



ประกาศกรมวิทยาศาสตร์บริการ
เรื่อง ข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC
(DSS 9-2567)

พิเพอร์รีนเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในพริกไทย มักใช้สำหรับบ่งชี้ถึงคุณภาพของพริกไทย การวิเคราะห์สารพิเพอร์รีนในพริกไทยด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็วและจำเพาะเจาะจงสูง เพื่อให้วิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยด้วยเทคนิค HPLC มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการควบคุมคุณภาพพริกไทยของประเทศ กรมวิทยาศาสตร์บริการจึงประกาศข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC (DSS 9-2567) ไว้ดังต่อไปนี้

๑. วิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC ต้องมีคุณลักษณะตามรายละเอียดที่แนบท้ายประกาศนี้

๒. ผู้ผลิตรายใดที่มีความประสงค์จะใช้ข้อกำหนดคุณลักษณะตามประกาศนี้ สามารถระบุในผลิตภัณฑ์ ได้ว่า “คุณลักษณะของวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC เป็นไปตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์บริการ เรื่อง ข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC ฉบับลงวันที่ ๑ ตุลาคม ๒๕๖๗”

๓. ประกาศนี้เป็นข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC เท่านั้น มิใช่การกำหนดเป็นมาตรฐานหรือเป็นการบังคับตามกฎหมาย

ประกาศ ณ วันที่ ๑ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๖๗

(นายรุ่งเรือง กิจผาติ)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์บริการ

เอกสารแนบท้ายประกาศ

ข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC

แนบท้ายประกาศกรมวิทยาศาสตร์บริการ ลงวันที่ 9 ตุลาคม ๒๕๖๗

1. ขอบข่าย

ข้อกำหนดคุณลักษณะนี้ครอบคลุมเฉพาะวิธีการทดสอบหาปริมาณพิเพอร์รีนในวัตถุดิบพริกไทยแห้งด้วยเทคนิค HPLC

2. เอกสารอ้างอิง

2.1 ISO 11027:1993, International Standard : Pepper and pepper oleoresins - Determination of piperine content - Method using high-performance liquid chromatography

2.2 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พริกไทย เล่ม 297-2556

2.3 Development and validation of rapid RP-HPLC method for estimation of piperine in *Piper nigrum* L.. Upadhyay, V., Sharma, N., Joshi, H. M., Malik, A., Mishra, M., Singh, B. P., & Tripathi, S. International Journal of Herbal Medicine, 1(4), (2013): 6-9.

2.4 Analysis of piperine in black pepper by high performance liquid chromatography. Shrestha, S., Chaudhary, N., Sah, R., & Malakar, N. Journal of Nepal Chemical Society, 41(1), (2020): 80-86.

2.5 คู่มือการตรวจวิเคราะห์ด้านเคมีของสมุนไพร (เล่ม 1) สถาบันวิจัยสมุนไพร นนทบุรี : สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2564. 55 หน้า.

3. หลักการ

พริกไทย มีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ พิเพอร์รีน และน้ำมันหอมระเหย พิเพอร์รีนจัดเป็นสารประกอบประเภทแอลคาลอยด์ อยู่ในกลุ่มพิเพอริดีน ซึ่งปริมาณพิเพอร์รีนเป็นสารที่ใช้บ่งชี้ถึงคุณภาพของพริกไทย การวิเคราะห์สารพิเพอร์รีนในพริกไทยตามวิธีมาตรฐานส่วนใหญ่ใช้เทคนิค UV-Vis Spectrophotometry เทคนิคนี้จะให้ผลการวิเคราะห์เป็นปริมาณพิเพอร์รีนรวม ซึ่งรวมถึงอนุพันธ์ของพิเพอร์รีนด้วย ทำให้การวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ ดังนั้น ข้อกำหนดคุณลักษณะวิธีการทดสอบพิเพอร์รีนนี้จึงเลือกใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) วิเคราะห์สารพิเพอร์รีนในพริกไทย ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง รวดเร็ว และมีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการควบคุมคุณภาพพริกไทย

4. สารเคมี และตัวทำละลาย

4.1 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานพิเพอร์รีนที่มีความบริสุทธิ์อย่างน้อย ร้อยละ 97

4.2 ตัวทำละลาย

4.2.1 เมทานอล HPLC grade

4.2.2 อะซีโตไนไตรล์ HPLC grade

4.2.3 กรดแกลเซียลแอซีติก analytical grade

4.3 สารละลายตัวพา (mobile phase)

ตัวทำละลายผสมของอะซีโตไนไตรล์ น้ำ และกรดแกลเซียลแอซีติก อัตราส่วน 60:39.5:0.5

5. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

5.1 ขวดรูปخمพู่ ขนาด 125 mL

5.2 ขวดปรับปริมาตร class A ขนาด 5 และ 10 mL

5.3 ปิเปต (volumetric pipette) class A ขนาด 50 mL

5.4 ไมโครปิเปต ขนาด 20-200 μ L และ 100-1,000 μ L

5.5 กระจาดกรอง เบอร์ 4

5.6 เยื่อกรองชนิดที่ต่อตรงเข้ากับกระบอกฉีดยา (syringe filter membrane) ขนาดรูพรุน 0.22 μ m

5.7 โถดูดความชื้น

5.8 ตะแกรงร่อน (test sieve) ขนาด 300 μ m

5.9 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5.10 อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath)

5.11 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)

5.12 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) พร้อมตัวตรวจวัดชนิด photo diode array (PDA) หรือเทียบเท่า

5.13 คอลัมน์ชนิด C18 ความยาว 150 mm เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.9 mm ขนาดอนุภาค 5 μ m

5.14 ตู้อบไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 105 °C \pm 2 °C

5.15 อะลูมิเนียมฟอยล์

5.16 พาราฟิล์ม

6. วิธีการทดสอบ

6.1 สภาวะของเครื่องมือที่ใช้ทดสอบ

การทดสอบหาปริมาณพิเพอร์รีนด้วยเครื่อง HPLC ทำโดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 โดยใช้ตัวทำละลายผสมของอะซีโตไนโตรล์ น้ำ และกรดแกลเซียลแอซีติก ในอัตราส่วน 60:39.5:0.5 เป็นสารละลายตัวพา ใช้อัตราการไหล 1 mL/min ปริมาตรการฉีด 20 μ L ตัวตรวจวัดชนิด PDA หรือเทียบเท่า ที่ความยาวคลื่น 340 nm

6.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

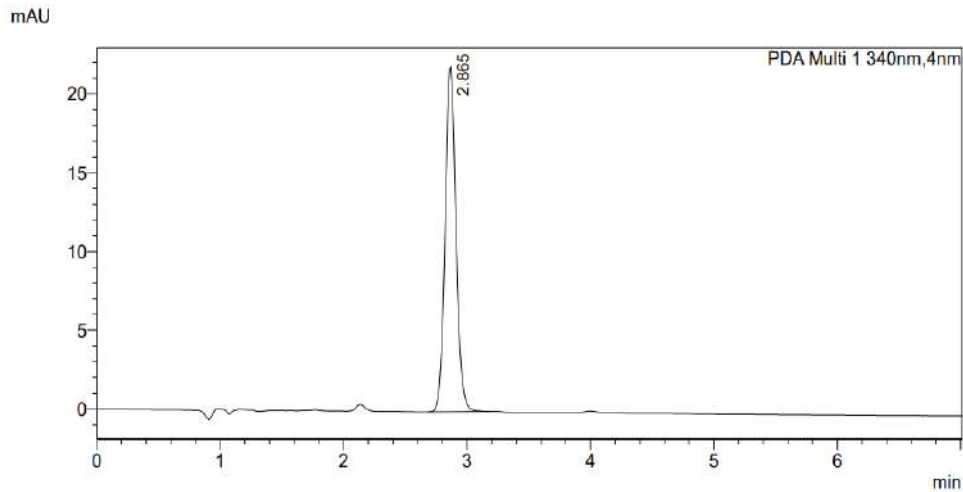
เตรียมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 1,000 mg/L (stock solution) โดยชั่งสารมาตรฐานพิเพอร์รีน 0.0100 g ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเมทานอล ในกรณีที่สารมาตรฐานพิเพอร์รีนมีความบริสุทธิ์น้อยกว่าร้อยละ 100 ให้นำร้อยละความบริสุทธิ์ (%assay) มาคำนวณดังสมการ

$$C = \frac{w \times P \times 10^4}{V}$$

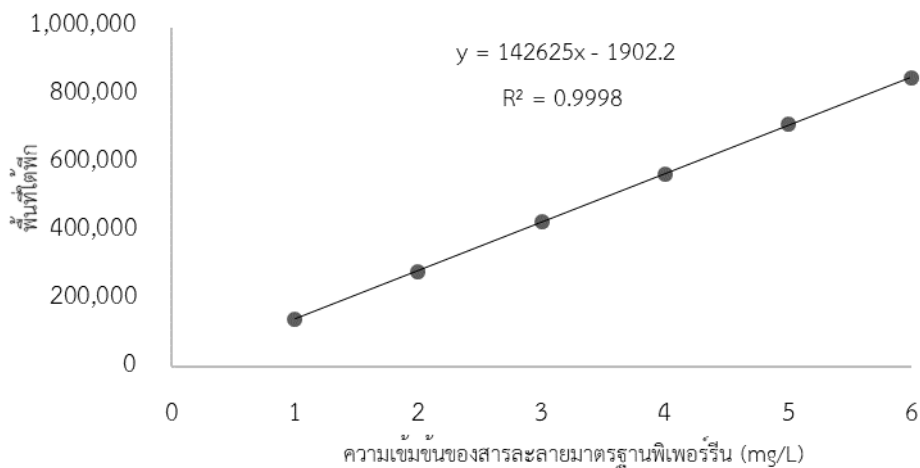
- เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน เป็น มิลลิกรัมต่อลิตร
 w = น้ำหนักของสารมาตรฐานพิเพอร์รีน เป็น กรัม
 P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานพิเพอร์รีน (%assay)
 V = ปริมาตรสารมาตรฐานพิเพอร์รีนที่ต้องการเตรียม เป็น มิลลิลิตร

จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100 mg/L โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีนความเข้มข้น 1,000 mg/L ปริมาตร 500 μ L ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 mL และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเมทานอล

เตรียมสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 และ 6 mg/L เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 50 100 150 200 250 และ 300 μ L ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 mL และปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเมทานอล นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้แต่ละความเข้มข้น กรองด้วยเยื่อกรองชนิดที่ต่อตรงเข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาดรูพรุน 0.22 μ m นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC เพื่อให้ได้พื้นที่พีกดังรูป 1 จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้น และพื้นที่พีกของสารมาตรฐานทั้ง 6 ความเข้มข้น ดังรูป 2 คำนวณหาสมการเส้นตรง (regression equation) และหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น (coefficient of determination, R^2)



รูป 1 HPLC โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน
(ข้อ 6.2)



รูป 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานพิเพอร์รีน
(ข้อ 6.2)

7. การเตรียมตัวอย่าง

7.1 นำตัวอย่างพริกไทยแห้งมาบดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 300 μm ใส่ภาชนะปิดสนิท เก็บตัวอย่างไว้ในโถดูดความชื้น

7.2 นำตัวอย่างพริกไทยไปอบในตู้อบไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้ที่ $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ซึ่งแล้วอบซ้ำจนมวลที่ชั่งได้ 2 ครั้งติดต่อกันต่างกันไม่เกิน 0.5 mg/g

7.3 ชั่งตัวอย่างที่ได้จากข้อ 7.2 จำนวน 0.2 g ให้ทราบมวลแน่นอนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 mL เติมตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 50 mL ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และปิดทับด้วยพาราฟิล์ม นำไปสกัดในอ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 30 นาที

7.4 กรองสารสกัดที่ได้จากข้อ 7.3 ลงในขวดสีชาด้วยกระดาษกรอง และทำการทดสอบต่อไป

7.5 การหาปริมาณพิเพอร์รีนในสารละลายตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 7.4 ปริมาตร 100 μL ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 mL ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองด้วยเยื่อกรองชนิดที่ต่อตรงเข้ากับกระบอกฉีดยา ขนาดรูพรุน 0.22 μm และนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC นำพื้นที่ฟีกของสารตัวอย่างที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณพิเพอร์รีนจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานจากข้อ 6.2

8. การคำนวณหาปริมาณพิเพอร์รีน

8.1 สร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานพิเพอร์รีนที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ตามข้อ 6.2 เพื่อให้ได้สมการเส้นตรง โดยค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (coefficient of determination, R^2) ต้องไม่น้อยกว่า 0.995

8.2 คำนวณหาปริมาณพิเพอร์รีน จากสมการ

$$A = \left[\left(\frac{C_x \times V}{m} \right) \times D \times 10^{-4} \right]$$

เมื่อ	A	คือ	ปริมาณพิเพอร์รีน เป็น ร้อยละโดยมวล
	C_x	คือ	ความเข้มข้นของพิเพอร์รีนที่คำนวณจากกราฟมาตรฐาน เป็น มิลลิกรัมต่อลิตร
	V	คือ	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการสกัด (จากข้อ 7.3) เป็น มิลลิลิตร
	m	คือ	มวลของตัวอย่าง เป็น กรัม
	D	คือ	แฟกเตอร์การเจือจาง (dilution factor) ของสารละลายตัวอย่าง

8.3 ปริมาณพิเพอร์รีนที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ต้องมีค่า %RSD ไม่มากกว่า 5.0 ของการวิเคราะห์ตัวอย่างอย่างน้อย 3 ครั้ง

9. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิจาก มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร สถาบันอาหาร และบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด