

KARABİBER (*Fructus Piperis nigri*) ÖRNEKLERİNDE PİPERİN MİKTARI TAYİNİ

DETERMINATION OF PIPERINE IN BLACK PEPPER (*Fructus Piperis nigri*) SAMPLES

Gülden Zehra OMURTAG* - Buket ALPERTUNGA* - Ömer ERSOY*

SUMMARY

Piperine was determined in black pepper powder and dry berry samples using a spectrophotometrical method. Analyses were carried out on the samples provided from markets, street bazaars and spice-sellers and on the samples from the known origin of Brazil, Vietnam and Sarawak. Piperine contents in black pepper powder and dry berry samples were found as 2.86-9.05 %, 4.53-9.06 %, respectively.

Key words: Piperine, black pepper, spectrophotometer

ÖZET

Bu çalışmada toz ve tane karabiber örneklerinde piperin miktarı spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Market, semt pazarları ve baharatçılardan sağlanan kaynağı belli olmayan örnekler ve Brezilya, Vietnam ve Sarawak kaynaklı örneklerde analiz yapılmıştır. Piperin miktarının toz karabiber örneklerinde % 2.86-9.05, tane karabiber örneklerinde % 4.53-9.06 arasında olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Piperin, karabiber, spektrofotometre

GİRİŞ

Piper nigrum L. (Piperaceae) bitkisinin kurutulmuş meyvaları olan karabiber (*F. Piperis nigri*) tane veya toz edilmiş olarak besinlerin hazırlanmasında ve besinlerle birlikte yaygın olarak kullanılan bir baharattır. Karabiberin yiyeceklere lezzet veren bir madde olmasının yanında bir koruyucu, bir ilaç, bir insektisit olarak ve ayrıca parfümeride kullanıldığı bildirilmiştir (1, 2). Taze olarak

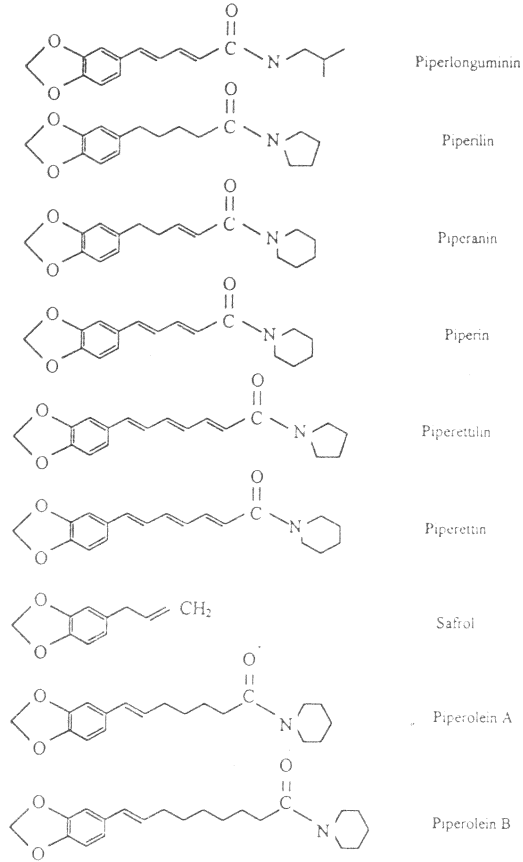
* Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı,
81010 Haydarpaşa-İSTANBUL.

toplanmış yeşil biber taneleri güneşte kurutulduktan sonra karabiber olmakta ve meyvalar kurutulup siyah kısmı oluşturan dış kabuklardan ayrıldığı zaman beyazbiber (*F.Piperis albi*) diye adlandırılmaktadır (3, 4).

Karabiberde safrol ve tanen gibi bilinen karsinojen maddelerin bulunmasının yanısıra metilendioksibenzen kısmı içeren piperin, kavisin, piperettin, miristisin gibi alkaloidlerle birlikte d- limonen, linalool ve fellandren gibi terpenoidler ve diğer maddelerin varlığı karsinojenite şüphesini arttırmıştır (1, 5, 6). Concon ve ark. farelerde 3 ay deriye karabiberin alkol ekstresini uygulamış, 17 ay sonra farelerin tümünde tümör gözlemişlerdir. Tümör oluşumu başlıca akciğer olmak üzere karaciğer, pankreas gibi uygulama yeri dışında organlarda saptanmıştır. Çalışmada karabiberin endojen karsinojenik maddeler içerdiği bildirilmiş ve karabiberden elde edilen bir fraksiyonun *Salmonella typhimurium* TA 100'de mikrozomal aktivasyona gerek duyulmaksızın mutajenik etkisinin saptanması da bu bulguları kuvvetlendirmiştir (1). Öğütülmüş karabiberin besleme ve enjeksiyon yoluyla kurbağalara (*Bufo regularis*) verilmesiyle yapılan bir çalışmada, test hayvanlarında karaciğerde primer tümör oluşumu, buna bağlı olarak diğer organlarda metastaz oluşumu, ileum ve midede sekonder tümörler oluşturduğu bildirilmiştir (6). Bir araştırmada öğütülmüş karabiber ekstraktı besleme ve deriye uygulama suretiyle farelere uygulanmış, tümör insidensinde artış görülmüş (7), diğer bir çalışmada oral yolla 160 mg/kg dozda farelere verildiğinde tümöre neden olduğu bildirilmiştir (8).

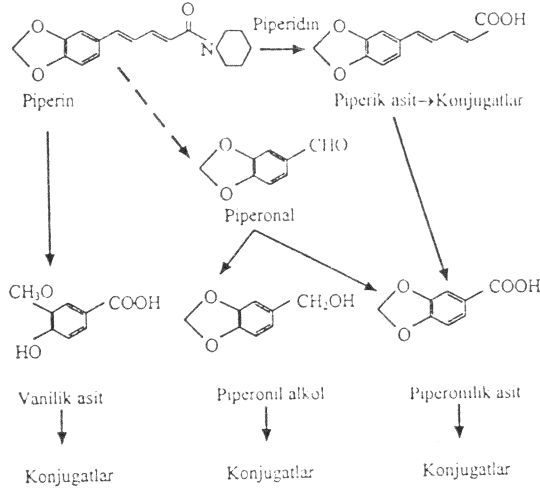
Dünyada ve ülkemizde çok sayıda insan tarafından tüketilen baharatların başında gelen kara ve beyaz biberlere keskin ve aromalı lezzet veren bileşen piperindir (9,10). Piperin ilk kez Oersted tarafından 1820' de izole edilmiş ve yapısı daha sonra 1-piperoilpiperidin'in trans-trans izomeri olarak teşhis edilmiştir. Pelletier 1821' de piperinin tanınması ile ilgili çalışmaları sürdürmüş ve Buchheim 1876'da piperin'in cis-cis izomerini kavisin olarak isimlendirmiştir (11). Piperin'in yapısı 1894'te Ladenburg ve Sholtz tarafından total sentezi yapılarak belirlenmiş (9) ve karsinojen bir madde olan safrol (4-allil-1,2-metilendioksibenzen) gibi metilendioksifenil (MDP) türevi olduğu açıklanmıştır (10, 12, 13). Bu nedenle piperin üzerine çok fazla dikkat çekilmiş, toksik yönleri araştırılmıştır (1, 5-7, 10, 15, 16). Piperin ve diğer biber alkaloidleri ile safrolün kimyasal yapısı Şekil 1.' de verilmiştir (11, 14). Piperinin toksik dozlarının sıçanlar, fareler ve hamsterlerin çeşitli organlarında ciddi hemorajik nekroz ve ödeme karakterize edilmiş fonksiyon bozuklukları ve solunum felci oluşturduğu (16), kültürü yapılmış embriyonik sıçan beyni nöronlarında ise sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (17). Piperin, oral yolla verildiğinde dil ve damağın çeşitli bölgelerinde duyarlılık oluşturmuş ve bu nedenle oral kimyasal iritan olarak kabul edilmiştir (18).

Piperinin, farmakolojik dozlarda tavşanlarda ve sıçanlarda sırasıyla antipiretik ve antienflamatuvar aktiviteye sahipken, farelerde MSS üzerine depresan etkiye (10, 19) ve analjezik aktiviteye sahip olduğu (10), ayrıca karaciğer



Şekil 1.: Biber alkaloidleri ve safrolün kimyasal yapıları.

rejenerasyonunu stimüle ettiği (20) ve silimarine kıyasla daha düşük hepatoprotektif etki gösterdiği bildirilmektedir (19). Karabiber ekstraktı ve piperinin insanlarda gastrik sekresyonları ve salivasyonu stimüle ettiği (21) ve antifertilite etkisinin olduğu (22), biyokimyasal olarak ise; piperinin oksidatif fosforilasyonu ve kalsiyum transportunu inhibe ettiği (10), izole sıçan karaciğer mitokondrisinde ATPaz aktivitesini stimüle ettiği bildirilmiştir (23). Son yıllarda piperinin güçlü bir ilaç metabolizması inhibitörü olduğu (19, 24), ksenobiyotik metabolize eden enzimlerle etkileşmek suretiyle ilaçların biyoyararlılığını artırdığı açıklanmıştır (25). Ayrıca piperinin *Aspergillus parasiticus*'un üremesini ve aflatoksin oluşturmasını inhibe ettiği (26), sıçanlarda beyinde serotonin sentezini stimüle ettiği rapor edilmektedir (27). Piperinin benzo (α)-piren tarafından oluşturulan sitotoksitesiteyi ve DNA hasarını geliştirdiği (28), sıçanlarda beslemeyle yapılmış olan bir çalışmada aril hidrosilasyonda artışa, N-demetilaz aktivitesinde



Şekil 2. : Sıçanlardaki piperinin biyotransformasyonu.

ve sitokrom b₅'te azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (22). Piperinin, benzo (α)-piren ve 7-etoksikumarinin sıçan pulmoner sitokrom P-450 tarafından katalize edilen oksidasyonu üzerine in vitro ve in vivo etkisi incelenmiş, her iki durumda da monooksijenazları inhibe edici etkisi anlaşılmıştır (29).

Sıçanlara piperinin oral uygulanmasından sonra biyotransformasyonu incelenmiş ve idrarla 4 tip metabolit bulunmuştur. Bu metabolitler, glukuronik asit ve sülfat konjugatları (21, 30) şeklinde atılmaktadır (Şekil 2.). Piperinin fareler, sıçanlar ve hamsterlerde yapılmış akut ve subakut toksisite testlerinde; erkek farelerde i.p. LD₅₀ 43.0 mg/kg, dişi farelerde i.p. LD₅₀ 60.0 mg/kg, süten kesilmiş erkek farelerde i.p. LD₅₀ 132.0 mg/kg, ergin dişi sıçanlarda i.p. LD₅₀ 33.5 mg/kg, ergin dişi sıçanlarda i.g. LD₅₀ 514.0 mg/kg şeklinde verilmiştir. Deney hayvanlarının çoğu akut toksisite testlerinde 3-17 dak. içinde solunum felci sonucu; subakut toksisite testlerinde ise uygulamadan 1-3 gün sonra ölmüşlerdir (16).

Kara ve beyazbiberlerde bulunan başlıca alkaloid olan piperinin miktarı değişiklik göstermektedir (3, 11, 14, 15, 31-34). Bu çalışmada, karsinojen bir madde olan safrolle (10, 12, 13) yapısal benzerlik taşıyan piperinin, ülkemizde tüketilen kara ve beyaz biberlerdeki miktarı araştırılmıştır.

DENEYSEL BÖLÜM

Materyal

Karabiber ve beyazbiber örnekleri toz veya tane halinde marketler, semt

pazarları ve baharatçılardan temin edildi*. Tane halindeki karabiber elektrikli değirmende kayıpsız olarak öğütüldü.

Piperin Sigma firmasının, kromotropik asit ve kullanılan diğer kimyasal maddeler Merck firmasının ürünüdür. Kromotropik asit ılık suda çözüldü ve %20'lik çözeltisi günlük olarak hazırlandı.

Standart piperin çözeltisi: 28 mg/100 ml etilalkolde çözüldü ve kahverengi şişede ışıktan uzakta saklanan çözelti 1 ay süre ile kullanıldı. Standart çözeltiden 0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml, 0.4 ml ve 0.5 ml ile aşağıdaki yöntemle göre çalışılarak reaksiyonun lineer yürüdüğü görüldü ($y = 0.7376x + 0.0025$, $r = 0.9999$).

Yöntem

Kara ve beyazbiberlerde piperin tayini, ASTA (American Spice Trade Association)'nın önerdiği spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapıldı (35). 250 ml'lik balonjojede 0.5 g öğütülmüş örnek üzerine 100 ml etanol ilave edildi ve 15 dak.'da bir karıştırılarak su banyosunda 3 saat kaynatıldı. Soğutuldu ve etanolle tamamlandı.

Ekstraktın 10 ml'si çift katlı süzgeç kağıdından süzüldü. İki adet 25 ml'lik cam kapaklı balonjojeye 1'er ml filtrat ilavesinden sonra birisine kromotropik asit çözeltisinden 0.5 ml ilave edildi (Ç_1), diğerine kromotropik asit ilave edilmedi (Ç_2). Kons. H_2SO_4 'in piperin dışındaki biber içerikleri (nişasta, şekerler, proteinler ve pentozanlar v.b.) ile girişim oluşturması nedeniyle (33) Ç_2 'nin hazırlanmasına gerek duyuldu. Üçüncü bir 25 ml'lik balonjojeye 1 ml etil alkol ve 0.5 ml kromotropik asit belirteci ilave edildi (=Boş deneme 1). Balonjojelerin hepsine 10 ml kons. H_2SO_4 ilave edilerek iyice karıştırıldı. 30 dak. kaynar su banyosunda tutuldu, oda ısısına getirildi daha sonra kons. H_2SO_4 ile 25 ml'ye tamamlandı.

Boş deneme 1'e karşı Ç_1 'in, boş deneme 2 (kons. H_2SO_4)'e karşı Ç_2 'nin 580 nm'de absorbansı ölçüldü (A_1 ve A_2).

Piperin konsantrasyonunun hesaplanması için Formül 1. kullanıldı.

$$\% \text{ Piperin} = 9.64 \frac{A_1 - A_2}{\text{Örnek ağırlığı(g)}} \quad (\text{Formül 1.})$$

* Çalışmamızda kullanılan özellikle kaynağı belli ürünlerin temin edilmesindeki yardımları için Mısır Çarşısı Ucuzcular Baharat Yönetim Kurulu Başkanı Sayın Ecz.Dilaver Kadioğlu'na teşekkür ederiz.

Herbir örnek ile 2 paralel çalışma yapıldı. 9.64 sabitesi 1µmol piperinin kromotropik asitle oluşturduğu kompleksin 25 ml kons. sülfürik asitteki çözeltisinin verdiği 0.740 absorbansın (=B) Formül 2.'ye yerleştirilmesinden elde edildi (laboratuvarlar arasında değişiklikler olabilir).

$$\text{Sabite} = \frac{\text{mol. a.g.} \times 10^{-6} \times \text{seyreltme faktörü} \times 100}{B} \quad (\text{Formül 2.})$$

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda, değişik kaynaklardan toz veya tane halinde temin edilen 23 karabiber ve 4 beyazbiber örneğinde saptanan piperin miktarları Tablo 1.'de sunulmaktadır.

Marketler, semt pazarları ve baharatçılardan temin edilen toz karabiber örneklerinin ortalama % piperin miktarları birbirleriyle karşılaştırıldığında sadece baharatçılarla semt pazarlarından temin edilen karabiber örnekleri arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($t=3.051 > 2.447$; $t=0.05, 6$).

Beyazbiber örneklerinde beklenildiği gibi piperin miktarı karabiber örneklerine göre daha yüksek (ort.%8.44) bulunmuştur.

Kara ve beyaz biberlerde piperin tayini için yapılan araştırmalarda Kjeldahl (9, 11), kolorimetrik (7, 11, 33, 34, 36), spektrofotometrik (9, 11, 14, 32, 35, 36), ince tabaka kromatografisi (İTK) (31, 37) ve gaz kromatografisi (GK) (31), yüksek basınçlı likid kromatografi (YBSK) (11, 13, 14, 31, 32) yöntemleri ile biyolojik dokularda ise İTK ve UV-absorbsiyon densitometri (39) yöntemleri uygulanmıştır. Çalışmamızda kara ve beyazbiberlerde piperin tayini için ASTA'nın önerdiği spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin, sonuçları yeterli derecede duyarlı olarak vermesinin yanısıra uygulanabilirliğinin kolay olması tercih nedeni olmuştur.

Likid kromatografi kullanılarak yapılmış olan bir çalışmada, Sarawak'ta yetişmiş karabiber örneğinde piperin miktarı %5.00, Brezilya'da yetişmiş örnekte %3.30, Malabar kaynaklı örnekte %3.83 olarak verilmiştir (14). Kara ve beyazbiberlerde yapılmış bir başka çalışmada piperin miktarları %1.36-5.49 arasında değişmektedir (3). Çalışmamızda piperin miktarları Sarawak örneğinde %4.60, Brezilya örneğinde %4.53 ve Vietnam örneğinde de %5.25 olarak bulunmuştur.

Tablo 1. : Çeşitli kaynaklardan sağlanan kara ve beyazbiber örneklerinde saptanan piperin miktarları

Toz Karabiber	% Piperin	Tane Karabiber	% Piperin
Market (markalı)	5.32	Semt pazarı (markasız)	7.84
	7.00	Baharatçı (markasız)	7.30
	2.86		9.06
	8.10		6.10
	5.82		5.55
	6.88	Sarawak	4.60
Semt pazarı (markasız)	6.45	Brezilya	4.53
	7.41	Vietnam	5.25
	5.75	Tane beyazbiber semt pazarı (markasız)	8.61
	5.44	Tane beyazbiber baharatçı (markasız)	7.90
Baharatçı (markasız)	6.41		8.40
	7.75		
	8.24		
	9.05		
Toz beyazbiber baharatçı (markasız)	7.15		
	8.83		

Bu çalışmada, karsinojen etkisi şüpheli olan karabiberin insan beslenmesinde yer alan önemli bir baharat olmasından dolayı piperin miktarları incelenmiş, analizi yapılan 27 örnekteki en yüksek piperin miktarı %9.06 olarak baharatçıdan alınan markasız karabiber (tane) örneğinde, en düşük piperin miktarı ise %2.86 olarak marketten alınan markalı karabiber (toz) örneğinde saptanmıştır. Piyasadan temin edilen karabiber örneklerinin birçoğunun menşei belli olmayıp büyük ihtimalle değişik ürünlerin harman edilmesiyle elde edilmektedir. Elde ettiğimiz menşei belli ürünlerde ise daha düşük miktarlarda piperin bulunduğu görülmüştür. Günlük karabiber tüketimimiz, genel olarak yüksek değildir. Amerika'da ortalama günlük kişi başına 280 mg karabiber alındığı hesaplanmıştır (1), bu da piperin içeriği hesabıyla günlük 20 mg'ı aşmayan piperine eşdeğerdir. Karabiber çeşitli araştırmaların ışığında içerdiği değişik kimyasal bileşikler ve

etkileri dolayısıyla şüphe çeken bir baharat olmakla birlikte tüketildiği miktarın düşüklüğü nedeniyle "genel olarak emniyetli kabul edilen maddeler" arasına girmektedir (1). Ancak karabiber çeşitli ülkelerde halk arasında daha yüksek miktarda kullanılabilir. Tayland'da 7.5 g karabiber meyvasının ilaç olarak kullanıldığı bildirilmiştir (16). Bu dozda günde birkaç kez kullanıldığında toksik konsantrasyonlara ulaşılması mümkün görülmektedir. Bu bakımdan karabiberin içerdiği piperin ve diğer kimyasal maddelerin karsinojenik potansiyelinin araştırılması, bu maddelerle ortaya çıkabilecek karsinojenite riskinin önlenmesi bakımından uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Concon, J.M., Newburg, D.S., Swerczek, T.W.: *Nutr. Cancer*, **1**, 22-26 (1979).
2. Bhat, B.G., Chandrasekhara, N.: *Die Nahrung*, **31** (9), 913-916 (1987).
3. Verzele, M., Van Damme, F., Schuddinck, G., Vyncke, P.: *J.Chromatogr.*, **471**, 335-346 (1989).
4. Baytop, T.: *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, İ.Ü. Yay. No: 3255, Ecz. Fak. No: 40, İstanbul 1984.
5. Wrba, H., El-Mofly, M.M., Schwaireb, M.H., Dutter, A.: *Exp. Toxic Pathol.* **44**(2), 61-65 (1992).
6. El-Mofly, M.M., Soliman, A.A., Abdel-Gawad, A.F., Sakr, S.A., Shwaireb, M.H.: *Oncology*, **45**, 247-252 (1988).
7. Shwaireb, M.H., Wrba, H., El-Mofly, M.M., Dutter, A.: *Exp. Pathol.* **40**(4), 233-238 (1990).
8. Arena, J. M., Drew, R. H.: *Poisoning*, Fifth Edition, Charles C. Thomas Publisher, USA 1986.
9. Tausig, F., Suzuki, J.I., Morse, R.E.: *Food Technology*, **3**, 151-154 (1956).
10. Dalvi, R.R., Dalvi, P.S.: *Drug Metabol Drug Interact.* **9** (1), 23-30 (1991).
11. Purseglove, J. W., Brown, E. G., Green, C.L., Robbins, S.R.J.: *Spices*, Longman, London and New York 1981.
12. Doull, J., Klaassen, C.D., Amdur, M. O.: *Toxicology*, Macmillan Publishing Co., Inc., New York 1975.
13. Wiseman, R.W., Miller, E.C., Miller, J.A., Liem, A.: *Cancer Res.*, **47**, 2275-2283 (1987).
14. Weaver, K.M., Neale, M.E., Laneville, A.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**(1), 53-55 (1988).
15. Ames, B. N.: *Science*, **221**(9), 1256-1264 (1983).
16. Piyachaturawat, P., Glinsukon, T., Toskulkao, C.: *Toxic. Lett.*, **16**, 351-359 (1983).
17. Unchern, S., Nagata, K., Saito, H., Fukuda, J.: *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **17** (3), 403-406 (1994).
18. Lawless, H.T., Stevens, D.A.: *Percept Psychophys*, **43**, 72-78 (1988).
19. Koul, I.B., Kapil, A.: *Planta Med.* **59**, 413-417 (1993).
20. Gershbein, L.L.: *Food Cosmet. Toxicol.*, **15**, 173-181 (1977).
21. Bhat, B.G., Chandrasekhara, N.: *Toxicology*, **40**, 83-92 (1986).
22. Sambaiyah, K., Srinivasan, K.: *Indian J Biochem Biophys.* **26**, 254-258 (1989).
23. Reanmongkol, W., Jantasoat, W., Wattanatorn, W., Dhumma-Upakorn, P., Chudapongse, P.: *Biochem Pharmacol.* **37** (4), 753-757 (1988).
24. Bhat, B. G., Chandrasekhara, N.: *Toxicology*, **44**, 91-98 (1987).
25. Singh, J., Dubey, R.K., Atal, C.K.: *J Pharmacol Exp Ther.* **236** (2), 488-493 (1986).
26. Madhyastha, M.S., Bhat, R.V.: *Appl Environ Microbiol.* **48** (2), 376-379 (1984).
27. Guo-qing, L., Garattini, S.: *Chin Med J*, **99** (5), 411-416 (1986).
28. Chu, C.Y., Chang, J.P., Wang, C.J.: *Fd. Chem. Toxic.* **32** (4), 373-377 (1994).
29. Reen, R.K., Singh, J.: *Indian J Exp Biol.* **29**, 568-573 (1991).
30. Bhat, B.G., Chandrasekhara, N.: *Toxicology*, **44**, 99-106 (1987).
31. Archer, A.W.: *J. Chromatogr.*, **351**, 595-598 (1986).
32. Rathnawathie, M., Buckle, K.A.: *J. Chromatogr.*, **264**, 316-320 (1983).
33. Graham, H.D.: *J.Food Sci.*, **30**, 644-650 (1965).
34. Genest, C., Smith, D. M., Chapman, D.G.: *Agric Food Chem*, **11** (6), 508-512 (1963).
35. Hart, F.L., Fisher, H.J.: *Modern Food Analysis*, Springer-Verlag, Berlin 1971.
36. Lupina, T., Cripps, H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70** (1), 112-113 (1987).
37. De Cleyne, R., Verzele, M.: *Chromatographia* **5**, 346-350 (1972).
38. Bhat, B.G., Chandrasekhara, N.: *J. Chromatogr.*, **338**, 259-263 (1985).

(Received October 27, 1996)