



Validation of HPLC Method for Quantitative Determination of *N*-acetylglucosamine in Skin-Lightening Microemulsion

Krisada WUTTIKUL & Prapaporn BOONME *

Department of Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences &
Drug Delivery System Excellence Center, Prince of Songkla University,
Songkhla 90112, Thailand

SUMMARY. The aim of this study was to validate a high performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative determination of *N*-acetylglucosamine (NAG) in a microemulsion (ME). Pseudoternary phase diagram was constructed to find ME formulation for preparation of NAG-loaded ME for skin-lightening propose. A NH_2 column (5 μm particle size, 250 \times 4.6 mm) was used as a chromatographic column. The various ratios (65:35, 70:30, or 75:25 v/v) of acetonitrile and water mixtures were studied as mobile phase to investigate the potential for NAG determination. The flow rate was set at 0.5 mL/min. The column temperature was controlled at 30 °C. Each sample was injected by auto-sampler with the injection volume of 10 μL . The UV detection wavelength was operated at 194 nm. The quantification was performed using peak area counts. NAG peak was found at a retention time of 9.8, 11.5, and 14.1 min when acetonitrile:water ratios of 65:35, 70:30, and 75:25 v/v were used, respectively. The mixture of acetonitrile and water at 70:30 v/v was chosen for quantitative NAG analysis due to symmetric NAG peak and high specificity. NAG standard solutions and NAG-spiked MEs were used for the assay validation. Percent recovery (% recovery) was within $100 \pm 2\%$ and percent relative standard deviation (%RSD) was less than 2%, translating for accuracy and precision, respectively. The calibration curve also showed a good linear relationship. LOD and LOQ values were 0.35 and 0.67 $\mu\text{g/mL}$, respectively. One g of 1% NAG-loaded ME was extracted and quantified to contain NAG of 9.94 ± 0.05 mg or $99.40 \pm 0.53\%$ labeled amount. It could be concluded that the investigated HPLC and extraction methods were appropriate for analysis of NAG in NAG-loaded ME, a novel formulation.

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue validar un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de *N*-acetilglucosamina (NAG) en una microemulsión (ME). Se construyó un diagrama de fases pseudoternario para encontrar la formulación ME para la preparación de EM cargada de NAG para lograr suavizar la piel. Se usó una columna de NH_2 (tamaño de partícula de 5 μm , 250 \times 4,6 mm) como columna cromatográfica. Diversas proporciones (65:35, 70:30 o 75:25 v/v) de acetonitrilo y mezclas de agua se estudiaron como fase móvil para investigar el potencial de determinación de NAG. La velocidad de flujo se estableció en 0.5 mL/min. La temperatura de la columna se fijó a 30 °C. Cada muestra se inyectó de manera automática con un volumen de inyección de 10 μL . La longitud de onda de detección de UV fu de 194 nm. La cuantificación se realizó usando recuentos de área de pico. El pico NAG se encontró en un tiempo de retención de 9.8, 11.5 y 14.1 min cuando se usaron relaciones de acetonitrilo: agua de 65:35, 70:30 y 75:25 v/v, respectivamente. La mezcla de acetonitrilo y agua a 70:30 v/v se eligió para el análisis cuantitativo de NAG debido al pico NAG simétrico y alta especificidad. Las soluciones estándar de NAG y las ME con picos NAG se usaron para la validación del ensayo. El porcentaje de recuperación estuvo dentro de $100 \pm 2\%$ y el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) fue menor al 2%, lo que se tradujo en exactitud y precisión, respectivamente. La curva de calibración también mostró una buena relación lineal. Los valores de LOD y LOQ fueron de 0.35 y 0.67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Un g de ME cargado con NAG al 1% se extrajo y se cuantificó para que contuviera NAG de 9.94 ± 0.05 mg o $99.40 \pm 0.53\%$ de cantidad marcada. Se puede concluir que el método de HPLC ensayado y los métodos de extracción fueron apropiados para el análisis de NAG en ME cargado con NAG, una nueva formulación.

KEY WORDS: analytical validation, HPLC, microemulsion, *N*-acetylglucosamine, skin-lightening.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: prapaporn.b@psu.ac.th