

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION α -MANGOSTIN IN MANGOSTEEN PEEL

Huynh Thi Nhu Quynh, Tran Luu Phuc, Ha Hoang Anh Vinh,
Hoang Thi Thu Huyen, Le Trung Khoang, Huynh Van Chung*
Buon Ma Thuot Medical University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 21/6/2023</p> <p>Revised: 15/8/2023</p> <p>Published: 18/8/2023</p>	<p>In this study, a procedure for quantifying α-mangostin in mangosteen peel by high performance liquid chromatography (HPLC) with a PDA detector was carried out. Chromatographic separation was achieved using a symmetry C18 column (4.6 mm x 250 mm) with the mobile phase consisting of acetonitril : water (95 : 5, v/v) at a flow rate of 1.5 ml/min, and monitored at 320 nm. The method was validated in accordance with International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines. The calibration curve was linear over the concentration range from 0.01 to 200 μg/ml. The limit of detection (LOD) was 0.01 μg/ml and the limit of quantitation (LOQ) was 0.03 μg/ml. The method achieved accuracy with recovery in the range of 99.2 – 101.9%, high repeatability with an RSD of 0.746 % for peak area and 0.074 % for retention time. The procedure was applied to determine the α-mangostin content in mangosteen peels of several different regions in Viet Nam.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>α-mangostin</p> <p>Mangosteen</p> <p>HPLC</p> <p>Validation</p> <p>Determination</p>	

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG α -MANGOSTIN TRONG VỎ QUẢ MĂNG CỤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Huỳnh Thị Như Quỳnh, Trần Lưu Phúc, Hà Hoàng Anh Vĩnh,
Hoàng Thị Thu Huyền, Lê Trung Khoang, Huỳnh Văn Chung*
Trường Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 21/6/2023</p> <p>Ngày hoàn thiện: 15/8/2023</p> <p>Ngày đăng: 18/8/2023</p>	<p>Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích xây dựng quy trình định lượng α-mangostin trong vỏ quả măng cụt bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò PDA. Quá trình phân tích được thực hiện trên cột sắc ký Reliant C18 5μm (4,6x250 mm), sử dụng pha động là hỗn hợp acetonitril : nước (95:5, v/v) với tốc độ dòng là 1,5 ml/phút và được phát hiện tại bước sóng 320 nm. Quy trình định lượng đã được thẩm định đáp ứng các yêu cầu của hội nghị quốc tế về hài hòa hóa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người (ICH) với khoảng tuyến tính 0,1-200 μg/ml, giới hạn phát hiện (LOD) 0,01 μg/ml, giới hạn định lượng (LOQ) 0,03 μg/ml. Phương pháp đạt được độ đúng với độ thu hồi nằm trong khoảng 99,2 – 101,9%, độ lặp lại cao với RSD là 0,746% đối với diện tích peak và 0,074% đối với thời gian lưu. Nghiên cứu đã sử dụng quy trình trên để xác định hàm lượng α-mangostin trong vỏ quả măng cụt của một số vùng khác nhau tại Việt Nam.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>α-mangostin</p> <p>Măng cụt</p> <p>HPLC</p> <p>Thẩm định</p> <p>Định lượng</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8182>

* Corresponding author. Email: hvchung@bmtvietnam.com

1. Giới thiệu

Mãng cụt (*Garcinia mangostana* Linn.) thuộc họ Guttiferae, được trồng ở các nước Đông Nam Á, đặc biệt là ở phía đông và nam của Thái Lan. Vỏ quả của loại cây này từ lâu đã được sử dụng như một vị thuốc trong y học cổ truyền để điều trị đầy bụng, tiêu chảy, kiết lỵ, nhiễm trùng vết thương [1], [2]. Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng α - mangostin là xanthone chính, có một số hoạt tính sinh học tốt như chống oxy hóa [3], chống ung thư [4], chống dị ứng, kháng khuẩn [5], chống viêm và hoạt tính kháng nấm [6]. Vì măng cụt có một số tác dụng dược lý như trên nên ngày càng được sử dụng phổ biến trong mỹ phẩm và dược phẩm.

Ở Việt Nam, măng cụt chủ yếu được trồng ở vùng đồng bằng sông Cửu Long với tổng diện tích lên tới 4900 ha, cho sản lượng khoảng 4500 tấn/năm. Theo dự án phát triển sản xuất và xuất khẩu rau, hoa quả tươi của Việt Nam, dự kiến phát triển diện tích trồng măng cụt ở vùng đồng bằng sông Cửu Long lên khoảng 11300 ha, cho sản lượng 24000 tấn/năm. Do vậy, đây là một trong những nguồn nguyên liệu quý để sản xuất dược phẩm và mỹ phẩm. Vì đó, việc kiểm soát chất lượng nguồn nguyên liệu ban đầu đặc biệt quan trọng, trong đó có hợp chất α -mangostin. Chính vì thế, việc xây dựng quy trình định lượng hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt là rất cần thiết.

Đã có nhiều nghiên cứu xác định hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt như UV-Vis, TLC [7], [8], với ưu điểm là chi phí thấp tuy nhiên độ chính xác và độ lặp lại không cao. Do vậy, gần đây phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đã được ứng dụng để định lượng α -mangostin với độ chính xác cao hơn. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đây thời gian phân tích dài gây lãng phí dung môi và thời gian của người phân tích. Do vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình định lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt bằng phương pháp HPLC nhằm mục đích rút ngắn thời gian phân tích cũng như giúp các nhà sản xuất dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm có thể kiểm soát được nguồn nguyên liệu đầu vào của vỏ quả măng cụt.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng, hóa chất nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Vỏ quả măng cụt được thu hái tại một số huyện như: Chợ Lách (Bến Tre), Cầu Kè (Trà Vinh), Châu Thành (Hậu Giang), Dầu Tiếng (Bình Dương) vào thời điểm tháng 6/2022. Sau khi thu hái, măng cụt (hình 1a) được bóc tách vỏ và sấy ở nhiệt độ 40°C để thu được vỏ khô (hình 1b). Tiến hành xay vỏ măng cụt đã sấy khô thành bột và rây qua rây 1 mm (hình 1c), bột vỏ quả măng cụt được đựng trong túi PE và hút chân không để tránh ảnh hưởng của không khí và độ ẩm.



Hình 1. Quả măng cụt (a), Vỏ quả măng cụt sau khi sấy (b), Bột vỏ quả măng cụt (c)

Hóa chất: Chất chuẩn α -mangostin (99,7% của Sigma-Aldrich), acetonitril (HPLC grade, Fisher), nước cất (Merk), ethanol (HPLC grade, Fisher), methanol (HPLC grade, Fisher).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu thử: Bột khô của vỏ măng cụt được chiết xuất bằng phương pháp ngâm với 95% ethanol (1 g bột khô / 100 ml 95% ethanol) trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng bằng cách lắc liên

tục. Tiến hành lọc bằng giấy lọc whatman số 1, thu được dịch chiết (dung dịch A). Hút chính xác 1,0 mL dung dịch A và pha loãng với methanol trong bình định mức 100 mL (dung dịch B). Trước khi phân tích dung dịch B được lọc qua màng lọc 0,45 μm [9].

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 10,0 mg α -mangostin chuẩn cho vào bình định mức 50 ml. Thêm MeOH đến vạch, lắc đều thu được dung dịch chuẩn gốc 200 $\mu\text{g/ml}$. Sau đó tiến hành pha loãng bằng dung môi MeOH 96% để thu được các dung dịch chuẩn có nồng độ 0,1 – 200 $\mu\text{g/ml}$.

Mẫu trắng: Dung môi MeOH 96%.

Điều kiện sắc ký: Cột sắc ký Reliant C18 5 μm (4.6x250 mm), tốc độ dòng là 1,0 ml/phút và được phát hiện tại bước sóng 320 nm. Sau đó tiến hành khảo sát lần lượt từng yếu tố: loại dung môi acetonitril (ACN)-H₃PO₄ 0,1% (85:15, v/v), ACN-CH₃COOH 0,1% (85:15, v/v), ACN-HCOOH 0,1% (85:15, v/v), ACN-H₂O (85:15, v/v); tỷ lệ dung môi (80:20; 85:15; 90:10; 95:5, 100:0) và tốc độ dòng (0,8; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6 ml/phút).

Thẩm định qui trình định lượng: Thẩm định qui trình theo ICH [10] gồm: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ đúng của phương pháp HPLC.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Theo các tài liệu [9], [11], [12] khi định lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt thì thời gian phân tích tương đối dài, gây mất thời gian cho người phân tích cũng như tiêu tốn lượng dung môi tương đối lớn. Do vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát loại dung môi, tỷ lệ dung môi, tốc độ dòng đã trình bày ở mục 2.2 để chọn ra điều kiện sắc ký phù hợp nhất. Kết quả cho thấy:

Dung môi: Thời gian lưu của bốn hệ dung môi ACN-H₃PO₄ 0,1% (85:15,v/v), ACN-CH₃COOH 0,1% (85:15,v/v), ACN-HCOOH 0,1% (85:15,v/v), ACN-H₂O (85:15,v/v) khoảng 7,3 phút không có sự khác biệt giữa các hệ dung môi. Tuy nhiên đối với hệ dung môi acetonitril-H₂O cho diện tích peak lớn nhất và đây cũng là hệ dung môi đơn giản, chi phí thấp nhất cho quá trình thực hiện. Do vậy, hệ dung môi ACN-H₂O (85:15,v/v) được chọn cho các khảo sát tiếp theo.

Tỷ lệ dung môi

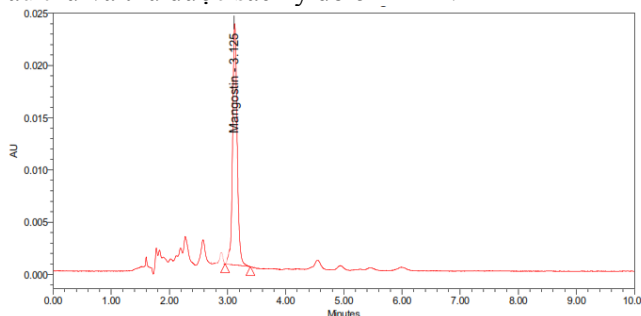
+ Với tỷ lệ dung môi 80:20; 85:15; 90:10; 95:5 thời gian lưu tương ứng 9,719; 7,312; 5,678; 4,832 phút, peak cân đối.

+ Với tỷ lệ dung môi 100 ACN peak α -mangostin không tách được ra khỏi các peak tạp.

Vì vậy tỷ lệ dung môi 95:5 được chọn cho các khảo sát tiếp theo

Tốc độ dòng: Tại tốc độ dòng 0,8 ml/phút áp suất cột nhỏ nhất, tuy nhiên thời gian lưu lớn nhất; với tốc độ dòng 1,6 ml/phút thì thời gian lưu ngắn nhất nhưng α -mangostin không tách được với các peak tạp; tại tốc độ dòng 1,5 ml/phút thời gian lưu có dài hơn so với 1,6 ml/phút nhưng peak α -mangostin tách tốt với các peak tạp. Do vậy, tốc độ dòng 1,5 ml/phút được chọn.

Do vậy điều kiện sắc ký được chọn như sau: cột sắc ký Reliant C18 5 μm (4,6x250 mm), sử dụng dung môi pha động là hỗn hợp ACN : H₂O (95:5,v/v) với tốc độ dòng là 1,5 ml/phút và được phát hiện tại bước sóng 320 nm. Sau khi chọn được điều kiện sắc ký thích hợp chúng tôi tiến hành phân tích mẫu thử và thu được sắc ký đồ ở hình 2.



Hình 2. Sắc ký đồ của mẫu thử ở điều kiện sắc ký đã chọn

3.2. Thẩm định qui trình định lượng

Tính tương thích hệ thống:

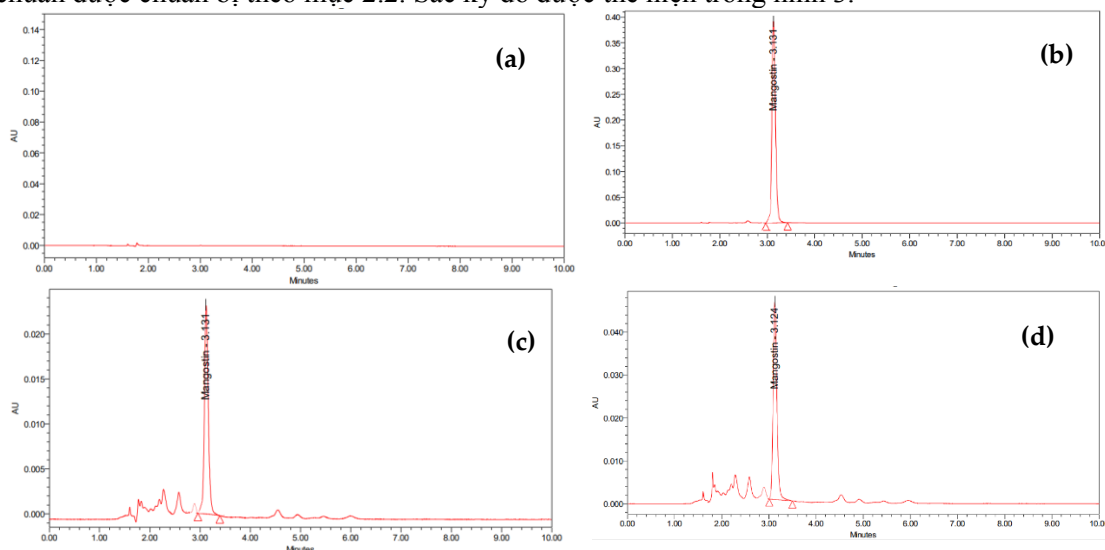
Tiến hành tiêm mẫu α -mangostin chuẩn 8 lần vào hệ thống với điều kiện sắc ký đã chọn và ghi nhận sắc ký đồ. Kết quả bảng 1 cho thấy thời gian lưu, diện tích peak đều có RSD < 2%, từ đó cho thấy qui trình đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tính tương thích của hệ thống

Lần đo	Thời gian lưu t_R (phút)	Diện tích peak (mAU*min)
1	3,138	1094194
2	3,129	1099468
3	3,129	1073077
4	3,127	1084339
5	3,129	1082164
6	3,128	1078743
7	3,132	1087526
8	3,130	1107154
RSD (%)	0,108	1,037

Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng (MeOH 96%), mẫu α -mangostin chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn được chuẩn bị theo mục 2.2. Sắc ký đồ được thể hiện trong hình 3.

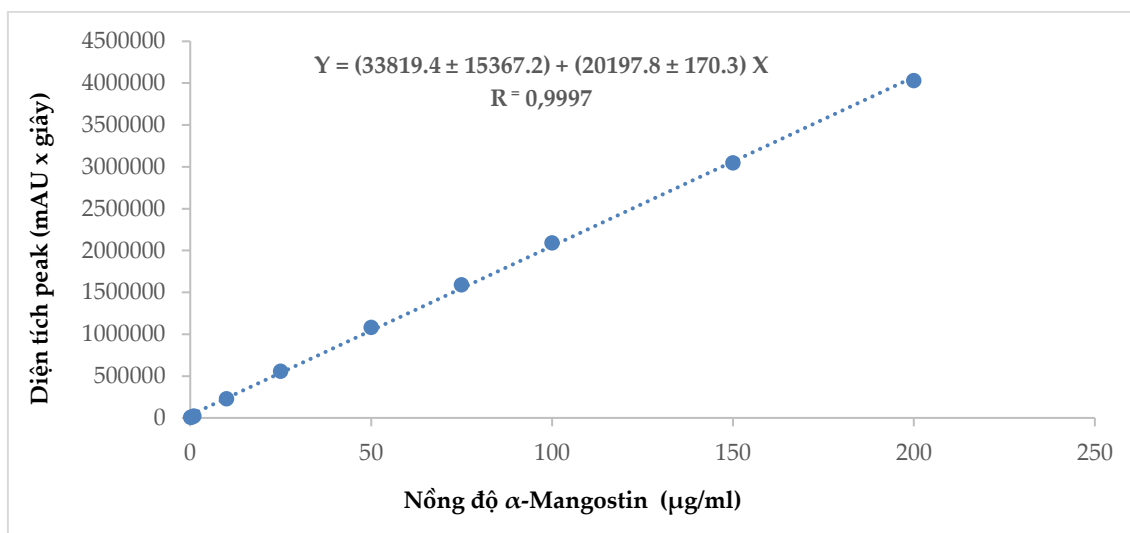


Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu trắng (a), mẫu α -mangostin chuẩn (b), mẫu thử (c) và mẫu thử thêm chuẩn (d)

Kết quả cho thấy sắc ký đồ của mẫu trắng (a) không xuất hiện peak nào tại thời điểm 3-4 phút, vậy mẫu trắng không ảnh hưởng tới kết quả của phép đo. Mẫu chuẩn (b) và mẫu thử (c) đều có peak α -mangostin có thời gian lưu $t_R \approx 3,1$ phút. Đối với mẫu thử thêm chuẩn (d), có sự gia tăng về diện tích peak tại thời gian lưu $t_R \approx 3,1$ phút và không xuất hiện peak mới nào. Điều đó chứng tỏ phương pháp định lượng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

Tính tuyến tính

Xây dựng đường chuẩn: Tiến hành phân tích mẫu chuẩn α -mangostin có khoảng nồng độ từ 0,1 - 200 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa diện tích peak và nồng độ của dung dịch α -mangostin

Nhận xét: Kết quả cho thấy có sự phụ thuộc tuyến tính giữa diện tích peak tại bước sóng 320 nm và nồng độ α -mangostin trong khoảng khảo sát từ 0,1-200 $\mu\text{g/ml}$ với giá trị $R = 0,9997$. Điều này chứng tỏ trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ α -mangostin trong mẫu chuẩn với diện tích peak. Khoảng tuyến tính này phù hợp để định lượng α -mangostin trong các mẫu thử.

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Chuẩn bị và tiến hành phân tích các mẫu chứa α -mangostin có nồng độ giảm dần, giá trị giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) được xác định bằng tỷ số tín hiệu/nhiều nền (S/N). Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ mà tại đó $S/N = 3$; giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ mà tại đó $S/N = 10$. Kết quả đã xác định được giới hạn phát hiện của phương pháp LOD = 0,01 $\mu\text{g/ml}$ với tỉ số $S/N = 3,8$ và giới hạn định lượng của phương pháp LOQ = 0,03 $\mu\text{g/ml}$ với tỉ số $S/N = 11,3$.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp

STT	Thời gian lưu t_R (phút)	Diện tích peak (mAU*min)
1	3,127	127320
2	3,131	126166
3	3,131	124359
4	3,128	127142
5	3,127	126472
6	3,125	125525
7	3,127	126116
8	3,125	126576
RSD (%)	0,074	0,746

Độ lặp lại

Tiêm 8 mẫu thử được chuẩn bị theo quy trình 2.2 và tiêm vào hệ thống HPLC. Kết quả khảo sát độ lặp lại được trình bày trong bảng 2. Kết quả cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt với RSD là 0,746% với diện tích peak và thời gian lưu là 0,074% đối với thời gian lưu.

Độ đúng

Độ đúng được đánh giá thông qua độ thu hồi (%) khi tính toán lượng chuẩn cần thêm vào mẫu thử với các tỷ lệ lần lượt là 80%, 100%, 120% so với nồng độ mẫu thử, mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần trong cùng điều kiện khảo sát. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

STT	% thêm vào	Nồng độ mẫu thử (C1) ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ thu hồi (C2) ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ thu hồi $(C2-C1)/C0*100\%$ (%)
1		5,52	9,97	100,7
2	80	5,52	9,88	98,7
3		5,52	9,96	99,3
TB			9,94	99,6
RSD (%)			0,496	1,031
4		5,52	11,15	101,9
5	100	5,52	11,08	100,7
6		5,52	11,12	101,4
TB			11,12	101,3
RSD (%)			0,181	0,595
7		5,52	12,17	100,5
8	120	5,52	12,11	99,5
9		5,52	12,09	99,2
TB			12,12	99,7
RSD (%)			0,343	0,683

Kết quả cho thấy trong tất cả các lần thử đều có RSD nhỏ hơn 2% và tỷ lệ thu hồi trong các lần đo đều nằm trong giới hạn cho phép 90 - 107% [13]. Do vậy phương pháp đạt độ đúng.

3.3. Xác định hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt

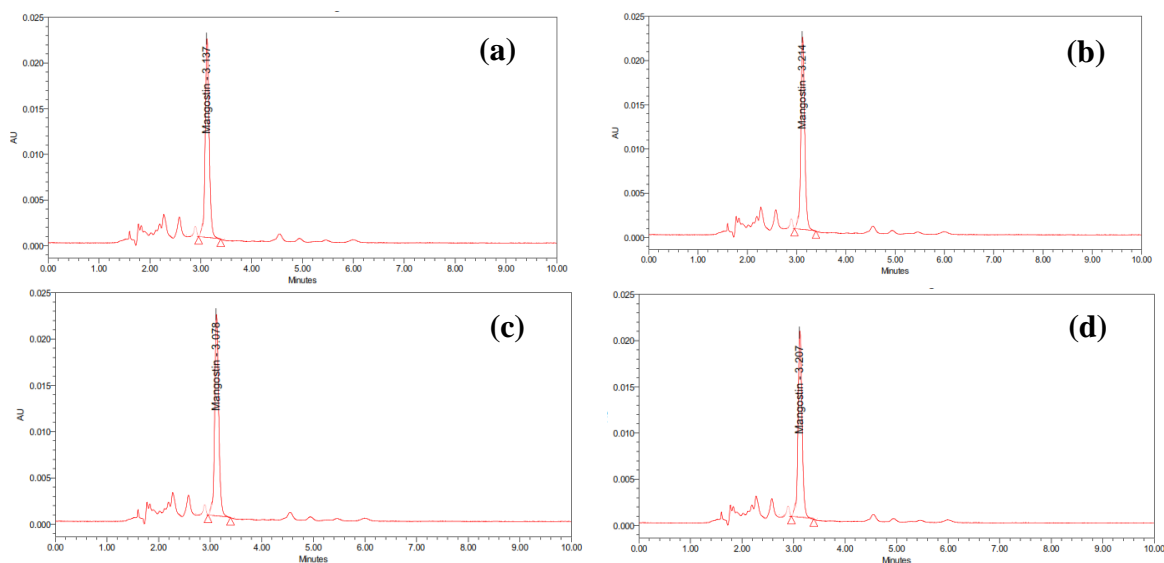
Áp dụng phương pháp định lượng đã xây dựng để xác định hàm lượng α -mangostin trong 4 mẫu măng cụt được thu hái tại các huyện như: Chợ Lách (Bến Tre), Cầu Kè (Trà Vinh), Châu Thành (Hậu Giang), Dầu Tiếng (Bình Dương) vào thời điểm tháng 6/2022. Sau khi thu hái, măng cụt được bóc tách vỏ và sấy ở nhiệt độ 40°C. Tiến hành xay thành bột (qua rây 1 mm), đựng trong túi PE và hút chân không để tránh ảnh hưởng của không khí và độ ẩm. Tiến hành chiết xuất bằng phương pháp ngâm dầm vì phương pháp này các mẫu phân tích có bề mặt bị phá hủy hoàn toàn. Do bề mặt thành bị vỡ ra nên tăng khả năng khuếch tán hoạt chất ra dung môi. Vì vậy hiệu quả của phương pháp chiết suất sẽ cao [14]. Ngoài ra phương pháp ngâm dầm tuy thời gian chiết xuất dài nhưng có ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện, trang thiết bị rẻ tiền. Do vậy chúng tôi chọn phương pháp ngâm dầm để tiến hành chiết suất và xác định hàm lượng α -mangostin. Mỗi mẫu được định lượng 3 lần, kết quả được trình bày trong Bảng 4 và sắc ký đồ ở hình 5.

Bảng 4. Kết quả định lượng hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt

Địa điểm	Chợ Lách	Cầu Kè	Châu Thành	Dầu Tiếng
Hàm lượng α -mangostin (mg/g)	38,76 \pm 0,27	37,57 \pm 0,70	36,31 \pm 0,47	30,27 \pm 0,30

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng mean \pm ts.n^{-1/2}; p = 0,95.

Kết quả cho thấy hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt của các huyện trên khác nhau có ý nghĩa thống kê, việc này có thể kể đến do sự ảnh hưởng của các yếu tố thổ nhưỡng và thời tiết khác nhau ở các huyện. Trong đó hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt ở Chợ Lách là cao nhất. Điều này rất thuận lợi cho việc chủ động nguồn nguyên liệu đầu vào chất lượng, vì diện tích trồng măng cụt của huyện Chợ Lách khoảng 1.100 ha là diện tích măng cụt lớn nhất của nước ta. Ngoài ra các huyện Cầu Kè và Châu Thành tuy có sự khác biệt về hàm lượng α -mangostin so với huyện Chợ Lách nhưng sự khác nhau này không nhiều. Vì vậy có thể tận dụng thêm nguồn nguyên liệu của huyện Cầu Kè và Châu Thành để làm nguyên liệu đầu vào cho quá trình sản xuất dược phẩm và mỹ phẩm.



Hình 5. Sắc ký đồ của mẫu dịch chiết vỏ quả măng cụt được thu hái tại Chợ Lách (a), Cầu Kè (b), Châu Thành (c), Dầu Tiếng (d)

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định được quy trình định lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt. Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng của phương pháp. Nghiên cứu đã ứng dụng để xác định được hàm lượng α -mangostin trong vỏ quả măng cụt của một số huyện có diện tích trồng măng cụt lớn của nước ta như Chợ Lách (Bến Tre), Cầu Kè (Trà Vinh), Châu Thành (Hậu Giang), Dầu Tiếng (Bình Dương).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] W. Mahabusarakam, P. Iriyachitra, and W. C. Taylor, "Chemical constituents of *Garcinia mangostana*," *J. Nat. Prod.*, vol. 50, no. 3, pp. 474-478, 1987.
- [2] F. W. Martin, "Durian and mangosteen," In S. Nagy and D. S. Shaw (eds.), *Tropical and Subtropical Fruits: Composition, Properties and Uses*, 1980, pp. 407-414.
- [3] A. D. Kinghorn, H. A. Jung, B. N. Su, W. J. Keller, and R. G. Mehta, "Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 6, pp. 2077-2082, 2006.
- [4] P. Moongkarndi, N. Kosem, S. Kaslungka, O. Luanratana, N. Pongpan, and N. Neungton, "Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 90, pp. 161-166, 2004.
- [5] Y. Sakagami, M. Iinuma, K. Piyasena, and H. Dharmaratne, "Antibacterial activity of α -mangostin against vancomycin resistant enterococci (VRE) and synergism with antibiotics," *Phytomedicine*, vol. 12, pp. 203-208, 2005.
- [6] J. Cui, W. Hu, Z. Cai, Y. Liu, S. Li, W. Tao *et al.*, "New medicinal properties of mangostins: analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L.," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 95, pp. 166-172, 2010.
- [7] W. Pothitirat and W. Gritsanapan, "Thin layer chromatography densitometric analysis of α -mangostin content in *Garcinia mangostana* fruit rind extracts," *J. AOAC Int*, vol. 91, pp. 1145-1148, 2008.
- [8] W. Pothitirat and W. Gritsanapan, "Quantitative analysis of total mangostins in *Garcinia mangostana* fruit rind," *J. Health Res*, vol. 22, pp. 161-166, 2008.
- [9] P. Jujun, K. Pootakham, Y. Pongpaibul, P. Tharavichitkul, and C. Ampasavate, "HPLC Determination of Mangostin and Its Application to Storage Stability Study," *CMU. J. Nat. Sci*, vol. 8, no. 1, pp. 43-53, 2009.

-
- [10] ICH, *Harmonised Tripartite Guideline: Guidelines for validation of analytical procedures: Q2 (R1)*, Text and Methodology, 2005.
- [11] W. Pothitirat and W. Gritsanapan, "HPLC Quantitative analysis method for the determination of α -mangostin in mangosteen fruit rind extract," *Thai Journal of Agricultural Science*, vol. 42, no. 1, pp. 7-12, 2009.
- [12] M. Muchtaridi, N. A. Puteri, T. Milanda, *et al.*, "Validation Analysis Methods of α -Mangostin, γ - Mangostin and Gartanin Mixture in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Fruit Rind Extract from West Java with HPLC," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 7, no. 10, pp. 125-130, 2017.
- [13] AOAC, *Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Section 3.4.1- 3.4.2*, pp. 8-9, 2013.
- [14] J. R. Jocalyn Paré, M. R. Jacqueline, and S. S. S. Bélanger, "Microwave-Assisted Process (MAP): a new tool for the analytical laboratory," *Trends in analytical chemistry*, vol. 13, no. 4, pp. 176-184, 1994.