5      | 10      | 25      | 30      | 50      |
|                       | Diện tích pic                                                                  | 157250 | 311058  | 799557  | 949468  | 1597113 |
|                       | Phương trình hồi quy: $y = 32031 x + 5842,9$<br>Hệ số tương quan $r = 0,9999$  |        |         |         |         |         |
| Nystatin              | Nồng độ IU/ml                                                                  | 500    | 1500    | 2500    | 3000    | 5000    |
|                       | Diện tích pic                                                                  | 420175 | 1260526 | 2100877 | 2521052 | 4301504 |
|                       | Phương trình hồi quy: $y = 862,04 x - 34262$<br>Hệ số tương quan $r = 0,9997$  |        |         |         |         |         |
| Clotrimazol           | Nồng độ µg/ml                                                                  | 10     | 50      | 150     | 250     | 400     |
|                       | Diện tích pic                                                                  | 24137  | 120685  | 347901  | 578428  | 921484  |
|                       | Phương trình hồi quy: $y = 2296,6 x + 3506,5$<br>Hệ số tương quan $r = 0,9999$ |        |         |         |         |         |

Bằng phương pháp bình phương cực tiểu suy ra giới hạn định lượng LOQ:

- Triamcinolon acetonid: 1,56 µg/ml
- Nystatin: 338,5 IU/ml
- Clotrimazol: 8,7 µg/ml

3.2.4. Khảo sát độ lặp lại

Khảo sát trên kem bôi da ultracomb với các điều kiện sắc ký như trên, tiến hành lặp lại 6 lần thử. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại

| Mẫu thử        | Lượng cân (g) | Triamcinolon acetonid |               | Nystatin           |               | Clotrimazol         |               |
|----------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|
|                |               | Diện tích             | Hàm lượng (%) | Diện tích          | Hàm lượng (%) | Diện tích           | Hàm lượng (%) |
| 1              | 3,0092        | 997283                | 102,92        | 2452761            | 97,09         | 683506              | 105,12        |
| 2              | 2,4621        | 809623                | 102,12        | 2108069            | 97,63         | 560503              | 105,36        |
| 3              | 2,4513        | 805575                | 102,08        | 2104667            | 97,89         | 556908              | 105,14        |
| 4              | 2,4512        | 805935                | 102,12        | 2017339            | 98,03         | 555815              | 104,94        |
| 5              | 2,4525        | 810310                | 102,63        | 2011175            | 97,68         | 558811              | 105,45        |
| 6              | 2,5419        | 836548                | 102,21        | 2072511            | 97,12         | 581590              | 105,89        |
| Trung bình (%) |               | 102,35 ; RSD = 0,34   |               | 97,57 ; RSD = 0,40 |               | 105,32 ; RSD = 0,32 |               |

Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt ( $RSD \leq 0,40\%$ ) có thể áp dụng để định lượng các hoạt chất trong mẫu thành phẩm.

3.2.5. Khảo sát độ đúng

Thêm chính xác lượng 80%, 100%, 120% mỗi hoạt chất chuẩn vào mẫu thử đã biết hàm lượng, tiến hành định lượng theo điều kiện đã chọn. Kết quả độ đúng được trình bày trong bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng**

| Lượng hoạt chất (mg)<br>có sẵn trong 2,5927 g kem | Lượng chuẩn thêm vào (mg) | Lượng thu hồi (mg) | Tỷ lệ thu hồi (%) | Trung bình (%)      |
|---------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| Triamcinolon acetonid (mg)                        |                           |                    |                   |                     |
| 2,6532                                            | 2,1229                    | 2,1203             | 99,88             | 99,94<br>RSD = 0,11 |
| 2,6532                                            | 2,1229                    | 2,1241             | 100,06            |                     |
| 2,6532                                            | 2,1229                    | 2,1203             | 99,88             |                     |
| 2,6532                                            | 2,6550                    | 2,6350             | 99,25             | 99,28<br>RSD = 0,05 |
| 2,6532                                            | 2,6550                    | 2,6350             | 99,25             |                     |
| 2,6532                                            | 2,6550                    | 2,6372             | 99,33             |                     |
| 2,6532                                            | 3,1850                    | 3,1528             | 98,99             | 99,33<br>RSD = 0,48 |
| 2,6532                                            | 3,1850                    | 3,1572             | 99,13             |                     |
| 2,6532                                            | 3,1850                    | 3,1811             | 99,88             |                     |
| Nystatin (IU)                                     |                           |                    |                   |                     |
| 252969                                            | 202375 (36,09 mg)*        | 202658             | 100,14            | 99,72<br>RSD = 0,50 |
| 252969                                            | 202430 (36,10 mg)*        | 202146             | 99,86             |                     |
| 252969                                            | 202711 (36,15 mg)*        | 201008             | 99,16             |                     |
| 252969                                            | 249533 (44,50 mg)*        | 248759             | 99,69             | 99,46<br>RSD = 0,68 |
| 252969                                            | 250374 (44,65 mg)*        | 250375             | 100,00            |                     |
| 252969                                            | 249814 (44,55 mg)*        | 246541             | 98,69             |                     |
| 252969                                            | 303562 (54,13 mg)*        | 301558             | 99,34             | 99,11<br>RSD = 0,25 |
| 252969                                            | 303365 (54,10 mg)*        | 299845             | 98,84             |                     |
| 252969                                            | 303926 (54,20 mg)*        | 301312             | 99,14             |                     |
| Clotrimazol (mg)                                  |                           |                    |                   |                     |
| 27,31                                             | 21,84                     | 21,82              | 99,89             | 99,54<br>RSD = 0,50 |
| 27,31                                             | 21,50                     | 21,28              | 98,97             |                     |
| 27,31                                             | 21,75                     | 21,70              | 99,77             |                     |
| 27,31                                             | 27,30                     | 26,97              | 98,81             | 99,38<br>RSD = 0,53 |
| 27,31                                             | 27,35                     | 27,21              | 99,49             |                     |
| 27,31                                             | 27,36                     | 27,32              | 99,85             |                     |
| 27,31                                             | 32,77                     | 32,79              | 100,07            | 99,56<br>RSD = 0,56 |
| 27,31                                             | 32,50                     | 32,16              | 98,96             |                     |
| 27,31                                             | 32,60                     | 32,49              | 99,66             |                     |
| * Nystatin hoạt lực 5605,7 IU/mg                  |                           |                    |                   |                     |

Phân tích Anova cho thấy  $t_m < t_l$ : hàm lượng cho vào và tìm lại khác nhau không có ý nghĩa thống kê hay phương pháp có độ đúng cao (Tỷ lệ phục hồi 98,81-100,14% với RSD từ 0,05 - 0,68 %).

#### 4. Kết luận

Các kết quả thực nghiệm cho thấy điều kiện sắc ký đã chọn ở trên cho phép định tính, định lượng đồng thời triamcinolon acetonid, nystatin và clotrimazol trong mẫu kem bôi da ultracomb. Phương pháp có sự tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic. Với độ chính xác, độ đúng cao, phương pháp có thể áp dụng định lượng những mẫu có thành phần hoạt chất tương tự.