

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไพเพอรีนในพริกไทยดำ โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Method validation for determination of piperine in black pepper by high performance liquid chromatography

ธิดารัตน์ เครือเทียน¹, ปัทมาพร จิตปรีดา¹, สุนงกช ทรัพย์แดง^{1*}

Thidarat Kruatian¹, Pattamaporn Jitpreeda¹, Subongkoch Subtaeng^{1*}

รับบทความ 10 มิถุนายน 2567 แก้ไขบทความ 29 เมษายน 2568 ยอมรับตีพิมพ์ 20 พฤษภาคม 2568

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารไพเพอรีนในตัวอย่างพริกไทยดำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิธีดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงและมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 - 6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9998 ความถูกต้องแสดงในรูปของค่าร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 100.25 - 101.65 ความเที่ยงจากการทำซ้ำมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วงร้อยละ 0.36 - 2.50 สำหรับการวิเคราะห์ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ซึ่งไม่เกินเกณฑ์กำหนดที่ร้อยละ 5 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.99 และ 1.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงสมบัติของวิธีทดสอบทั้งหมดเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC guidelines for single laboratory, validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2019) โดยมีค่าประมาณความไม่แน่นอนของการวัดร้อยละ 3.49 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($k = 2$) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณไพเพอรีนในตัวอย่างพริกไทยดำ จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพริกไทยดำจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 28 ตัวอย่าง ตามวิธีที่ผ่านการทดสอบความใช้ได้แล้ว พบว่าตัวอย่างพริกไทยดำมีปริมาณไพเพอรีนอยู่ในช่วงร้อยละ 3.15 ถึง 6.41 โดยน้ำหนัก ซึ่งตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมพริกไทย (มอก. 297-2556) กำหนดปริมาณไพเพอรีนในตัวอย่างพริกไทยต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 โดยผลจากงานวิจัยนี้มีตัวอย่างพริกไทยดำผ่านเกณฑ์คุณภาพ จำนวน 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 71.4 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์สารไพเพอรีนในตัวอย่างพริกไทยดำด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้สามารถใช้หาปริมาณไพเพอรีนในตัวอย่างพริกไทยดำจากแหล่งต่าง ๆ และสามารถใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและสารสกัดสมุนไพรไทยให้ได้มาตรฐาน สามารถแข่งขันได้ในระดับสากล

คำสำคัญ: : ไพเพอรีน, พริกไทยดำ, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

¹ศูนย์วิจัยและพัฒนาวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ สถาบันวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Abstract

The determination of piperine in black pepper samples using high performance liquid chromatography (HPLC) was successfully performed and validated. The method demonstrated specificity and good linearity in the concentration range of 1 - 6 mg/L with a coefficient of determination (R^2) of 0.9998. Accuracy was evaluated through %recovery studies and obtaining results between 100.25 - 101.65%. The precision expressed as a relative standard deviation (%RSD), showed good repeatability for both intra-day and inter-day analyses, with %RSD values less than 5%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.99 and 1.09 mg/L, respectively. The linearity, percent recovery, precision, LOD and LOQ values were acceptable and complied with AOAC guidelines for single laboratory, validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Measurement uncertainty was calculated as 3.49% at a 95% confidence interval ($k = 2$). All results presented that the method was reliable and suitable for the determination of piperine in black pepper sample. Subsequently, 28 black pepper samples from various sources were analyzed using a validated method. The results showed that piperine content ranged from 3.15% to 6.41% w/w, with 20 samples (71.4%) meeting the Thai Industrial Standard (TIS. 297-2556) requirement of piperine content $\geq 4\%$. The results demonstrate that the proposed HPLC technique for analyzing piperine content in black pepper samples is effective and can be applied to samples from various sources. Furthermore, the data from this study can serve as a guideline for the quality control of Thai herbal raw materials and extracts, ensuring compliance with standard requirements and enhancing global competitiveness.

Keywords: Piperine, Black pepper, High performance liquid chromatography

¹Raw Materials and Product Research Center, Institute of Community Science Technology, Department of Science Service

*Corresponding author e-mail address : subongkoch@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

พริกไทยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่ผลผลิตมีราคาสูง ประโยชน์ของพริกไทยนอกจากจะใช้เป็นเครื่องเทศแต่งกลิ่น รส และถนอมอาหารแล้วยังจัดเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณตามตำรายาไทย คือ ใช้เป็นยาขับลม แก้ท้องอืดเพื่อบำรุงธาตุ เจริญอาหาร ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ และกระตุ้นประสาท ปัจจุบันประเทศไทยมีการปลูกพริกไทยเพื่อการส่งออกและในขณะเดียวกันก็มีการนำเข้าพริกไทยเพื่อบริโภคภายในประเทศด้วย โดยปริมาณการส่งออกและปริมาณการนำเข้าพริกไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ถึงปี พ.ศ. 2564 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าความต้องการบริโภคพริกไทยทั่วโลกมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น [1] พริกไทยประกอบไปด้วย น้ำ แบ่ง เส้นใย โปรตีน พิเพอริน และน้ำมันหอมระเหย [2] โดยพิเพอริน (Piperine) เป็นสารประกอบประเภทแอลคาลอยด์ (Alkaloid) อยู่ในกลุ่มพิเพอริดีน (Piperidine) เป็นสารที่ให้รสเผ็ดร้อนออกฤทธิ์กระตุ้นต่อมรับรส ทำให้กรดในกระเพาะถูกหลั่งออกมา มีฤทธิ์ทางยาในการขับเหงื่อและปัสสาวะ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ไล่แมลงได้อีกด้วย [3] พิเพอรินเป็นพฤษเคมีที่พบในปริมาณสูง จึงถือเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในพริกไทย [4] ซึ่งปริมาณพิเพอรินใช้บ่งชี้ถึงคุณภาพและเพิ่มมูลค่าให้กับพริกไทยได้ จากการศึกษาปริมาณสารพิเพอรินในพริกไทยสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า พริกไทยดำมีปริมาณสารพิเพอรินสูงกว่าในพริกไทยขาว [5] โดยในพริกไทยดำมีปริมาณสารพิเพอรินสูงถึง 9% [6] ทั้งนี้ปริมาณของสารพิเพอรินในพริกไทยขึ้นอยู่กับสภาวะปัจจัยต่าง ๆ เช่น สายพันธุ์ อายุการเก็บเกี่ยว แหล่งการปลูก สภาพภูมิอากาศ รวมทั้งกระบวนการการทำแห้งพริกไทย [7] จากการศึกษางานวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพิเพอรินพบว่า มีฤทธิ์ในการเพิ่มการหมุนเวียนเลือด กระตุ้นการย่อยอาหาร [8] ด้านการติดเชื้อ [9] ด้านจุลชีพ [10] และด้านการอักเสบ [11]

การวิเคราะห์สารพิเพอรินในพริกไทยสามารถทำได้โดยใช้หลายเทคนิค ได้แก่ เทคนิค UV-Vis spectrophotometry [12-15], High performance liquid chromatography (HPLC) [16, 17], Thin-layer chromatography (TLC) [18], Voltammetry [19] โดยปัจจุบันวิธีวิเคราะห์พิเพอรินในมาตรฐานต่าง ๆ ของไทย ได้แก่ ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai herbal pharmacopoeia, THP) มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมพริกไทย (มอก. 297-2556) และคู่มือสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีกระบวนการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน จึงทำให้ปริมาณพิเพอรินที่วิเคราะห์ได้มีค่าแตกต่างกัน ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เทคนิค UV-Vis spectrophotometry ในการวิเคราะห์สารพิเพอรินในพริกไทย โดยเทคนิคนี้ให้ผลการวิเคราะห์เป็นปริมาณพิเพอรินรวม ซึ่งรวมถึงอนุพันธ์ต่าง ๆ ของพิเพอรินด้วย ทำให้การวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ นอกจากการเลือกเทคนิคการวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว การสกัดถือเป็นกระบวนการสำคัญที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณพิเพอรินในตัวอย่างพริกไทย โดยวิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารพิเพอรินในตัวอย่างพริกไทย ได้แก่ การรียกซ์ การกลั่น และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับสกัดด้วยตัวทำละลาย [12-17] ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงวิเคราะห์ปริมาณพิเพอรินในตัวอย่างพริกไทยดำด้วยเทคนิค HPLC เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง รวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือ โดยได้ทำการสกัดตัวอย่างพริกไทยในเมทานอลด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อช่วยลดระยะเวลาและปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พิเพอรินในตัวอย่างพริกไทยดำด้วยเทคนิค HPLC เพื่อให้ผลการวิเคราะห์สามารถนำมาจัดทำเป็นข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบ (Specification) หรือวิธีมาตรฐานที่ใช้เป็นวิธีอ้างอิงในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 ตัวอย่าง

ผู้วิจัยได้ดำเนินการรวบรวมตัวอย่างพริกไทยดำทางการค้า จำนวน 25 ตัวอย่าง และวัตถุดิบพริกไทยดำจากแหล่งปลูกจำนวน 3 ตัวอย่าง รวม 28 ตัวอย่าง นำตัวอย่างพริกไทยดำมาบดให้ละเอียด และคัดขนาดผ่านตะแกรงร่อนขนาด 300 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทในตู้ดูดความชื้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, photodiode array detector, HPLC-PDA) ยี่ห้อ Waters รุ่น Waters 2998 ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.2 คอลัมน์ C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Waters ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.3 เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Scaltec รุ่น SBA 31 ผลิตจากประเทศเยอรมัน

2.2.4 เครื่องเขย่าสารโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) กำลัง 300 วัตต์ และความถี่ 40 kHz ยี่ห้อ GT sonic ผลิตจากประเทศจีน

2.2.5 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (Deionized water) ยี่ห้อ Ultra-pure water, ELGA, รุ่น Ultra ionic ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกา

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารมาตรฐานพิเพอร์รีน (Piperine) ความบริสุทธิ์ร้อยละ 97 ยี่ห้อ Sigma-aldrich ผลิตจากประเทศเยอรมัน

2.3.2 เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Ethanol 95%) AR grade ยี่ห้อ Merck

2.3.3 เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 99 (Ethanol 99%) AR grade ยี่ห้อ Merck

2.3.4 เมทานอล (Methanol) HPLC grade ยี่ห้อ Merck

2.3.5 กรดแอซีติก (Acetic acid) HPLC grade ยี่ห้อ Merck

2.3.6 แอซีโตนไทรล์ (Acetonitrile) HPLC grade ยี่ห้อ Merck ผลิตจากประเทศเยอรมัน

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Stock solution) โดยชั่งสารมาตรฐานพิเพอร์รีน 0.0100 กรัม ลงในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในขวดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

2.5 วิธีดำเนินงาน

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ พัฒนาขึ้นตาม AOAC guidelines for single laboratory, validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2019) [20] และ ISO 11027:1993, International standard: Pepper and pepper oleoresins – Determination of piperine content (1993) [21] โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณพิเพอร์รีนด้วยเครื่อง HPLC แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการทดสอบพิเพอร์รีนด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography

สภาวะ	รายละเอียด
คอลัมน์	ชนิด C18 เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 มิลลิเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร
Elution mode	Isocratic
เฟสเคลื่อนที่	แอซีโทไนไตรล์ น้ำ และกรดแอซีติก อัตราส่วน 60 : 39.5 : 0.5
อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	1.0
ปริมาตรที่ฉีด (ไมโครลิตร)	20
เวลาในการวิเคราะห์ (นาที)	7
Retention time (นาที)	2.86
เครื่องตรวจจับ	ชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (Photodiode array detector)
ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	340

2.5.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 และ 6.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้แต่ละความเข้มข้น กรองด้วย Syringe filter ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าพื้นที่ใต้พีค (Peak area) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนมาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ของกราฟมาตรฐานควรมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

2.5.2 ความเที่ยง (Precision)

การทดสอบหาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สารมาตรฐานพิเพอร์รีน 3 ระดับความเข้มข้นในช่วงต่ำ กลาง สูง ได้แก่ ความเข้มข้น 1.00, 3.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และตัวอย่างผงพริกไทยดำ จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยทำ Intra-day precision จำนวน 6 ซ้ำภายในวันเดียวกัน แล้วนำปริมาณพิเพอร์รีนมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากนั้นทำ Intermediate precision โดย (1) เปลี่ยนผู้ทดลอง และ (2) เปลี่ยนวันที่ ทำการทดลองโดยเป็นผู้ทดลองเดิม เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำปริมาณพิเพอร์รีนมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และคำนวณหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ โดยควรมีค่าไม่เกิน 5% [21]

$$\%RSD = SD / \bar{X}$$

เมื่อ SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทำการทดลอง 6 ซ้ำ

$\bar{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณพิเพอร์รีนที่ได้จากการทำการทดลอง 6 ซ้ำ

2.5.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

การทดสอบความถูกต้อง ทำโดยใช้วิธีการเติมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างพริกไทยที่มีปริมาณพิเพอร์รีนต่ำ หรือ Sample blank ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ ต่ำ กลาง และสูง ได้แก่ 1.00, 3.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2 แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีเดียวกับการวิเคราะห์จริง ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (%Recovery) ในแต่ละระดับความเข้มข้น ควรอยู่ในช่วงร้อยละ 92 - 105 ตาม AOAC guidelines for single laboratory (2019) [20] และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ %RSD ไม่เกิน 3.0 โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\% \text{Recovery} = (C1 - C2)/C3 \times 100$$

- เมื่อ
- C1 คือ ความเข้มข้นของพิเพอร์รีนในตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน
 - C2 คือ ความเข้มข้นของพิเพอร์รีนในตัวอย่างแบลงค์ (Sample blank)
 - C3 คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนที่เติมลงในตัวอย่าง (Spiked sample)

ตารางที่ 2 การเติมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน และเมทานอลในการสกัดเพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธี

ระดับความเข้มข้น ของสารละลายมาตรฐาน พิเพอร์รีน (mg/L)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน พิเพอร์รีน Stock solution ความเข้มข้น 100 mg/L (mL)	ปริมาตร เมทานอล (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
0	0	50.00	50
1.00	0.50	49.50	50
3.00	1.50	48.50	50
5.00	2.50	47.50	50

2.5.4 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) ทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) โดยใช้ตัวอย่างพริกไทยที่มีพิเพอร์รีนปริมาณต่ำมาใช้ศึกษา โดยประมาณค่าเป็น 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานบวกกับค่าเฉลี่ยของ Sample blank ตัวอย่างพริกไทยที่มีพิเพอร์รีนปริมาณต่ำทำการวิเคราะห์จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อหาค่า LOD และค่าประมาณ LOQ โดยคำนวณจาก

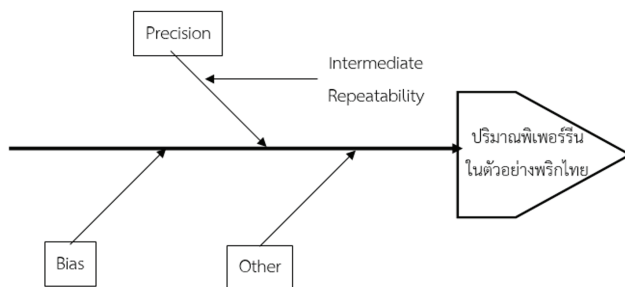
$$\text{LOD} = \bar{X} + 3\text{SD}$$

$$\text{การประมาณค่า LOQ} = \bar{X} + 10\text{SD}$$

จากนั้นยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับค่าประมาณ LOQ จำนวน 7 ซ้ำ แล้วพิจารณาความเที่ยง (Precision) ที่แสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, %RSD) และความแม่นยำ (Accuracy) โดยคำนวณจากค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)

2.5.5 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ค่าความไม่แน่นอนของการวัดเป็นการประเมินค่ารวมของผลกระทบทั้งหมดที่มีผลต่อการทดสอบเชิงปริมาณ สามารถประมาณได้จากข้อมูลการทดสอบ งานวิจัยนี้ทำการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทย โดยใช้ข้อมูลจาก method validation approach ตามวิธีของ VAM Project 3.2.1 development and harmonisation of measurement uncertainty principles part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data (2000) [22] โดยรวมแหล่งที่มาของค่าความไม่แน่นอนต่าง ๆ แสดงด้วยแผนภูมิแกงปลา (รูปที่ 1) จากนั้นคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนแต่ละแหล่ง ค่าความไม่แน่นอนรวม และค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k=2$)



รูปที่ 1 แผนภูมิแกงปลาแสดงแหล่งความไม่แน่นอนในการวัดปริมาณสารพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทย

ค่าความไม่แน่นอนรวม, u_c คำนวณจากสมการ

$$\frac{u_c}{C} = \sqrt{u(R)^2 + u(P)^2}$$

เมื่อ $u(R)$ คือ ค่าความไม่แน่นอนรวมของความเอนเอียง

$u(P)$ คือ ค่าความไม่แน่นอนจากความเที่ยง

C คือ ค่าความเข้มข้นระดับกลาง ที่ใช้ศึกษาความเอนเอียงของวิธี (3 mg/L)

ความไม่แน่นอนขยาย, U ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) คำนวณได้จากสมการ

$$U = ku_c$$

เมื่อ k คือ ค่า Coverage factor ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีค่าเท่ากับ 2

u_c คือ ค่าความไม่แน่นอนรวม

จากนั้นคำนวณหาร้อยละความไม่แน่นอน

$$\text{ร้อยละความไม่แน่นอน} = \frac{\text{ความไม่แน่นอนขยาย}}{\text{ความเข้มข้นระดับกลางที่ใช้คำนวณ}} \times 100$$

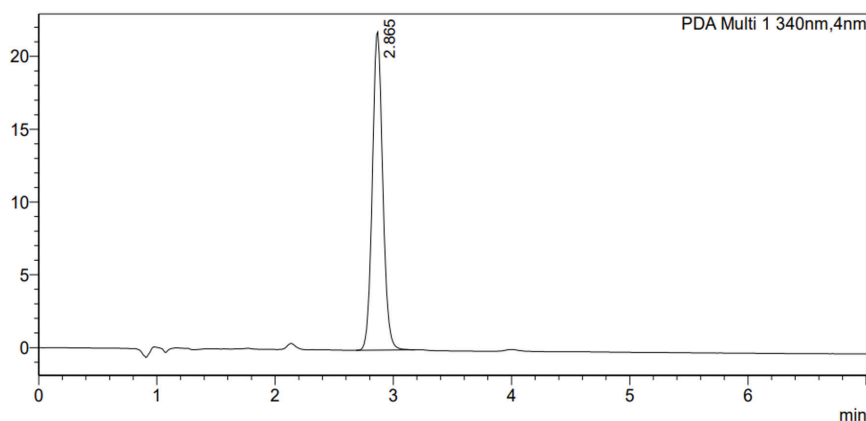
2.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยดำจากแหล่งต่าง ๆ

เตรียมตัวอย่างสารสกัดพริกไทยดำจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่างจำนวน 0.2 ± 0.0005 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมนีโตนอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และปิดทับด้วยพาราฟิล์ม นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 30 นาที กรองสารสกัดที่ได้ลงในขวดสีชาด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำสารละลายกรองผ่าน Syringe filter ขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอนเมตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และนำไปวิเคราะห์ปริมาณพิเพอร์รีนด้วยเทคนิค HPLC แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณสารพิเพอร์รีนในหน่วยร้อยละโดยมวล (%w/w)

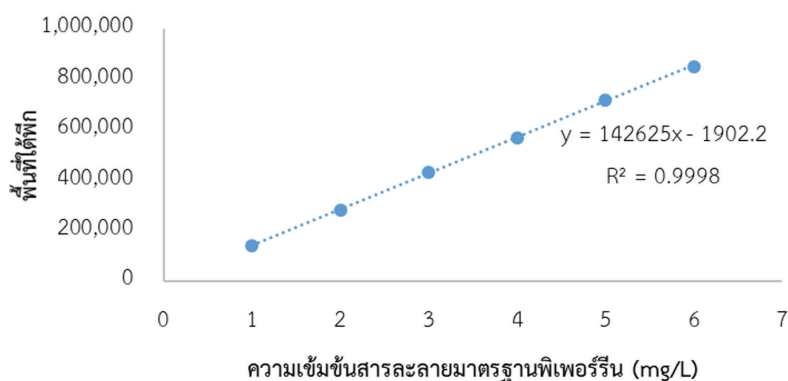
3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การทดสอบนี้ได้กำหนดช่วงการวิเคราะห์สารพิเพอร์รีนในช่วงความเข้มข้น 1 - 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อนำสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนที่เตรียมไว้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จะได้โครมาโทแกรมของพิเพอร์รีนที่ Retention time เท่ากับ 2.86 นาที ดังรูปที่ 2 แล้วเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน และค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค จะได้กราฟมาตรฐานที่มีสมการเส้นตรง $y = 142625x - 1902.2$ และ Coefficient of determination (R^2) = 0.9998 ดังรูปที่ 3



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนความเข้มข้น 1 - 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ทดสอบความเที่ยงจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน 3 ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ได้แก่ 1.00, 3.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และตัวอย่างพริกไทยจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์แบบ Intra-day precision และแบบ Inter-day precision แล้วนำผลการวิเคราะห์มารายงานผลในรูปของ %Relative standard deviation (%RSD) จากผลการทดลองตารางที่ 3 จะเห็นว่าค่า %RSD ของ Intra-day และ Inter-day precision ของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนทั้ง 3 ความเข้มข้น และของตัวอย่างสารสกัดพริกไทยที่วิเคราะห์ได้มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.36 - 2.50 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 5% [21] แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยงสูง

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความเที่ยง Intra-day และ Inter-day precision ของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนและในตัวอย่างสารสกัดพริกไทย (n = 6)

สารละลาย มาตรฐาน พิเพอร์รีน/ ตัวอย่าง (mg/L)	Intra-day (n = 6)						Inter-day (n =18)	
	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3			
	Mean ± SD	%RSD	Mean ± SD	%RSD	Mean ± SD	%RSD	Mean ± SD	%RSD
1.00	1.01± 0.01	1.21	1.01 ± 0.01	1.23	1.02 ± 0.01	1.23	1.01 ± 0.01	0.40
3.00	2.99 ± 0.02	0.65	2.99 ± 0.02	0.69	3.02 ± 0.02	0.75	3.00 ± 0.01	0.49
5.00	5.02 ± 0.03	0.64	5.02 ± 0.03	0.56	5.06 ± 0.02	0.36	5.04 ± 0.02	0.45
Sample 1	4.53 ± 0.08	1.65	4.68 ± 0.08	1.70	4.65 ± 0.09	1.98	4.59 ± 0.07	1.44
Sample 2	3.77 ± 0.09	2.50	3.71 ± 0.05	1.25	3.68 ± 0.04	1.07	3.72 ± 0.09	1.18

3.3 การทดสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของผลทดสอบ เป็นคุณสมบัติที่แสดงความใกล้เคียงของค่าที่วิเคราะห์ได้ ด้วยวิธีการทดสอบนั้นกับค่าอ้างอิงหรือค่าจริง สำหรับงานวิจัยนี้เนื่องจากไม่สามารถหาสารมาตรฐานอ้างอิงได้ จึงทำการเติมสารมาตรฐานพิเพอร์รีน 3 ความเข้มข้น ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ได้แก่ 1.00, 3.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างก่อนการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณพิเพอร์รีน แล้วจึงคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 100.25 - 101.65% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตาม AOAC guidelines for single laboratory (2019) [20] ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของสารพิเพอร์รีนในตัวอย่างสารสกัดพริกไทย

ความเข้มข้นของสารพิเพอร์รีนที่เติม (mg/L)	ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)	%RSD
1.00	100.25 $\pm$ 0.23	0.23
3.00	101.01 $\pm$ 1.33	1.31
5.00	101.65 $\pm$ 0.82	0.81

3.4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) และการประมาณค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และการประมาณค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของสารพิเพอร์รีน โดยคำนวณจากสมการในข้อ 2.5.4 เพื่อหาค่า LOD และ LOQ พบว่าเมื่อนำตัวอย่างพริกไทยที่ถูกสกัดพิเพอร์รีน (Sample blank) มาสกัดและวิเคราะห์ขีดจำกัดของการตรวจพบของพิเพอร์รีนเท่ากับ 0.99 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าประมาณขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 1.09 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และการประมาณค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของพิเพอร์รีน

ลำดับ	ปริมาณพิเพอร์รีน (mg/L)
1	0.980
2	0.964
3	0.950
4	0.963
5	0.940
6	0.939
7	0.953
8	0.945
9	0.944
10	0.938
เฉลี่ย ($\bar{X}$)	0.952
SD	0.0135
%RSD	1.419
LOD = ($\bar{X} + 3SD$)	0.99
การประมาณค่า LOQ=($\bar{X} + 10SD$)	1.09

จากนั้นพิสูจน์ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ โดยทำการเติมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนที่ได้จากการคำนวณที่ระดับความเข้มข้น 1.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในตัวอย่างพริกไทยที่มีพิเพอร์รีนปริมาณต่ำ จำนวน 7 หลอด และนำไปวิเคราะห์ปริมาณพิเพอร์รีนด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับของสารพิเพอร์รีนอยู่ในช่วง 98.95 - 101.01 และมีค่า %RSD เท่ากับ 0.83 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตาม AOAC guidelines for single laboratory (2019) ที่กำหนดให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 92 - 105 และค่า %RSD ≤ 3 แสดงผลดังตารางที่ 6 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์พิเพอร์รีนมีความถูกต้องและมีความเที่ยงที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 การพิสูจน์ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของสารพิเพอร์รีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นที่พิสูจน์	ปริมาณพิเพอร์รีน		
	No.	%Recovery	ปริมาณสารพิเพอร์รีนในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (mg/L)
ความเข้มข้นที่เติม (1.09 mg/L)	1	100.27	1.08
	2	101.01	1.07
	3	99.57	1.08
	4	99.50	1.09
	5	100.88	1.07
	6	99.15	1.09
	7	98.95	1.09
เฉลี่ย ($\bar{X}$)			1.08
SD			0.0089
%RSD			0.83

3.5 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด

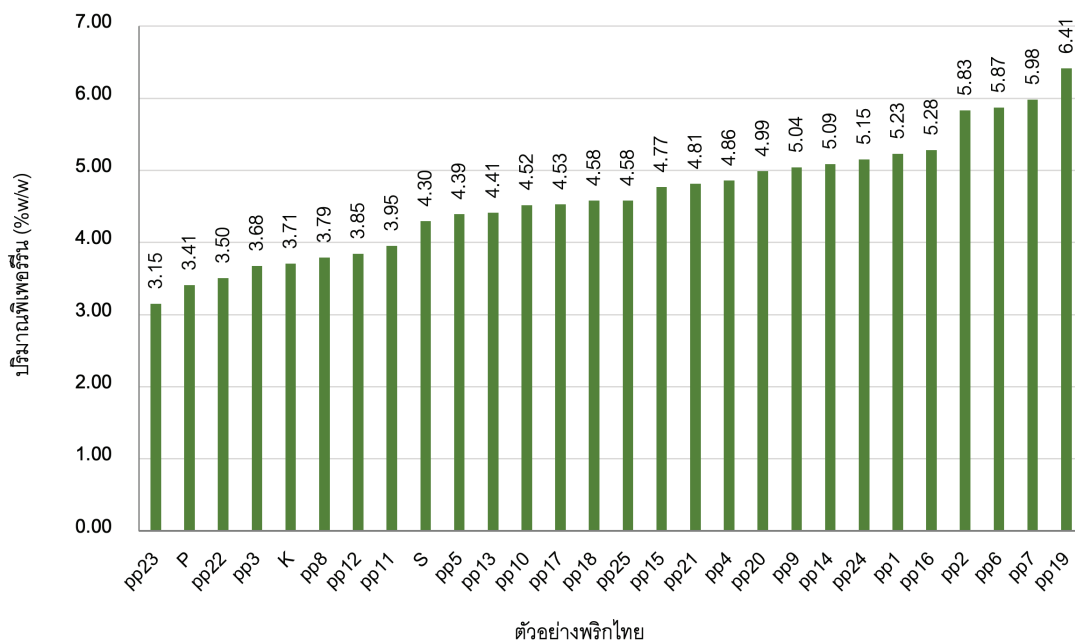
จากผลการทดลอง สามารถประมาณค่าไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยโดยเทคนิค HPLC โดยค่าความไม่แน่นอนแต่ละแหล่ง ค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($k = 2$) และร้อยละความไม่แน่นอน แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิเพอร์รีนในพริกไทยดำด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography

แหล่งของค่าความไม่แน่นอน	ค่าที่คำนวณได้
1. ความไม่แน่นอนจากความเอนเอียง, $u(R)$	0.0124
2. ความไม่แน่นอนจากความเที่ยง, $u(P)$	0.0123
3. ความไม่แน่นอนรวม, u_c (mg/L)	0.0523
4. ความไม่แน่นอนขยาย, U ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$)	0.1046 mg/L
5. ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน	3.0 mg/L
6. ร้อยละความไม่แน่นอน	3.49

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยดำจากแหล่งต่างๆ

จากการรวบรวมตัวอย่างพริกไทยดำจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ตัวอย่างพริกไทยดำทางการค้า 25 ตัวอย่าง และพริกไทยจากเกษตรกรผู้ปลูก 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 28 ตัวอย่าง นำมาสกัดและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้ผลแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าตัวอย่างพริกไทยดำทั้ง 28 ตัวอย่าง มีปริมาณสารพิเพอร์รีนอยู่ในช่วงร้อยละ 3.15 ถึง 6.41 โดยน้ำหนัก ($\bar{X}$ = 4.63 %w/w) ซึ่งผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) ที่กำหนดปริมาณพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 [13] จำนวน 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 71.4



รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยทั้ง 28 ตัวอย่าง

4. สรุป (Conclusion)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยดำด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยทำการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง ความเที่ยง ชีตจำกัดของการตรวจพบและชีตจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ และค่าประมาณความไม่แน่นอนของการวัด พบว่าผลที่วิเคราะห์ได้เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guidelines for single laboratory, validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals แสดงว่าวิธีวิเคราะห์สามารถใช้หาปริมาณพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทยดำจากแหล่งต่าง ๆ ได้ และมีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัดสูง โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความน่าเชื่อถือเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณพิเพอร์รีนในตัวอย่างพริกไทย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการควบคุมคุณภาพพริกไทย หรือเป็นวิธีอ้างอิงในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบได้

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัย และนวัตกรรม และขอบคุณบุคลากรศูนย์วิจัยและพัฒนาวัตถุุดิบและผลิตภัณฑ์ที่ร่วมแรงร่วมใจตลอดการทำวิจัย ขอขอบคุณผู้บังคับบัญชาและเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนการทำวิจัย และทำให้การดำเนินงานวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์, กรมศุลกากร. การส่งออกพริกไทยของไทย. 2562.
- [2] อารยา ข้อคำ. สารพฤกษเคมีจากพริกไทยดำและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2560;1(2):28-39.
- [3] Srinivasan K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. Crit Rev Food Sci Nutr. 2007;47(8):735-48. doi: 10.1080/10408390601062054.
- [4] Luerueang K, Rochoanapo M, Klangprapun S. Phytochemical composition and pharmacological activities of herbal ingredients in Trikatuk remedy. J Tradit Thai Med Res. 2019;5(2):1-19.
- [5] อุดมลักษณ์ อุ่นจิตต์วรรณะ, สานิตย์ สุขสวัสดิ์, อาภรณ์ เจียมสายใจ, มณี ชิงดวง. วิจัยชนิดและปริมาณสารสำคัญในพริกไทยพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆ และอายุแตกต่างกัน. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร; 2547.
- [6] Chopra B, Dhingra AK, Kapoor RP, Prasad DN. Piperine and its various physicochemical and biological aspects: A review. Open Chem J. 2016;3:1-8. doi: 10.2174/1874842201603010075.
- [7] Sozzi GO, Peter KV, Babu KN, Divakaran M. Capers and caperberries. In: Handbook of herbs and spices. 2nd ed. Cambridge: Elsevier; 2012. p. 193-224.
- [8] Pruthi JS. Major spices of India: Crop management and post-harvest technology. India: Allied Publishers; 1993.
- [9] Tavares WS, Cruz I, Petacci F, Freitas SS, Serrão JE, Zanon JC. Insecticide activity of piperine: Toxicity to eggs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and phytotoxicity on several vegetables. J Med Plants Res. 2011;5(21):5301-6.
- [10] Zarai Z, Boujelbene E, Salem NB, Gargouri Y, Sayari A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. LWT-Food Sci Technol. 2013;50(2):634-41. doi: 10.1016/j.lwt.2012.07.036
- [11] Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis Res Ther. 2009;11(2):R49. doi: 10.1186/ar2662.
- [12] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, สถาบันวิจัยสมุนไพร. คู่มือการตรวจวิเคราะห์ด้านเคมีของสมุนไพร เล่ม 2. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2564. น. 55.
- [13] กระทรวงอุตสาหกรรม. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 4552 (พ.ศ. 2556) เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมพริกไทย. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 130 ตอนพิเศษ 93 ง, 1 สิงหาคม 2556. 4.
- [14] American Spice Trade Association. ASTA analytical methods, Method 12.1: Piperine content of black and white pepper, their oleoresins and soluble pepper seasonings. 2018. p. 51-54.
- [15] Ministry of Public Health, Department of Medical Sciences, Bureau of Drug and Narcotics. Thai herbal pharmacopoeia. Bangkok: Ministry of Public Health; 2020.
- [16] Upadhyay V, Sharma N, Joshi HM, Malik A, Mishra M, Singh BP, et al. Development and validation of rapid RP-HPLC method for estimation of piperine in *Piper nigrum* L. Int J Herbal Med. 2013;1(4):6-9.
- [17] Shrestha S, Chaudhary N, Sah R, Malakar N. Analysis of piperine in black pepper by high performance liquid chromatography. J Nepal Chem Soc. 2020;41(1):80-6. doi: 10.3126/jncs.v41i1.30492.

- [18] Hamrapurkar PD, Jadhav K, Zine S. Quantitative estimation of piperine in *Piper nigrum* and *Piper longum* using high performance thin layer chromatography. *J Appl Pharm Sci.* 2011;1(3):117-20.
- [19] Banerjee S, Tudu B, Naskar H, Mandal D, Bandyopadhyay R, Das N, et al. Detection of piperine content in black pepper using a molecular imprinted poly(N,N-dimethylacrylamide) embedded graphite electrode: A machine learning based prediction approach. *Microchem J.* 2024;207:111914. doi: 10.1016/j.microc.2024.111914.
- [20] AOAC International. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Rockville (MD): AOAC International; 2019.
- [21] International Organization for Standardization (ISO). Pepper and pepper oleoresins – Determination of piperine content – Method using high-performance liquid chromatography. ISO 11027:1993. Geneva: ISO; 1993.
- [22] Barwick VJ, Ellison SLR. VAM Project 3.2.1 development and harmonisation of measurement uncertainty principles part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data version 5.1. LGC/VAM/1998/088. Teddington (UK): LGC (Teddington) Limited; 2000.