

HPLC Method Development and Validation for the Estimation of Thymoquinone in *Nigella sativa* Seed Extract by Quality by Design (QbD) Approach

Manal A. ALOSSAIMI¹, Abdulmalik S.A. ALTAMIMI¹, Safar M. ALQAHTANI¹,
Mohd. Zaheen HASSAN², Mohammad RASHID³, Mehnaz KAMAL¹ & Obaid AFZAL¹*

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmacy,
Prince Sattam Bin Abdulaziz University, Al-Kharj 11942, Saudi Arabia.

² Department of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmacy,
King Khalid University, Abha 61441, Saudi Arabia.

³ Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy,
College of Dentistry and Pharmacy, Buraydah Colleges, Al-Qassim 31717, Saudi Arabia.

SUMMARY. Thymoquinone (THY) is a bioactive phytochemical constituent found in *Nigella sativa* (NS) seed. The purpose of this research is to determine THY with high precision and accuracy using HPLC by Quality by Design (QbD) approach. To improve chromatographic conditions, response surface approach with central composite design (CCD) was employed, with flow rate and λ_{\max} as independent factors, and retention time and tailing factor as dependent variables. The mobile phase composition was 2-propanol: acetonitrile: buffer (2 mM ammonium formate) in the ratio of 45:40:15 v/v/v. The separation was achieved on Symmetry® C18 (5 μm , 3.9×150 mm) column, as stationary phase. The flow rate of mobile phase was 1 mL/min in isocratic mode, and the eluted analyte was detected at 254 nm by UV-Visible detector. The developed HPLC method was validated according to ICH guidelines. A calibration curve of eight dilutions over the range 6.25-100 $\mu\text{g/mL}$ with r^2 value of 0.9957 was obtained. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) obtained were 2.08 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The percentage relative standard deviation (%RSD) of system suitability (retention time 0.883, and tailing factor 0.512), and other validation parameters like precision and accuracy, solution stability, and robustness were determined. The developed HPLC method is simple, accurate, quick, and robust, and it can be used for the routine analysis of THY in different kinds of formulations.

RESUMEN. La timoquinona (THY) es un componente fitoquímico bioactivo que se encuentra en la semilla de *Nigella sativa* (NS). El propósito de esta investigación es determinar THY con alta precisión y exactitud utilizando el enfoque de HPLC por calidad por diseño (QbD). Para mejorar las condiciones cromatográficas, se empleó un enfoque de superficie de respuesta con un diseño compuesto central (CCD), con el caudal y λ_{\max} como factores independientes, y el tiempo de retención y el factor de cola como variables dependientes. La composición de la fase móvil fue 2-propanol:acetonitrilo:tampón (formato de amonio 2 mM) en la relación 45:40:15 v/v/v. La separación se logró en la columna Symmetry® C18 (5 μm , 3,9 x150 mm), como fase estacionaria. El caudal de la fase móvil fue de 1 mL/min en modo isocrático y el analito eluido se detectó a 254 nm mediante un detector UV-Visible. El método de HPLC desarrollado se validó de acuerdo con las directrices de la ICH. Se obtuvo una curva de calibración de ocho diluciones en el rango de 6,25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ con un valor de r^2 de 0,9957. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) obtenidos fueron 2,08 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se determinaron el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) de la idoneidad del sistema (tiempo de retención 0,883 y factor de cola 0,512) y otros parámetros de validación como precisión y exactitud, estabilidad de la solución y robustez. El método HPLC desarrollado es simple, preciso, rápido y robusto, y puede usarse para el análisis de rutina de THY en diferentes tipos de formulaciones.

KEY WORDS: HPLC, *Nigella sativa*, Quality by Design (QbD), response surface morphology, thymoquinone.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: o.akram@psau.edu.sa