

Xác định hàm lượng Piperin trong hồ tiêu ở tỉnh Kon Tum bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis

Nguyễn Lê Kim Phụng^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Nhung¹, Nguyễn Trần Kim Tiền¹,
Nguyễn Ngọc Phương¹, Bùi Quang Minh², Lê Minh Tuấn¹

¹Trung tâm Công nghệ Môi trường tại TP Hồ Chí Minh, Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 20/10/2021; ngày chuyển phản biện 25/10/2021; ngày nhận phản biện 10/11/2021; ngày chấp nhận đăng 15/11/2021

Tóm tắt:

Piperin là alkaloid quan trọng nhất trong hồ tiêu, có ý nghĩa góp phần quyết định giá trị sản phẩm của hạt hồ tiêu. Trong nghiên cứu này, hàm lượng Piperin được chiết bằng phương pháp chiết Soxhlet trong 3,5 giờ và định lượng bằng cách đo mẫu ở bước sóng 343 nm trên thiết bị máy quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Kết quả sau khi khảo sát cho độ lặp lại của mẫu hạt tiêu xanh và đen lần lượt là từ 1,76 đến 2,07% và 3,79 đến 4,85%, độ tái lập trong phòng thí nghiệm từ 2,00 đến 2,24% đối với tiêu xanh và 3,81 đến 5,48% đối với tiêu đen, hiệu suất thu hồi đạt 87,2-91,4% đối với tiêu xanh và 84,4-89,2% đối với tiêu đen. Kết quả hàm lượng Piperin trong mẫu hạt tiêu xanh thu thập được phân bố từ 5,23 đến 10,2% và tiêu đen là từ 0,77 đến 5,31%.

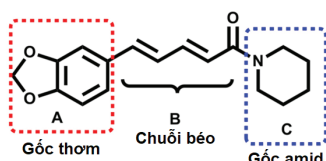
Từ khóa: hạt tiêu đen, hạt tiêu xanh, Kon Tum, Piperin, quang phổ hấp thụ phân tử, Soxhlet.

Chỉ số phân loại: 1.4

Mở đầu

Piperin là alkaloid quan trọng nhất được tìm thấy trong hạt tiêu đen (*Piper nigrum*), tiêu trắng, tiêu dài (*Piper longum*) thuộc họ Hồ tiêu. Năm 1819, Hans Christian Ørsted cô lập Piperin từ hạt tiêu đen xay và nhận thấy vị cay của hồ tiêu là do Piperin. Hồ tiêu được sử dụng phổ biến trong đời sống con người, không chỉ để làm gia vị cho thực phẩm mà còn dùng cho các loại thuốc. Hồ tiêu đã được sử dụng trong điều trị các loại bệnh như đầy hơi, khó tiêu, dạ dày, tả và tiêu chảy [1].

Ngày nay, có nhiều nghiên cứu đang tập trung vào dược tính của Piperin như: giảm thiệt hại cho DNA gây ra bởi các chất gây ung thư trong tế bào soma và tế bào mầm; chống lại benzo (a) pyrene sinh ra ung thư phổi bằng cách bảo vệ nồng độ glycoprotein trong huyết thanh và mô ở chuột bạch tạng Thụy Sĩ; có hiệu quả đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt; bảo vệ chống lại hàm lượng chất béo cao gây ra stress oxy hóa đối với tế bào. Vì vậy, các nghiên cứu gần đây đã tập trung nhiều hơn vào công thức của Piperin dạng hạt nano có thể hòa tan trong nước, sử dụng cho điều trị các bệnh khác nhau [2]. Công thức cấu tạo của Piperin là $C_{17}H_{19}NO_3$ được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Công thức cấu tạo của Piperin [3].

*Tác giả liên hệ: Email: kimphung274@gmail.com

Tại Việt Nam, Piperin được ứng dụng trong các thực phẩm chức năng kết hợp cùng với curcumin để giúp hỗ trợ điều trị bệnh như ung thư, viêm gan và lão hóa. Ngoài ra, Piperin còn được nghiên cứu thêm nhiều vai trò và giá trị khác trong y học như: tăng khả năng hấp thu chất dinh dưỡng thông qua cơ chế kích thích sự dịch chuyển của các amino axit trong thành ruột và hạn chế các enzyme, tạo điều kiện để cơ thể chuyển hóa các hợp chất dinh dưỡng, chống trầm cảm tự nhiên, chống oxy hóa, tăng khả năng hấp thu của curcumin, chống lại chứng biếng ăn nhờ sự kích thích khứu giác, hỗ trợ tiêu hóa bằng cách làm tăng cảm giác thèm ăn, giúp đốt cháy nhiều calo, chữa viêm khớp nhờ đặc tính kháng viêm... Tuy nhiên, việc sử dụng Piperin ở liều cao sẽ làm tăng huyết áp, tê liệt hô hấp và một số dây thần kinh [3].

Hàm lượng Piperin là yếu tố có ý nghĩa quan trọng góp phần quyết định giá trị sản phẩm của hồ tiêu. Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7036:2008 quy định kỹ thuật cho hạt tiêu đen, bao gồm cả hạt tiêu đen sơ chế và đã chế biến. Trong tiêu chuẩn này yêu cầu hạt tiêu đen phải có hàm lượng Piperin không được nhỏ hơn 4%. Vì vậy, để biết được sản phẩm hồ tiêu có đạt yêu cầu về mặt kỹ thuật để đến tay người tiêu dùng cũng như xuất khẩu thì việc đánh giá hàm lượng Piperin trong hồ tiêu là việc làm cần thiết.

Đến nay, có nhiều phương pháp khác nhau để phân tích định lượng Piperin trong hồ tiêu như: HPTLC [4, 5], quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis [6, 7], GC-FID [8] và HPLC [9, 10]. Trong các phương pháp phân tích nêu trên, quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis được xem là phương pháp phân tích đơn giản, giá thành thấp nhưng có độ chính xác cao và được

Determination of Piperine contents in pepper in Kon Tum province by UV-Vis spectroscopy method

Le Kim Phung Nguyen^{1*}, Thi Hong Nhung Nguyen¹,
Tran Kim Tien Nguyen¹, Ngoc Phuong Nguyen¹,
Quang Minh Bui², Minh Tuan Le¹

¹Centre of Environment Technology in Ho Chi Minh city,
Institute of Environmental Technology, VAST

²Centre for Research and Technology Transfer, VAST

Received 20 October 2021; accepted 15 November 2021

Abstract:

Piperine is the most major alkaloid in pepper. It plays an important role in determining the value of pepper. Piperine content was extracted by the Soxhlet extraction method for 3.5 hours and measured at 343 nm by an UV-Vis molecular absorption spectrophotometer. After surveying, the repeatability of green and black pepper samples was from 1.76 to 2.07% and from 3.79 to 4.85%, respectively, and the laboratory's reproducibility was from 2.0 to 2.24% for green pepper and from 3.81 to 5.48% for black pepper, the recovery was from 87.2 to 91.4% for green pepper and from 84.4 to 89.2% for black pepper. Results showed that the Piperine content in green pepper samples was from 5.23 to 10.2% and 0.77 to 5.31% for black pepper.

Keywords: black pepper, green pepper, Kon Tum province, molecular absorption spectrophotometer, Piperine, Soxhlet.

Classification number: 1.4

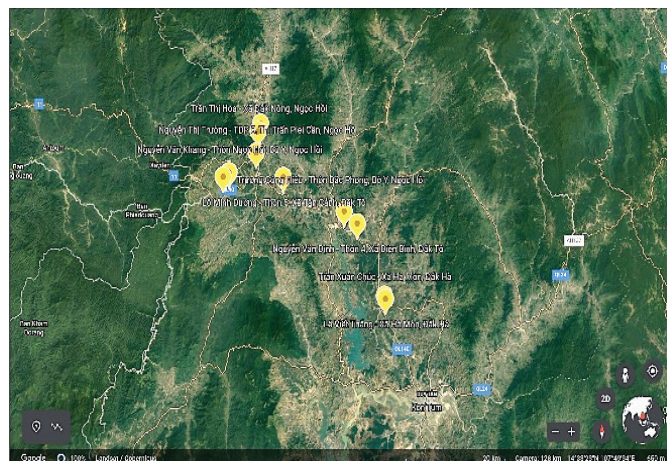
sử dụng phổ biến ở Việt Nam. Tuy nhiên, trong tiêu chuẩn này chỉ đề cập phương pháp phân tích hàm lượng Piperin cho nền hồ tiêu thành phẩm, chứ không đề cập tới nền hồ tiêu tươi. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá lại phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử UV-Vis theo TCVN 9683:2013 để sử dụng trên cả 2 nền mẫu hạt tiêu xanh và đen. Các mẫu hạt tiêu xanh và đen được lấy tại một số địa phương thuộc tỉnh Kon Tum, đây cũng là một trong những tỉnh trồng nhiều hồ tiêu ở Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

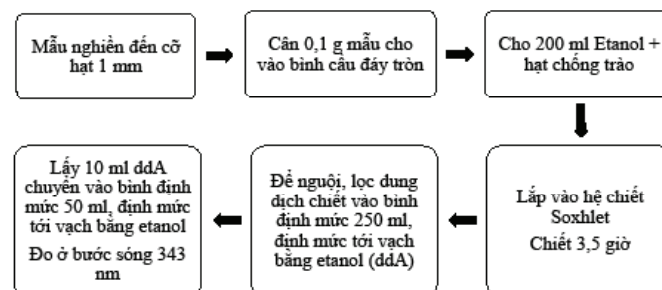
Quy trình và địa điểm lấy mẫu hồ tiêu: 100 mẫu hạt tiêu xanh và 10 mẫu hạt tiêu đen đã được thu thập từ các vườn trồng hồ tiêu của 10 hộ dân tại 5 xã và 1 thị trấn thuộc 3 huyện của tỉnh Kon Tum vào tháng 1/2021 (mỗi hộ dân lấy 10 mẫu tiêu

xanh và 1 mẫu tiêu đen tại các vườn hồ tiêu đã trồng được 4-10 năm, theo mô hình canh tác truyền thống). Trong đó, 2 hộ dân thuộc xã Hà Môn, huyện Đắk Hà, 3 hộ dân thuộc huyện Đắk Tô (2 hộ dân ở xã Diên Bình, 1 hộ dân ở xã Tân Cảnh) và 5 hộ dân ở huyện Ngọc Hồi (2 hộ dân ở xã Đắk Nông, 2 hộ dân ở xã Bờ Y, 1 hộ dân ở thị trấn Plei Càn) (hình 2).



Hình 2. Mô tả vị trí lấy mẫu hồ tiêu ở tỉnh Kon Tum.

Quy trình xử lý mẫu: các mẫu sau khi thu được từ thực địa được xử lý theo quy trình kỹ thuật chuẩn trong phân tích mẫu hồ tiêu bằng cách nghiền mịn đến cỡ hạt khoảng 1 mm rồi trộn đều. Đầu tiên, lấy một lượng mẫu nhỏ khoảng 10 g cho vào thiết bị nghiền rồi loại bỏ phần mẫu này. Sau đó, lấy một lượng mẫu khoảng 100 g cho vào thiết bị, nghiền nhanh để tránh thiết bị bị nóng quá sẽ gây ảnh hưởng đến mẫu cần phân tích. Rây mẫu đã được nghiền mịn qua rây 1 mm. Trộn kỹ mẫu sao cho tránh bị phân lớp. Chuyển toàn bộ mẫu đã rây vào túi bảo quản mẫu đã được làm khô trước. Lưu ý đối với hạt tiêu xanh thì khi xay phải bỏ thêm đá khô để tránh tình trạng mẫu hồ tiêu khi xay bị chảy nước. Mẫu sau khi được nghiền sẽ được chiết mẫu và đo theo quy trình phân tích mẫu hồ tiêu được mô tả ở hình 3.



Hình 3. Quy trình phân tích mẫu [11].

Phương pháp nghiên cứu

Xác định khoảng tuyến tính: chuẩn bị các điểm chuẩn có nồng độ Piperin 0, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0, 20,0 và 30,0 ppm. Đo các điểm chuẩn ở bước sóng 343 nm bằng máy đo quang phổ UV-Vis, dùng etanol làm chất lỏng so sánh. Chọn khoảng tuyến tính có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,99$.

Xác định thời gian chiết mẫu: thời gian chiết cũng là một yếu tố quan trọng trong quá trình chiết. Tối ưu hóa thời gian chiết để cho hiệu suất chiết cao và ổn định. Chính vì vậy, nghiên cứu đã khảo sát yếu tố này và các điểm thực nghiệm được lựa chọn là 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 và 4,0 giờ. Các điểm khảo sát được thực hiện trên mẫu hạt tiêu xanh và đen.

Xác định độ lặp lại: tiến hành phân tích lặp 10 mẫu hạt tiêu xanh và đen cùng một nồng độ. Thực hiện ở 3 nồng độ mẫu hạt tiêu xanh và đen khác nhau, tính toán độ lặp lại (RSD_r , %) theo công thức sau:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100\%$$

trong đó: S_r : độ lệch chuẩn (mg N/l); n: số lần một kiểm nghiệm viên thử nghiệm lặp lại; x_i : kết quả của lần thử nghiệm thứ i (mg N/l); $\bar{x}$: kết quả trung bình của n lần thử nghiệm (mg N/l).

Xác định độ chụm trung gian (độ tái lập trong phòng thí nghiệm): tiến hành phân tích độ tái lập ở 3 nồng độ mẫu hạt tiêu xanh và đen khác nhau, mỗi nồng độ thực hiện 10 mẫu. Tính toán RSD_r theo công thức sau:

$$S_r = \sqrt{n} \times s_{1,2}$$

$$S_{rpool} = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{m}}$$

$$S_L = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_{rpool}^2}{n}}$$

$$S_r = \sqrt{s_{rpool}^2 + s_L^2}$$

$$RSD_r = \frac{S_r}{x_{1,2}} \times 100\%$$

trong đó: n: số lần thử nghiệm lặp lại của kiểm nghiệm viên; m: số kiểm nghiệm viên tham gia thử nghiệm lặp lại ($m=2$); x_1, x_2 : giá trị trung bình của n lần thử nghiệm của kỹ thuật viên 1 (KTV 1) và kỹ thuật viên 2 (KTV 2) (mg N/l); S_1 và S_2 : độ lệch chuẩn của n lần thử của KTV 1 và KTV 2 (mg N/l); $x_{1,2}$: là giá trị trung bình của 2 giá trị x_1 và x_2 (mg N/l); $S_{1,2}$: độ lệch chuẩn của x_1 và x_2 (mg N/l); S_r : độ tái lập (mg N/l).

Xác định hiệu suất thu hồi: xác định hiệu suất thu hồi được thực hiện trên việc phân tích lặp lại mẫu thêm chuẩn. Mẫu tiêu đen: tiến hành chuẩn bị những dây có nồng độ Piperin là 1,25, 2,5 và 5,0%, mỗi dây thực hiện 10 mẫu. Mẫu tiêu xanh: tiến hành chuẩn bị những dây có nồng độ Piperin là 0,625, 1,25, và 2,5%, mỗi dây thực hiện 10 mẫu. Tính toán theo công thức sau:

$$R\% = \frac{C_{obs} - C_b}{C_s} \times 100$$

trong đó: R%: hiệu suất thu hồi của quy trình; C_{obs} : nồng độ có trong mẫu thực đã spike chuẩn; C_b : nồng độ có trong mẫu thực; C_s : nồng độ chất phân tích thêm vào.

Kết quả và bàn luận

Khoảng tuyến tính

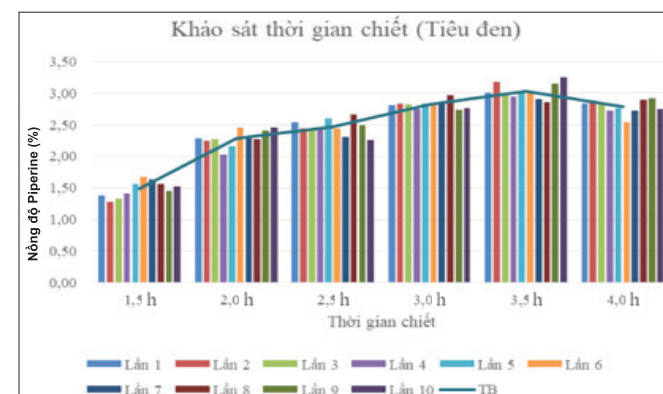
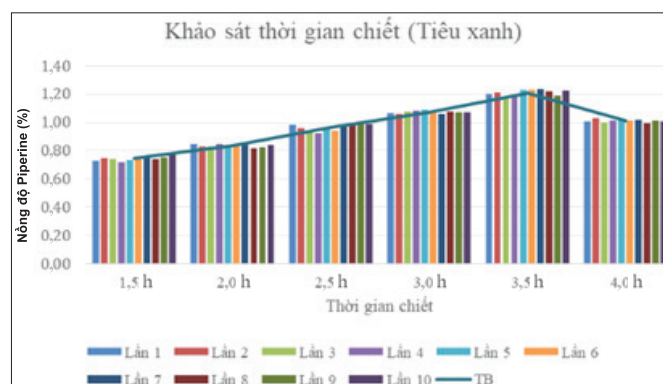
Chuẩn bị các điểm chuẩn có nồng độ Piperin 0, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 10,0, 20,0 và 30,0 ppm, đo các điểm chuẩn ở bước sóng 343 nm, kết quả khoảng tuyến tính được chọn là 0 đến 10 ppm (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính.

Khoảng nồng độ (ppm)	Hệ số tương quan R^2
0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 20,0; 30,0	0,9355
0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 20,0	0,9820
0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0	0,9995

Thời gian chiết mẫu

Thời gian chiết mẫu được khảo sát ở 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 và 4,0 giờ. Kết quả cho thấy, nồng độ Piperin với các khoảng thời gian chiết như sau: đối với tiêu xanh dao động trong khoảng 0,68-1,20% và đạt cực đại tại thời gian chiết là 3,5 giờ; đối với tiêu đen dao động trong khoảng 1,5-3,0% và đạt cực đại tại thời điểm chiết là 3,5 giờ (hình 4). Như vậy, đối với cả hạt tiêu xanh và đen thời gian chiết mẫu được chọn đều là 3,5 giờ.



Hình 4. Kết quả khảo sát thời gian chiết hạt tiêu xanh và đen.

Xác định độ lặp lại

Tiến hành phân tích lặp 10 mẫu hạt tiêu xanh và đen cùng một nồng độ. Thực hiện ở 3 nồng độ mẫu hạt tiêu xanh và đen khác nhau. Kết quả xác định độ lặp lại của mẫu hạt tiêu xanh và đen lần lượt là 1,76-2,07% và 3,79-4,85% (bảng 2). Kết quả độ lặp lại của phương pháp phù hợp với quy định của AOAC là 3,7-5,3% [12].

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ lặp lại.

Loại hạt tiêu	Nồng độ khảo sát (%)	Kết quả trung bình 10 lần lặp lại (%)	Độ lệch chuẩn S_r (%)	Độ lặp lại RSD_r (%)
Xanh	0,625	1,77	0,04	2,07
	1,25	2,31	0,04	1,94
	2,5	3,49	0,08	1,76
Đen	1,25	1,13	0,05	4,64
	2,50	2,17	0,11	4,85
	5,00	4,45	0,17	3,79

Xác định độ chụm trung gian (độ tái lập trong phòng thí nghiệm)

Tiến hành phân tích độ tái lập ở 3 nồng độ mẫu hạt tiêu xanh và đen khác nhau, mỗi nồng độ thực hiện 10 mẫu. Kết quả xác định độ tái lập trong phòng thí nghiệm từ 2,00 đến 2,24% đối với hạt tiêu xanh và 3,81 đến 5,48% đối với hạt tiêu đen (bảng 3). Kết quả độ tái lập trong phòng thí nghiệm phù hợp với quy định của AOAC là 4,0 đến 8,0% [12].

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ chụm trung gian.

Loại hạt tiêu	Nồng độ khảo sát (%)	Kết quả trung bình KTV 1, KTV 2 (%)	Độ lệch chuẩn S_r (%)	Độ chụm trung gian RSD_r (%)
Xanh	0,625	1,77	0,04	2,13
	1,25	2,30	0,05	2,00
	2,5	3,49	0,08	2,24
Đen	1,25	1,11	0,06	5,48
	2,50	2,14	0,12	5,44
	5,00	4,47	0,17	3,81

Hiệu suất thu hồi

Từ phương pháp xác định hiệu suất thu hồi đã trình bày ở trên, nghiên cứu đã tiến hành xác định hiệu suất thu hồi với hạt tiêu xanh và đen thu được kết quả của các thí nghiệm phân bố từ 87,2 đến 91,4% đối với tiêu xanh và từ 85,4 đến 89,2% đối với tiêu đen (bảng 4). Kết quả hiệu suất thu hồi từ 2 nền mẫu tiêu đen và xanh phù hợp với quy định của AOAC là 80 đến 110% [12].

Bảng 4. Kết quả xác định hiệu suất thu hồi Piperin trong mẫu hồ tiêu.

Loại hạt tiêu	Nồng độ khảo sát (%)	KTV 1 (%)	KTV 2 (%)	Trung bình (%)
Xanh	0,625	89,4	88,6	89,0
	1,25	87,8	86,6	87,2
	2,5	91,1	91,6	91,4
Đen	1,25	90,1	87,2	88,6
	2,50	86,7	84,2	85,4
	5,00	88,9	89,6	89,2

Hàm lượng Piperin trong mẫu hạt tiêu xanh và đen

10 mẫu hạt tiêu xanh và 1 mẫu hạt tiêu đen được lấy tại mỗi hộ dân thuộc một số địa phương ở tỉnh Kon Tum, 10 mẫu hạt tiêu xanh được lấy theo phương pháp lấy mẫu đại diện cho cả vườn tiêu, tính theo số gốc tiêu mỗi hộ trồng được, cứ khoảng 20-30 gốc thì lấy 1 mẫu, do diện tích và số gốc tiêu của các hộ cần khảo sát khá đồng đều nên mỗi hộ lấy được 10 mẫu hạt tiêu xanh. Hàm lượng Piperin trung bình của 10 mẫu hạt tiêu xanh phân bố từ 5,23-10,2% (bảng 5).

Bảng 5. Hàm lượng Piperin trong mẫu tiêu xanh và đen.

Mã mẫu	Địa chỉ lấy mẫu	Hàm lượng Piperin (%)		Mã mẫu	Địa chỉ lấy mẫu	Hàm lượng Piperin (%)	
		Mẫu tiêu xanh (n=10)	Mẫu tiêu đen (n=1)			Mẫu tiêu xanh (n=10)	Mẫu tiêu đen (n=1)
M01	Xã Hà Môn, huyện Đắk Hà	7,76±0,41	3,44	M06	Xã Đắk Nông, huyện Ngọc Hồi	8,09±0,46	4,15
M02	Xã Hà Môn, huyện Đắk Hà	8,49±0,45	3,96	M07	Xã Đắk Nông, huyện Ngọc Hồi	8,47±0,51	4,47
M03	Xã Diên Bình, huyện Đắk Tô	10,0±0,53	5,31	M08	Xã Bờ Y, huyện Ngọc Hồi	9,35±0,33	5,04
M04	Xã Diên Bình, huyện Đắk Tô	5,23±0,19	0,77	M09	Xã Bờ Y, huyện Ngọc Hồi	8,13±0,39	3,91
M05	Xã Tân Cảnh, huyện Đắk Tô	10,2±0,50	4,62	M10	Thị trấn Plei Càn, huyện Ngọc Hồi	9,14±0,36	4,47

Tại mỗi vườn tiêu cũng chỉ thu thập được duy nhất 1 mẫu hạt tiêu đen vì sau khi hạt tiêu xanh có tỷ lệ chín từ 70 đến 90%, các hộ dân sẽ thu thập toàn bộ sơ chế thành hồ tiêu đen, hàm lượng Piperin trong mẫu hạt tiêu đen của các hộ dân dao động từ 0,77 đến 5,31% (bảng 5). Phương pháp tính kết quả và xử lý số liệu thống kê dùng phần mềm Excel. Trong đó, 4 mẫu hạt tiêu đen có hàm lượng Piperin thấp hơn 4%, chưa đạt yêu cầu kỹ thuật do TCVN 7036:2008 đưa ra.

Kết luận

Kết quả thu được từ nghiên cứu này giúp cung cấp thông tin hữu ích để đánh giá hàm lượng Piperin trong hạt tiêu xanh và đen có hiệu quả đạt được cao hơn so với TCVN

9683:2013, cụ thể thời gian chiết hồi lưu mẫu là 3,5 giờ thay vì là 3 giờ để thu được hàm lượng Piperin đạt cao nhất. Trong nghiên cứu này, hàm lượng Piperin có trong các mẫu hạt tiêu xanh và đen lần lượt dao động từ 5,23 đến 10,0% và 0,77 đến 5,31%. Từ đây cho thấy, hàm lượng Piperin đã giảm sau khi thu hoạch và đem sơ chế hạt tiêu xanh thành đen. Ngoài ra, khi đem so sánh kết quả hàm lượng Piperin trong mẫu tiêu đen sau khi sơ chế thì có 40% lượng mẫu hạt tiêu đen thu thập tại 10 hộ dân chưa đạt yêu cầu của TVCN 7036:2008 về quy định kỹ thuật cho hạt tiêu đen. Vì vậy, để nâng cao chất lượng sản phẩm hạt tiêu đen cần có biện pháp bảo toàn hàm lượng Piperin trong quá trình thu hoạch và sơ chế hạt tiêu xanh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài “Phân tích hàm lượng dư lượng hóa chất bảo vệ thực vật họ Cúc (Pyrethroid) trong hạt tiêu xanh giai đoạn thu hoạch trên thiết bị GC/MS/MS” (mã số CSCL.09/21-21). Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Leila Gorgani, et al. (2017), “Piperine - the bioactive compound of black pepper: from isolation to medicinal formulations”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **16**, pp.124-140.

[2] Suraj Shrestha, et al. (2020), “Analysis of Piperin in black pepper by high performance liquid chromatography”, *Journal of Nepal Chemical Society*, **41(1)**, pp.80-86.

[3] Anshuly Tiwari, et al. (2020), “Piperine: a comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties”, *Medicine in Drug Discovery*, **7**, pp.1-21.

[4] M. Rezvanian, et al. (2016), “Pharmacognostical and chromatographic analysis of Malaysian *Piper nigrum* Linn. fruits”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78(3)**, pp.334-343.

[5] K. Alok, et al. (2019), “A rapid HPTLC method to estimate piperine in Ayurvedic formulations”, *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, **10**, pp.248-254.

[6] Yosi Bayu Murti, et al. (2019), “UV-Vis spectroscopy to enable determination of the dissolution behavior of solid dispersions containing curcumin and Piperine”, *Journal of Young Pharmacists*, **11(1)**, pp.26-30.

[7] Srinivas Bhairy, et al. (2021), “Development and validation of bivariate UV-Visible spectroscopic method for simultaneous estimation of curcumin and piperine in their combined nanoparticulate system”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **11(5)**, pp.64-70.

[8] Juan Vazquez-Martinez, et al. (2020), “Bioautography and GC-MS based identification of piperine and trichostachine as the active quorum quenching compounds in black pepper”, *Heliyon*, **6**, DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e03137.

[9] Jong-Rak Park, et al. (2020), “Application of non-destructive rapid determination of Piperine in *Piper nigrum* L. (black pepper) using NIR and multivariate statistical analysis: a promising quality control tool”, *Foods*, **9**, DOI: 10.3390/foods9101437.

[10] Satyanshu Kumar, et al. (2021), “Antioxidant activities, phenolics and piperine contents in four piper species from India”, *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, **9(1)**, pp.24-31.

[11] Bộ Khoa học và Công nghệ (2013), *Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 9683:2013 (ISO 5564:1982) về hàm lượng Piperin trong hạt tiêu đen và trắng - Xác định hàm lượng Piperin - Phương pháp đo quang phổ*.

[12] AOAC (1998), *AOAC Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures*.