

DOI: <https://doi.org/10.59294/HIUJS.KHTT.2026.024>

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP HPLC-UV ĐỊNH LƯỢNG PIPERINE TRONG QUẢ TIÊU LỐT (*Piper longum* L.)

Phan Nguyễn Thu Xuân*, Bùi Thế Vinh, Nguyễn Hữu Phúc, Võ Sỹ Nhật
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tiêu lốt (*Piper longum* L.) là dược liệu có giá trị trong y học cổ truyền, piperine là alkaloid chính và có thể được sử dụng như một chỉ thị hóa học trong đánh giá chất lượng dược liệu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC-UV định lượng piperine trong quả tiêu lốt. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng nghiên cứu là quy trình định lượng piperine trong quả tiêu lốt bằng HPLC-UV. Điều kiện sắc ký được thiết lập trên cột Shim-pack GIST C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm), pha động methanol:nước (80:20, v/v), bước sóng phát hiện 340 nm, tốc độ dòng 1.0 mL/phút, nhiệt độ cột 35°C, thể tích tiêm 20 μL và thời gian phân tích 10 phút. Phương pháp được thẩm định các chỉ tiêu tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng. **Kết quả và phát hiện chính:** Phương pháp cho tính tuyến tính tốt trong khoảng 5.25 - 84 μg/mL với $R^2 = 0.9999$; LOD và LOQ lần lượt là 1.0444 μg/mL và 3.1650 μg/mL; độ chính xác đạt RSD 1.89%; độ đúng có tỷ lệ phục hồi 97.8 - 101.3%; hàm lượng piperine trung bình là 4.314%. **Kết luận và kiến nghị:** Quy trình định lượng có độ tin cậy tốt, điều kiện phân tích đơn giản và có thể ứng dụng trong định lượng piperine để kiểm soát chất lượng dược liệu tiêu lốt; cần tiếp tục khảo sát nhiều lô mẫu khác nhau để mở rộng khả năng ứng dụng của phương pháp.

Từ khóa: tiêu lốt; piperine, HPLC-UV, thẩm định phương pháp, định lượng

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC-UV METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF PIPERINE IN FRUITS OF *Piper longum* L.

Phan Nguyen Thu Xuan, Bui The Vinh, Nguyen Huu Phuc, Vo Sy Nhat

ABSTRACT

Background: *Piper longum* L. is a medicinal plant of value in traditional medicine, in which piperine is the major alkaloid and can be used as a chemical marker for herbal quality assessment. **Objective:** To develop and validate an HPLC-UV method for the quantification of piperine in the fruits of *Piper longum* L. **Materials and Methods:** The study focused on an HPLC-UV procedure for piperine determination in *Piper longum* fruits. Chromatographic separation was performed on a Shim-pack GIST C18 column (250 × 4.6 mm; 5 μm) using methanol:water (80:20, v/v) as the mobile phase, with a detection wavelength of 340 nm, a flow rate of 1.0 mL/min, a column temperature of 35 °C, an injection volume of 20 μL, and an analysis time of 10 min. The method was validated for system suitability, specificity, linearity, accuracy, precision, limit of detection, and limit of quantification. **Results:** Good linearity was obtained over 5.25 - 84 μg/mL with $R^2 = 0.9999$. The LOD and LOQ were 1.0444 μg/mL and 3.1650 μg/mL, respectively. Precision showed an RSD of 1.89%, recovery ranged from 97.8 to 101.3%, and the average piperine content in the herbal sample was 4.314%. **Conclusions and Recommendations:** The developed HPLC-UV method is reliable, simple, and suitable for piperine quantification in *Piper longum* fruits for herbal quality control; further studies on more sample batches are recommended to expand its practical applicability.

Keywords: *Piper longum* L., piperine; HPLC-UV, method validation, quantification

* Tác giả liên hệ: Phan Nguyễn Thu Xuân, Email: xuanpnt@hiu.vn
(Ngày nhận bài: 26/3/2026; Ngày nhận bản sửa: 09/4/2026; Ngày duyệt đăng: 13/4/2026)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu lốt (*Piper longum* L., họ Piperaceae) là dược liệu được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền và cũng là nguyên liệu có giá trị trong nhiều chế phẩm thảo dược [1 - 3]. Trong thành phần hóa học của *Piper longum*, piperine được xem là một trong những alkaloid chính, đồng thời có thể được lựa chọn như một chỉ thị hóa học quan trọng trong đánh giá chất lượng dược liệu. Hợp chất này góp phần vào nhiều tác dụng sinh học đã được ghi nhận như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, bảo vệ gan và tăng sinh khả dụng của một số hoạt chất khác [3 - 5]. Do đó, việc xây dựng một phương pháp định lượng piperine có độ tin cậy cao là cần thiết nhằm phục vụ kiểm soát chất lượng dược liệu và các chế phẩm có chứa tiêu lốt.

Mặc dù piperine trong *Piper longum* đã được xác định bằng nhiều kỹ thuật như HPLC-ESI-MS/MS, UFLC-ESI-MS/MS và RP-HPLC [6 - 8], các công bố trước chủ yếu tập trung vào phân tích đồng thời nhiều hợp chất, nên mẫu phối hợp hoặc sử dụng các điều kiện sắc ký tương đối chuyên biệt. Những đặc điểm này cho thấy việc định lượng piperine là khả thi, nhưng đồng thời cũng cho thấy nhu cầu xây dựng một phương pháp HPLC-UV đơn giản hơn, sử dụng hệ dung môi thông dụng và dễ triển khai trong điều kiện kiểm nghiệm thường quy đối với dược liệu quả tiêu lốt. Để phương pháp có thể được ứng dụng trong kiểm soát chất lượng, việc thẩm định theo các chỉ tiêu thích hợp như tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng là cần thiết [9].

Tại Việt Nam, việc xác định hàm lượng piperine trong nguyên liệu thuộc chi Piper đã được tiếp cận thông qua các tài liệu tiêu chuẩn và một số nghiên cứu trong nước, chủ yếu trên hồ tiêu. Những tài liệu này cho thấy piperine là chỉ thị hóa học phù hợp để phục vụ đánh giá chất lượng nguyên liệu và đồng thời gợi ý cơ sở tham khảo cho việc lựa chọn điều kiện phân tích trong phòng kiểm nghiệm [10 - 12]. Tuy nhiên, dữ liệu dành riêng cho tiêu lốt (*Piper longum*) vẫn còn hạn chế, đặc biệt đối với quy trình HPLC-UV được xây dựng theo hướng đơn giản, dễ triển khai và phù hợp với điều kiện kiểm nghiệm thường quy trong nước. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC-UV định lượng piperine trong quả tiêu lốt, làm cơ sở cho kiểm soát chất lượng và bước đầu hỗ trợ xây dựng tiêu chuẩn cơ sở đối với dược liệu này [9].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Quy trình định lượng piperine trong dược liệu tiêu lốt (*Piper longum* L.) bằng phương pháp HPLC-UV, bao gồm việc xây dựng điều kiện sắc ký phù hợp và thẩm định phương pháp theo các chỉ tiêu cần thiết đối với phép phân tích định lượng.

Mẫu dược liệu sử dụng trong nghiên cứu là quả tiêu lốt (*Piper longum* L.) được thu hái tại xã Tân Thạnh Tây, huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu được định danh tên khoa học tại Trung tâm Sâm và Dược liệu Thành phố Hồ Chí Minh. Sau khi thu hái, mẫu được làm sạch, phơi hoặc sấy khô, xay nhỏ thành bột dược liệu tương đối đồng nhất, sau đó bảo quản trong điều kiện phòng thí nghiệm đến khi phân tích. Mẫu dược liệu sử dụng trong nghiên cứu được ghi nhận có độ ẩm 10.86% trước khi tiến hành phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất, chất chuẩn và thiết bị

Chất chuẩn piperine (CAS: 94 - 62 - 2, độ tinh khiết 98.0%, Adamas-beta, Trung Quốc), methanol đạt cấp HPLC grade (Merck, Đức) và nước cất 2 lần điều chế tại phòng thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu.

Hệ thống phân tích sử dụng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-2030, cột Shim-pack GIST C18 (250 × 4.6 mm; 5 μm), máy quang phổ UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Nhật), cân phân tích Shimadzu UniBloc (Nhật Bản), bể siêu âm Elmasonic S 180 H (Elma, Đức), các dụng cụ thủy tinh thông thường trong phòng thí nghiệm.

2.2.2. Chuẩn bị dung dịch chuẩn

Cân chính xác 2.1 mg chất chuẩn piperine, hòa tan trong methanol và định mức đến 10 mL trong bình định mức để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 210 $\mu\text{g/mL}$. Dung dịch được siêu âm đến khi hòa tan hoàn toàn. Từ dung dịch chuẩn gốc, pha loãng bằng methanol để thu dãy dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ từ 5.25 đến 84 $\mu\text{g/mL}$, dùng cho khảo sát tính tuyến tính của phương pháp. Trước khi tiêm vào hệ thống HPLC, các dung dịch chuẩn được lọc qua màng lọc 0.45 μm .

2.2.3. Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Cân chính xác 0.36 g bột tiêu lốt (độ ẩm 10.86%), cho vào bình thích hợp, chiết siêu âm 3 lần, mỗi lần với 15 mL methanol, ở 40°C. Gộp các dịch chiết, chuyển vào bình định mức 50 mL và thêm methanol đến vạch. Hút chính xác 1.2 mL dịch chiết, chuyển vào bình định mức 50 mL, thêm methanol đến vạch, lắc đều và lọc qua màng lọc 0.45 μm trước khi phân tích bằng HPLC. Methanol được sử dụng làm dung môi pha mẫu do phù hợp với tính tan của piperine và tương thích với hệ pha động đã lựa chọn [13, 14].

2.2.4. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Điều kiện sắc ký được khảo sát trên cột C18, ưu tiên hệ pha động methanol:nước và bước sóng 340 - 343 nm theo các công bố trước [13, 14]. Điều kiện được chọn gồm cột Shim-pack GIST C18 (250 \times 4.6 mm; 5 μm), pha động methanol:nước (80:20, v/v), bước sóng 340 nm, tốc độ dòng 1.0 mL/phút, nhiệt độ cột 35°C, thể tích tiêm 20 μL và thời gian phân tích 10 phút.

2.2.5. Thẩm định phương pháp phân tích

Phương pháp HPLC-UV được thẩm định theo hướng dẫn ICH Q2(R1) [9] với các chỉ tiêu gồm tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Tính tương thích hệ thống: Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn và 6 lần dung dịch mẫu thử, đánh giá thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết và hệ số đối xứng. Hệ thống đạt yêu cầu khi RSD không vượt quá 2.0%.

Tính đặc hiệu: So sánh sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Phương pháp đạt yêu cầu khi mẫu trắng không xuất hiện pic trùng thời gian lưu với piperine, pic piperine trong mẫu thử có thời gian lưu tương đương mẫu chuẩn và diện tích pic tăng tương ứng sau khi thêm chuẩn.

Tính tuyến tính: Được đánh giá từ dãy dung dịch chuẩn piperine 5.25 - 84 $\mu\text{g/mL}$ thông qua mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic, với yêu cầu hệ số tương quan $R^2 \geq 0.998$ [9].

LOD và LOQ: Được xác định dựa trên độ dốc đường chuẩn và độ lệch chuẩn của tín hiệu đáp ứng theo hướng dẫn ICH Q2(R1) [9].

Độ chính xác: Được đánh giá trên 6 dung dịch mẫu thử chuẩn bị độc lập, biểu thị bằng RSD, với yêu cầu không vượt quá 2.7%.

Độ đúng: Độ đúng được đánh giá bằng phương pháp thêm chuẩn ở 3 mức 80%, 100% và 120% ($n = 3$). Dung dịch mẫu thử được thêm lần lượt 0.0540 mL, 0.0671 mL và 0.0805 mL dung dịch chuẩn piperine 5.45 mg/mL, sau đó định mức bằng methanol, lọc qua màng 0.45 μm và phân tích bằng HPLC-UV. Kết quả được biểu thị bằng tỷ lệ phục hồi (%) với yêu cầu nằm trong khoảng 97 - 103%.

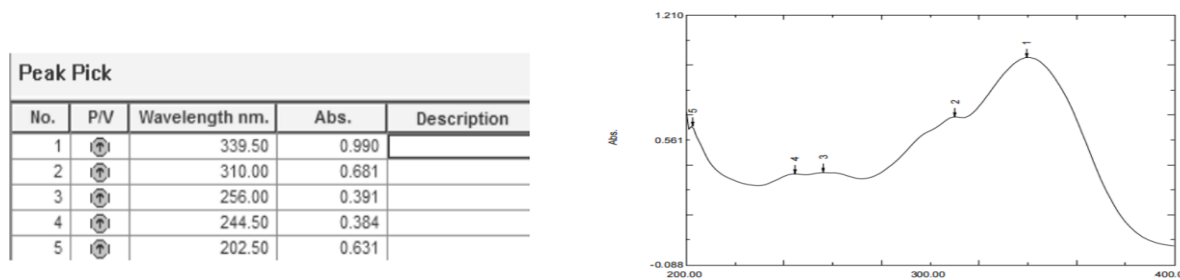
2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng Microsoft Excel và biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn. Phương trình hồi quy tuyến tính được sử dụng để đánh giá tính tuyến tính và tính hàm lượng piperine trong mẫu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc ký

Phổ hấp thu UV của piperine cho thấy bước sóng 340 nm cho tín hiệu phù hợp để theo dõi chất phân tích (Hình 1). Trên cơ sở đó, các điều kiện sắc ký khác nhau được khảo sát và so sánh về độ phân giải, thời gian lưu, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết (Bảng 1). Kết quả cho thấy điều kiện số 9, gồm pha động methanol:nước (80:20, v/v), nhiệt độ cột 35°C và tốc độ dòng 1.0 mL/phút, cho pic piperine có thời gian lưu 6.749 phút, hệ số đối xứng 1.015 và số đĩa lý thuyết 7141, đồng thời bảo đảm thời gian phân tích ngắn. Vì vậy, điều kiện này được lựa chọn cho các bước thẩm định tiếp theo.



Hình 1. Phổ hấp thu của piperine chọn được bước sóng phát hiện 340 nm

Bảng 1. Các điều kiện sắc ký được khảo sát và thông số sắc ký tương ứng

Điều kiện sắc ký	Tỷ lệ pha động (CH ₃ OH : H ₂ O)	Nhiệt độ cột (°C)	Tốc độ dòng (mL/phút)	Độ phân giải (R _s)	Thời gian lưu (t _R)	Hệ số đối xứng (A _s)	Số đĩa lý thuyết (N)
1	70:30	25	1.0	4.671	14.043	1.002	7226
2	70:30	30	1.0	4.716	13.076	0.985	7723
3	70:30	35	1.0	4.339	11.960	1.005	6563
4	75:25	25	1.0	3.490	9.626	1.006	7199
5	75:25	30	1.0	3.616	9.213	0.980	7986
6	75:25	35	1.0	3.123	8.513	1.021	6074
7	80:20	25	1.0	3.858	8.532	1.041	7152
8	80:20	30	1.0	2.551	7.003	1.011	6996
9	80:20	35	1.0	2.573	6.749	1.015	7141

3.2. Thẩm định quy trình định lượng

3.2.1. Tính tương thích hệ thống

Tính tương thích hệ thống được đánh giá bằng cách tiêm lặp lại 6 lần mẫu chuẩn và 6 lần mẫu thử, theo dõi các thông số gồm thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết.

Bảng 2. Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống của mẫu chuẩn piperine

Lần bơm	t _R	S	A _s	N
1	6.758	1,177,225	1.005	6,636
2	6.760	1,182,390	1.008	6,583
3	6.757	1,180,096	1.010	6,622
4	6.751	1,182,988	1.014	6,591
5	6.754	1,180,766	1.016	6,600
6	6.752	1,184,826	1.017	6,612
X̄	6.755	1,181,382	1.012	6,607
RSD (%)	0.05	0.23	0.47	0.30

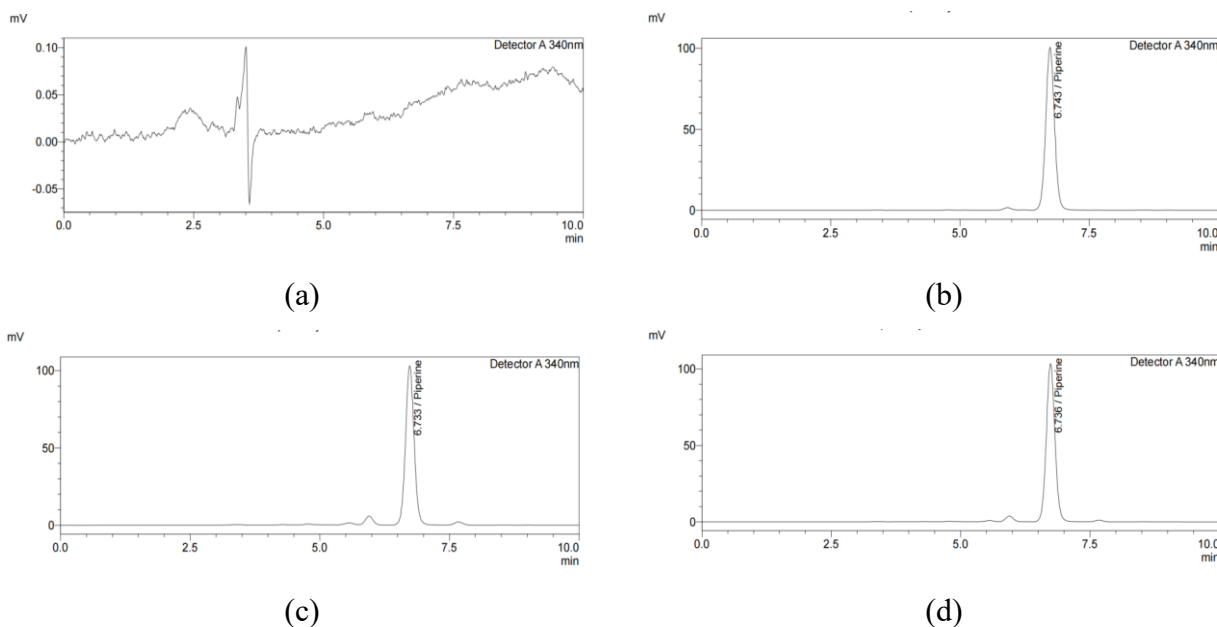
Bảng 3. Kết quả thẩm định tính tương thích hệ thống của mẫu thử piperine

Lần bơm	t _R	S	As	N
1	6.747	1,153,164	1.017	6,936
2	6.749	1,150,230	1.018	6,938
3	6.747	1,154,187	1.018	6,884
4	6.748	1,153,713	1.019	6,899
5	6.751	1,153,164	1.019	6,898
6	6.743	1,153,932	1.020	6,934
X̄	6.748	1,153,065	1.019	6,915
RSD (%)	0.04	0.13	0.10	0.34

Kết quả ở Bảng 2 và Bảng 3 cho thấy các thông số sắc ký của cả mẫu chuẩn và mẫu thử đều ổn định, với RSD của thời gian lưu, diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết đều nhỏ hơn 2.0%. Cụ thể, đối với mẫu chuẩn thời gian lưu trung bình là 6.755 phút và đối với mẫu thử thời gian lưu trung bình là 6.748 phút. Những kết quả này chứng tỏ hệ thống HPLC hoạt động ổn định và đáp ứng yêu cầu sử dụng cho phép định lượng piperine.

3.2.2. Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu của phương pháp được khảo sát thông qua so sánh sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn (Hình 2). Kết quả cho thấy mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của piperine, trong khi mẫu thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với mẫu chuẩn. Ở mẫu thử thêm chuẩn, thời gian lưu của piperine hầu như không thay đổi so với mẫu thử, cho thấy tính ổn định của hệ sắc ký đối với chất phân tích. Do lượng chuẩn thêm vào được lựa chọn ở mức nồng độ cùng bậc với mẫu thử, diện tích pic tăng theo chiều hướng phù hợp nhưng không chênh lệch quá lớn. Các dữ liệu này cho thấy pic piperine được tách khỏi nền mẫu và không bị nhiễu bởi các thành phần khác, chứng minh phương pháp đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

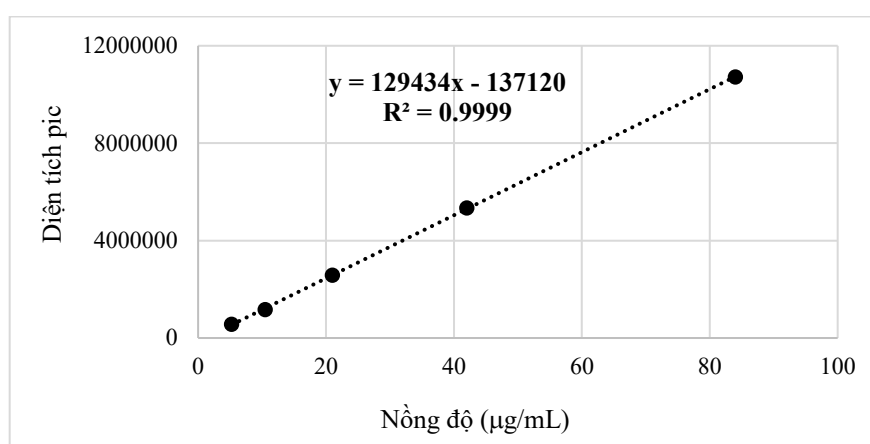
**Hình 2.** Sắc ký đồ (a) mẫu trắng, (b) mẫu chuẩn, (c) mẫu thử, (d) mẫu thêm chuẩn

3.2.3. Tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Đường chuẩn piperine được thiết lập trên 5 mức nồng độ 5.25; 10.5; 21; 42 và 84 $\mu\text{g/mL}$. Diện tích pic tăng tuyến tính theo nồng độ trong khoảng khảo sát (Bảng 4, Hình 3).

Bảng 4. Tương quan nồng độ và diện tích pic chuẩn piperine

STT	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic
1	5.25	560,859
2	10.5	1,172,838
3	21	2,585,922
4	42	5,342,998
5	84	10,717,093



Hình 3. Đồ thị thể hiện mối tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ

Phương trình hồi quy thu được là $y = 129434x - 137120$, với hệ số tương quan $R^2 = 0.9999$, cho thấy mối tương quan tuyến tính rất chặt chẽ giữa nồng độ piperine và đáp ứng sắc ký.

Từ độ lệch chuẩn của đáp ứng và độ dốc đường chuẩn, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp được xác định lần lượt là 1.0444 µg/mL và 3.1650 µg/mL. Kết quả này cho thấy phương pháp có độ tuyến tính tốt và độ nhạy phù hợp cho mục tiêu định lượng piperine trong dược liệu tiêu lốt.

3.2.4. Độ chính xác

Độ chính xác của phương pháp được đánh giá qua độ lặp lại trên 6 mẫu thử chuẩn bị độc lập (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp đối với mẫu thử piperine

STT	Khối lượng cân được liệu (g)	Diện tích pic	Nồng độ piperine (µg/mL)	Hàm lượng piperine (%)
1	0.3598	832973	7.4949	4.3397
2	0.3608	824022	7.4257	4.2878
3	0.3603	809929	7.3168	4.2308
4	0.3603	808254	7.3039	4.2233
5	0.3603	842277	7.5668	4.3753
6	0.3605	854783	7.6634	4.4287
X̄	0.3603	828706	7.4619	4.3143
RSD (%)	0.091	2.21	1.9	1.89

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy hàm lượng piperine xác định được dao động từ 4.2233% đến 4.4287%, với giá trị trung bình là 4.3143% và RSD là 1.89%. Giá trị RSD nhỏ hơn giới hạn chấp nhận cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt, phù hợp để áp dụng cho phân tích định lượng thường quy.

3.2.5. Độ đúng

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng đối với piperine

Mức thêm chuẩn (%)	Khối lượng cân của dược liệu (g)	Thể tích dung dịch chuẩn piperine 5.45 mg/mL thêm vào (mL)	Hàm lượng lý thuyết ($\mu\text{g/mL}$)	Hàm lượng thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80	0.3603	0.0540	5.9032	5.9534	100.9
	0.3602	0.0540	5.9032	5.9663	101.1
	0.3603	0.0540	5.9032	5.9538	100.9
100	0.3603	0.0671	7.3243	7.4162	101.3
	0.3603	0.0671	7.3243	7.3394	100.2
	0.3602	0.0671	7.3243	7.3883	100.9
120	0.3603	0.0805	8.7455	8.551	97.8
	0.3601	0.0805	8.7455	8.5656	97.9
	0.3603	0.0805	8.7455	8.8406	101.1
\bar{X}					100.2%

Độ đúng của phương pháp được đánh giá bằng phương pháp thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 80%, 100% và 120%, mỗi mức thực hiện trên 3 mẫu (Bảng 6). Kết quả cho thấy tỷ lệ phục hồi của piperine nằm trong khoảng 97.8 - 101.3%, với giá trị trung bình đạt 100.2%. Tỷ lệ phục hồi xấp xỉ 100% chứng tỏ phương pháp có khả năng phản ánh tốt hàm lượng piperine trong nền mẫu tiêu lốt, đồng thời ảnh hưởng của nền mẫu đến phép đo là không đáng kể.

3.2.6. Định lượng piperine trong mẫu tiêu lốt

Sau khi được xây dựng và thẩm định, phương pháp HPLC-UV được áp dụng để định lượng piperine trong mẫu dược liệu tiêu lốt. Kết quả trên 6 lần phân tích cho thấy nồng độ piperine trong dung dịch phân tích dao động từ 7.3039 đến 7.6634 $\mu\text{g/mL}$, tương ứng với hàm lượng piperine trong dược liệu từ 4.2233% đến 4.4287%. Hàm lượng piperine trung bình xác định được là 4.314%, với RSD = 1.89%. Kết quả này cho thấy phương pháp không chỉ đạt yêu cầu thẩm định mà còn có khả năng ứng dụng trên mẫu dược liệu thực tế.

4. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể xây dựng được phương pháp HPLC-UV tương đối đơn giản nhưng vẫn đáp ứng yêu cầu định lượng piperine trong tiêu lốt. Với điều kiện sắc ký đã lựa chọn, gồm cột Shim-pack GIST C18, pha động methanol:nước (80:20, v/v), bước sóng phát hiện 340 nm, tốc độ dòng 1.0 mL/phút, nhiệt độ cột 35 °C và thời gian phân tích 10 phút, pic piperine được tách tốt, có thời gian lưu phù hợp và hệ thống vận hành ổn định. Kết quả này có ý nghĩa thực tiễn vì piperine là một trong những alkaloid chính của *Piper longum* và thường được sử dụng như một chỉ thị hóa học trong kiểm soát chất lượng dược liệu [1, 4, 5].

Về mặt ứng dụng, phương pháp trong nghiên cứu này có ưu điểm là sử dụng hệ pha động methanol:nước, là hệ dung môi tương đối đơn giản, dễ chuẩn bị và thuận lợi cho triển khai thường quy. Trong các công bố trước đây, RP-HPLC đã được sử dụng để đánh giá hàm lượng piperine trong các nguồn gen *Piper longum* khác nhau cũng như để so sánh hàm lượng piperine giữa mẫu nuôi cấy *in vitro* và cây trồng tự nhiên [13, 14]. So với các nghiên cứu đó, quy trình hiện tại tập trung trực tiếp vào mục tiêu định lượng piperine trong dược liệu tiêu lốt bằng cấu hình HPLC-UV gọn, phù hợp với điều kiện của các phòng kiểm nghiệm thông thường [13, 14].

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt yêu cầu theo định hướng của ICH Q2(R1) [9]. Phương pháp có tính đặc hiệu tốt, tuyến tính trong khoảng nồng độ 5.25 - 84 $\mu\text{g/mL}$ với phương trình hồi quy $y = 129434x - 137120$ và $R^2 = 0.9999$; giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng lần lượt là 1.0444

$\mu\text{g/mL}$ và $3.1650 \mu\text{g/mL}$; độ chính xác đạt RSD 1.89%; độ đúng có tỷ lệ phục hồi từ 97.8% đến 101.3%. Các số liệu này cho thấy phương pháp có độ tin cậy phù hợp để áp dụng định lượng piperine trong nền mẫu dược liệu tiêu lốt [9].

Khi áp dụng phương pháp đã thẩm định trên mẫu thực, hàm lượng piperine trung bình xác định được là 4.314% với RSD = 1.89%. Giá trị này thấp hơn mức cao nhất 7.85% được ghi nhận ở một số nguồn gen *Piper longum* tại vùng Đông Bắc Ấn Độ [13]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu trước cũng cho thấy hàm lượng piperine có thể thay đổi giữa vật liệu *in vitro* và *in vivo* [14]. Vì vậy, sự khác biệt về hàm lượng piperine giữa nghiên cứu hiện tại và các công bố trước có thể liên quan đến nguồn gốc nguyên liệu, điều kiện sinh trưởng, thời điểm thu hái và cách xử lý mẫu [13, 14]. Nhận định này cũng cho thấy giá trị ứng dụng của phương pháp HPLC-UV trong đánh giá biến thiên hàm lượng piperine giữa các lô mẫu tiêu lốt phục vụ kiểm soát chất lượng dược liệu.

Trong bối cảnh các nghiên cứu đã công bố, phương pháp của đề tài đi theo hướng đơn giản hóa nhưng vẫn bảo đảm độ tin cậy. Một số nghiên cứu trước đây tập trung vào định lượng đồng thời nhiều alkaloid trong *Piper longum* bằng HPLC-ESI-MS hoặc UFLC-ESI-MS/MS [6], hoặc định lượng piperine trong các công thức đa dược liệu và chế phẩm phối hợp bằng RP-HPLC [7, 8]. So với các hướng tiếp cận đó, phương pháp HPLC-UV trong nghiên cứu này không nhằm phân tích đa cấu tử hay nền mẫu phức tạp mà tập trung vào một chỉ thị hóa học chính của tiêu lốt [6 - 8]. Cách tiếp cận này phù hợp với mục tiêu kiểm soát chất lượng nguyên liệu ở mức thường quy, trong đó tính đơn giản, khả thi và chi phí vận hành hợp lý là những tiêu chí quan trọng.

Ngoài HPLC, piperine trong *Piper longum* còn được phân tích bằng HPTLC trên rễ dược liệu và trên viên nén chứa dịch chiết quả *Piper longum* [15, 16]. Các công bố này cho thấy piperine là chỉ thị phân tích có giá trị thực tiễn cao trong kiểm soát chất lượng dược liệu và chế phẩm từ loài này [15, 16]. Trong bối cảnh trong nước, các tài liệu tiêu chuẩn và nghiên cứu liên quan đến piperine trên nguyên liệu thuộc chi Piper cho thấy việc lựa chọn chỉ thị hóa học này là phù hợp cho mục tiêu kiểm soát chất lượng [10 - 12]. So với các hướng tiếp cận đã công bố trên nền mẫu khác hoặc trên các hệ phân tích phức tạp hơn, quy trình HPLC-UV trong nghiên cứu này được xây dựng theo hướng đơn giản hóa điều kiện sắc ký nhưng vẫn bảo đảm độ tin cậy, từ đó thuận lợi hơn cho triển khai thường quy tại các phòng kiểm nghiệm có trang thiết bị tương đương. Trong bối cảnh đó, kết quả nghiên cứu hiện tại góp phần bổ sung một phương pháp HPLC-UV đã được thẩm định, có thể được sử dụng như một lựa chọn phù hợp khi cần định lượng piperine với độ tin cậy cao trên hệ thống HPLC thông dụng.

Tuy vậy, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế. Phương pháp mới được thẩm định trên một hệ điều kiện sắc ký cụ thể và trong phạm vi mẫu nghiên cứu của đề tài; chưa có dữ liệu mở rộng trên nhiều lô mẫu tiêu lốt hoặc ở các điều kiện phòng thí nghiệm khác nhau. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần đánh giá thêm độ bền phương pháp, độ chính xác trung gian và khả năng áp dụng trên nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau để nâng cao tính khái quát và giá trị ứng dụng của quy trình.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và thẩm định thành công phương pháp HPLC-UV định lượng piperine trong tiêu lốt (*Piper longum* L.) với điều kiện sắc ký phù hợp trên cột Shim-pack GIST C18, pha động methanol:nước (80:20, v/v), bước sóng 340 nm và thời gian phân tích 10 phút. Phương pháp cho tính tuyến tính tốt trong khoảng 5.25 - 84 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9999$), LOD và LOQ lần lượt là 1.0444 $\mu\text{g/mL}$ và 3.1650 $\mu\text{g/mL}$, độ chính xác đạt RSD 1.89% và độ đúng có tỷ lệ phục hồi từ 97.8% đến 101.3%. Kết quả cho thấy phương pháp có độ tin cậy, dễ triển khai và có thể ứng dụng trong định lượng piperine để phục vụ kiểm soát chất lượng dược liệu tiêu lốt.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng cấp kinh phí thực hiện dưới mã số đề tài GVTC19.66.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Kumar, J. Kamboj, Suman, and S. Sharma, "Overview for various aspects of the health benefits of *Piper longum* Linn. fruit", *J. Acupunct. Meridian Stud.*, vol. 4, no. 2, pp. 134-140, 2011.
- [2] V. Yadav, A. Krishnan, and D. Vohora, "A systematic review on *Piper longum* L.: Bridging traditional knowledge and pharmacological evidence for future translational research", *J. Ethnopharmacol.*, vol. 247, art. no. 112255, 2020.
- [3] P. Biswas, M. Ghorai, T. Mishra, A. V. Gopalakrishnan, D. Roy, A. B. Mane, A. Mundhra, N. Das, V. M. Mohture, M. T. Patil, M. H. Rahman, N. K. Jha, G. El-Saber Batiha, S. C. Saha, M. S. Shekhawat, Radha, M. Kumar, D. K. Pandey, and A. Dey, "*Piper longum* L.: A comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and health-promoting activities", *Phytother. Res.*, vol. 36, no. 12, pp. 4425-4476, 2022.
- [4] K. Srinivasan, "Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, no. 8, pp. 735-748, 2007.
- [5] I.-U. Haq, M. Imran, M. Nadeem, T. Tufail, T. A. Gondal, and M. S. Mubarak, "Piperine: A review of its biological effects", *Phytother. Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 680-700, 2021.
- [6] H.-L. Liu, R. Luo, X.Q. Chen, Y.Y. Ba, L. Zheng, W.W. Guo, and X. Wu, "Identification and simultaneous quantification of five alkaloids in *Piper longum* L. by HPLC-ESI-MS(n) and UFLC-ESI-MS/MS and their application to *Piper nigrum* L.", *Food Chem.*, vol. 177, pp. 191-196, 2015.
- [7] R. K. Harwansh, K. Mukherjee, S. Bhadra, A. Kar, S. Bahadur, A. Mitra, and P. K. Mukherjee, "Cytochrome P450 inhibitory potential and RP-HPLC standardization of trikatu—A Rasayana from Indian Ayurveda", *J. Ethnopharmacol.*, vol. 153, no. 3, pp. 674-681, 2014.
- [8] P. Rai, A. Pathak, and S. J. Rajput, "Stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic methods for the determination of aconitine and piperine in a polyherbal formulation", *J. AOAC Int.*, vol. 92, no. 4, pp. 1044-1054, 2009.
- [9] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*, Nov. 2005.
- [10] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 9684:2013 (ISO 11027:1993), Hạt tiêu và nhựa dầu hạt tiêu - Xác định hàm lượng piperin - Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao. Hà Nội, 2013.
- [11] Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 9683:2013 (ISO 5564:1982), Hạt tiêu đen và hạt tiêu trắng nguyên hạt hoặc dạng bột - Xác định hàm lượng piperin - Phương pháp đo quang phổ. Hà Nội, 2013.
- [12] N. L. K. Phụng, N. T. H. Nhung, N. T. K. Tiên, N. N. Phương, L. M. Tuấn, and B. Q. Minh, "Xác định hàm lượng Piperin trong hồ tiêu ở tỉnh Kon Tum bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis," *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, Tập. 64, Số 1, 2022.
- [13] A. Khound, P. C. Barua, B. Saud, A. Saikia, and S. Kumar, "Piperine content variation in different *Piper longum* germplasms of North East India determined through RP-HPLC method", *J. Appl. Nat. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 960-965, 2017.
- [14] M. Chatterjee, S. Chatterjee, and I. Chandra, "In vitro regeneration of *Piper longum* L. and comparative RP-HPLC analysis of piperine production of in vitro and in vivo grown plants", *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, vol. 149, pp. 205-212, 2022.
- [15] A. A. Rajopadhye, T. P. Namjoshi, and A. S. Upadhye, "Rapid validated HPTLC method for estimation of piperine and piperlongumine in root of *Piper longum* extract and its commercial formulation", *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 22, no. 6, pp. 1355-1361, 2012.
- [16] K. B. Bodiwala, J. Kataria, and J. Dave, "HPTLC method to support formulation development and quality control of the tablets prepared from fruit extracts of *Piper longum*", *Nat. Prod. Res.*, vol. 40, no. 2, pp. 481-489, 2026.