

Glucose máu tại thời điểm vào viện = 2,7 mmol/l, có khả năng dự đoán nguy cơ RLYT với độ nhạy 18,18%, độ đặc hiệu 16,67%. Kết quả tại bảng 3.25 cũng cho thấy bệnh nhân có đường máu dưới 2,7 mmol/l có nguy cơ RLYT gấp 22,5 lần so với nhóm còn lại (95%CI:1,43–355,07; p=0,0013). Masahito Katoh cũng cho kết quả đường huyết trung bình ở các bệnh nhân HĐH có RLYT là 1,8 mmol/l.

## V. KẾT LUẬN

Các yếu tố đường máu dưới 2,7 mmol/l, tuổi trên 60 và có tình trạng nhiễm trùng đi kèm là các yếu tố làm tăng nguy cơ RLYT ở bệnh nhân HĐH.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Witsch J, Neugebauer H, Flechsenhar J, Jüttler E.** Hypoglycemic encephalopathy: a case series and literature review on outcome determination. *Journal of neurology.* Oct 2012; 259(10):2172-81. doi:10.1007/s00415-012-6480-z
2. **Cryer PE.** Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest.* Jun 2006;116(6):1470-3. doi: 10.1172/jci28735
3. **Souza CV.** Hypoglycemia, Diabetes, and Cardiovascular Events. *Diabetes care.* 2010;33(6):1389-1394.
4. **Nguyễn Minh Tuấn.** Khảo sát tình trạng hạ đường huyết và đáp ứng điều trị ở bệnh nhân đái tháo đường tuýp 2 nhập viện cấp cứu. Đại học Y Hà Nội; 2020.
5. **Fischer KF, Lees JA, Newman JH.** Hypoglycemia in hospitalized patients. *New England journal of medicine.* 1986;315(20):1245-1250.
6. **Kumar JG, Abhilash KP, Saya RP, Tadipaneni N, Bose JM.** A retrospective study on epidemiology of hypoglycemia in Emergency Department. *Indian journal of endocrinology and metabolism.* Jan-Feb 2017;21(1):119-124. doi:10.4103/2230-8210.195993
7. **Kotera A, Iwashita S, Irie H, Taniguchi J, Kasaoka S, Kinoshita Y.** An analysis of the relationship between Glasgow Coma Scale score and plasma glucose level according to the severity of hypoglycemia. *Journal of Intensive Care.* 2014/01/03 2014;2(1):1. doi:10.1186/2052-0492-2-1
8. **Saikawa R, Yamada H, Suzuki D, et al.** Risk Factors of Hypoglycemic Encephalopathy and Prolonged Hypoglycemia in Patients With Severe Hypoglycemia. *Journal of clinical medicine research.* Mar 2019;11(3):213-218. doi: 10.14740/jocmr3728
9. **Halawa I, Zelano J, Kumlien E.** Hypoglycemia and risk of seizures: A retrospective cross-sectional study. *Seizure.* 2015/02/01/2015;25:147-149. doi:https://doi.org/10.1016/j.seizure.2014.10.005

# NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG CLOBETASOL PROPIONAT TRONG DẦU GỘI ĐẦU BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Trần Quang Trung<sup>1</sup>, Đinh Thị Khánh Ly<sup>1</sup>, Trịnh Nam Trung<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng clobetasol propionat trong mẫu dầu gội đầu. **Phương pháp nghiên cứu:** Thẩm định tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính và đường chuẩn, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. **Kết quả:** Thẩm định được phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để định lượng clobetasol propionat trong mẫu dầu gội đầu theo các tiêu chí quy định. **Kết luận:** Đã xây dựng được phương pháp định lượng clobetasol propionat trong nền mẫu dầu gội đầu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao để làm cơ sở đánh giá các sản phẩm dầu gội đầu có chứa clobetasol propionat.

**Từ khóa:** Clobetasol propionat, dầu gội đầu, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**Viết tắt:** CLP: Clobetasol propionat, LOD: giới

hạn phát hiện, LOQ: giới hạn định lượng.

## SUMMARY

### A STUDY ON THE DETERMINATION OF CLOBETASOL PROPIONATE IN SHAMPOO BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Objectives:** To validate the determination method of clobetasol propionate in shampoo by high performance liquid chromatography. **Method:** The evaluation of the system suitability, specificity, the linear range and calibration curve, repeatability, intermediate precision, accuracy, limit of detection and limit of quantitation. **Results:** The high performance liquid chromatography method has been evaluated and achieved the specific regulations. **Conclusion:** The high performance liquid chromatography method has been developed. This method can be used to determine the clobetasol propionate in shampoo, which will use in the evaluation of shampoos containing clobetasol propionate.

**Keywords:** Clobetasol propionate, shampoo, high performance liquid chromatography.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Clobetasol propionat (CLP) là một loại

<sup>1</sup>Học viện Quân Y

Chịu trách nhiệm chính: Trần Quang Trung

Email: tqt201316@gmail.com

Ngày nhận bài: 30.9.2022

Ngày phản biện khoa học: 18.11.2022

Ngày duyệt bài: 30.11.2022

corticosteroid thuộc nhóm 1 (có tác dụng mạnh nhất) và được bào chế dưới nhiều dạng khác nhau để điều trị tại chỗ trong nhiều bệnh về da liễu [1], [5]. Tuy nhiên, CLP thường bị lạm dụng để điều trị bất kỳ vấn đề nào trên da và để lại những hậu quả nghiêm trọng [8]. Để góp phần vào việc quản lý sử dụng corticosteroid, chúng tôi tiến hành nghiên cứu định lượng CLP trong dầu gội đầu bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Đối tượng nghiên cứu**

**2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất, mẫu nghiên cứu**

- CLP chuẩn: hàm lượng 99,2% (Viện kiểm nghiệm thuốc Trung Ương cấp).
- Acetonitril, methanol đạt tiêu chuẩn HPLC.
- Acetonitril, methanol, aceton đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.
- Mẫu nghiên cứu:
  - + Mẫu thử: dầu gội Jussunny (Công ty CPDP Gia Nguyễn) chứa CLP hàm lượng 0,25mg/g.
  - + Mẫu nền: dầu gội Olexrs + HairSalon (Olexrs, UK) không chứa CLP.

**2.1.2. Thiết bị.** Hệ thống HPLC Alliance Waters 2695D, Detector 2487 dual  $\alpha$  Absorbance, cột SunFireTM (RP-C18, 5  $\mu$ m, 100A°, 250 x 4,6 mm) (Mỹ); Máy quang phổ EMC-61 PC-UV Spectrophotometer (Emclab, Đức); Bể siêu âm Elmasonic S 100 H (Đức); Cân phân tích Mettler Toledo có độ chính xác 0,01 mg (Thụy Sĩ) và các dụng cụ thí nghiệm khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

**2.1.3. Mẫu nghiên cứu**

- CLP trong nền mẫu mỹ phẩm là các dầu gội đầu.
- Một số mẫu dầu gội đầu đang lưu hành trên thị trường.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**3.1. Tính tương thích hệ thống.** Tiến hành khảo sát mẫu CLP chuẩn nồng độ 20  $\mu$ g/ml với 6 lần tiêm mẫu theo điều kiện sắc ký đã chọn. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống**

Lần	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ( $\mu$ V.s)	Chiều cao	Số đĩa lý thuyết (N)	Hệ số bất đối xứng (AF)
1	10,502	541622	32928	10249	1,103
2	10,497	547992	32787	10523	1,106
3	10,458	549968	33021	10146	1,115
4	10,503	543415	32951	10328	1,118
5	10,548	546709	32772	10282	1,104
6	10,492	547972	32190	10184	1,125
<b>Trung bình</b>	10,500	546280	32775	10285	1,112
<b>SD</b>	0,03	3145,93	302,42	133,66	0,01
<b>RSD(%)</b>	0,27	0,58	0,92	1,30	0,80

**Nhận xét:** Kết quả khảo sát cho thấy độ lệch chuẩn tương đối RSD (%) của các thông số

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**2.2.1. Xử lý mẫu**

- Dung dịch chuẩn: Pha dung dịch chuẩn gốc CLP trong methanol có nồng độ khoảng 100  $\mu$ g/ml. Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng với methanol để được dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng 20  $\mu$ g/ml. Dung dịch chuẩn được lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m trước khi tiêm mẫu vào hệ thống sắc ký.

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 2g dầu gội đầu chứa CLP vào bình định mức 25 ml, thêm 20 ml methanol, lắc siêu âm 30 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ đến vạch, lắc đều. Để lạnh trong nước đá 20 phút, ly tâm 7000 vòng/phút trong 10 phút. Để ở nhiệt độ phòng, lấy phần dịch trong lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ m.

**2.2.2. Điều kiện sắc ký.** Quá trình phân tích được tiến hành trên hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Alliance Water 2695D với các điều kiện sắc ký sau:

- Cột SunFireTM C18, 5  $\mu$ m (4,6 x 250mm).
- Detector: PDA 237 nm.
- Pha động: ACN - H<sub>2</sub>O với tỷ lệ 60:40 (thể tích/thể tích).
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 10  $\mu$ l.

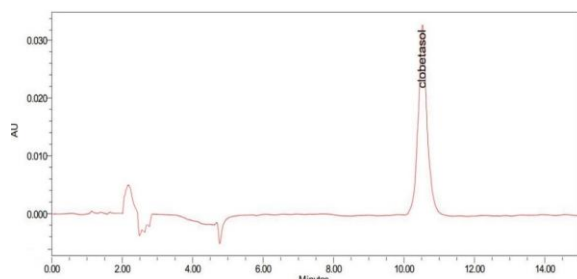
**2.2.3. Thẩm định phương pháp định lượng clobetasol propionat trong dầu gội đầu.**

Phương pháp được đánh giá theo hướng dẫn của ICH và thông tư 32/2018/TT-BYT của Bộ Y tế [7], [2] dựa trên khảo sát các chỉ tiêu trong thẩm định quy trình phân tích như sau: Tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính và đường chuẩn, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ).

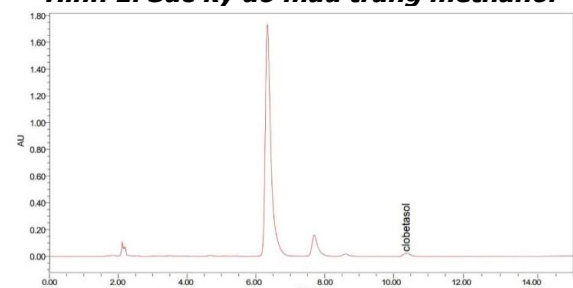
đều <2%, các giá trị của hệ số bất đối xứng nằm trong khoảng cho phép (0,8-1,5). Như vậy, hệ

thống sắc ký lỏng hiệu năng cao phù hợp để định lượng CLP.

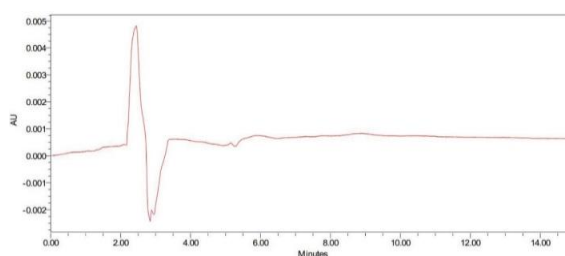
**3.2. Độ đặc hiệu.** Chuẩn bị các mẫu trắng (methanol), mẫu chuẩn (CLP nồng độ 20 µg/ml), mẫu thử chứa CLP và nền mẫu không chứa CLP. Tiến hành sắc ký như mục 2.2.2. Kết quả được trình bày ở hình 1, hình 2, hình 3, hình 4.



**Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng methanol**



**Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn CLP nồng độ 20 µg/ml**



**Hình 3. Sắc ký đồ mẫu thử chứa CLP**



**Hình 4. Sắc ký đồ nền mẫu không chứa CLP**

**Nhận xét:** Tại vị trí xuất hiện đáp ứng pic của CLP trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, xuất hiện pic tương ứng trên sắc ký đồ mẫu thử và đồng thời không xuất hiện trên sắc ký đồ trên dung môi pha mẫu, nền mẫu. Trên sắc ký đồ mẫu thử, pic tách hoàn toàn các tạp. Như vậy, phương pháp phân tích đã xây dựng đặc hiệu cho phân tích CLP.

**3.3. Khoảng tuyến tính và đường chuẩn**

Pha một dãy 6 dung dịch CLP chuẩn trong methanol có nồng độ khoảng từ 10 µg/ml đến 40 µg/ml. Tiến hành sắc ký như mục 2.2.2. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của clobetasol propionat**

Mẫu	1	2	3	4	5	6
Nồng độ (µg/ml)	10,12	15,18	20,24	25,30	30,26	40,47
Diện tích pic (µV.s)	319983	439592	546527	651799	757481	981252

Phương trình hồi quy:  $y = 21607x + 106322$ ; Hệ số tương quan:  $R^2 = 0,9997$

**Nhận xét:** Kết quả khảo sát cho thấy trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ CLP và diện tích pic thu được với hệ số tương quan r bằng 0,9998. Khoảng tuyến tính này phù hợp để định lượng CLP trong dầu gội đầu.

**3.4. Độ chính xác**

**3.4.1. Độ lặp lại.** Chuẩn bị 6 mẫu thử theo quy trình ở mục 2.2.1. Tiến hành phân tích các mẫu theo các điều kiện sắc ký như mục 2.2.2. Tính lượng CLP tìm thấy trong mẫu thử dựa vào đường chuẩn. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp**

STT	Lượng mẫu thử (g)	Lượng CLP theo nhãn (µg)	Diện tích pic (µV.s)	% so với nhãn
1	2,1021	525,53	557711	99,38
2	2,0684	517,10	549944	99,26
3	2,0402	510,05	542698	98,99
4	1,9821	495,53	527898	98,44
5	1,9328	483,20	521942	99,52
6	2,1247	531,18	561100	99,06
Trung bình				99,11
RSD (%)				0,39

**Nhận xét:** Kết quả khảo sát thử độ lặp lại của phương pháp cho thấy với các điều kiện sắc ký đã chọn, độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả định lượng là 0,39%, nhỏ hơn 2%. Như vậy, phương pháp định lượng CLP trong dầu gội đầu đảm bảo được độ lặp lại.

**3.4.2. Độ chính xác trung gian.** Chuẩn bị 6 mẫu thử theo quy trình ở mục 2.2.1 trong ngày 2. Tiến hành phân tích các mẫu theo các điều kiện sắc ký như mục 2.2.2. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của phương pháp**

STT	Lượng mẫu thử (g)	Lượng CLP theo nhãn (µg)	Diện tích pic (µV.s)	% so với nhãn
1	1,9739	493,48	530763	99,52
2	2,1047	526,18	561024	99,99
3	2,1250	531,25	558783	98,54
4	2,0016	500,40	536854	99,55
5	2,0560	514,00	549883	99,85
6	2,0755	518,88	548733	98,65
Trung bình (n=6)				99,35
RSD (% , n=6)				0,61
Trung bình (n=12)				99,23
RSD (% , n=12)				0,51

**Nhận xét:** Với các điều kiện sắc ký đã lựa chọn, độ lặp lại kết quả định lượng trong mỗi ngày cho RSD (%) đạt 0,39%, 0,61% và trong cả hai ngày là 0,51% nhỏ hơn 2%. Như vậy, phương pháp đã lựa chọn đảm bảo được độ chính xác trung gian.

**3.5. Độ đúng**

Xác định tỷ lệ thu hồi (%) bằng cách tính toán lượng chất chuẩn của chất cần phân tích thêm vào nền mẫu. Lượng chất chuẩn thêm vào tương ứng với 3 mức nồng độ 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng. Tại mỗi mức nồng độ, tiến hành 3 mẫu độc lập trong cùng điều kiện khảo sát. Kết quả được thể hiện trong Bảng 5.

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

Mức nồng độ	Lượng thêm vào (µg)	Diện tích pic (µV.s)	Lượng tìm thấy (µg)	Tỷ lệ thu hồi (%)	Trung bình (%)	RSD (%)
80%	16,1888	454890	16,1322	99,65	99,07	0,77
		453808	16,0821	99,34		
		449843	15,8986	98,21		
100%	20,2360	539878	20,0655	99,16	99,50	0,30
		542087	20,1678	99,66		
		542134	20,1699	99,67		
120%	24,2832	630746	24,2710	99,95	100,35	0,41
		635022	24,4689	100,76		
		632839	24,3679	100,35		

**Nhận xét:** Tại mỗi mức nồng độ, tỷ lệ thu hồi từ 98,21-100,76%, đều nằm trong khoảng 98-102% so với lượng chất chuẩn thêm vào với RSD<2%. Điều đó chứng tỏ phương pháp sử dụng có độ đúng cao.

**3.6. Khoảng xác định.** Kết quả độ đúng cho thấy tại nồng độ clobetasol propionat bằng 80% đến 120% so với nồng độ định lượng có độ đúng và độ lặp lại tốt. Như vậy, khoảng xác định của phương pháp là trong giới hạn 16µg/ml - 24µg/ml.

**3.7. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).** Bằng phương pháp dựa vào tỷ số giữa tín hiệu và nhiễu đã xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp LOD là

0,34µg/ml và giới hạn định lượng LOQ là 1,32µg/ml.

**IV. BÀN LUẬN**

CLP là một trong những loại corticosteroid tại chỗ được kê đơn phổ biến trong điều trị các bệnh về da liễu do có tác dụng làm giảm nhanh các dấu hiệu và triệu chứng khó chịu trên da của bệnh như ngứa, chàm chích, đau nhức, mẩn đỏ, đóng vảy, tăng sắc tố. CLP thường được sử dụng trong nhiều dạng thuốc dùng tại chỗ, cũng như các sản phẩm dược mỹ phẩm. Tuy nhiên, ở Việt Nam đến nay vẫn chưa có văn bản pháp lý quản lý riêng cho dòng sản phẩm này.

Theo bản cập nhật của Ủy ban Khoa học Mỹ

phẩm ASEAN vào năm 2021, corticosteroid được liệt kê vào danh mục các chất bị cấm sử dụng trong mỹ phẩm (với số tham chiếu là 300 trong phụ lục II, phần 1) [4]. Do vậy, các sản phẩm được mỹ phẩm có chứa thành phần clobetasol propionat (như dầu gội đầu) đều phải đăng ký và quản lý dưới dạng thuốc mới được phép lưu hành. Mức giới hạn hàm lượng sử dụng an toàn cho phép của clobetasol propionat trong các sản phẩm dược mỹ phẩm là 0,05% [6]. Mặt khác ở trong nước chưa có phương pháp cụ thể để phân tích clobetasol propionat trong dầu gội đầu, trong khi trên thực tế việc xác định hàm lượng của clobetasol propionat trong các sản phẩm dược mỹ phẩm là rất cần thiết.

Mỹ phẩm là loại sản phẩm đặc biệt, rất phong phú, đa dạng, có thành phần phức tạp và khó biết trước. Do đó, việc xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng hoạt chất trên nền mỹ phẩm là thực sự cần thiết. Do CLP được sử dụng ở mức hàm lượng chỉ định rất nhỏ (0,05%) và với nhiều nền mẫu tương ứng với các hãng mỹ phẩm khác nhau, nên để thẩm định phương pháp nghiên cứu đã tiến hành trên mẫu tự tạo với nền mẫu là dầu gội Olexrs + HairSalon (Olexrs, UK) không chứa CLP được thêm chuẩn CLP ở hàm lượng nhỏ cỡ microgram. Do lượng chất chuẩn thêm vào là rất nhỏ nên cần phải sử dụng phương pháp thêm các thể tích đã được tính toán của dung dịch chuẩn CLP. Mặc dù việc thẩm định được tiến hành ở nồng độ rất thấp nhưng kết quả thu được đã cho thấy phương pháp đã đáp ứng được yêu cầu theo hướng dẫn của ICH và thông tư 32/2018/TT-BYT của Bộ Y tế về:

- Độ tương thích hệ thống: cho độ lặp lại tốt với giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 1%, số đĩa lý thuyết lớn hơn 10000, hệ số bất đối xứng pic nằm trong khoảng 0,8-1,5 [3].

- Độ đặc hiệu: Trên sắc ký đồ mẫu trắng và nền mẫu không xuất hiện pic ở thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của CLP trên sắc ký đồ mẫu thử. Tại vị trí xuất hiện đáp ứng pic của CLP trên sắc ký đồ mẫu chuẩn, xuất hiện pic tương ứng trên sắc ký đồ mẫu thử.

- Độ tuyến tính: Hệ số tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của CLP là  $r \geq 0,997$ .

- Độ lặp lại: Giá trị RSD của tất cả các mẫu đều không quá 2%.

- Độ chính xác trung gian: độ lặp lại kết quả định lượng trong mỗi ngày cho giá trị RSD đạt 0,39%, 0,61% và trong cả hai ngày là 0,51% nhỏ hơn 2%.

- Độ đúng: Tỷ lệ thu hồi của tất cả các mẫu từ 98,21-100,76%, đều nằm trong khoảng 98-102%.

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: Do nền mẫu phức tạp nên để xác định LOD, LOQ, nghiên cứu đã sử dụng phương pháp pha loãng. Kết quả cho thấy các giá trị LOD, LOQ là phù hợp để phân tích các mẫu dầu gội đầu có chứa CLP.

## V. KẾT LUẬN

- Đã xây dựng được phương pháp định lượng clobetasol propionat trong dầu gội đầu bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ở những điều kiện sau: hệ thống HPLC Alliance Waters 2695D; cột SunFire™ C18 5 $\mu$ m (4,6 x 250mm), 100A<sup>0</sup>; detector: PDA 237 nm; pha động: ACN - H<sub>2</sub>O với tỷ lệ 60:40 (thể tích/thể tích); thể tích tiêm mẫu 10 $\mu$ l; tốc độ dòng 1 ml/phút; nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng.

- Phương pháp đã được thẩm định trên các chỉ tiêu và đáp ứng yêu cầu của một phương pháp phân tích theo quy định của ICH và thông tư 32/2018/TT-BYT của Bộ Y tế. Phương pháp này có thể áp dụng để định lượng clobetasol propionat trong dầu gội đầu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bộ Y tế** (2018). Dược thư quốc gia Việt Nam, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội: 411-412
2. **Bộ Y tế** (2018). Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc. Thông tư 32/2018/TT-BYT, ngày 12/11/2018.
3. **Nguyễn Minh Đức** (2006). Sắc ký lỏng hiệu năng cao và một số ứng dụng vào nghiên cứu, kiểm nghiệm dược phẩm, dược liệu và hợp chất tự nhiên, Nhà xuất bản Y học, Chi nhánh Thành phố Hồ Chí Minh: 127-138.
4. **ASEAN Cosmetic Committee** (2021), Annexes of the ASEAN cosmetic directive, Version No.: 2021-02 15<sup>th</sup> November 2021 ASEAN Cosmetic Documents.
5. **Barange H., Asghar S., Gour P.** (2017). Development of analytical method and validation for simultaneous estimation of clobetasol propionate and ketoconazole in pharmaceutical cream formulation by RP-HPLC method. IAJPS, 4(10): 3779-3786.
6. **Emerson A.N., Brodell R.T.** (2020). Comprehensive dermatologic drug therapy: Therapeutic shampoos, Elsevier, Philadelphia: 576-584.
7. **ICH Harmonised Tripartite Guideline** (2005). Guidelines for validation of analytical procedures: Q2 (R1). Text and Methodology.
8. **Saraswat A.** (2014). Ethical use of topical corticosteroids. Indian Journal of Dermatology, 59(5): 469-472.