

**Phát triển và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao
để định lượng nystatin trong hệ tiểu phân nano lipid**

Nguyễn Hà Phúc Tâm^{1,2}, Khuru Mỹ Lệ², Phan Lê Tâm²,

Phan Thanh Dũng^{1,3}, Trần Văn Thành^{1,3*}

¹Trường Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng,

phường Sài Gòn, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 1 Dương Quang Trung,

phường Hòa Hưng, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trung tâm Khoa học Công nghệ UMP, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh,

41 Đinh Tiên Hoàng, phường Sài Gòn, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/12/2025; ngày chuyển phản biện 4/12/2025; ngày nhận phản biện
17/12/2025; ngày chấp nhận đăng 23/12/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm thiết lập và thẩm định một quy trình định lượng nystatin (NYS) chính xác trong hệ thống chất mang lipid cấu trúc nano (NLC), khắc phục hạn chế về độ tan và tính thấm thấp của hoạt chất nhóm BCS IV (Biopharmaceutics Classification System Class IV). Phương pháp: Quá trình phân tích được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High Performance Liquid Chromatograph) Waters e2695 với cột C18 (250x4,6 mm, 5 μ m). Pha động tối ưu bao gồm: methanol - acetonitril - đệm amoni acetat 0,05 M (55:15:30, tt/tt/tt) với tốc độ dòng 1 ml/phút, phát hiện tại bước sóng 305 nm. Quy trình xử lý mẫu sử dụng DMSO 5% làm dung môi trung gian để phá vỡ cấu trúc lipid. Kết quả: Phương pháp đạt tính tương thích hệ thống cao với RSD (Relative Standard Deviation) của thời gian lưu và diện tích pic <2%. Tính tuyến tính được thiết lập trong khoảng 20-200 IU/ml với hệ số tương quan $R^2=0,9996$. Giới hạn định lượng và phát hiện cho thấy độ nhạy cao. Độ đúng của phương pháp đạt tỷ lệ thu hồi từ 98,18 đến 101,38%. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian đều đạt yêu cầu với RSD<2,0%. Đặc biệt, phương pháp chứng minh tính đặc hiệu tuyệt đối, không chịu ảnh hưởng bởi nền mẫu lipid phức tạp. Kết luận: Quy trình HPLC được xây dựng đơn giản, tin cậy và chính xác, phù hợp để kiểm soát chất lượng và đánh giá hiệu suất tải thuốc của các hệ tiểu phân nano lipid chứa nystatin.

Từ khóa: nano lipid, nystatin, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Chỉ số phân loại: 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: tranvanthanh@ump.edu.vn

Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of nystatin in a lipid nanoparticle system**Ha Phuc Tam Nguyen^{1,2}, My Le Khuu², Le Tam Phan²,****Thanh Dung Phan^{1,3}, Van Thanh Tran^{1,3*}***¹School of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,**41 Dinh Tien Hoang Street, Sai Gon Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam**²Faculty of Pharmacy, Pham Ngoc Thach University of Medicine,**1 Duong Quang Trung Street, Hoa Hung Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam**³Science and Technology Centre, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Sai Gon Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam*

Received 1 December 2025; revised 17 December 2025; accepted 23 December 2025

Abstract:

This study aims to establish and validate an accurate high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantification of nystatin (NYS) in nanostructured lipid carrier (NLC) systems, thereby addressing the limitations regarding the poor solubility and low permeability of this Biopharmaceutics Classification System (BCS) class IV drug. Methods: The analysis was performed using a Waters e2695 HPLC system equipped with a C18 column (250x4.6 mm, 5 μ m). The optimised mobile phase consisted of methanol, acetonitrile, and 0.05 M ammonium acetate buffer (55:15:30, v/v/v), delivered at a flow rate of 1.0 ml/min with UV detection at 305 nm. The sample preparation protocol utilised 5% DMSO (Dimethyl Sulfoxide) as an intermediate solvent to disrupt the lipid matrix. Results: The method demonstrated high system suitability, with Relative Standard Deviations (RSD) for retention time and peak area of less than 2%. Linearity was established within the concentration range of 20-200 IU/ml, yielding a correlation coefficient (R^2) of 0.9996. The Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) values indicated high sensitivity. The method's accuracy was confirmed with recovery rates ranging from 98.18 to 101.38%. Both repeatability and intermediate precision met the acceptance criteria with RSD values <2.0%. Notably, the method demonstrated absolute specificity with no interference from the complex lipid matrix. Conclusion: The developed HPLC procedure is simple, reliable, and accurate, making it suitable for quality control and the evaluation of drug loading efficiency in nystatin-loaded lipid nanoparticle systems.

Keywords: high-performance liquid chromatography, nano lipid, nystatin.**Classification number: 3.4**

1. Đặt vấn đề

Nhiễm nấm *Candida* là một vấn đề sức khỏe toàn cầu với tỷ lệ mắc và tử vong đáng báo động, đặc biệt ở các nước đang phát triển và trên bệnh nhân suy giảm miễn dịch. Nystatin, một kháng sinh chống nấm nhóm polyene macrolide được chiết xuất từ *Streptomyces noursei*, là lựa chọn đầu tay trong điều trị nhiễm nấm tại chỗ. Cơ chế tác dụng của nystatin liên quan đến việc liên kết với ergosterol trên màng tế bào nấm, tạo ra các lỗ xốp làm rò rỉ các thành phần nội bào và gây chết tế bào [1].

Tuy nhiên, thách thức lớn nhất trong việc ứng dụng nystatin nằm ở đặc tính lý hóa của nó. Theo Hệ thống phân loại sinh dược học (BCS), nystatin thuộc nhóm IV, đặc trưng bởi độ tan thấp trong nước và tính thấm kém. Ngoài ra, hoạt chất này rất nhạy cảm với ánh sáng, nhiệt độ và pH, dễ bị phân hủy dẫn đến mất hoạt tính. Để khắc phục, các hệ thống phân phối thuốc hiện đại như nano lipid rắn (SLN) và chất mang lipid cấu trúc nano (NLC) đã được phát triển nhằm tăng độ tan, bảo vệ dược chất và cải thiện sinh khả dụng [1].

Việc phát triển các hệ thống nano lipid đặt ra yêu cầu cấp thiết về một phương pháp phân tích chính xác để đánh giá hiệu suất bao gói và tải lượng thuốc. Các phương pháp vi sinh truyền thống tuy phản ánh hoạt lực nhưng tốn thời gian và độ chính xác thấp. Trong khi đó, việc định lượng bằng quang phổ UV-Vis thường gặp trở ngại do độ đục của nền mẫu lipid gây nhiễu [1, 2].

Nghiên cứu này tập trung xây dựng và thẩm định quy trình định lượng nystatin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo hướng dẫn của ICH và Bộ Y tế Việt Nam [2, 3]. Điểm mới của nghiên cứu nằm ở quy trình xử lý mẫu sử dụng DMSO để phá vỡ hoàn toàn cấu trúc nano lipid, đảm bảo định lượng chính xác toàn bộ lượng thuốc được bao gói, tạo tiền đề vững chắc cho việc tối ưu hóa công thức bào chế [1, 4, 5].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng và hóa chất

- Chất chuẩn: nystatin nguyên liệu dạng bột được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Dược liệu Pharmedic, với giấy chứng nhận phân tích (COA) được cấp bởi công ty.

- Hóa chất tinh khiết phân tích và dung môi HPLC: methanol HPLC, acetonitrile HPLC (Fisher - Mỹ), ammonium acetat (Merck - Đức) dùng pha đệm, dimethyl sulfoxide (DMSO) dùng làm dung môi hòa tan, acid acetic (Xilong - Trung Quốc).

- Tá dược bào chế nano (cho mẫu placebo): Glyceryl monostearate (GMS) (Basf - Đức), Acid oleic (Merck - Đức), Tween 80 (Merck - Đức).

- Thiết bị: hệ thống HPLC Waters e2695 với đầu dò PDA 2998 (Waters - Mỹ), cân phân tích Quintix (Satorius - Đức), bể siêu âm Elma.

2.2. Chuẩn bị mẫu

Quy trình chuẩn bị mẫu đóng vai trò quyết định độ đúng của phép phân tích, đặc biệt với mẫu dạng hạt nano lipid [1].

- Dung dịch chuẩn gốc: Hòa tan 1 g nguyên liệu nystatin trong 2 ml DMSO và siêu âm cho tan hoàn toàn. Thêm methanol vừa đủ thể tích 100 ml để được dung dịch chuẩn (theo COA - Certificate of Analysis) 1 mg nystatin nguyên liệu (tương đương 6478 IU). Từ dung dịch này, tiến hành pha loãng bằng methanol để được các dung dịch làm việc nồng độ 20, 50, 100, 150 và 200 IU/ml; lọc qua màng PTFE (Polytetrafluoroethylene) 0,45 μ m và sử dụng trong 24 giờ.

- Dung dịch mẫu thử: Lấy lượng bán thành phẩm nano lipid (chứa tương đương 0,01 g nystatin nguyên liệu) hòa tan trong 1 ml DMSO, thêm methanol vừa đủ trong bình định mức 100 ml để thu được dung dịch A, dùng dung dịch A pha loãng bằng methanol để được dung dịch thử có nồng độ 100 IU/ml; lọc qua màng PTFE 0,45 μ m và sử dụng trong 24 giờ.

- Dự kiến nystatin được nạp vào hệ nano với các tỷ lệ lần lượt là: 0,125; 0,25; 0,5 và 1%.

- Mẫu trắng: Chuẩn bị tương tự mẫu chuẩn gốc nhưng không có nystatin.

- Mẫu placebo: Chuẩn bị tương tự mẫu thử nhưng không có nystatin.

- Mẫu thử thêm chuẩn: Lấy lượng bán thành phẩm nano lipid (chứa tương đương 0,01 g nystatin nguyên liệu) và 0,01 g nystatin nguyên liệu hòa tan trong 1 ml DMSO, thêm methanol vừa đủ trong bình định mức 100 ml để thu được dung dịch A, dùng dung dịch A pha loãng bằng methanol để được dung dịch thử có nồng độ 100 IU/ml; lọc qua màng PTFE 0,45 μ m và sử dụng trong 24 giờ.

2.3. Phương pháp sắc ký

Quá trình phân tích được thực hiện dựa trên các thông số tham khảo từ nghiên cứu của B.N.N. Quynh và cs (2019) [4].

Cột sắc ký: C18 (250x4,6 mm, 5 μ m).

Nhiệt độ cột: 30°C.

Pha động: Hỗn hợp methanol - acetonitril - đệm amoni acetat 0,05 M theo tỷ lệ 55:15:30 (tt/tt/tt).

Tốc độ dòng: 1 ml/phút.

Thể tích tiêm: 10 μ l.

Bước sóng phát hiện: 305 nm (dựa trên cực đại hấp thụ của nystatin).

2.4. Thẩm định quy trình

Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH Q2(R1) và Sổ tay đăng ký thuốc (Bộ Y tế) với các chỉ tiêu: tính phù hợp hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian [2, 3].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tính phù hợp hệ thống

Trước khi tiến hành phân tích mẫu, tính phù hợp của hệ thống sắc ký được đánh giá qua 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn nồng độ 100 IU/ml.

Bảng 1. Kết quả tính tương thích hệ thống.

Lần tiêm mẫu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu V \times giây$)	Hệ số dung lượng	Hệ số bất đối xứng	Số đĩa lý thuyết
1	9,8	405902	2,927	0,91	6022
2	9,8	410172	2,928	0,89	6004
3	9,8	406515	2,927	0,89	5937
4	9,8	408897	2,928	0,9	6005
5	9,8	408250	2,928	0,89	5986
6	9,8	408757	2,927	0,88	5989
Giá trị trung bình	9,8	408082			
SD		1595,25			
%RSD		0,39			

Bảng kết quả tính tương thích hệ thống cho thấy, giá trị RSD của thời gian lưu (tR), diện tích (S) của các pic trong mẫu chuẩn đều <2,0% và các thông số sắc ký đều nằm trong khoảng yêu cầu.

Các thông số này khẳng định hệ thống sắc ký hoạt động ổn định và chính xác, đủ điều kiện cho phép phân tích định lượng.

3.2. Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu được đánh giá bằng cách so sánh sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu placebo (nano không thuốc), mẫu chuẩn và mẫu thử.

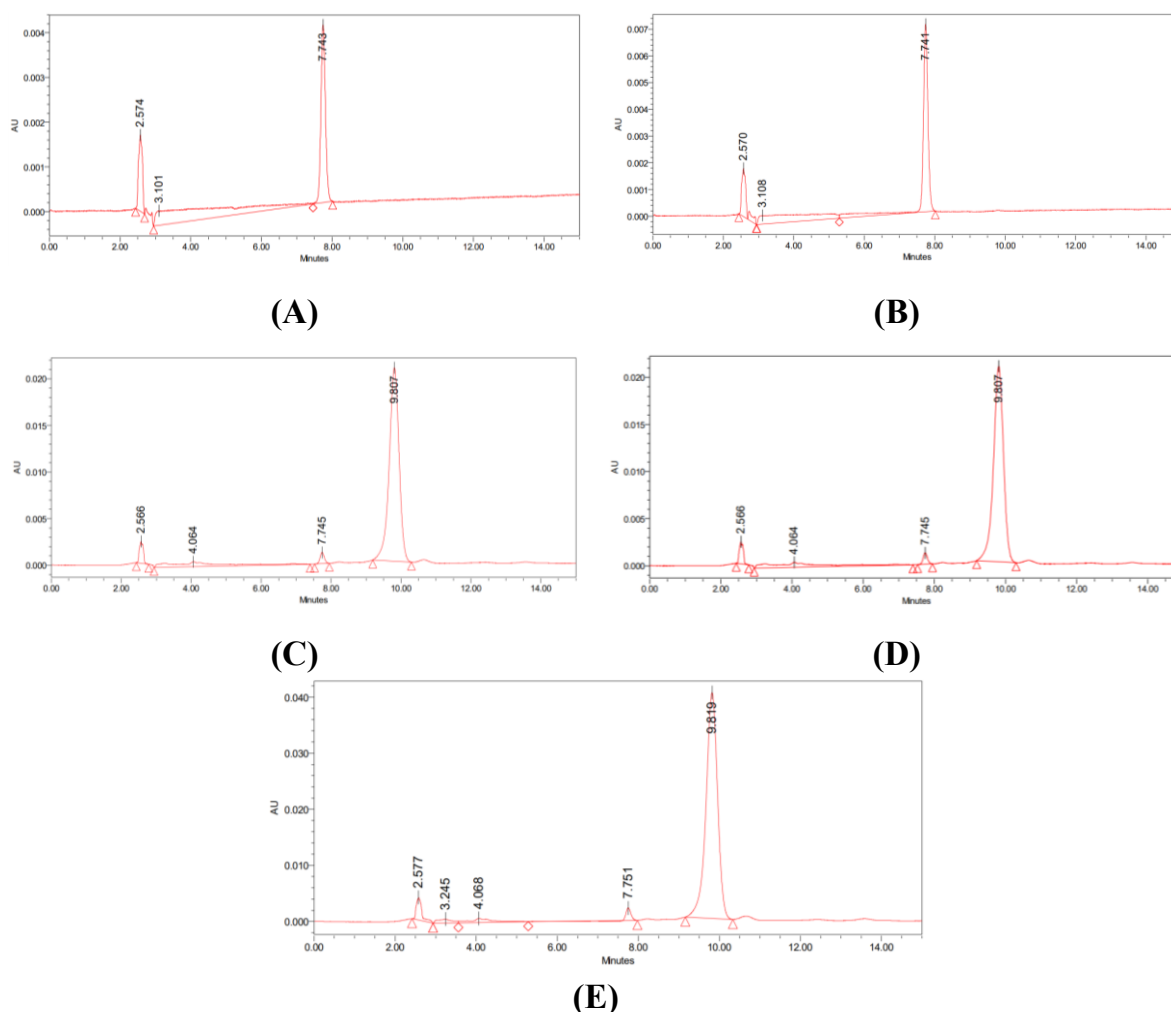
- Mẫu trắng và mẫu placebo: Không xuất hiện bất kỳ pic nào tại thời gian lưu 9,8 phút.

- Mẫu thử và mẫu chuẩn: Xuất hiện pic nhọn, cân đối tại thời gian lưu 9,8 phút.

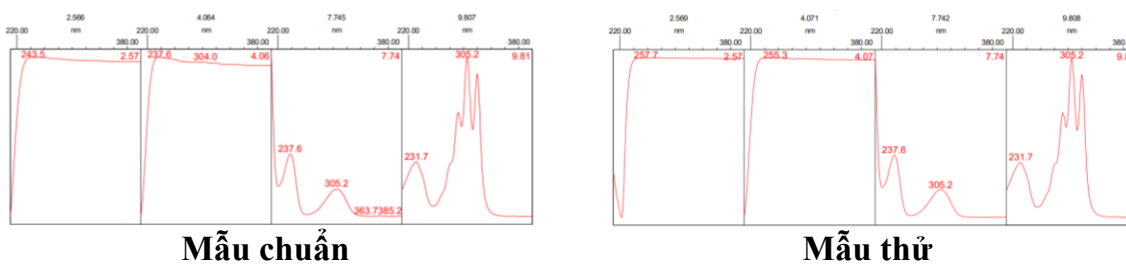
- Độ tinh khiết của pic (Peak Purity): Kết quả phân tích PDA cho thấy, góc tinh khiết (Purity Angle) nhỏ hơn ngưỡng tinh khiết (Purity Threshold) (mẫu thử: $0,176 < 0,298$), chứng tỏ pic thu được là tinh khiết, không bị nhiễu bởi các thành phần khác (hình 1, 2, 3 và bảng 2).

- Phổ UV tại thời gian lưu 9,8 thể hiện rõ là nystatin với hình dạng phổ đặc trưng, các phổ UV của các thời gian lưu khác không có phổ UV này cho thấy là tạp.

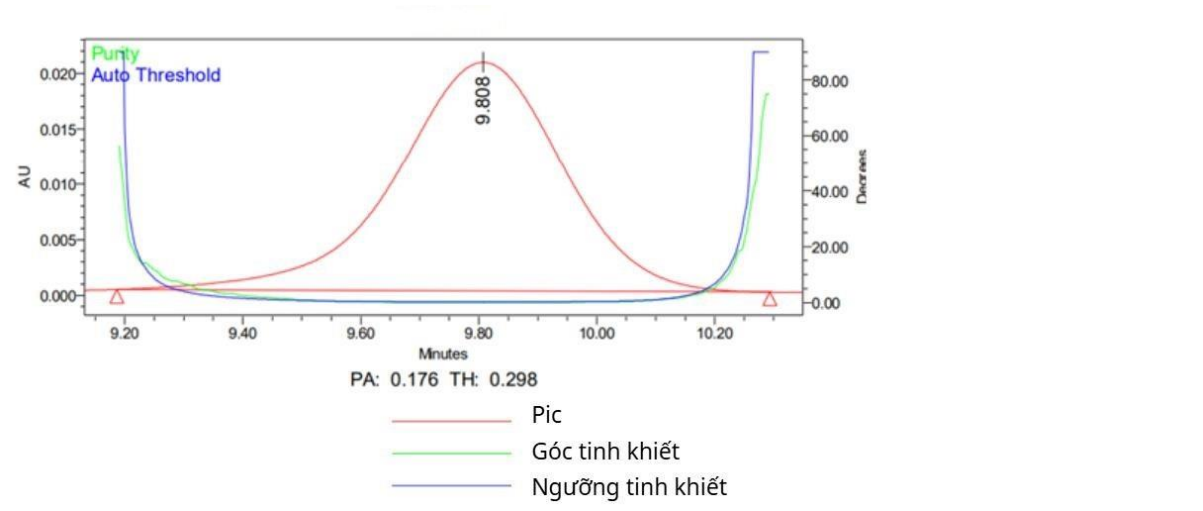
Điều này chứng minh quy trình xử lý mẫu đã loại bỏ hoàn toàn ảnh hưởng của tá dược lipid (GMS, Acid oleic) và chất diện hoạt (Tween 80).



Hình 1. Sắc ký đồ của tính đặc hiệu. (A) Mẫu trắng, (B) Mẫu placebo, (C) Mẫu chuẩn, (D) Mẫu thử, (E) Mẫu thử thêm chuẩn.



Hình 2. Phổ UV.



Hình 3. Độ tinh khiết pic của mẫu thử.

Bảng 2. Kết quả tính đặc hiệu.

STT	Mẫu	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (μVxgiây)	Góc tinh khiết (Purity angle)	Ngưỡng tinh khiết (Purity Threshold)
1	Mẫu trắng	Không có pic			
2	Mẫu placebo	Không có pic			
3	Mẫu chuẩn	9,8	407344	0,168	0,294
4	Mẫu thử	9,8	403948	0,176	0,298
5	Mẫu thử thêm chuẩn	9,8	800336	0,226	0,243

3.3. Tính tuyến tính

Khoảng tuyến tính được khảo sát từ 20 đến 200 IU/ml. Kết quả diện tích pic tương ứng với các nồng độ cho thấy mối tương quan chặt chẽ. Phương trình hồi quy: Mặc dù phương trình hồi quy ban đầu được xác định là $y=4039,2x+1382,7$ với hệ số tương quan $R^2=0,9996$, tuy nhiên, phân tích thống kê sâu hơn cho thấy hệ số chặn (tung độ gốc B) có giá trị $p=0,83 (>0,05)$, nghĩa là không có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, hệ số góc (độ dốc) có ý nghĩa thống kê cao ($p<0,05$). Do đó, phương trình hồi quy tối ưu được xác định đi qua gốc tọa độ: $\hat{y}=4039,2x$ (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả tính tuyến tính.

STT	Mức nồng độ (IU/ml)	Diện tích pic trung bình
1	20	80669
2	50	200702
3	100	407344
4	150	616468
5	200	802091
Phương trình hồi quy: $\hat{y}=4039,2x+1382,7$, $R^2=0,9996$		

3.4. Độ đúng

Độ đúng được đánh giá thông qua phương pháp thêm chuẩn vào nền mẫu placebo tại 3 mức nồng độ: 80, 100 và 120% so với nồng độ mục tiêu.

Tất cả giá trị thu hồi đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép (98,0-102,0%) với $RSD < 2,0\%$ (bảng 4). Điều này đặc biệt quan trọng vì nó xác nhận rằng, dung môi DMSO 5% đã phá vỡ hoàn toàn cấu trúc hạt nano lipid, giải phóng toàn bộ nystatin để định lượng mà không bị mất mát trong quá trình xử lý.

Bảng 4. Kết quả độ đúng.

Tỷ lệ chuẩn	Mẫu	Nồng độ mẫu placebo (IU/ml)	Hàm lượng chuẩn thêm vào (IU/ml)	Diện tích pic ($\mu V \times giây$)	Hàm lượng nystatin tính theo phương trình hồi quy (IU/ml)	Tỷ lệ thu hồi (%)
80%	1	0	80	324720	80,05	100,06%
	2	0	80	320117	78,91	98,64%
	3	0	80	318631	78,54	98,18%
Trung bình						98,96%
SD						0,97
RSD (%)						0,99
100%	1	0	100	407411	100,52	100,52%
	2	0	100	399889	98,66	98,66%
	3	0	100	410866	101,38	101,38%
Trung bình						100,19%
SD						1,39
RSD (%)						1,39
120%	1	0	120	488443	120,58	100,49%
	2	0	120	479060	118,26	98,55%
	3	0	120	477198	117,80	98,17%
Trung bình						99,07%
SD						1,24
RSD (%)						1,26

3.5. Độ chính xác

Độ lặp lại: Thực hiện 6 lần trên cùng một mẫu thử nồng độ 100 IU/ml. Kết quả hàm lượng tính toán dao động từ 98,88% đến 99,56%. Giá trị trung bình đạt 99,17% với $RSD=0,23\%$. Kết quả đo được thể hiện tại bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của quy trình định lượng nystatin.

Mẫu	Hàm lượng nystatin lý thuyết (IU/ml)	Diện tích pic ($\mu V \times giây$)	Hàm lượng nystatin tính theo phương trình hồi quy (IU/ml)
1	100	401883	99,15%
2	100	402079	99,20%
3	100	403540	99,56%
4	100	402158	99,22%
5	100	400797	98,88%
6	100	401315	99,01%
Trung bình		401962	99,17%
SD		929,97	0,23
RSD (%)		0,23	0,23

Độ chính xác trung gian: Được thực hiện bởi hai kiểm nghiệm viên khác nhau trên hai hệ thống hoặc thời điểm khác nhau.

- Kiểm nghiệm viên 1: Trung bình 99,17%, RSD 0,23%.

- Kiểm nghiệm viên 2: Trung bình 100,27%, RSD 0,66%.

Độ sai khác giữa hai kiểm nghiệm viên là 0,78% (<2,0%), và RSD gộp của cả 12 mẫu là 0,73%. Kết quả đo được thể hiện trong bảng 6.

Kết quả này khẳng định phương pháp có độ tin cậy cao, ít bị ảnh hưởng bởi các yếu tố ngẫu nhiên từ con người hay thời điểm phân tích.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của quy trình định lượng nystatin.

STT	Người phân tích 1, ngày 1 Hệ thống HPLC: Waters e2695, (Waters, Mỹ)			Người phân tích 2, ngày 2 Hệ thống HPLC: Waters e2695, (Waters, Mỹ)		
	Nồng độ định lượng (IU/ml)	Diện tích pic ($\mu V \times s$)	% Hàm lượng	Nồng độ định lượng (IU/ml)	Diện tích pic ($\mu V \times s$)	% Hàm lượng
1	100	401883	99,15	100	406502	100,30
2	100	402079	99,20	100	401216	98,99
3	100	403540	99,56	100	407385	100,52
4	100	402158	99,22	100	406377	100,27
5	100	400797	98,88	100	408336	100,75
6	100	401315	99,01	100	408461	100,78
Trung bình: 99,17%; SD: 0,23; RSD: 0,23%			Trung bình: 100,27%; SD: 0,66; RSD: 0,66%			
Kết quả phân tích của cả 2 người phân tích: Trung bình: 99,97%; RSD: 0,73%						
Độ sai khác kết quả định lượng trung bình:						
Giữa hai người phân tích: 0,78%						
Giữa các người phân tích với kết quả trung bình của cả hai người phân tích:						
+ Người phân tích 1: 0,55%			+ Người phân tích 2: 0,55%			

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công quy trình định lượng nystatin trong hệ thống nano lipid bằng phương pháp HPLC. Các điều kiện sắc ký tối ưu (cột C18, pha động methanol:acetonitril:đệm amoniacetat 55:15:30, bước sóng 305 nm) cho phép tách và định lượng hoạt chất một cách nhanh chóng (thời gian lưu <10 phút) và chính xác.

Quy trình đã đáp ứng đầy đủ các yêu cầu thẩm định khắt khe theo tiêu chuẩn quốc tế:

Tính đặc hiệu cao: Phân biệt rõ ràng thuốc khỏi nền mẫu lipid phức tạp.

Độ chính xác và độ đúng phù hợp: Tỷ lệ thu hồi khoảng 100% và sai số RSD<1%, chứng minh hiệu quả của quy trình xử lý mẫu dùng DMSO.

Khoảng tuyến tính rộng: 20-200 IU/ml, phù hợp cho nhiều giai đoạn kiểm nghiệm từ bán thành phẩm đến thành phẩm.

Phương pháp này là công cụ phân tích đặc lực để phục vụ các bước tiếp theo của quá trình phát triển thuốc, cụ thể là đánh giá hiệu suất bao gói, tải lượng thuốc và độ ổn định của hệ NLC nystatin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] F. Sousa, C. Nascimento, D. Ferreira, et al. (2023), “Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **199**, DOI: 10.1016/j.addr.2023.114969.

[2] Ministry of Health (2018), “Nystatin”, *Vietnamese Pharmacopoeia V*, **2**, Medical Publishing House, 1078pp (in Vietnamese).

[3] ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*.

[4] B.N.N. Quynh, T.A. Vu, N.D. Nga, et al. (2019), “Development of an HPLC method for the quantification of nystatin”, *Vietnam Journal of Pharmacy*, **59(8)**, pp.49-53 (in Vietnamese).

[5] M. Elmowafy, M.M.A. Sanea (2021), “Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **29(9)**, pp.999-1012, DOI: 10.1016/j.jsps.2021.07.015.