

# Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng eugenol trong niosome bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Nguyễn Trần Hưng Yên\* và Võ Sỹ Nhật  
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

## TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Dạng phức hợp niosome chứa tinh dầu hương nhu trắng (N - HNT) là một dạng bào chế mới và cần có phương pháp định lượng để đánh giá hàm lượng eugenol với độ chính xác cao. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng điều kiện xử lý mẫu để định lượng eugenol toàn phần trong N - HNT; Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng eugenol toàn phần trong N - HNT bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò UV. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Trong nghiên cứu đối tượng là N - HNT được điều chế bằng phương pháp tiêm ethanol; quy trình định lượng được khảo sát về hệ pha động, tốc độ dòng, thời gian phân tích mẫu và thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH. **Kết quả nghiên cứu:** điều kiện tối ưu để định lượng là cột sắc ký C18 (250 x 4.6 mm; 5µm), pha động methanol - nước - acetonitril (60 : 35 : 5), bước sóng phát hiện 280 nm, tốc độ dòng 0.7 mL/phút, nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 10 µL, thời gian phân tích mẫu 20 phút. **Kết luận và kiến nghị:** Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng eugenol toàn phần bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò UV theo hướng dẫn của ICH.

**Từ khóa:** eugenol, HPLC, đầu dò UV, tinh dầu hương nhu trắng, niosome

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Eugenol là thành phần chính và chiếm tỷ lệ cao nhất trong tinh dầu hương nhu trắng. Mặt khác, tinh dầu hương nhu trắng đã được sản xuất quy mô công nghiệp tại nước ta và tính ứng dụng cao ở khả năng kháng khuẩn, giảm đau, kháng nấm [1, 2]. Thành phần của tinh dầu hương nhu trắng gồm có các chất như eugenol; 1,8-cineole; carophylen; linalool; ...[3, 4]. Theo Dược điển Việt Nam V (ĐDVN V), tinh dầu hương nhu trắng phải chứa ít nhất 60% eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) với phương pháp định lượng bằng bình cassia 100 ml [5]. Vì vậy tiến hành chọn eugenol là chất đánh dấu để định lượng tinh dầu hương nhu trắng. Để xác định hàm lượng eugenol trong tinh dầu hay dịch chiết có thể sử dụng các phương pháp như sắc ký lỏng, sắc ký khí, sử dụng bình cassia, ...

Niosome là một dạng tiểu phân nano giúp phân phối thuốc đến đích tác động, tăng hiệu quả điều trị và giảm các tác dụng không mong muốn [6]. Với cấu trúc 2 lớp khép kín, tiểu phân niosome có thể mang được đa dạng loại hoạt chất: lớp vỏ kỵ nước

chứa hoạt chất thân dầu, phần lõi thân nước chứa hoạt chất thân nước [7]. Dạng phức hợp N - HNT là một dạng bào chế mới, trong phức hợp này tinh dầu hương nhu trắng và eugenol được giữ trong lớp vỏ thân dầu.

Hiện nay chưa có phương pháp để định lượng eugenol trong phức hợp niosome chứa tinh dầu hương nhu trắng nên nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài: "Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng eugenol bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao" với mục tiêu cụ thể sau:

- Xây dựng điều kiện xử lý mẫu để định lượng eugenol toàn phần trong phức hợp niosome chứa tinh dầu hương nhu trắng (N - HNT).
- Xây dựng quy trình định lượng eugenol toàn phần bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phù hợp với dạng phức hợp, điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm và thẩm định quy trình theo hướng dẫn của The international conference on harmonisation (ICH).

Tác giả liên hệ: Nguyễn Trần Hưng Yên

Email: [yennth2@hiu.vn](mailto:yennth2@hiu.vn)

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

**Hóa chất, thuốc thử:** Chất chuẩn eugenol (nhà sản xuất Sigma - aldrich, hàm lượng chuẩn 99.797 %; hạn dùng 12/2024). N - HNT và N - T được điều chế bằng phương pháp tiêm ethanol. Dung môi acetonitril (ACN), methanol (MeOH), nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn HPLC.

**Trang thiết bị:** bộ lọc chân không, máy siêu âm Elma (Elmasonic S 180 H), cân phân tích 4 số lẻ Shimadzu (ATX224), máy sắc ký lỏng Shimadzu (LC-2030, đầu dò UV), cột Shim-pack GIST C18 (250 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m).

**Dung dịch chuẩn/Mẫu chuẩn:** thực hiện pha chuẩn eugenol nồng độ 99.80  $\mu$ g/ml bằng dung môi MeOH và lọc qua màng lọc 0.45  $\mu$ m (chuẩn sử dụng trong ngày).

**Mẫu thử:** mẫu thử N - T và mẫu thử N - HNT được phân tán trong MeOH, đánh siêu âm để phá vỡ hoàn toàn cấu trúc của niosome. Mẫu sau đó được pha loãng bằng pha động (nếu cần) và lọc qua

màng lọc 0.45  $\mu$ m.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Xây dựng điều kiện xử lý mẫu để định lượng eugenol toàn phần trong N - HNT

Sử dụng methanol (MeOH) để phá hủy cấu trúc của niosome, eugenol trong lớp vỏ sẽ được thoát ra ngoài môi trường. Tiến hành cân chính xác khoảng N - HNT vào bình định mức, thêm 20 ml MeOH, đánh siêu âm trong các khoảng thời gian là: 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 phút. Sau đó bổ sung pha động tới vạch, lắc đều (pha loãng mẫu nếu cần) và lọc qua màng lọc 0.45  $\mu$ m. Eugenol sau khi giải phóng ra môi trường được định lượng bằng phương pháp HPLC. Lựa chọn thời gian đánh siêu âm thấp nhất mà eugenol đã được giải phóng hoàn toàn.

#### 2.2.2. Xây dựng quy trình định lượng

Thông số cố định gồm: cột sắc ký C18 (250 x 4.6 mm; 5  $\mu$ m), đầu dò UV bước sóng phát hiện 280 nm; thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ L; nhiệt độ cột 30°C.

Thông số khảo sát bao gồm hệ pha động, tỷ lệ pha động và tốc độ dòng được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Các điều kiện sắc ký khảo sát để xây dựng quy trình định lượng

Điều kiện sắc ký	Hệ pha động	Tỷ lệ pha động	Tốc độ dòng (mL/phút)
1	MeOH - H <sub>2</sub> O	60 : 40	1.0
2	MeOH - H <sub>2</sub> O	60 : 40	0.7
3	MeOH - H <sub>2</sub> O - ACN	60 : 35 : 5	1.0
4	MeOH - H <sub>2</sub> O - ACN	60 : 35 : 5	0.7

Lựa chọn điều kiện để có: peak đối xứng, hệ số kéo đuôi tiến tới 1, thời gian lưu/phân tích ngắn và số đĩa lý thuyết lớn.

#### 2.2.3. Thẩm định quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH Q2/R2 (2023)

Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm: tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ chính xác - độ chính xác trung gian, độ đúng[8].

##### Khảo sát tính đặc hiệu:

Tiến hành sắc ký mẫu trắng, mẫu placebo, mẫu chuẩn, mẫu thử. Trong đó:

Mẫu trắng: Dung môi chuẩn bị mẫu hay pha động.

Mẫu placebo: niosome không chứa tinh dầu hương nhu trắng (N - T).

Mẫu chuẩn: Dung dịch chuẩn có nồng độ eugenol 99.80  $\mu$ g/ml trong methanol.

Mẫu thử: Mẫu thử N - HNT.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện peak có thời gian lưu tương ứng với peak trên sắc ký đồ mẫu chuẩn. Sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu placebo không xuất hiện peak trong khoảng thời gian lưu tương ứng với peak eugenol trên sắc ký đồ mẫu chuẩn.

##### Khảo sát tính tương thích hệ thống:

Tiến hành sắc ký 6 lần liên tiếp dung dịch chuẩn.

Yêu cầu: Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống khi giá trị RSD của thời gian lưu, diện tích peak và số đĩa lý thuyết không được lớn hơn 2.0 %. Hệ số kéo đuôi của peak eugenol phải trong

khoảng 0.8 - 1.5.

*Khảo sát tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:*

Tương quan giữa nồng độ và diện tích peak eugenol được xây dựng ở 5 nồng độ chuẩn nằm trong khoảng 16.63 - 199.59 µg/mL. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn trên mỗi mẫu 1 lần. Ghi lại sắc ký đồ và diện tích peak. Xác định sự tương quan giữa nồng độ và diện tích peak của các dung dịch. Thiết lập phương trình hồi quy giữa nồng độ và diện tích peak, tính hệ số tương quan bằng phần mềm Excel. Sử dụng trắc nghiệm F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy và trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số tương quan trong phương trình hồi quy.

Yêu cầu: Hệ số tương quan  $R^2 \geq 0.999$ .

Giới hạn phát hiện (Limit of detection - LOD) và giới hạn định lượng (Limit of Quantitation - LOQ) được tính toán dựa vào độ lệch chuẩn của đáp ứng và độ dốc.

Công thức để tính LOD và LOQ là:

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{a}; LOQ = \frac{10 \times SD}{a}$$

Trong đó:

SD: độ lệch chuẩn của độ đáp ứng

a: độ dốc của đường tuyến tính

*Khảo sát độ chính xác:*

Độ lặp lại: Chuẩn bị 6 mẫu thử và 1 mẫu chuẩn, tiến hành xử lý mẫu và phân tích mẫu trong cùng điều

kiện. Tiến hành sắc ký mỗi mẫu thử 1 lần, mẫu chuẩn 6 lần sau đó tính hàm lượng eugenol trong mẫu thử.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành như độ lặp lại trong một ngày khác.

Yêu cầu: Giá trị RSD của hàm lượng eugenol có trong mẫu thử trong cùng một ngày không quá 2.0%. Độ sai khác kết quả định lượng giữa hai ngày không quá 2.0%.

*Khảo sát độ đúng:*

Độ đúng được tiến hành bằng cách thêm từng lượng chất chuẩn tương ứng vào mẫu trắng, ở 3 mức độ tương đương 80%, 100% và 120% hàm lượng hoạt chất trong N - HNT. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu và tiến hành sắc ký mỗi mẫu 1 lần. Tính tỷ lệ phục hồi dựa trên lượng chất chuẩn thêm vào và lượng tìm được. Tỷ lệ phục hồi được tính theo công thức:

$$T\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

Trong đó:

T: Tỷ lệ phục hồi eugenol (%)

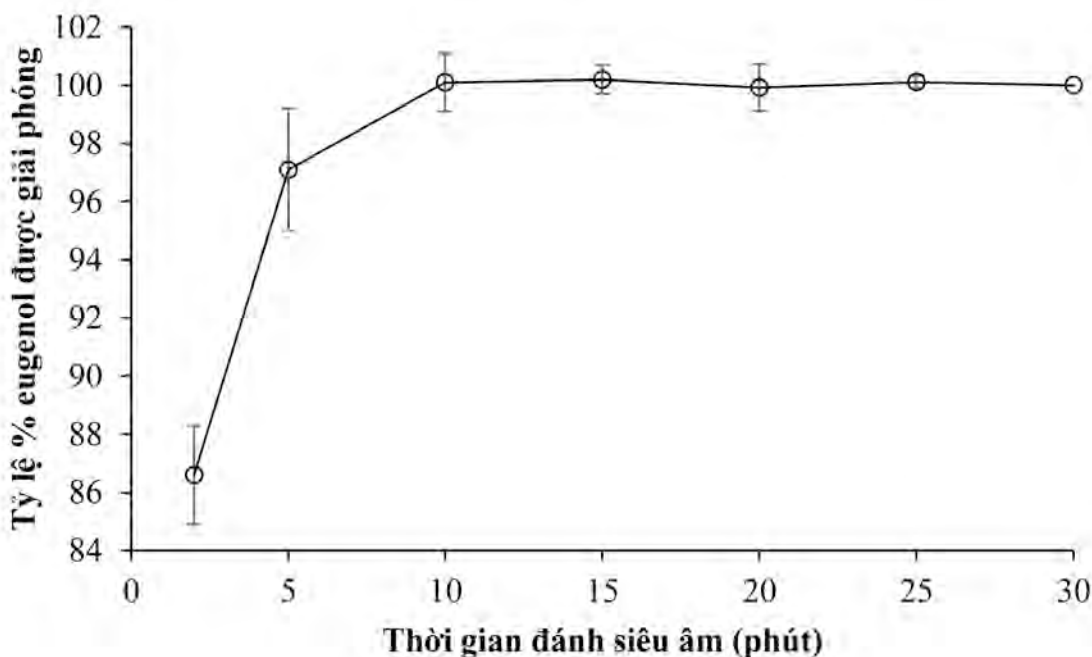
$m_1$ : Khối lượng eugenol được tìm thấy (mg)

$m_2$ : Khối lượng eugenol được thêm vào (mg)

Yêu cầu: Quy trình định lượng đạt độ đúng khi tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 98.0 - 102.0%, RSD của tỷ lệ phục hồi không quá 2.0%.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả điều kiện xử lý mẫu



Hình 1. Tỷ lệ eugenol giải phóng theo thời gian đánh siêu âm

Eugenol được giữ trong lớp vỏ của phức hợp N - HNT nên để có thể định lượng đúng hàm lượng eugenol cần có bước giải phóng hoàn toàn eugenol từ N - HNT ra môi trường phân tán. Nhóm tác giả lựa chọn phương pháp sử dụng methanol và sóng siêu âm để phá vỡ lớp vỏ do thiết bị đơn giản, giảm thời gian chờ và không cần sử dụng thêm chất hoạt động bề mặt khác. Dựa vào tỷ lệ eugenol giải

phóng theo thời gian đánh siêu âm để xử lý mẫu N - HNT được trình bày trong Hình 1, cho thấy khi tăng thời gian đánh siêu âm từ 2 đến 10 phút thì tỷ lệ giải phóng eugenol tỷ lệ thuận với thời gian; kể từ thời gian 10 phút trở về sau tỷ lệ không tăng do toàn bộ lượng eugenol trong lớp vỏ đã được giải phóng hoàn toàn. Kết luận, lựa chọn thời gian đánh siêu âm để xử lý mẫu N - HNT là 10 phút.

### 3.2. Kết quả xây dựng quy trình định lượng

**Bảng 2.** Thời gian lưu, thời gian phân tích, hệ số kéo đuôi và số đĩa lý thuyết của các điều kiện sắc ký khảo sát

Điều kiện sắc ký	Hệ pha động	Tỷ lệ pha động	Tốc độ dòng (mL/phút)	Thời gian lưu $R_t$ (phút)	Thời gian phân tích mẫu (phút)	Hệ số kéo đuôi $T_f$	Số đĩa lý thuyết N
1	MeOH - H <sub>2</sub> O	60 : 40	1.0	12.185	20	1.180	15787
2	MeOH - H <sub>2</sub> O	60 : 40	0.7	17.320	25	1.183	16722
3	MeOH - H <sub>2</sub> O - ACN	60 : 35 : 5	1.0	8.605	15	1.165	5423
<b>4</b>	<b>MeOH - H<sub>2</sub>O - ACN</b>	<b>60 : 35 : 5</b>	<b>0.7</b>	<b>11.958</b>	<b>20</b>	<b>1.042</b>	<b>14475</b>

Kết quả khảo sát các điều kiện sắc ký được trình bày trong Bảng 2, cho thấy điều kiện sắc ký thứ 4 với hệ pha động là MeOH - H<sub>2</sub>O - ACN (60 : 35 : 5) cho kết quả peak đối xứng nhất, hệ số kéo đuôi 1.042 tiến tới gần 1 nhất trong 4 điều kiện khảo sát, thời gian lưu ngắn hơn điều kiện sắc ký 1 và 2 là khoảng 11.958 phút, thời gian phân tích 20 phút và số đĩa lý thuyết là 14475.

Do đó điều kiện sắc ký được lựa chọn: cột sắc ký C18 (250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m), pha động MeOH - H<sub>2</sub>O - ACN (60 : 35 : 5), bước sóng phát hiện 280 nm, tốc độ dòng 0.7 mL/phút, nhiệt độ cột 30°C, thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ L, thời gian phân tích mẫu 20 phút.

Thông thường để phát hiện và định lượng các chất dễ bay hơi hay tinh dầu thì phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) được áp dụng nhiều nhưng không vì thế mà giới hạn chỉ định lượng bằng phương pháp này. Về nguyên tắc, phương pháp GC - MS sử dụng để định lượng một chất trong hỗn hợp nhiều chất có nhược điểm là tiến hành phức tạp, kết quả có độ phân giải không cao và trong Dược điển Việt Nam V vẫn chưa có hướng dẫn định lượng eugenol trong tinh dầu hương nhu trắng bằng phương pháp này. Ngoài ra, phương pháp GC - MS tiến hành phân tích mẫu ở nhiệt độ cao và điều này có thể ảnh hưởng đến sự ổn định của các thành phần không bền với

nhiệt trong tinh dầu. Nhóm tác giả lựa chọn sử dụng phương pháp HPLC vì tính phổ biến, dễ tiến hành và đã có các bài nghiên cứu định lượng eugenol bằng phương pháp HPLC cho độ nhạy cao, khả năng linh hoạt khi điều chỉnh các yếu tố như tốc độ dòng, hệ dung môi mà không cần thay đổi nhiệt độ.

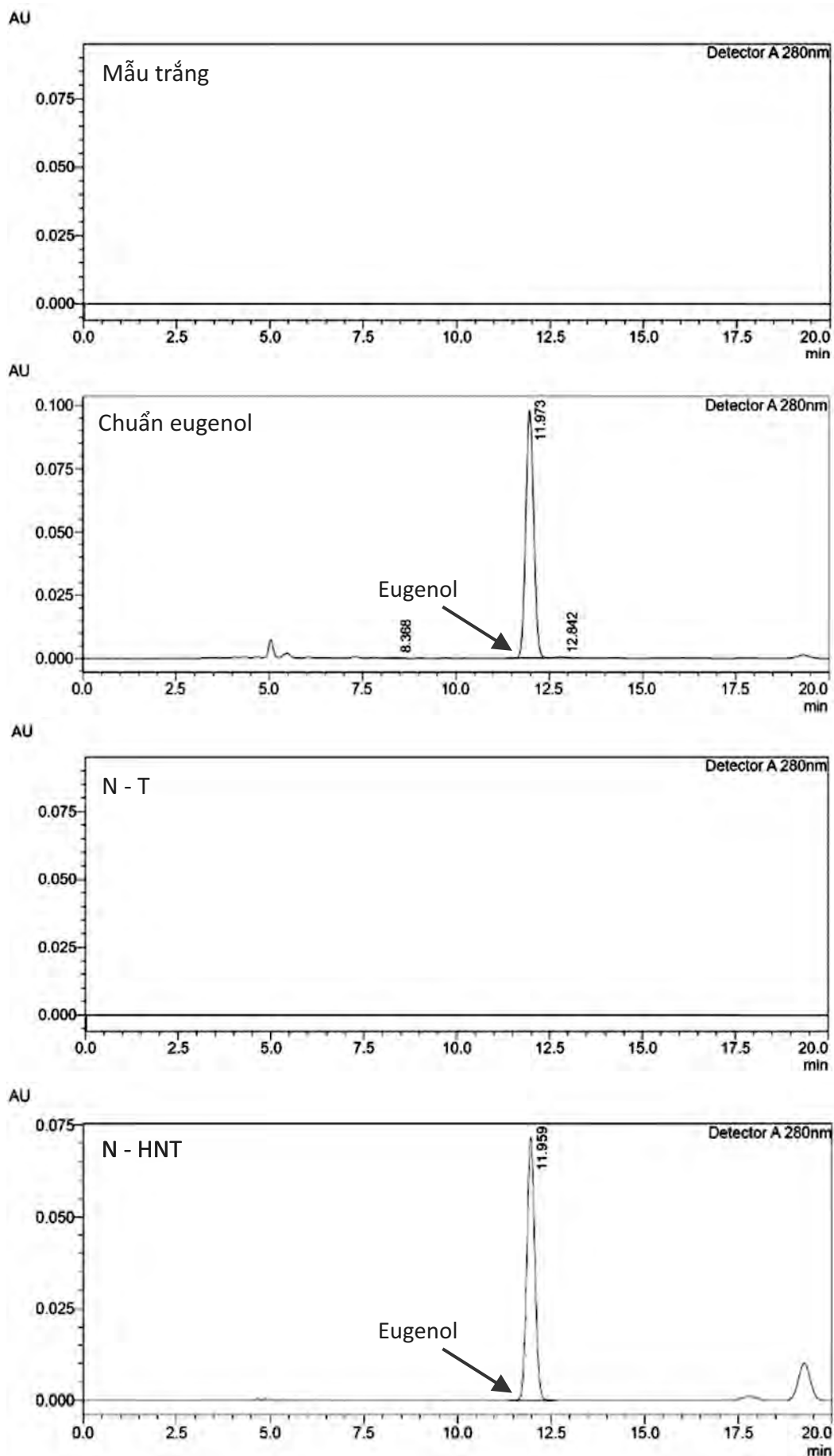
### 3.3. Thẩm định quy trình định lượng

#### 3.3.1. Tính đặc hiệu

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy trong cùng điều kiện phân tích, sắc ký đồ mẫu trắng (pha động), mẫu placebo (N - T) không xuất hiện peak trong khoảng thời gian lưu tương ứng với peak eugenol trong sắc ký đồ chuẩn, eugenol là peak có thời gian lưu ở 11.973 phút. Sắc ký đồ mẫu thử (N - HNT) và mẫu chuẩn xuất hiện peak có thời gian lưu tương ứng nhau lần lượt là 11.959 và 11.973 phút. Như vậy, quy trình định lượng eugenol trong niosome bằng phương pháp HPLC đạt tính đặc hiệu. Sắc ký đồ các mẫu được trình bày trong Hình 2.

#### 3.2. Tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống đối với quy trình định lượng eugenol trong N - HNT được trình bày trong Bảng 3.



Hình 2. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu của quy trình định lượng eugenol

**Bảng 3.** Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của quy trình định lượng eugenol trong N - HNT

STT	Thời gian lưu R <sub>t</sub> (phút)	Diện tích peak (μAu.s)	Hệ số kéo đuôi T <sub>f</sub>	Số đĩa lý thuyết N
1	11.978	1469518	1.050	14129
2	11.980	1469513	1.049	14067
3	11.980	1471408	1.048	13952
4	11.973	1473341	1.047	13880
5	11.968	1474480	1.048	13879
6	11.958	1475195	1.048	13831
<b>TB</b>	<b>11.973</b>	<b>1472243</b>	<b>1.048</b>	<b>13956</b>
<b>RSD%</b>	<b>0.07</b>	<b>0.17</b>	<b>0.10</b>	<b>0.85</b>

Kết quả cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu, diện tích peak và số đĩa lý thuyết của eugenol nhỏ hơn 2.0 %; hệ số kéo đuôi của peak eugenol nằm trong khoảng 0.8 - 1.5. Như vậy, quy trình định lượng eugenol trong N - HNT bằng phương pháp HPLC đạt tính tương thích hệ thống.

**3.3.3. Khoảng tuyến tính của đường chuẩn, LOD và LOQ**

Kết quả khảo sát tính tuyến tính của quy trình định lượng eugenol trong N - HNT được trình bày trong Bảng 4 và Hình 3.

**Bảng 4.** Kết quả khảo sát mối tương quan nồng độ với diện tích peak của eugenol

STT	Nồng độ (μg/mL)	Diện tích peak (mAu.s)
1	16.63	270477
2	24.95	384215
3	49.90	738431
4	99.80	1430861
5	199.59	2752310

Kết quả xử lý thống kê:

Đánh giá ý nghĩa của phương trình hồi quy (α = 0.05) dùng trắc nghiệm F: Giá trị Significance - F = 1.1755 x 10<sup>-6</sup> < 0.05 vậy phương trình hồi quy có ý nghĩa.

Đánh giá ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi quy (α = 0.05) dùng trắc nghiệm t:

p(b) = 0.0174 < 0.05: hệ số b có ý nghĩa.

p(a) = 0.0000 < 0.05: hệ số a có ý nghĩa.

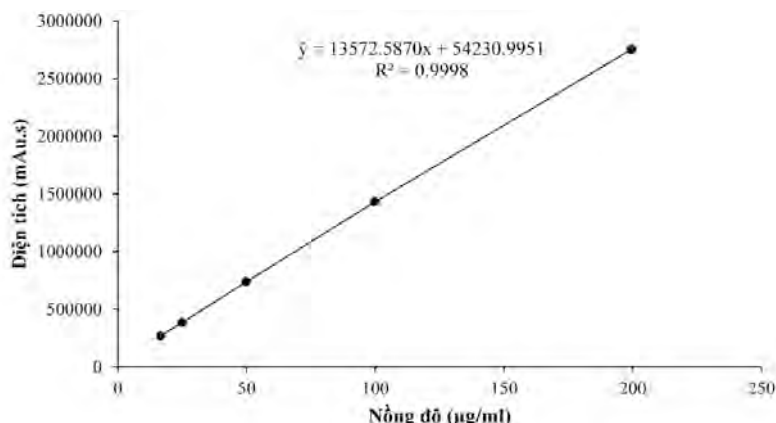
Như vậy, phương pháp phân tích đạt yêu cầu về tính tuyến tính với miền giá trị nồng độ từ 16.63 -

199.59 μg/ml, phương trình hồi quy  $\hat{y} = 13572.5870x + 54230.9951$  và hệ số tương quan  $R^2 = 0.9998$ .

Xác định được giới hạn phát hiện (Limit of detection - LOD) và giới hạn định lượng (Limit of Quantitation - LOQ) lần lượt là:

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{a} = 4.0254 \mu\text{g/mL}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a} = 12.1980 \mu\text{g/mL}$$



**Hình 3.** Đồ thị biểu thị tương quan nồng độ với diện tích peak của eugenol

**3.3.4. Độ chính xác và độ chính xác trung gian**

Kết quả khảo sát độ chính xác và độ chính xác trung gian của quy trình định lượng eugenol được trình bày trong Bảng 5.

**Bảng 5.** Kết quả khảo sát độ chính xác của quy trình định lượng eugenol

STT	Hàm lượng eugenol (%)	
	Ngày 1	Ngày 2
1	2.03	2.05
2	2.03	2.05
3	2.05	2.07
4	2.07	2.06
5	2.07	2.05
6	2.04	2.07
TB (%)	2.05	2.06
TB (%) (n = 12)	2.05	
RSD (%) (n = 6)	0.86	0.45
RSD (%) (n = 12)	0.70	

Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của hàm lượng eugenol trong mẫu thử cùng ngày và khác ngày đều nhỏ hơn 2.0 %. Kết quả xử lý thống kê cho thấy kết quả định lượng giữa hai ngày không khác nhau có ý nghĩa thống kê. Như vậy, quy trình định lượng eugenol trong

niosome bằng phương pháp HPLC đạt độ chính xác.

**3.3.5. Độ đúng**

Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng được trình bày trong Bảng 6.

**3.3.5. Độ đúng**

Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng được trình bày trong Bảng 6.

**Bảng 6.** Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng eugenol

Mẫu	Trung bình tỷ lệ phục hồi (%)	RSD tỷ lệ phục hồi (%)
Thêm chuẩn 80 %	99.5	0.08
Thêm chuẩn 100 %	98.8	0.09
Thêm chuẩn 120 %	98.1	0.03
Trung bình	98.79	0.62

Kết quả cho thấy tỷ lệ phục hồi eugenol ở 3 mức nồng độ 80 %, 100 %, 120 % so với nồng độ chuẩn thêm vào đều nằm trong khoảng từ 98 - 102 % với RSD của tỷ lệ phục hồi không quá 2.0 %. Như vậy, quy trình định lượng eugenol trong niosome bằng phương pháp HPLC đạt độ đúng.

Xét về thành phần của phức hợp N - HNT sẽ phức tạp hơn so với chỉ có tinh dầu hương nhu trắng do đó nhóm tác giả dự đoán với quy trình định lượng đã thẩm định đạt với N - HNT sẽ tương ứng đạt với tinh dầu hương nhu trắng nói riêng và tinh dầu hương nhu nói chung.

Quy trình đã xây dựng đáp ứng được các yêu cầu về tính đặc hiệu, tính tương thích hệ thống, tính tuyến tính, độ chính xác - độ chính xác trung gian, độ đúng theo hướng dẫn của ICH. Thành phần cấu tạo của N - HNT gồm có: tinh dầu hương nhu trắng và tá dược tạo vỏ niosome (span 60, cholesterol).

**4. KẾT LUẬN**

Đề tài đã khảo sát được điều kiện xử lý mẫu N - HNT là phá vỡ vỏ niosome bằng methanol kết hợp với đánh siêu âm 10 phút. Quy trình định lượng eugenol trong N - HNT bằng phương pháp HPLC với

điều kiện cụ thể như sau: cột sắc ký C18 (250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m), pha động methanol - nước - acetonitril (60 : 35 : 5), bước sóng phát hiện 280 nm, tốc độ dòng 0.7 mL/phút, nhiệt độ cột 30 °C, thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ L, thời gian phân tích mẫu 20 phút. Ưu điểm của quy trình trên là thời gian phân tích mẫu

ngắn, đơn giản và phù hợp với máy móc thiết bị sẵn có tại phòng nghiên cứu. Phương pháp xây dựng đáp ứng đủ yêu cầu của một phương pháp phân tích theo hướng dẫn của ICH và ứng dụng định lượng tinh dầu hương nhu trắng, tinh dầu hương nhu tím trên thị trường và dạng N - HNT.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] O. C. Ugbogu, O. Emmanuel, G. O. Agi, et al, "A review on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.)", *Heliyon*, Vol. 7, No. 11, pp. 1-17, 2021.

[2] H. J. Baptiste, P. M. J. Dongmo, F. Boyom, et al, "Antioxidant and antifungal activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* from Yaoundé and Dschang (Cameroon)", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 2, No. 4, pp. 257-268, 2014.

[3] R. S. Melo, A. M. A. Azevedo, A. M. G. Pereira, et al, "Chemical composition and antimicrobial effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. essential oil against multidrug-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*", *Molecules*, Vol. 24, No. 21, pp. 3864, 2019.

[4] N. C. Huong, T. T. K. Ngan, T. T. Anh, et al, "Physical and chemical profile of essential oil of Vietnamese *Ocimum gratissimum* L.", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Vol. 736, pp. 1-6, 2020.

[5] Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam V - Tập 2*. 2017, 1202-1204, 1400-1401, PL-1275.

[6] R. Bartelds, M. H. Nematollahi, T. Pols, et al, "Niosomes, an alternative for liposomal delivery", *PLOS ONE*, Vol. 13, No. 4, pp.1-18, 2018.

[7] X. Ge, M. Wei, S. He, et al, "Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery", *Pharmaceutics*, Vol. 11, No. 55, pp. 1-16, 2019.

[8] ICH Harmonised Tripartite Guideline Analytical validation Q2(R2), pp. 7-14, 2023.

# Development and validation for analyzing eugenol in niosome by high-performance liquid chromatography

Nguyen Tran Hung Yen and Vo Sy Nhat

## ABSTRACT

**Introduction:** Complex niosomes with the basil - clove essential oil (N - HNT) are new dosage form and need a quantitative method to evaluate eugenol content with high accuracy. **Objectives:** The sample processing conditions to quantify total eugenol in N - HNT were determined; the quantified process of total eugenol in N - HNT using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector was developed and validated. **Materials and methods:** The N - HNT were prepared by ethanol injection. The quantitative process conditions such as mobile phase system, flow rate, sample analysis time and process validation were examined according to ICH guidelines. **Results:** The optimal conditions for N - HNT quantification were C18 (250 x 4.6 mm; 5 $\mu$ m) chromatography column and the mobile phase consisted of three components such as methanol - water - acetonitrile (60 : 35 : 5). The detection wavelength was set at 280 nm, the flow rate of the mobile phase was standardized at 0.7 ml/min, the injection volume was 10  $\mu$ l and the column temperature was set at 30 °C. The sample was analyzed in 20 minutes. **Conclusions:** The total eugenol quantitative procedure in N - HNT using HPLC with a UV detector was developed according to ICH guidelines.

**Keywords:** eugenol, HPLC, detector UV, basil - clove essential oil, niosome

Received: 27/03/2024

Revised: 29/04/2024

Accepted for publication: 02/05/2024