

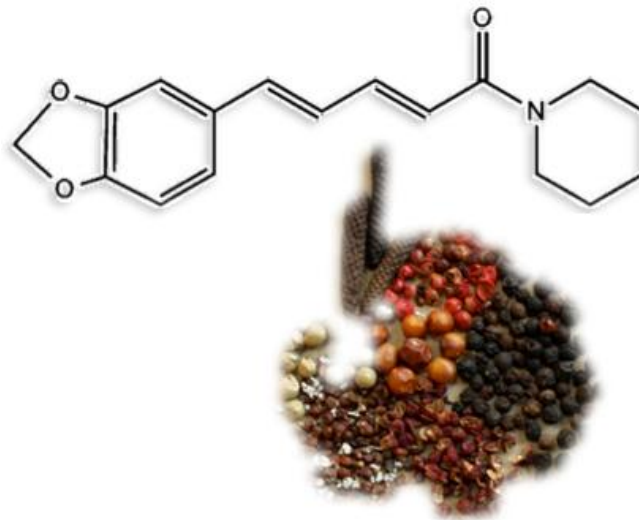


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ**  
**ΚΛΑΔΟΣ ΠΙ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ**  
**ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ελένη Κατσίβα**

**«Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης σε πιπέρια με  
φασματοσκοπία UV-Vis. Ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων  
προσδιορισμού με φασματοσκοπικές τεχνικές IR και Raman»**



**Επιβλέπων Καθηγητής :**

**Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ**  
**ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ : ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ**  
**ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ελένη Κατσίβα**

Γεωπόνος Βιοτεχνολόγος

**«Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης σε πιπέρια με  
φασματοσκοπία UV-Vis. Ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων  
προσδιορισμού με φασματοσκοπικές τεχνικές IR και Raman»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κωνσταντίνου Βιολέττα, Καθηγήτρια ΓΠΑ.

Παππάς Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ**

**ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2014**

*«Αυτό που παρατηρούμε δεν είναι η ίδια η φύση, αλλά το κομμάτι της φύσης που αποκαλύπτεται στη μέθοδο έρευνας που χρησιμοποιούμε»*



*Werner Heisenberg, Γερμανός φυσικός*

## *ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ*

Η παρούσα διπλωματική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής Ανθρώπου και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Γενικής Χημείας, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014.

Πριν την παρουσίαση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Θα ήθελα καταρχάς, να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη, εισηγητή του θέματος και επιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την πολύτιμη καθοδήγησή του, την ενθάρρυνση, την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και κατά το στάδιο συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο καθηγητή Χρήστο Παππά για την ουσιαστική συνεργασία και βοήθειά του, για το χρόνο και τη γνώση που μου έδωσε σε ό, τι αφορά στα θέματα της χημειομετρίας.

Ευχαριστώ επίσης τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας, Καθηγητή Μόσχο Πολυσιού για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου και την παραχώρηση των οργάνων για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, καθώς και όλη την «ομάδα» του εργαστηρίου που ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει σε ό, τι πρόβλημα προέκυπτε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου και τον αδερφό μου, η συνεισφορά των οποίων σε κάθε μου προσπάθεια είναι ανεκτίμητη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και όλους όσους βρέθηκαν πλάι μου, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

*Ελένη Κατσιβα*

*Αθήνα, Οκτώβριος 2014*

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	I
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	II
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	IV
ABSTRACT.....	VI

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	1
1.2 ΠΙΠΕΡΙ .....	3
1.3 ΠΙΠΕΡΙ ΤΟ ΜΕΛΑΝ ( <i>Piper nigrum</i> ) .....	4
1.3.1 Γενική μορφολογία κα ανάπτυξη .....	6
1.3.2 Παραγωγή .....	7
1.3.3 Επεξεργασία .....	9
1.3.4 Προϊόντα του <i>Piper nigrum</i> .....	12
1.3.5 Συστατικά και κλάσματα του πιπεριού.....	15
1.3.5.1 Ελαιορητίνη-Πιπερίνη .....	17
1.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	21
1.4.1 Ιδιότητες ελαιορητίνης πιπερίνης .....	21
1.4.2 Ιδιότητες πιπεριού.....	25
1.4.3 Επιπτώσεις στον οργανισμό .....	27
1.5 ΙΣΧΥΟΥΣΑ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ .....	28

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΛΑΙΟΡΗΤΙΝΗΣ-ΠΙΠΕΡΙΝΗΣ.....	31
2.1.1 Άλλες τεχνικές απομόνωσης.....	34
2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΙΠΕΡΙΝΗΣ.....	38
2.2.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) .....	38
2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) .....	39
2.2.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου IR.....	41
2.2.3.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier .....	42
2.2.3.2 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης.....	43

2.2.4	Φασματοσκοπία Raman.....	45
2.2.5	Εφαρμογές φασματοσκοπίας IR και Raman στον προσδιορισμό πιπερίνης .	47
2.2.6	Χημειομετρία και μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων.....	48
2.3	ΣΚΟΠΟΣ .....	49
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>		
3.1	ΥΛΙΚΑ.....	51
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	52
3.2.1	Προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών.....	52
3.2.1.1	Προσδιορισμός υγρασίας.....	52
3.2.1.2	Προσδιορισμός πιπερίνης .....	52
3.2.2	Φασματοσκοπική μελέτη με FT-IR και Raman.....	54
3.2.3	Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR και Raman .....	56
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>		
4.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ.....	57
4.1.1	Περιεκτικότητα υγρασίας .....	58
4.1.2	Περιεκτικότητα πιπερίνης .....	59
4.2	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ FT-IR.....	61
4.2.1	Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με χημειομετρική ανάλυση στα φάσματα IR.....	69
4.3	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ RAMAN .....	85
4.3.1	Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με χημειομετρική ανάλυση στα φάσματα Raman .....	91
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>		
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>		<b>104</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
1.1	Επιστημονική ταξινόμηση του <i>P.nigrum</i>	5
1.2	Αρωματικά και πτητικά συστατικά του <i>P.nigrum</i>	16
1.3	Έντομα που παρουσιάζουν ευαισθησία στις ενώσεις <i>Piper nigrum</i>	22
1.4	Προδιαγραφές σχετικά με την υγρασία και την πιπερίνη κατά ΚΤΠ, ESA-ASTA, ISO και Σρι Λάνκα	30
3.1	Στοιχεία πιπεριών της ελληνικής αγοράς	51
3.2	Στοιχεία πιπεριών από τη Σουηδία	52
4.1	Συνολικά αποτελέσματα αναλύσεων των πιπεριών της Ελληνικής αγοράς	57
4.2	Συνολικά αποτελέσματα αναλύσεων των πιπεριών από τη Σουηδία	58
4.3	Δονήσεις της πιπερίνης στο IR	62
4.4	Παρατηρούμενες κορυφές στα IR φάσματα των πιπεριών	64
4.5	Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στις περιοχές 3050- 2805 cm <sup>-1</sup> και 1700-800 cm <sup>-1</sup>	74
4.6	Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 3050- 882 cm <sup>-1</sup>	78
4.7	Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 1776-600 cm <sup>-1</sup>	83
4.8	Χαρακτηριστικές εντάσεις Raman καθαρής πιπερίνης	85
4.9	Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στις περιοχές 1625-1580 cm <sup>-1</sup> και 1400-1100 cm <sup>-1</sup>	94
4.10	Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 1703-1608 cm <sup>-1</sup>	99
	(Παράστημα) Πίνακες μετρήσεων υγρασίας και πιπερίνης επί ξηρού	115

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists	Ένωση Αναλυτικών Χημικών
<b>ASTA</b>	American Spice Trade Association	Αμερικανικός Εμπορικός Σύλλογος Μπαχαρικών
<b>CCD</b>	Charge-Coupled Device	Ανιχνευτής Σύζευξης Φορτίου
<b>DIS</b>	Draft International Standard	Σύνταξη Διεθνούς Πρότυπου
<b>DRIFTS</b>	Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου Διάχυτης Ανάκλασης με Μετασχηματισμό κατά Fourier
<b>DRS</b>	Diffuse Reflectance Spectroscopy	Φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης
<b>ESA</b>	European Spice Association-ESA	Ευρωπαϊκός Σύλλογος Μπαχαρικών
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization	Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας
<b>FT-IR</b>	Fourier Transform Infra Red Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό κατά Fourier
<b>FT-Raman</b>	Fourier Transform Raman Spectroscopy	Φασματοσκοπία Raman με Μετασχηματισμό κατά Fourier
<b>GC</b>	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
<b>GRAS</b>	Generally Recognized as Safe	Γενικά Αναγνωρισμένο ως Ασφαλές
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
<b>HPTLC</b>	High Performance Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης
<b>InGaAs</b>	Indium Gallium Arsenide	Ινδίου Γάλλιο Αρσενικούχο
<b>IPC</b>	International Pepper Community	Διεθνής Κοινότητα Πιπεριού
<b>IR</b>	Infra Red Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου
<b>ISO</b>	International Organization of Standardization	Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης
<b>MAE</b>	Microwave-assisted Extraction	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από



		Μικροκύματα
<b>MS</b>	Mass spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
<b>PLE</b>	Pressurized Liquid Extraction	Εκχύλιση με Υγρά Υπό Πίεση
<b>PLS</b>	Partial Least Squares	(Μέθοδος) Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
<b>PPO</b>	Plant Polyphenol Oxidases	Οξειδάση πολυφαινόλων
<b>RMSEC</b>	Root Mean Square Error of Calibration	Μέση Τετραγωνική Ρίζα των Σφαλμάτων Βαθμονόμησης
<b>SCFE</b>	Supercritical Fluid Extraction	Εκχύλιση με Υπερκρίσιμα Ρευστά
<b>TRPV</b>	Transient Receptor Potential Vanilloid	Υποδοχέας βανιλλοειδών
<b>UNIDO</b>	United Nations Industrial Development Organization	Οργανισμός Βιομηχανικής Ανάπτυξης των Ηνωμένων Εθνών
<b>UV-Vis</b>	Ultra Violet-Visible	Υπεριώδους-Ορατού (Φασματοφωτομετρία)
<b>USE</b>	Ultra Sound-assisted Extraction	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Υπερήχους
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας
<b>ΚΤΠ</b>		Κώδικας Τροφίμων και Ποτών

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιστορία των μπαχαρικών είναι τόσο παλιά όσο και ο ανθρώπινος πολιτισμός, θα μπορούσαμε να την παραλληλίσουμε με την πορεία της ανθρωπότητας αφού δεν υπήρξε πολιτισμός που να μην αναγνώρισε την αξία τους. Το μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*) ήταν το πρώτο μπαχαρικό που αποτέλεσε αντικείμενο συναλλαγής σε παγκόσμιο επίπεδο και γνωστό ως ο «Βασιλιάς» των μπαχαρικών, ξεχώριζε για το χαρακτηριστικό άρωμα και την πικάντικη γεύση του.

Το μαύρο πιπέρι έχει πολλές ιδιότητες και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα για διάφορους σκοπούς, όπως για παράδειγμα ως πρόσθετο στο φαγητό, για τη βελτίωση της γεύσης και του αρώματός του. Ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του πιπεριού είναι η πιπερίνη η οποία είναι υπεύθυνη για την οξεία και πικάντικη γεύση του. Οι ιδιότητες της φαίνεται να είναι πολλές, ενώ σημαντικός είναι ο ρόλος της στην αύξηση της απορρόφησης και της βιοδιαθεσιμότητας των άλλων βιοδραστικών ενώσεων.

Τα προϊόντα του *P. nigrum* είναι αρκετά, ανάμεσα στα πιο σημαντικά βρίσκονται το μαύρο και το λευκό πιπέρι και διατίθενται στο εμπόριο είτε ως ολόκληροι κόκκοι, είτε σε μορφή τριμμένου πιπεριού.

Η πιπερίνη έχει προσδιοριστεί κατά καιρούς με πολλές από τις τεχνικές της σύγχρονης ανάλυσης, όπως είναι η χρωματογραφία και η φασματοσκοπία. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης σε 16 μαύρα και 6 λευκά πιπέρια με φασματοσκοπία UV-Vis, σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO 5564 και η ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων προσδιορισμού με φασματοσκοπικές τεχνικές IR και Raman με τη βοήθεια της χημειομετρίας. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε:

- Προσδιορισμός της υγρασίας για την αναγωγή αποτελεσμάτων επί ξηρού προϊόντος.
- Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με φασματοσκοπία UV-Vis.
- Έρευνα των πιπεριών με φασματοσκοπία IR (DRIFTS) και Raman, μελετώντας χαρακτηριστικές απορροφήσεις και εντάσεις που οφείλονται στην πιπερίνη.
- Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού της περιεκτικότητας της πιπερίνης μέσω φασματοσκοπίας IR και Raman με δημιουργία μοντέλων PLS ποσοτικής ανάλυσης.

Βάσει των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η υγρασία είναι της τάξεως του 11%, με τα μαύρα πιπέρια να περιέχουν λιγότερη υγρασία από τα λευκά.

Τα ποσοστά πιπερίνης στα μαύρα και τα λευκά πιπέρια είναι παρόμοια αν και τα μαύρα πιπέρια δείχνουν να έχουν έστω και ελάχιστα περισσότερη πιπερίνη από τα λευκά ( $6,5 \pm 1,2\%$  έναντι  $6 \pm 0,7\%$ ). Αυτές οι τιμές ενδέχεται να είναι υψηλότερες από τις "πραγματικές", επειδή στο ίδιο μήκος κύματος απορροφούν και άλλα αλκαλοειδή.

Τα φάσματα IR (DRIFTS) παρουσιάζουν χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή  $3600-2800 \text{ cm}^{-1}$  (δονήσεις τάσης των O-H, αρωματικών και αλειφατικών C-H, ασύμμετρων

και συμμετρικών CH<sub>2</sub>) και 1700-800 cm<sup>-1</sup> (δονήσεις τάσης και κάμψης των συμμετρικών και ασύμμετρων C = C, -CO-N, αρωματικών C = C, CH<sub>2</sub> = C-O-C, C-O, εντός και εκτός πεδίου φαινολικών C-H) που αποδίδονται στην πιπερίνη αλλά και στην περιεχόμενη υγρασία (δονήσεις τάσης O-H).

Τα φάσματα Raman δίνουν χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή 1630-1100 cm<sup>-1</sup> (δονήσεις τάσης και κάμψης των αρωματικών και αλειφατικών -C=C-, >N-C=O, -CH<sub>2</sub>, -C-C-) που αποδίδονται στην πιπερίνη.

Τα λευκά πιπεριών, που στερούνται περικαρπίου, δίνουν πιο "καθαρά" φάσματα IR και ειδικότερα φάσματα Raman, απ' ό,τι τα μαύρα πιπέρια.

Με τη βοήθεια της χημειομετρίας (Μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων) και έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας UV-Vis, αναπτύχθηκαν τρεις μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού της πιπερίνης στα καταγεγραμμένα φάσματα FT-IR και δύο μέθοδοι στα φάσματα Raman, των πιπεριών. Σε όλες τις μεθόδους, η προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS δεν αποκλίνει πολύ από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί κατά τη μέθοδο ISO 5564, με αποτέλεσμα να καταφέρνουν να δώσουν μια ικανοποιητική εκτίμηση της περιεκτικότητας ενός άγνωστου πιπεριού (*Piper nigrum*), με μια απόκλιση από 0 έως 2,4% σε πιπερίνη. Επιπλέον, οι δύο μέθοδοι με τα φάσματα Raman παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα από τις αντίστοιχες τρεις μεθόδους με τα φάσματα IR και αυτό οφείλεται στις μικρότερες αποκλίσεις που παρουσιάζουν οι πρώτες μέθοδοι.

Οι δύο τεχνικές φασματοσκοπίας IR (DRIFT) και Raman φαίνεται ότι έχουν τη δυνατότητα να αντικαταστήσουν τα ισχύοντα πρότυπα των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται σήμερα (UV-Vis και HPLC) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της πιπερίνης σε μαύρα και λευκά πιπέρια.

Εργαστήριο Χημείας του Γ.Π.Α.

Οκτώβριος 2014

---

**Λέξεις κλειδιά :** *Piper nigrum* • Μαύρο πιπέρι • Πιπερίνη • Φασματοσκοπία UV-Vis • ISO • Φασματοσκοπία IR (DRIFT) • Φασματοσκοπία Raman • Χημειομετρία

---

## **"Quantification of piperine in peppers by spectroscopy UV-Vis. Development of alternative methods of determination by spectroscopic techniques IR and Raman »**

### **ABSTRACT**

The history of spices is as old as human civilization, could be a parallel to the progress of mankind since there was no culture that did not recognize their value. Black pepper (*Piper nigrum*) was the first spice traded in the world and known as the "King" of spices, stood for the characteristic aroma and spicy flavor.

Black pepper has many properties and therefore used since ancient times for various purposes, such as additive to food to improve its taste and aroma. One of the most important components of pepper is piperine which is responsible for the sharp and spicy flavor. These properties appear to be numerous, while her role in increasing the absorption and bioavailability of other bioactive compounds, is important.

The products of *P. nigrum* are many, among the most important are the black and white pepper and marketed either as whole grains, either in the form of ground pepper.

Piperine at times has been determined by many of the techniques of modern analysis, such as chromatography and spectroscopy. The purpose of this Master Thesis is determination of piperine in 16 black and 6 white peppercorns by spectroscopy UV-Vis, according with International Standard ISO 5564 and the development of alternative methods of determination by spectral IR and Raman techniques with the assistance of Chemometrics. Specifically conducted:

- Determination of moisture to reduce effects on dry weight.
- Quantification of piperine by spectroscopy UV-Vis.
- Research of peppers by spectroscopy IR (DRIFTS) and Raman, studying characteristic absorptions and intensities due to piperine.
- Development of methods for determining the content of piperine by IR and Raman spectroscopy and framing chemometric algorithms PLS quantitative analysis.

Based on the results, it is found that the humidity is around 11%, with black peppers containing less moisture than white.

The rates of piperine in black and white peppers are similar even if black peppers seem to have remotely more piperine from white ( $6,5 \pm 1,2\%$  versus  $6 \pm 0,7\%$ ). These prices may be higher than the "real" because at the same wavelength absorb other alkaloids.

Spectra IR (DRIFTS) show characteristic peaks in the region  $3600-2800\text{ cm}^{-1}$  (stretching vibration of O-H, aromatic and aliphatic C-H, asymmetric and symmetric CH<sub>2</sub>) and  $1700-800\text{ cm}^{-1}$  (stretching vibration and bending of symmetric and asymmetric C = C, -CO-N, aromatic C = C, CH<sub>2</sub>, = COC, C-O, within and outside the scope of phenolic C-H) attributed to piperine and moisture content (stretching vibration O-H).

The Raman spectra give characteristic peaks in the region 1630-1100  $\text{cm}^{-1}$  (stretching vibration and bending of aromatic and aliphatic  $-\text{C}=\text{C}-$ ,  $>\text{NC}=\text{O}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CC}-$ ) attributed to piperine.

White peppers, lacking pericarp, give more "distinct" IR spectra and particular Raman spectra, than black pepper.

With the assistance of chemometrics (Method of Partial Least Squares) and having as a reference the results of spectroscopy UV-Vis, three quantification methods of piperine to the recorded FT-IR spectra and two methods to Raman spectra developed. In all methods, the predicted concentration of piperine (%) with PLS does not deviate far from those identified by the ISO 5564 method, thus manage to provide a satisfactory estimate of the content of an unknown pepper (*Piper nigrum*), in a deviation from 0 to 2.4% piperine. Furthermore, the two methods with Raman spectra show better results of the corresponding three methods with IR spectra and this is due to smaller deviations in the first methods.

The two spectroscopic techniques IR (DRIFT) and Raman seems to have the potential to replace the existing standards on procedures currently used (UV-Vis and HPLC) to determine the content of piperine in black and white peppers.

Chemistry Lab of A.U.A.

October 2014

---

**Keywords:** *Piper nigrum* • Black pepper • Piperine • Spectroscopy UV-Vis • ISO • Spectroscopy IR (DRIFTS) • Spectroscopy Raman • Chemometrics

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.6 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ένα ολόκληρο κείμενο θα μπορούσε να αφιερωθεί στην ιστορία των μπαχαρικών. Όταν ο άνθρωπος των σπηλαίων έβαλε το πρώτο κομμάτι κρέας πάνω από φωτιά, δημιουργήθηκε η έννοια της γεύσης. Στην αρχαιότητα, τα μπαχαρικά ήταν σύμβολα θέσης στην Ευρώπη και σε όλη τη Μεσόγειο για τους πλούσιους που τα χρησιμοποιούσαν. Καθώς τα παγκόσμια ταξίδια αναπτύχθηκαν, το εμπόριο μπαχαρικών επεκτάθηκε, με αποτέλεσμα την ανταλλαγή και τη ζήτηση μη κοινών μπαχαρικών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Η Ινδία, η Ασία και η Κίνα εισήγαγαν το γλυκάνισο, το βασιλικό, το κάρδαμο, την κανέλα, το γαρίφαλο, το σκόρδο, το τζίντζερ, τη μουστάρδα, το μοσχοκάρυδο, το κρεμμύδι, το ταμαρίνδο, και τον κουρκουμά. Οι χώρες της Μέσης Ανατολής και της Μεσογείου εκθέτουν τη δάφνη, το κόλιανδρο, το κύμινο, τον άνηθο, το μάραθο, το μοσχοσίταρο, το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο, το σουσάμι, και το θυμάρι. Η Βόρεια Αμερική και οι χώρες της Λατινικής Αμερικής παρέχουν το μπαχάρι, το αννάτο, την πιπεριά τσίλι, τη σοκολάτα, και τη σασάφρα (Tarté, 2009). Οι άνθρωποι θεώρησαν σημαντικά τα μπαχαρικά διότι ολόκληρη η οικονομία πολλών περιοχών βασίστηκε αποκλειστικά στο εμπόριο τους. Τα μπαχαρικά αποτελούσαν το σημαντικότερο στοιχείο του εμπορίου και η περιοχή που θα μπορούσε να ελέγξει το εμπόριο τους θα κυριαρχούσε ως παγκόσμια δύναμη (Risch, 1997). Επιπλέον, είχαν τεράστια εμπορική αξία, όχι μόνο ως άρτυμα για τα τρόφιμα, αλλά ως φάρμακα, συντηρητικά, και αρώματα. Από ξηρά ή θάλασσα, τα μπαχαρικά ήταν μερικά από τα πρώτα αγαθά που έπαιξαν ρόλο στην προώθηση του εμπορίου από καταβολής κόσμου (Tarté, 2009). Η κατάσταση αυτή έχει αλλάξει δραματικά με τα μπαχαρικά να αντιστοιχούν σήμερα σε λιγότερο από το 0,1% του παγκόσμιου εμπορίου. Άλλες πρώτες ύλες καθώς και τα επεξεργασμένα τρόφιμα αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερο ποσοστό του παγκόσμιου εμπορίου απ' ό,τι τα μπαχαρικά. Υπάρχουν όμως ακόμα πολλές χώρες που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό απ' το εμπόριο ενός συγκεκριμένου μπαχαρικού. Πλέον τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο σε αρωματισμένα προϊόντα διατροφής και δημιουργούν τις μοναδικές χαρακτηριστικές γεύσεις στις διαφορετικές κουζίνες. Η χρήση των μπαχαρικών έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια και

αυτό οφείλεται εν μέρει στο υψηλό επίπεδο ενδιαφέροντος σε διάφορα είδη τροφίμων που χρησιμοποιούν μια ευρεία ποικιλία καρυκευμάτων (Risch, 1997).

Το πιπέρι ήταν το πρώτο μπαχαρικό που αποτέλεσε αντικείμενο συναλλαγής σε παγκόσμιο επίπεδο και είναι το πιο σημαντικό μπαχαρικό σε εμπορευσιμότητα σε όρους ποσότητας και αξίας (Lim, 2012). Γνωστό ως ο «βασιλιάς» των μπαχαρικών, το μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*), μια πολυετής καλλιέργεια των τροπικών, είναι οικονομικά η πιο σημαντική και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη καλλιέργεια μπαχαρικών του κόσμου.

Η ιστορία των μπαχαρικών είναι πολύ συνυφασμένη με την ιστορία της ανθρωπότητας. Όμως, μέσα στην οικογένεια των μπαχαρικών, το μαύρο πιπέρι κυριαρχεί. Στην αρχαία Αίγυπτο, όταν το μουμιοποιημένο σώμα του Φαραώ, κηδεύτηκε στις Πυραμίδες, ήταν μαύρο πιπέρι, μαζί με χρυσό και ασήμι που κρατήθηκε γειτονικά του σώματος, με την πεποίθηση των αρχαίων Αιγυπτίων, ότι και στην μετέπειτα ζωή αυτό το πολύ σημαντικό μπαχαρικό θα ήταν χρήσιμο. Οι αρχαίες γραφές όπως η Αγία Γραφή, το Κοράνι, και οι Βέδες αναφέρουν τη χρήση των μπαχαρικών (Ravindran, 2000-Nair, 2011). Σύμφωνα με τη Βίβλο, κατά την επίσκεψή της η βασίλισσα Σίβα προσέφερε στο βασιλιά Σολομώντα ένα φορτίο μπαχαρικών, κυρίως πιπέρι. Σχεδόν 3000 χρόνια πριν τη γέννηση του Χριστού, τόσο οι Βαβυλώνιοι όσο και οι Ασσύριοι είχαν συναλλαγές με μπαχαρικά, κυρίως μαύρο πιπέρι, με τους ανθρώπους της ακτής του Μαλαμπάρ στην πολιτεία της Κεράλα στην Ινδική υποήπειρο. Επίσης, τα αρχαία Ινδικά ιατρικά κείμενα, αναφέρουν τη χρήση του πιπεριού σε σπάνια και μοναδικά ιατρικά σκευάσματα. Το γεγονός ότι τα μπαχαρικά, και ειδικότερα, το πιπέρι, είχαν μια διαρκή επίδραση στην οικονομική ευημερία των τόπων αποκαλύπτεται παρατηρώντας ότι η οικονομική ευημερία πόλεων όπως η Αλεξάνδρεια, η Γένοβα και η Βενετία μπορεί να εντοπιστεί από την εποχή του έντονου εμπορίου μπαχαρικών. Επίσης, αργότερα, λόγω της αυξημένης ζήτησης και κατανάλωσης του πιπεριού στην Αγγλία, δημιουργήθηκε στο Λονδίνο η πιο πλούσια συντεχνία εμπόρων, οι «Πιπεράδες» (Nair, 2011).

Το σύγχρονο κεφάλαιο στην πλούσια ιστορία του πιπεριού αρχίζει με την έλευση των Πορτογάλων στο προσκήνιο, με την απόβαση του Πορτογάλου ναυτικού Βάσκο ντα Γκάμα στην παραλία κοντά στην Κοχικόδε το 15<sup>ο</sup> αιώνα. Με αυτό τον τρόπο ξεκίνησε η διάδοση της καλλιέργειας του πιπεριού στην Κεράλα. Ύστερα, το 17<sup>ο</sup> αιώνα, ενεπλάκησαν αρχικά οι Ολλανδοί και στη συνέχεια οι Άγγλοι. Προς το τέλος του 18<sup>ου</sup> αιώνα, εισήλθαν στο εμπόριο του πιπεριού οι Αμερικάνοι. Το

Αμερικανικό εμπόριο πιπεριού μειώθηκε αργότερα κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού του περασμένου αιώνα, με την έναρξη του εμφύλιου πολέμου (Ravindran, 2000).



**Εικόνα 1.1:** Οι εμπορικοί δρόμοι στον Ινδικό Ωκεανό (Bridging World History, 2004)

Η ιστορία του πιπεριού μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο είναι απλά μια συνέχεια. Η Ινδία, η Μαλαισία, η Ινδονησία και η Βραζιλία είναι οι μεγαλύτεροι παραγωγοί και εξαγωγείς του πιπεριού, αλλά αυτό και πάλι είναι μια πολυτάραχη ιστορία με πολλά σκαμπανεβάσματα. Η καλλιέργεια του πιπεριού έχει εξαπλωθεί στο Βιετνάμ, την Κίνα, τα νησιά του Ειρηνικού, τα νησιά της Καραϊβικής, κλπ. Επίσης έχει γίνει μια εμπορική καλλιέργεια στο Βιετνάμ, την Ταϊλάνδη και την Κίνα. Επί του παρόντος, το πιπέρι καλλιεργείται ως εμπορική καλλιέργεια σε μια περιοχή 404.000 εκταρίων, που παράγει περίπου 180.000 τόνους πιπέρι ετησίως (Ravindran, 2000).

## 1.2 ΠΙΠΕΡΙ

Το όνομα του γένους *Piper* προήλθε, κατά πάσα πιθανότητα από το Ελληνικό όνομα για το μαύρο πιπέρι, «Πεπέρι» (Ravindran, 2000).

Η οικογένεια των Πιπερίδων περιλαμβάνει 10 γένη (genera) και πάνω από 1000 είδη (species) τροπικών φυτών (Jaramillo, Manos, 2001-Wiart, 2006-Chaveerach et al., 2006). Η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών του γένους *Piper* συναντάται



στις Αμερικανικές τροπικές περιοχές (700 είδη), ακολουθούμενη από τη Νότια Ασία (300 είδη) (Jaramillo, Manos, 2001).

Το πιπέρι είναι εγγενές είδος των πυκνών καταπράσινων δασών των Δυτικών Ghats στη Νότια Δυτική Ινδία (Lim, 2012). Το κράτος Κεράλα στην Ινδία ήταν η αρχική πηγή του μαύρου πιπεριού, αλλά σήμερα καλλιεργείται σε μεγάλο βαθμό σε αυτό το κράτος (95% της Ινδικής παραγωγής), καθώς και στην Ινδονησία, η δεύτερη αρχαιότερη χώρα καλλιέργειας πιπεριού, στη Βραζιλία, στη Μαλαισία, στη Σρι Λάνκα, στη Δημοκρατία Μαδαγασκάρης, σε αρκετές χώρες της Νοτιοανατολικής Ασίας, σε νησιά του Νότιου Ειρηνικού, στη Λατινική Αμερική και σε ορισμένες χώρες της Αφρικής (Ravindran, 2000).

Ευδοκμεί σε ζεστές περιοχές με 1.750 - 2.500 mm ετήσιας βροχόπτωσης, θερμοκρασίας περίπου 25-30 ° C και υγρασία πάνω από 85%. Αναπτύσσεται σε ηλιόλουστα ή μερικώς σκιαζόμενα, υγρά, καλά στραγγιζόμενα και γόνιμα εδάφη, πλούσια σε οργανική ύλη. Είναι ευαίσθητο στην ξηρασία και τον παγετό. Το μαύρο πιπέρι είναι αναρριχητικό φυτό και χρειάζεται τεχνητή υποστήριξη (ξύλινα ή από τσιμέντο υποστυλώματα) ή τον κορμό ενός ζωντανού δέντρου ως υποστήριγμα (Lim, 2012).

Ένα σημαντικό εμπόδιο στην καλλιέργεια πιπεριού είναι η χαμηλή παραγωγικότητά της καλλιέργειας η οποία οφείλεται στο φτωχό γενετικό υλικό και τη συχνότητα εμφάνισης εχθρών και ασθενειών. Η αναπαραγωγή με την εμφύτευση σπόρων είναι αβέβαιη γιατί παράγει λίγους ετερογενείς απογόνους λόγω της βραχυπρόθεσμης βιωσιμότητά τους και της υψηλής στειρότητά τους στα μετέπειτα στάδια αναπαραγωγής. Ως εκ τούτου, η αναπαραγωγή γίνεται κυρίως με μεταφύτευση 2-6 μοσχευμάτων από ώριμα φυτά ή φυτόνια. Οι δίοικοι απόγονοι παράγονται συνήθως από σπόρους, ωστόσο ποικιλίες με δύο φύλα μπορούν να ληφθούν και με αγενή πολλαπλασιασμό (Abassi et al.,2010).

### **1.3 ΠΙΠΕΡΙ ΤΟ ΜΕΛΑΝ (*Piper nigrum*)**

Από τα 1000 είδη *Piper* (*P.*), το *P. nigrum* είναι το πιο σημαντικά καλλιεργούμενο είδος, λόγω της οικονομικής του αξίας (Bhat et al., 1995, Abassi et al.,2010). Γεωγραφικά, περιορίζεται στα Δυτικά Ghats της νότιας Ινδίας (Nair, Gupta, 2003-Abassi et al.,2010). Ωστόσο, ορισμένες αναφορές καλλιέργειας από τη Μαλαισία, την Ινδονησία, τη Βραζιλία, τη Σρι Λάνκα και τις Δυτικές Ινδίες είναι επίσης διαθέσιμες. Το *P. nigrum* είχε βρεθεί σε μεγάλα υψόμετρα και έδειξε μεγάλη

προσαρμοστικότητα σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών που οδήγησαν στη διαφορετικότητα μεταξύ των ειδών (Howard, 1973- Abassi et al.,2010). Το «μαύρο πιπέρι», είναι η γενικευμένη ονομασία του και οφείλεται στο χρώμα του πιπεριού. Χρησιμοποιείται ευρέως στη μαγειρική και τη μεταποίηση των τροφίμων και αρωμάτων. Η ποιότητά του κρίνεται από την οσμή και πικάντικη γεύση του (Abassi et al.,2010).



**Εικόνα 1.2:** Ανώριμοι και ώριμοι καρποί πιπεριού  
(<http://blogs.reading.ac.uk/tropical-biodiversity/>)

**Πίνακας 1.1:** Επιστημονική ταξινόμηση του *P.nigrum*  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Black\\_pepper](http://en.wikipedia.org/wiki/Black_pepper))

<b>Βασίλειο</b>	Φυτικό
<b>Συνομοταξία</b>	Αγγειόσπερμα
<b>Ομοταξία</b>	Δικοτυλήδονα
<b>Τάξη</b>	Piperales
<b>Οικογένεια</b>	Piperaceae
<b>Γένος</b>	Piper
<b>Είδος</b>	<i>P. nigrum</i>

### 1.3.1 Γενική μορφολογία και ανάπτυξη

Τα φύλλα του *Piper nigrum* είναι κατ' εναλλαγή, απλά, ακέραια, ωοειδή έως ωοειδή-επιμήκη. Έχουν πάχος 10-15 × 5-9 cm και το έλασμα είναι ωοειδές, λιγότερο ή περισσότερο δερματώδες, συνήθως ελαφρώς πλάγιο και οξυκατάληκτο. Είναι πολύνευρα (5-7 (-9)) και η νεύρωση είναι δικτυωτή. Τα φύλλα έχουν σκούρο, γυαλιστερό, πράσινο χρώμα στην επάνω επιφάνεια και είναι πυκνά αδενώδη στην κάτω επιφάνεια. Ο μίσχος είναι 1-2 cm. Τα άνθη είναι μικρά, διγενή ή μονογενή, γυμνά κατά κρεμαστούς στάχεις που είναι αντίθετοι με επιμήκη βράκτια (Weiss, 2002-Lim, 2012).

Το μαύρο πιπέρι είναι ένα πολυετές αναρριχητικό φυτό που αναρριχείται στα δέντρα υποστήριξης με τη βοήθεια εναέριων προσκολλημένων ριζών. Καθώς το φυτό μεγαλώνει πάνω στο δέντρο υποστήριξης, παράγει δύο αναπτυξιακά διαφορετικούς τύπους κλάδων, δηλαδή το πιπέρι παρουσιάζει διμορφική διακλάδωση. Είναι η ευθύγραμμη, προς τα πάνω αύξηση, μονοποδιακή με ορθότροπα κλαδιά και η συμποδιακή πλευρική αύξηση, με πλαγιότροπους κλάδους καρποφορίας. Το κύριο στέλεχος ή οι ορθότροποι βλαστοί ανεβαίνουν το υποστήριγμα, έχουν απεριόριστη ανάπτυξη και υφίστανται διακλάδωση που παράγει πλευρικούς κλάδους καρποφορίας. Κάθε κόμβος παρέχει προσκολλητικές ρίζες και βοηθούν στην αγκίστρωση του αναρριχητικού φυτού πάνω στο δέντρο στήριξης. Οι ρίζες αυτές στην παρουσία άφθονων βροχοπτώσεων μπορεί να αυξηθούν σε μήκος και όταν έρθουν σε επαφή με ένα ρίζωμα μπορεί να εξελιχθούν σε κανονικές υπόγειες ρίζες. Οι βλαστοί αναπτύσσονται ορθότροπα σε πάχος από ένα τύπο δευτεροβάθμιας πύκνωσης. Από τις μασχάλες των φύλλων των ορθότροπων βλαστών, προκύπτουν πλευρικά πλαγιότροπα κλαδιά και έχουν συμποδιακή ανάπτυξη. Όπως αναπτύσσεται ο βλαστός, ο τερματικός οφθαλμός τροποποιείται σε στάχυ και η ανάπτυξη συνεχίζεται περαιτέρω από το μασχαλιαίο οφθαλμό. Οι πλευρικοί κλάδοι δεν παράγουν εναέριες ρίζες. Το μέγεθος και το σχήμα των φύλλων συχνά παρουσιάζει διαφορές από εκείνα των ορθότροπων βλαστών. Λόγω του ισχυρού θερμοτροπισμού, αυτοί οι δύο κλάδοι συμπεριφέρονται διαφορετικά όταν φυτεύονται. Ο ορθότροπος βλαστός παρέχει μια κανονική αναρρίχηση στο φυτό σε ένα υποστήριγμα και παραγωγή πλευρικών βλαστών από την ίδια βάση, ενώ ο πλαγιότροπος βλαστός παράγει ένα θαμνώδες φυτό που παράγει περαιτέρω πλαγιότροπα άνθη και καρπούς.

Οι ορθότροποι βλαστοί παράγουν περιστασιακά μασχαλιαίους κλάδους που εμφανίζουν μονοποδιακή ανάπτυξη. Δεν υφίστανται διακλάδωση όπως ο ορθότροπος

βλαστός και δεν παράγουν συνήθως προσκολλητικές ρίζες στους κόμβους. Είναι γεωτροπικοί, μεγαλώνουν προς τα κάτω και ως εκ τούτου ονομάζονται κρεμαστοί βλαστοί. Όταν έρχονται σε επαφή με το έδαφος, αν η υγρασία είναι διαθέσιμη, παράγουν ρίζες στους κόμβους και σέρνονται στο έδαφος ή ανεβαίνουν σε γειτονικά δέντρα ή θάμνους. Όταν χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό αναπτύσσονται ψηλά και λεπτά, ενώ παράγουν πλευρικούς κλάδους μόνο στην κορυφή (Ravindran, 2000).



**Εικόνα 1.3:** Ανάπτυξη του φυτού του *P. nigrum* σε υποστηρίγματα  
([www.cnseed.org](http://www.cnseed.org))

### 1.3.2 Παραγωγή

Το μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum* Linn), γνωστό ως ο «βασιλιάς των μπαχαρικών», παρέμεινε το πιο πολύτιμο είδος μπαχαρικού στον κόσμο. Λέγεται επίσης και «μαύρος χρυσός», λόγω της διατηρησιμότητας και της αξίας του. Είναι εγγενές είδος στην περιοχή Μάλαμπαρ (Malabar) στη δυτική ακτή της νότιας Ινδίας του κράτους Κεράλα και παράγει το 97% του Ινδικού πιπεριού (Hema et al., 2007). Άλλες παραδοσιακές χώρες παραγωγής είναι η Ινδονησία και η Σρι Λάνκα.

Σήμερα, το μαύρο πιπέρι είναι ευρέως καλλιεργούμενο σε αρκετές χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας όπως η Μαλαισία, η Ταϊλάνδη, το Βιετνάμ, η Καμπότζη, η Ν. Κορέα και κάποιες περιοχές του νότου της Κινεζικής επικράτειας. Καλλιεργείται επίσης στη Λατινική Αμερική, κυρίως στη Βραζιλία ακολουθούμενη από το Μεξικό, τη Γουατεμάλα, την Κόστα Ρίκα κ.α., όπως και στα νησιά του Ειρηνικού ωκεανού, με τα νησιά Φίτζι να παρουσιάζουν την πιο σημαντική παραγωγή πιπεριού σ' αυτή τη

γεωγραφική περιοχή. Εντός της Αφρικανικής ηπείρου η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα είναι η Μαδαγασκάρη και ακολουθούν χώρες όπως το Μαλάουι, η Κένυα, το Κονγκό, η Νιγηρία κ.α. (Peter, 2001-Nair, 2011-Lim, 2012-Yogesh, Mokshapathy, 2013).

Στο παρελθόν, η Ινδία, η Ινδονησία και η Βραζιλία ήταν οι κορυφαίες χώρες παραγωγής πιπεριού στον κόσμο. Από το 1990, το Βιετνάμ συμμετέχει στην εξαγωγή του πιπεριού με μερίδιο 6% και παρουσιάζει ισχυρή συνεχή παραγωγική αύξηση. Το 2006 εξήγαγε 118618 τόνους πιπεριού, καταλαμβάνοντας το 60% της παγκόσμιας παραγωγής πιπεριού. Μέχρι σήμερα, το Βιετνάμ είναι η μεγαλύτερη χώρα εξαγωγής πιπεριού στον κόσμο. (Nam, 2008-Yogesh, Mokshapathy, 2013).

Από το 2004, η συνολική παγκόσμια εξαγωγή πιπεριού εκτιμάται ότι έχει μειωθεί εξαιτίας του μεγάλου πληθυσμού των εντόμων στις κύριες περιοχές παραγωγής του καθώς και λόγω της μείωσης των τιμών το 2002. Δεδομένου της μείωσης του εξαγωγίμου πιπεριού στην παγκόσμια αγορά, η προσφορά ήταν ανεπαρκής σε σχέση με τη ζήτηση του πιπεριού με αποτέλεσμα να αυξηθεί εν τέλει η τιμή του. Το 2006 η τιμή αυξήθηκε απότομα και έφθασε το υψηλότερο επίπεδο, μερικές φορές πάνω από 3000 δολάρια / τόνο για το μαύρο πιπέρι και 4000 δολάρια/τόνο για το λευκό πιπέρι.

Η παραγωγή του πιπεριού αναμένεται να αλλάξει ως αποτέλεσμα των κοινωνικό-οικονομικών αλλαγών που υφίστανται οι χώρες που το παράγουν. Η γεωργία δεν είναι πλέον ελκυστική στις ταχέως αναπτυσσόμενες χώρες όπως η Βραζιλία, η Μαλαισία και η Ταϊλάνδη, όπου το κόστος της γεωργικής εργασίας έχει αυξηθεί, αποκλείοντας την οικονομικά βιώσιμη παραγωγή με αποτέλεσμα να μειωθεί στις ερχόμενες δεκαετίες. Η Σρι Λάνκα δεν πρόκειται να είναι ένας σημαντικός παραγωγός λόγω των περιορισμένων εκτάσεων. Η Κίνα και το Βιετνάμ ίσως παίξουν μεγαλύτερο ρόλο στο παγκόσμιο εμπόριο πιπεριού και την οικονομία, και αναμένεται ταχεία αύξηση των εκτάσεων και της παραγωγής στις χώρες αυτές.

Η μέση κατανάλωση πιπεριού αυξάνεται ετησίως 4-5% λόγω της αυξημένης χρήσης τους στα τρόφιμα. Υπάρχουν πάνω από 40 χώρες που εισάγουν πιπέρι και οι σημαντικότερες είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Γερμανία και η Γαλλία. Το 2004, οι Ευρωπαϊκές χώρες είχαν το μεγαλύτερο μερίδιο εισαγωγών, καταλαμβάνοντας το 34%, επόμενες είναι οι χώρες της Ασίας και της Ωκεανίας. Πρόσφατα, υπήρξε μια έντονη αύξηση στην κατανάλωση πιπεριού στη Μέση Ανατολή και στις χώρες της Βόρειας Αφρικής (Nam, 2008). Η παραγωγή το 2010 εκτιμάται ότι ανήλθε στους

230000 τόνους και το 2020 υπολογίζεται ότι θα φτάσει τους 280000 τόνους. Δηλαδή, η ετήσια αύξηση θα είναι της τάξης των 50000 τόνων προκειμένου να ικανοποιηθεί η ζήτηση του καταναλωτικού κοινού στο συγκεκριμένο προϊόν (Nair, 2011).

### **1.3.3 Επεξεργασία**

Στην Ινδία, το μαύρο πιπέρι ανθίζει κατά τη διάρκεια του Μαΐου-Ιουνίου, με την έναρξη των Νοτιοδυτικών μουσώνων και η περίοδος συγκομιδής εκτείνεται από το Νοέμβριο έως τον Ιανουάριο. Στη Μαλαισία και την Ινδονησία η ανθοφορία ξεκινά τον Σεπτέμβριο με Οκτώβριο και οι καλλιέργειες συγκομίζονται το Μάρτιο-Απρίλιο. Η διακύμανση στο χρόνο ωρίμανσης εξαρτάται από παράγοντες όπως η ποικιλία, οι βροχοπτώσεις, το υψόμετρο, η θερμοκρασία περιβάλλοντος κ.λπ. Στις πεδιάδες της Κεράλα, οι πρώιμες ποικιλίες φτάνουν το στάδιο της συγκομιδής το Νοέμβριο και οι ώριμες το Δεκέμβριο με Ιανουάριο. Σε μεγαλύτερα υψόμετρα, η ανάπτυξη και η ωρίμανση των καρπών μπορεί να καθυστερήσει λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας του χειμώνα. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι πρώιμες ποικιλίες ωριμάζουν το Δεκέμβριο, αλλά οι όψιμες συγκομίζονται τον Φεβρουάριο με Μάρτιο μέχρι και τον Απρίλιο.

Η συγκομιδή ξεκινά με βάση κυρίως την εξωτερική εμφάνιση των καρπών. Όταν ένας ή δύο καρποί στο στάχυ παίρνουν έντονο πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα ξεκινά η συγκομιδή. Μόνο τα ώριμα στάχυα συγκομίζονται. Τα ανώριμα στάχυα όταν ξηραίνονται τείνουν να δίνουν συρρικνωμένους κόκκους και αυτό στη συνέχεια μειώνει την παραγόμενη ποιότητα. Ωστόσο, στη Σρι Λάνκα, γίνεται πρόωρη συγκομιδή και η παραγωγή είναι γενικά γνωστή ως "ελαφρύ πιπέρι», η οποία είναι υπερτιμημένη στην αγορά, επειδή περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ελαιορητίνης και πτητικών ελαίων. Η συγκομιδή γίνεται χειρωνακτικά με αναρρίχηση στο κλίμα χρησιμοποιώντας ένα καλάμι. Μόνο στις επίπεδες φυτείες μπορούν να χρησιμοποιηθούν μηχανικές σκάλες για τη συγκομιδή. Στην Ινδία, οι φυτείες πιπεριού τοποθετούνται σε λασπώδη εδάφη με αποτέλεσμα η συγκομιδή να γίνεται μόνο χειρωνακτικά (Thankamani et al., 2009- Nair, 2011).



**Εικόνα 1.4:** Χειρωνακτική συγκομιδή με καλάμι (αριστερά) και με σκάλα (δεξιά)  
(<http://brazil-trade-business.com>, <http://depedkto12.blogspot.gr>)

Μόλις ολοκληρωθεί η συγκομιδή και η παραγωγή μεταφερθεί στο αγρόκτημα, ακολουθούν οι μετασυλλεκτικές εργασίες. Ο κατάλληλος χειρισμός μετά τη συγκομιδή του προϊόντος είναι μεγάλης ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ποιότητας του προϊόντος.

Το πρώτο βήμα στο χειρισμό μετά τη συγκομιδή είναι η απομάκρυνση των καρπών από το στέλεχος. Τα στάχυα απλώνονται στο πάτωμα και οι καρποί διαχωρίζονται με τρίψιμο είτε στο χέρι είτε με αλωνιστικές μηχανές. Παρά το γεγονός ότι οι μηχανές εξοικονομούν χρόνο δεν είναι δημοφιλής στην Ινδία, αλλά χρησιμοποιούνται ευρέως σε άλλες χώρες, όπως η Ινδονησία και τη Μαλαισία. Στη συνέχεια πλένονται και ακολουθεί το ζεμάτισμα.

Η αμαύρωση των καρπών διεξάγεται με εμβάπτιση τους σε βραστό νερό για ένα λεπτό. Αυτή η διαδικασία καθαρίζει το προϊόν από όλα τα προσκολλημένα σωματίδια σκόνης και δίνει λαμπρό μαύρο χρώμα στο προϊόν ενισχύοντας τη διαδικασία της ξήρανσης που ακολουθεί.

Το ζεμάτισμα ενεργοποιεί το ένζυμο φαινόλαση η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του μαύρου χρώματος. Επίσης, διατρύει τα κύτταρα και ως εκ τούτου επιταχύνει την απομάκρυνση της υγρασίας από τον εσωτερικό πυρήνα, ενώ ταυτόχρονα ενισχύει το μαύρο χρώμα με τη βοήθεια των ρητινοειδών στο εσωτερικό

του καρπού. Το μαύρο χρώμα που αποκτά το πιπέρι οφείλεται στην οξείδωση των έγχρωμων φαινικών ενώσεων που υπάρχουν στην επιδερμίδα των καρπών.

Οι καρποί μετά το ράβδισμα γενικά ξηραίνονται στον ήλιο όταν η περιεκτικότητα σε υγρασία μειώνεται από περίπου 65% σε 8-10%. Η ξήρανση στον ήλιο είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται στις περισσότερες χώρες ανάπτυξης του πιπεριού. Το πιπέρι που ξηραίνεται στον ήλιο πρέπει να περιστρέφεται σε τακτά χρονικά διαστήματα για να διευκολύνεται η ομοιόμορφη ξήρανση και να αποφεύγεται η αλλοίωση από μούχλα. Το βασικό μειονέκτημα της ξήρανσης στον ήλιο είναι η έλλειψη ομοιομορφίας και η πιθανότητα μόλυνσης από μικροοργανισμούς. Η απόδοση επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και η υγρασία κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας, η γενική υγρασία του εδάφους, οι βροχοπτώσεις, η διαθεσιμότητα των λιπασμάτων κλπ. Για την καλή ποιότητα των προϊόντων, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί η κατάλληλη επιφάνεια ξήρανσης (Ravindran, 2000- Nair, 2011).

Η ξήρανση γίνεται σε διάφορες επιφάνειες, όπως είναι οι ψάθες μπαμπού, δάπεδα τσιμέντου ή μαύρα φύλλα πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας. Έχει παρατηρηθεί ότι η μαύρη επιφάνεια του φύλλου, λόγω της απορρόφησης και συγκράτησης της θερμότητας οδηγεί σε ταχύτερη ξήρανση από τις άλλες επιφάνειες που χρησιμοποιούνται.



**Εικόνα 1.5:** Ξήρανση πιπεριού στον ήλιο

Επίσης έχουν αναπτυχθεί ηλιακοί ξηραντήρες κατά τους οποίους η αλλαγή συμβαίνει κυρίως στην τελική φάση της ξήρανσης, ενώ η ξήρανση στον ήλιο απαιτεί αρκετές ημέρες για να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο υγρασίας. Επομένως, η



ηλιακή ξήρανση επιταχύνει τη διαδικασία οδηγώντας σε μια σημαντική μείωση του χρόνου ξήρανσης. Επιπροσθέτως, πλεονεκτεί έναντι της παραδοσιακής ξήρανσης, λόγω της διατήρησης μιας σταθερής θερμοκρασίας καθ' όλη τη διαδικασία της ξήρανσης, η οποία εξασφαλίζει ένα καθαρό προϊόν χωρίς μικροβιακές μολύνσεις ή άλλες αδρανείς ύλες. Η ξήρανση των καρπών μπορεί επίσης να γίνει με τη χρήση μηχανικών ξηραντήρων (Ravindran, 2000-Thankamani et al., 2009- Nair, 2011).

Μετά ακολουθεί το στάδιο του διαχωρισμού κατά το οποίο το αποξηραμένο πιπέρι καθαρίζεται για να απαλλαγεί από ξένα σώματα (χώμα, χαλίκι, πέτρες, κοτσάνια, φύλλα) και οι καρποί ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος ή την πυκνότητα. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με συνδυασμό κοσκινίσματος και ρεύματος αέρα. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάζεται το πιπέρι τύπου *Μάλαμπαρ* (Malabar Garbled) που αποτελεί το βασικό εξαγωγίμο πιπέρι της Ινδίας. Ένα «καλό» πιπέρι θα πρέπει να έχει πυκνότητα 500-600 gr/L. Οι ελαφρείς καρποί θα πρέπει να είναι κάτω από 10% και μη γονιμοποιημένοι λιγότερο από το 4%. Όταν η πυκνότητα είναι χαμηλή υποδεικνύει την παρουσία περισσότερων ελαφριών καρπών, με επακόλουθη μικρότερη περιεκτικότητα σε άμυλο, που οδηγεί σε κακής ποιότητας άλεση (Nair, 2011).

Οι καρποί τέλος συσκευάζονται σε σακιά και αποθηκεύονται. Η διάρκεια ζωής για τους καρπούς που αποθηκεύονται σωστά είναι 12-18 μήνες. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 15-20 °C και σχετική υγρασία πάνω από 60%, μπορούν να δημιουργηθούν στην επιφάνεια των καρπών επιβλαβείς μύκητες ή αφλατοξίνες. Η ορθή συσκευασία του πιπεριού εξασφαλίζει την προστασία από την απώλεια αρώματος και την απορρόφηση ανεπιθύμητων γεύσεων και οσμών. Η συσκευασία θα πρέπει να πραγματοποιείται στη χώρα προέλευσης και να προλαμβάνει την απώλεια ή την απορρόφηση υγρασίας (Nelson, Eger, 2011).

#### **1.3.4 Προϊόντα του *Piper nigrum***

Ωριμοί, άγουροι και αποξηραμένοι καρποί χρησιμοποιούνται ως καρύκευμα σε πολλά πιάτα. Οι αποξηραμένοι καρποί είναι αυτοί που ονομάζονται κόκκοι πιπεριού. Αποξηραμένο τριμμένο πιπέρι ή ολόκληροι οι κόκκοι πιπεριού αντιπροσωπεύουν ένα από τα πιο κοινά μπαχαρικά στην Ευρωπαϊκή και Ασιατική κουζίνα. Ανάλογα με το χρόνο και την επεξεργασία συγκομιδής, το πιπέρι μπορεί να είναι μαύρο, λευκό, πράσινο και κόκκινο (στην πραγματικότητα, κοκκινωπό καφέ).



**Εικόνα 1.6:** Κόκκοι πιπεριού ([www.junerooca.com](http://www.junerooca.com))

Τα παραδοσιακά είδη είναι μαύρο και τα λευκό και χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για τον αρωματισμό των τροφίμων. Το αποξηραμένο πράσινο πιπέρι είναι μια πιο πρόσφατη καινοτομία, αλλά τώρα είναι μάλλον συνηθισμένο στις δυτικές χώρες. Το κόκκινο πιπέρι, ωστόσο, εξακολουθεί να αποτελεί σπάνιο αγαθό. Το κόκκινο πιπέρι παρασκευάζεται από τους ώριμους καφεκόκκινους καρπούς με ξήρανση ή ξήρανση με κατάψυξη των ώριμων καρπών. Το μαύρο πιπέρι παράγεται από τους ακόμα πράσινους άγουρους καρπούς. Οι καρποί βράζονται για λίγο σε ζεστό νερό, τόσο για τον καθαρισμό τους όσο και για την προετοιμασία τους για ξήρανση. Η ξήρανση γίνεται συνήθως στον ήλιο για λίγες μέρες ή σε ένα φούρνο στεγνώματος ή στο φούρνο μικροκυμάτων. Μόλις στεγνώσει παράγεται το μαύρο πιπέρι. Το πράσινο πιπέρι συλλέγεται άγουρο και στη συνέχεια ξηραίνεται στον αέρα ή υφίσταται ξήρανση με ψύξη (Szallasi, 2005-Friedman, 2008- Lim, 2012).

Το λευκό πιπέρι προέρχεται από την επεξεργασία των ώριμων καρπών με την απομάκρυνση του εξωτερικού περικαρπίου είτε πριν είτε μετά την ξήρανση. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται κυρίως σε τρόφιμα στα οποία μαύρα σωματίδια είναι ανεπιθύμητα, όπως στις ανοιχτόχρωμες σάλτσες, στις σάλτσες σαλάτας, στις μαγιονέζες και τις σούπες. Σε ορισμένες χώρες, το άσπρο πιπέρι χρησιμοποιείται παραδοσιακά και προτιμάται από το μαύρο πιπέρι. (Lim, 2012).

Το λευκό πιπέρι παρασκευάζεται με τις ακόλουθες τεχνικές:

- (1) εμβάπτιση σε νερό και διαβροχή-είτε από τους ώριμους φρέσκους καρπούς, είτε από τους ξηρούς καρπούς
- (2) θέρμανση με ατμό ή με βρασμό

(3) χημική τεχνική

(4) τεχνική αποφλοιώσης

Ανάμεσα σε όλες τις διαδικασίες που αναφέρονται παραπάνω, η παραδοσιακή διαδικασία διαβροχής είναι η πιο δημοφιλής και το λευκό πιπέρι που λαμβάνεται με τη μέθοδο αυτή προτιμάται από τους καταναλωτές.

Σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα (ISO / DIS 959 - 2, 1996), το προϊόν θα πρέπει να έχει ανώτατο όριο μόνο 1% επιτρεπτές ξένες ύλες, 4% των σπασμένων καρπών και 15% των μαυρισμένων καρπών. Η ελάχιστη πυκνότητα θα πρέπει να είναι 600 g/l. Συγκριτικά, ενώ τα 100 κιλά ώριμου πράσινου πιπεριού θα αποφέρει 33 kg ξηρό πιπέρι, στην περίπτωση του λευκού πιπεριού θα είναι μόνο 25 kg. Από αυτό προκύπτει το συμπέρασμα ότι το κόστος του λευκού πιπεριού πρέπει να είναι τουλάχιστον 35% υψηλότερο από εκείνο του μαύρου (Nair, 2011) σελ. 334

Προκειμένου να διασφαλιστεί η υψηλή ποιότητα και η πρόληψη μικροβιακών μολύνσεων, το καθαρισμένο και αποξηραμένο πιπέρι υποβάλλεται σε αποστείρωση. Για αυτό, αρκετές μέθοδοι είναι διαθέσιμες συμπεριλαμβανομένης της αποστείρωσης όζοντος, επεξεργασία με πεπιεσμένο διοξειδίου του άνθρακα, ακτινοβόληση, θέρμανση με μικροκύματα, η κατεργασία με ατμούς αλκοόλης και η επεξεργασία με ατμό και απολύμανση (Ravindran, 2000)

Υπάρχει και μια άλλη κατηγορία πιπεριού το «τριμμένο» πιπέρι και περιλαμβάνει τόσο το λευκό όσο και το μαύρο πιπέρι. Το τριμμένο πιπέρι λαμβάνεται με την άλεση των κανονικού του πιπεριού, χωρίς την προσθήκη εξωτερικού υλικού. Το πιπέρι πρέπει να αλέθεται σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος και για το άλεσμα, ο σφυρόμυλος με χάλκινες σφαίρες προτιμάται από αυτές με πυρίτιο, καθώς το πιπέρι μπορεί να περιέχει πυρίτιο πάνω από το επιτρεπόμενο όριο. Τα αλεσμένα υλικά μετά το κοσκίνισμα, συσκευάζονται και όσα είναι πάνω από το καθορισμένο μέγεθος στέλνονται πίσω στο μύλο για περαιτέρω λείανση και μείωση του μεγέθους.

Το τριμμένο πιπέρι έχει μια χαρακτηριστική γεύση, πολύ αρωματική, ελαφρώς έντονη και πρέπει να είναι απαλλαγμένο από τυχόν ξένες οσμές και γεύσεις, συμπεριλαμβανομένων των οσμών μούχλας και ταγγίσματος και τα διεθνή πρότυπα είναι σύμφωνα με το πρότυπο ISO / DIS 959-2 (1996). Λευκό πιπέρι μπορεί επίσης να παραχθεί από το μαύρο πιπέρι με χρήση της επιλεκτικής λείανσης, που ακολουθείται από κοσκίνισμα. Το τριμμένο πιπέρι χρησιμοποιείται επίσης στη βιομηχανία ελαίων, για την παραγωγή ελαιορητίνης (Ravindran, 2000-Nair, 2011).

### 1.3.5 Συστατικά και κλάσματα του πιπεριού

Η χημεία του μαύρου πιπεριού έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον των χημικών από τις αρχές του δέκατου ένατου αιώνα και συνεχίζεται μέχρι σήμερα. Στο διάστημα που μεσολάβησε, πολλές ενδιαφέρουσες ενώσεις που συμβάλλουν στην πικάντικη γεύση και το άρωμα έχουν χαρακτηριστεί. Η χημεία του πιπεριού μπορεί γενικά να ταξινομηθεί σε

- i) ενώσεις που συμβάλλουν στην πικάντικη γεύση
- ii) ενώσεις που προσδίδουν το χαρακτηριστικό του άρωμα.

Το άρωμα του μαύρου και λευκού πιπεριού οφείλεται στο αιθέριο έλαιο που υπάρχει στους καρπούς, ενώ η οξύτητα οφείλεται στο αλκαλοειδές πιπερίνη. Το ποσοστό του αιθέριου ελαίου είναι υψηλότερο στο μαύρο πιπέρι σε σχέση με το λευκό (Parthasarathy et al., 2008). Επομένως, η ποιότητα του πιπεριού εξαρτάται από δύο παράγοντες, την πιπερίνη που συμβάλλει στην πικάντικη γεύση και το αιθέριο έλαιο που είναι υπεύθυνο για το άρωμα και τη γεύση (Perakis et al. 2005-Scott et al., 2008). Το εμπορικό προϊόν ελαιορητίνη, που παράγεται με εκχύλιση με διαλύτη από τους αποξηραμένους αλεσμένους καρπούς πιπεριού, περιέχει ενώσεις που συμβάλλουν τόσο στην πικάντικη γεύση όσο και στο άρωμα. Έτσι, η χημεία του πιπεριού είναι η χημεία του αιθέριου ελαίου του και της πιπερίνης, η ιστορία της οποίας εκτείνεται σε περισσότερο από έναν αιώνα. (Ravindran, 2000-Peter, 2001).

Έχουν ταυτοποιηθεί 42 αρωματικές και πτητικές ενώσεις (πίνακας 1.1), ενώ ανάμεσα τους το α-πινένιο, το β-πινένιο, το μυρκενίο, το α-φαιλανδρένιο, το λιμονένιο, η λιναλοόλη, η μεθυλοπροπανάλη, η 2 - και 3-μεθυλοβουτανάλη, το βουτυρικό οξύ και το 3-μεθυλοβουτυρικό οξύ είναι οι πιο σημαντικές αρωματικές ενώσεις που βρέθηκαν στο *P. nigrum*. Η ανάλυση του *P. nigrum* με αέρια χρωματογραφία (GC)-φασματομετρία μάζας (MS) και με απόσταξη-εκχύλιση, έδειξε ότι οι ενώσεις του βινυλίου είναι τα πιο κυρίαρχα πτητικά στο πιπέρι και ότι τα συστατικά που βρέθηκαν στο λευκό και το μαύρο πιπέρι ήταν αρκετά παρόμοια (Srinivasan, 2005-Chen et al, 2011-Meghwal και Goswami, 2013).

**Πίνακας 1.2:** Αρωματικά και πτητικά συστατικά του *P.nigrum* (Plessi et al., 2002-  
Chen et al. 2011-Meghwal και Goswami, 2013)

Μονοτερπένια	Σεσκιτερπένια	Άλλα συστατικά
α-θουγιόνη	α-κοπαένιο	ευγενόλη
α-πινένιο	β-καρνοφυλλένιο	μεθυλοευγενόλη
σαβινένιο	β-δισαμπολένιο	μυριστικήνη
β-πινένιο	οξείδιο του καρνοφυλλενίου	σαφρόλη
1,8-κινεδόλη	α-cis-μπεργαμοτένιο	βενζαλδεϋδη
λιμονένιο	α-trans-μπεργαμοτένιο	trans-ανηθόλη
καμφένιο	δ-καδινένιο	πιπερονάλη
δ <sup>3</sup> -καρένιο	γ-καδινένιο	m-μεθυλο-ακετοφαινόνη
μυρκένιο	καλαμενένιο	p-μεθυλο-ακετοφαινόνη
cis-οκιμένιο	α-κουμπεμπένιο	n-βουτυροφαινόνη
α-φελανδρίνη	β-κουμπεμπένιο	Φαινυλο οξικό οξύ
β-φελανδρίνη	ar-κουρκουμένιο	κινναμωμικό οξύ
α-τερπινολένιο	b-elmenes	πιπερικό οξύ
γ-τερπινένιο	α-σελινένιο	
τερπινολένιο		

Οι αλεσμένοι καρποί του *P. nigrum* περιέχουν 10,8% (w/w) ελαιορητήνη, 5 % (w/w) πιπερίνη, 1,5 % (v/w) αιθέριο έλαιο και 9% (w/w) νερό (Perakis et al. 2005-Scott et al., 2008) . Η συσσώρευση αυτών των συστατικών τείνει να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Parthasarathy et al., 2008).

Εκτός από τα παραπάνω συστατικά, το άμυλο είναι ένα κυρίαρχο συστατικό του πιπεριού και το περιεχόμενό του μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 35 και 40% στο μαύρο πιπέρι, ενώ στο λευκό φτάνει το 50% (Attokaran, 2011). Εκτός από το άμυλο, το πιπέρι περιέχει επίσης πρωτεΐνες και λίπος (1,9 έως 9%). Έχει καθοριστεί η σύσταση των λιπαρών οξέων του πιπεριού και αναφέρονται διάφορα λιπαρά οξέα, όπως παλμιτικό, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό. Το λινελαϊκό οξύ είναι τα πιο άφθονο (25-35%) και το λινολενικό το λιγότερο (8-19%) (Nair, 2011). Επίσης, οι Chun et al. (2002) βρήκαν ότι το 88% των πολυσακχαριτών των καρπών του μαύρου πιπεριού ήταν γλυκόζη, που ακολουθείται από γαλακτόζη, αραβινόζη, γαλακτουρονικό οξύ και ραμνόζη σε μικρότερες αναλογίες,

Εκτός από τις σημαντικότερες ιδιότητες της ποιότητας, όπως η οξύτητα και το άρωμα, η εμφάνιση, όσον αφορά το χρώμα (καφέ / μαύρο) είναι σημαντική για τη χρήση του μαύρου πιπεριού ως καρύκευμα σε ολόκληρη ή αλεσμένη μορφή. Δεδομένου ότι οι φαινόλες είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στην αμαύρωση / μελάνωση των τελικών πιπεριών, η φύση και η κατανομή τους είναι πολύ σημαντικές. Η αμαύρωση των φρέσκων πράσινων καρπών του πιπεριού οφείλεται στην ενζυμική οξείδωση του (3,4-διυδροξυ φαίνυλο) αίθανολ γλυκοζίτη από την ο-διφαινόλη οξειδάση (PPO) που βρίσκεται στους φρέσκους καρπούς. Οι Bandyopadhyay et al. (1990) ανέφεραν ότι η μετατροπή των πράσινων καρπών σε μαύρους κατά τη διαδικασία της αποξηράνσης συνοδεύτηκε από μία μείωση 75% της ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά και πλήρη απώλεια της ο-διφαινόλη οξειδάσης, το οποίο υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο της ενζυμικής οξείδωσης των φαινολικών κατά τη διάρκεια αμαύρωσης του πιπεριού (Parthasarathy et al., 2008).

#### **1.3.5.1 Ελαιορητίνη-Πιπερίνη**

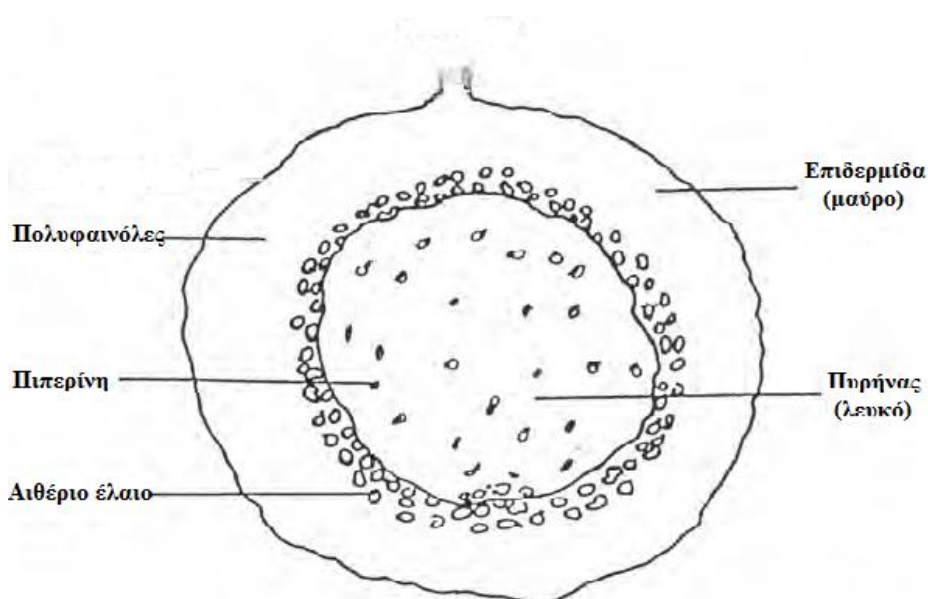
Η ελαιορητίνη, η οποία έχει σημαντική εμπορική αξία, συνήθως λαμβάνεται από την εκχύλιση του αποξηραμένου τριμμένου πιπεριού με κάποιο οργανικό διαλύτη. Περιέχει πτητικά και μη έλαια, χρωστικές, συστατικά που συμβάλλουν στην καυστικότητα και φυσικά αντιοξειδωτικά. Από το *Piper nigrum* έχουν εκχυλιστεί πολλές σημαντικές ενώσεις όπως, αλκαλοειδή, αμίδια, λιγνάνες, χαλκόνες, στεροειδή, τερπένια κ.α. ( Abbasi et al., 2010). Η χρήση της ελαιορητίνης κερδίζει έδαφος στην έρευνα λόγω της υψηλής ποιότητας αρώματός της και έχει ως κύριο πλεονέκτημα την ομοιόμορφη σύνθεση και η αντοχή της. Επιμολυντές, όπως η μούχλα και οι μύκητες απουσιάζουν από την ελαιορητίνη και έτσι μπορεί να προστεθεί απευθείας στα τρόφιμα μετά την προσαρμογή του επιπέδου της συγκέντρωσης της (Ravindran, 2000-UNIDO,FAO, 2005-Nair, 2011).

Η συγκέντρωση της ελαιορητίνης στο πιπέρι βρίσκεται περίπου στο 6-13% και περιέχει κυρίως αλκαλοειδή όπως η πιπερίνη, η συγκέντρωση των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 4-7% και είναι υπεύθυνα για την πικάντικη γεύση του πιπεριού (Perakis et al., 2005-Scott et al., 2006-Abbasi et al., 2010-Meghwal και Goswami, 2013). Η ιδανική εξαγωγή ελαιορητίνης γίνεται όταν οι καρποί του πιπεριού βρίσκονται λίγο πριν την ωρίμανση, όπου παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό πιπερίνης, και ενδεχομένως να είναι ελαφρά ρυτιδιασμένοι εξαιτίας της

ανωριμότητάς τους. Η συγκέντρωση της πιπερίνης στην ελαιορητίνη είναι πιο σημαντική από το άρωμα (Nair, 2011).

Η πιπερίνη [1 - (5 - (1,3-βενζοδιοξολ-5-υλ)-1-οξο-2, 4, πενταδιενυλ πιπεριδίνη)] ήταν το πρώτο αμίδιο που απομονώθηκε από τα γένη των πιπεριδών, έχοντας δομή παρόμοια με τη σαφρόλη, εστραγόλη και τη μεθυλενογενόλη, ενώσεις ευρέως διαδεδομένες στα μπαχαρικά και τα φυτικά έλαια. Η συγκέντρωσή της ποικίλει στα διάφορα είδη πιπεριών και από μια ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο γενετικό υλικό του *P. nigrum* από διαφορετικές πηγές της Βόρειας Αμερικής διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα πιπερίνης σε αποξηραμένους καρπούς αυξομειώνονται μαζί με τη συνολική περιεκτικότητα των πιπεριδινών (Ravindran, 2000-Scott et al. 2005b- Scott et al., 2008- Abassi et al.,2010).

Βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση απ' όλους τους δευτερογενείς μεταβολίτες στους ανώριμους καρπούς (10%) και καθώς ωριμάζει το περιεχόμενο σε πιπερίνη ελαττώνεται. Αυτό οφείλεται στη διάλυση από το γρήγορο σχηματισμό αμύλου και ακατέργαστων ινών. Με τη χρήση αντιδραστηρίων χρώματος, παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο ότι η πιπερίνη εντοπίζεται ελάχιστα στον καρπό στο στάδιο μεγέθους κεφαλής καρφίτσας, ενώ από το ανώριμο στάδιο και μετά τα κύτταρα πιπερίνης αυξάνονται και εντοπίζονται στο ενδοκάρπιο σε ποσοστό 90%. Ωστόσο, 7-8% του συνόλου της πιπερίνης εντοπίζεται στην επιδερμίδα του καρπού (Weiss, 2002-Attokaran, 2011).



Σχήμα 1.1 : Διατομή του πιπεριού (Attokaran, 2011)

Η πιπερίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Oersted (1819) ως μία κίτρινη κρυσταλλική ουσία που έχει σημείο τήξεως 128-130 ° C. Είναι σχεδόν αδιάλυτη ή ελαφρά διαλυτή σε νερό (40 mg / L στους 18° C), αλλά διαλύεται εύκολα σε αλκοόλη (1 g / 15 ml) και αιθέρα (1 g/ 1.7 ml) (Vasavirama, Upender, 2014). Πρόκειται για μία ασθενή βάση, η οποία κατά την υδρόλυση με HNO<sub>3</sub> ή υδατικά διαλύματα αλκαλίων παράγει μια πτητική βάση πιπεριδίνης (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N). Το όξινο προϊόν της υδρόλυσης είναι το πιπερικό οξύ (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>).



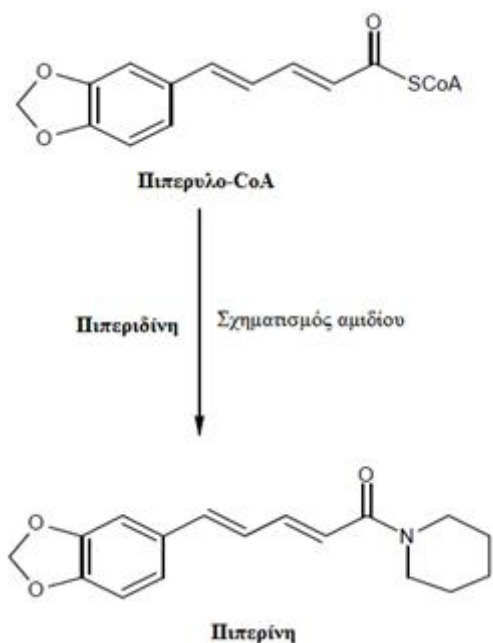
**Εικόνα 1.7:** Κρύσταλλοι πιπερίνης (<https://www.dmt-nexus.me>)

Η δομή της πιπερίνης έχει καθιερωθεί ως πιπερικό οξύ πιπεριδίνης (Peter, 2001-Ιγνατιάδου, Ραγκούση 2009). Το πιπερικό οξύ έχει τέσσερις ισομερείς μορφές: 2 trans 4 trans (πιπερίνη), 2 cis 4 trans (ισοπιπερίνη), 2 trans-4 cis (ισοχαβικίνη), 2 cis 4 cis (χαβικίνη). Η σύνθεση των ισομερών διεξήχθη από τους Grewe et al., το 1970. Τα τρία ισομερή της πιπερίνης είναι ασθενώς πικάντικα, ενώ το στερεοϊσομερές χαβικίνη, το οποίο λαμβάνεται μετά την απομάκρυνση της πιπερίνης από την ελαιορητίνη, συμμετέχει έντονα στην πικάντικη γεύση του πιπεριού. Η χαβικίνη στην αρχή φάνηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη καυστικότητα από την κρυσταλλική πιπερίνη, αλλά αργότερα οι ερευνητές κατέδειξαν ότι η πιπερίνη σε διάλυμα ήταν περισσότερο έντονη (Ravindran, 2000-Peter, 2001-Parthasarathy et al., 2008-Nair, 2011).

Οι Geisler και Gross το 1990 απομόνωσαν μια ακυλτρανσφεράση από τους βλαστούς του μαύρου πιπεριού, που έδρασε καταλυτικά στη σύνθεση της πιπερίνης παρουσία πιπέρυλο-συνενζύμου A (piperoyl-CoA) και πιπεριδίνης (Parthasarathy et al., 2008). Το πιπέρυλο-CoA προκύπτει από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού

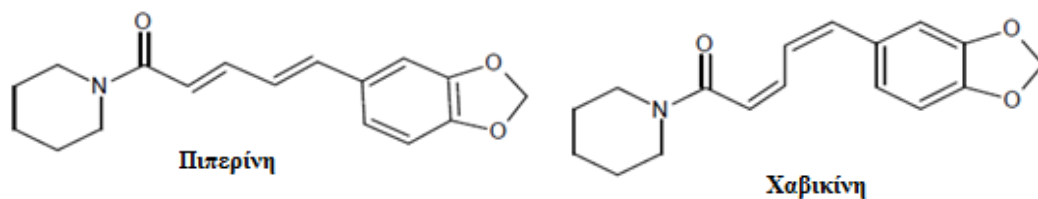


οξέος. Η πιπεριδίνη ενσωματώνει την τριτοταγή μονάδα του αμιδίου της πιπερίνης, η οποία ανήκει στην ομάδα των αλκαλοειδών όπου η βασική μονάδα τους βρίσκεται στο τέλος μιας αλειφατικής αλυσίδας και έχει βρεθεί ότι είναι μία πιπερίδυλο ή πιρολίδυλο ή ισοβουτυλάμινο ομάδα (Okwute, Egharevba, 2013).



**Σχήμα 1.2:** Βιοσύνθεση πιπερίνης (Okwute, Egharevba, 2013)

Η μέθοδος αποθήκευσης και επεξεργασίας του πιπεριού είναι εξαιρετικά σημαντική. Η πιπερίνη είναι ασταθής στη θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος και η περιεκτικότητά της μειώνεται, με τη μεγαλύτερη απώλεια να παρατηρείται στο μαγείρεμα υπό πίεση (Suresh et al., 2007-Nisha et al., 2009). Επίσης, η πιπερίνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο φως με αποτέλεσμα να υποβάλλεται σε φωτο-επαγόμενο ισομερισμό προς ισοπιπερίνη, χαβικίνη και ισοχαβικίνη όταν οι συνθήκες αποθήκευσης δεν είναι οι κατάλληλες. Ο ισομερισμός αυξάνεται με την ένταση του φωτός και το χρόνο έκθεσης. Η χαβικίνη μετασχηματίζεται βραδέως σε πιπερίνη κατά την αποθήκευση, οδηγώντας στην απώλεια της πικάντικης γεύσης (Kozukue et al., 2007-Scott et al., 2008-Meghwal και Goswami, 2013).



**Σχήμα 1.3:** Τα κυριότερα συστατικά της πικάντικης γεύσης του πιπεριού (Okwute, Egharevba, 2013)

Εκτός της πιπερίνης, πέντε ανάλογα παρόμοιας δομής έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από διάφορους ερευνητές (Narayanan 2000). Είναι η πιπεριτίνη, η πιπεραίνη, η πιπεριλίνη, Α, Β και η πιπεραλαίνη με την πιπεροκτόνη (Peter, 2001-Nair, 2011). Απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις, όπως για παράδειγμα η πιπεριλίνη και η πιπεριτίνη που βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 0,2-0,3 και 0,2-1,6% αντιστοίχως (Schultz et al., 2005).

Περαιτέρω έρευνες σχετικά με την πικάντικη γεύση του πιπεριού, αποκάλυψαν ότι η καυστικότητα της πιπερίνης προκαλείται από την ενεργοποίηση των ανιχνευτών της θερμότητας και της οξύτητας στον υποδοχέα των βανιλλοειδών (TRPV) του καναλιού ιόντων TRPV1 στους αλγούποδοχείς (νευρικά κύτταρα αίσθησης πόνου) (Vasavirama, Upender, 2014).

## 1.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### 1.4.1 Ιδιότητες ελαιορητίνης-πιπερίνης

Τα περισσότερα από τα φυτικά είδη, όπως και το πιπέρι, παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που βοηθούν στο μεταβολισμό και λειτουργούν ως αμυντικό σύστημα έναντι διάφορων παραγόντων, όπως τα έντομα (Ahmad et al., 2012). Πρόσφατα, επιστήμονες από διάφορα βιολογικά πεδία εξετάζουν φυτά για δευτερογενείς μεταβολίτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή φαρμάκων και μέσων βιολογικού ελέγχου.

Η οικογένεια των Πιπεριδών έχει αποτελέσει για πολλούς πολιτισμούς του παρελθόντος αλλά και του παρόντος πηγή φαρμάκων και καρυκευμάτων. Επίσης, οι δευτερογενείς μεταβολίτες των ειδών του γένους *Piper* έχουν χρησιμοποιηθεί για μια ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως η εντομοαπωθητική δράση τους. Τα ενεργά συστατικά που παρουσιάζουν εντομοαπωθητική δράση είναι τα πιπεραμίδια που

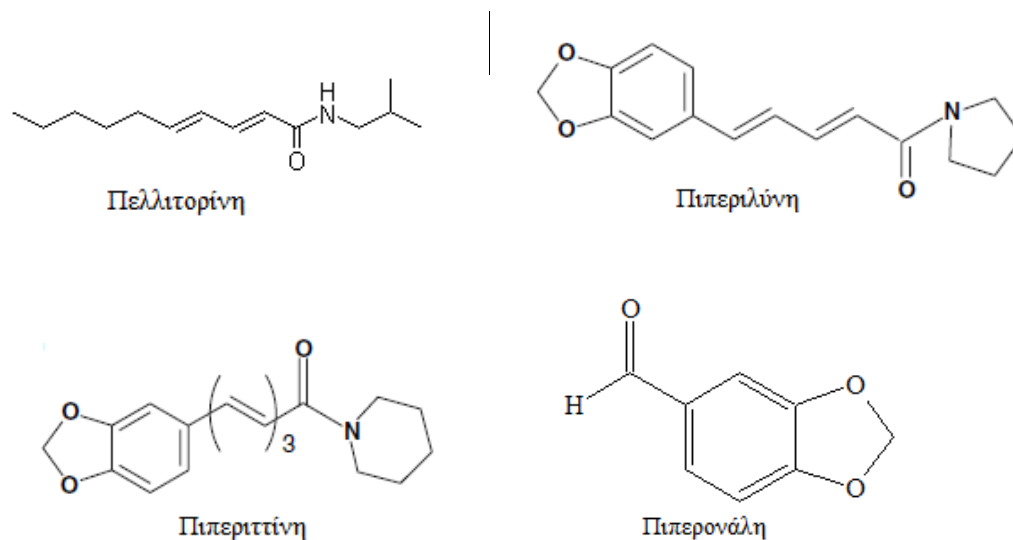
απομονώνονται από τα είδη του γένους *Piper*, συμπεριλαμβανομένου του *Piper nigrum* και έχουν προταθεί ως εν δυνάμει νέα εντομοκτόνα. Πολλές ποικιλίες πιπεριού έχουν χρησιμοποιηθεί στον παραδοσιακό έλεγχο εντόμων που είναι φορείς καταστροφικών νόσων (Scott et al., 2008).

Έρευνες με εκχυλίσματα καρπών του *Piper nigrum* έδειξαν ότι τα πιπεραμίδια έχουν ιδιότητες κατά των νυμφών και των ενήλικων εντόμων. Κάποια από τα δραστικά συστατικά που συνεισφέρουν στην εντομοκτόνο δράση είναι η πιπερίνη, η πιπεριλίνη, η πελλιτορίνη, η πιπεριτίνη, η πιπεροκτόνη, η πιπερονάλη, η διυδροπιπεροκτόνη κ.α. (Scott et al., 2008- Abassi et al., 2010- Ahmad et al., 2012). Οι παραπάνω ενώσεις είναι τοξικές σε προνύμφες εντόμων όπως τα σκαθάρια, λεπιδόπτερα, υμενόπτερα κ.α. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποια είδη εντόμων ευαίσθητα στις ενώσεις που προαναφέρθηκαν (Scott et al. 2004, 2007).

**Πίνακας 1.3:** Έντομα που παρουσιάζουν ευαισθησία στις ενώσεις *Piper nigrum*

Έντομο	Τάξη: Οικογένεια
<i>D. similis</i> προνύμφη	Υμενόπτερα: Diprionidae
<i>M. americanum</i> προνύμφη	Λεπιδόπτερα: Lasiocampidae
<i>N. sertifer</i> προνύμφη	Υμενόπτερα: Diprionidae
<i>M. disstria</i> προνύμφη	Λεπιδόπτερα: Lasiocampidae
<i>P. viburni</i> προνύμφη	Κολεόπτερα: Chrysomelidae
<i>L. decemlineata</i> ενήλικο	Κολεόπτερα: Chrysomelidae
<i>A. vittatum</i> ενήλικο	Κολεόπτερα: Chrysomelidae
<i>M. domestica</i> ενήλικο	Δίπτερα: Muscidae

Το κύριο αλκαλοειδές του πιπεριού, δηλαδή η πιπερίνη, είναι δραστικότερο από το πύρεθρο, ένα πρότυπο εντομοκτόνο για τις οικιακές μύγες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η εντομοκτόνος ή εντομοαπωθητική δράση λαμβάνεται ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ως εκ τούτου, αυτό το πεδίο χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω για να έχουμε θετικές εφαρμογές (Nair, 2011).



**Σχήμα 1.4:** Ορισμένα αλκαλοειδή του *Piper nigrum*

Η παρατήρηση ότι τα πιπεραμίδια αποδομούνται γρήγορα υπό πλήρη ηλιοφάνεια, δείχνει ότι η χρήση των εκχυλισμάτων του πιπεριού για την προστασία των αποθηκευμένων σπόρων, είναι πιο ελπιδοφόρα από τις εφαρμογές προστασίας των καλλιεργειών. Υπό υπεριώδη (UV) έκθεση, η καθαρή πιπερίνη αποδομείται γρήγορα με χρόνο ημιζωής περίπου 40 min. Αυτό αποδεικνύει ότι η φωτόλυση είναι πιθανόν υπεύθυνη για την αποδόμηση και όχι μια φωτοευαίσθητη αντίδραση από κάποια χρωστική στο εκχύλισμα του πιπεριού. Παρατηρείται επίσης ότι κάτω από συνθήκες όπου το εκχύλισμα του *P. nigrum* εφαρμόζεται στο έδαφος, η υπολειμματική δραστηριότητα είναι μεγαλύτερη: ο χρόνος ημιζωής των πιπεραμιδίων ήταν μία έως αρκετές ημέρες, ανάλογα με την εποχή του έτους (Scott et al, 2005a). Το όφελος της μικρής υπολειμματικής δράσης είναι ότι τα εκχυλίσματα των καρπών του *P. nigrum* είναι πιο αποδεκτά για τη βιολογική πιστοποίηση (Scott et al., 2008).

Η πιπερίνη παρουσιάζει διάφορες βιολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τη βιο-διαθεσιμότητα άλλων φαρμακευτικών ενώσεων και όταν καταναλώνεται μαζί με φάρμακα αυξάνει την αποτελεσματικότητά τους (Nisha et al., 2009-Vasavirama, Upender, 2014). Μία επίσης ενδιαφέρουσα λειτουργία της πιπερίνης είναι ότι αυξάνει σημαντικά την απορρόφηση του σεληνίου, της βιταμίνης B και του β-καροτένιου, καθώς και άλλα θρεπτικά συστατικά (Bhardwaj et al., 2007-Vasavirama, Upender, 2014).

Έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την έκκριση σάλιου και τις γαστρικές εκκρίσεις (Srinivasan, 2007). Επιπλέον, η κατάποση των κόκκων πιπεριού αυξάνει την παραγωγή και την ενεργοποίηση της σιελικής αμυλάσης (Kang et al., 2009- Ahmad et al., 2012). Ερευνητές εξέτασαν διάφορα ζώα για έκκριση χολικού οξέος έπειτα από κατάποση πιπερίνης του *P. nigrum*. Παρατηρήθηκε ότι η κατάποση πιπερίνης από το στόμα μπορεί να αυξήσει σημαντικά την έκκριση χολικού οξέος από το συκώτι (Hussain, 2011). Η προσθήκη πιπερίνης στα τρόφιμα ως πρόσθετο αυξάνει τη δραστηριότητα της λιπάσης, της παγκρεατικής αμυλάσης, της χυμοθρυψίνης και της προτεάσης (Srinivasan, 2007- Ahmad et al., 2012-Vasavirama, Upender, 2014).

Ακόμα μία δράση της πιπερίνης είναι ότι προλαμβάνει και ελαχιστοποιεί τη διάρροια, καθώς επίσης μειώνει τη συσσώρευση υγρού στο έντερο του ποντικού (Reshmi et al., 2010).

Πέραν της συμμετοχής της στην αύξηση της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών στο σώμα, η πιπερίνη έχει άλλες καινοτόμες εφαρμογές. Έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει το σχηματισμό όγκων σε πειραματικά μοντέλα (Lin, 2007- Ahmad et al., 2012). Το αλκοολικό εκχύλισμα πιπερίνης φαίνεται να επιδρά στην ανοσορυθμιστική και αντικαρκινική δραστηριότητα (Sunila, 2004- Ahmad et al., 2012). Οι Appiah et al., παρατήρησαν ότι η πιπερίνη εμπλέκεται στην αντιμεταστατική δραστηριότητα.

Σημαντική θεωρείται και η αντικαταθλιπτική δράση της πιπερίνης. Οι Singh και Duggal (2009), σε πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι τα επίπεδα του εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα στον ιππόκαμπο ποντικών με χρόνια στρες, επαναρυθμίστηκαν από τη θεραπεία με πιπερίνη (Ahmad et al., 2012-Vasavirama, Upender, 2014).

Υπάρχουν αναφορές και για άλλες δράσεις της πιπερίνης όπως, αντιαιμοπεταλιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιπερτασική και ηπατοπροστατευτική δράση (Ahmad et al., 2012). Επιπλέον, η πιπερίνη φαίνεται πως έχει μεγάλη αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιείται σε θεραπείες του αλτσχάιμερ (Selvendiran et al., 2003-Chonpathompikunlert et al., 2010-Zarai et al., 2013).

Τέλος, έχουν γίνει έρευνες για την αντιμικροβιακή δράση της πιπερίνης έναντι Gram-θετικών (*B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. xylosus*, *S. aureus* και *S. epidermidis*) και Gram-αρνητικών (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*) βακτηριακών στελεχών μετρώντας τη διάμετρο της ζώνης αναστολής και προσδιορισμός των τιμών MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Όλα τα εκχυλίσματα πιπερίνης της μελέτης των

Zarai et al., εμφανίζουν διάφορους βαθμούς αντιβακτηριακής δραστηριότητας έναντι των περισσότερων Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων που δοκιμάστηκαν (Zarai et al., 2013).

#### 1.4.2 Ιδιότητες πιπεριού

Η χρήση του μαύρου πιπεριού ως φάρμακο, εκτός από το ευρύ φάσμα χρήσης του ως πρόσθετο τροφίμων, τόσο στα Ινδικά όσο και στα Κινέζικα συστήματα ιατρικής είναι καλά τεκμηριωμένη. Έχει περίτεχνα περιγραφεί για τη φαρμακευτική του αξία στο αρχαίο Ινδικό σύστημα ιατρικής Ayurveda ως Katu (πικάντικο), tikta (πικρό) και ushnaveerya (δραστικό) (Nair, 2011).

Το *P. nigrum* χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά ως φάρμακο στην Ινδία για την ανακούφιση από τον πόνο, τη ρίγη, τους ρευματισμούς, τη γρίπη, τους μυϊκούς πόνους, τα κρυολογήματα, την εξάντληση, τους πυρετούς, ως τονωτικό νεύρων και για την αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος (Sharon, 2002-Srinivasan, 2007-Meghwal και Goswami, 2013). Το μαύρο πιπέρι χρησιμοποιούνταν ως θεραπεία των παραπάνω ασθενειών, αλλά φαίνεται ότι η γενικευμένη χρήση του ήταν να ενισχύει τις επιδράσεις των άλλων βοτάνων. Επίσης, αποτελούσε συστατικό της παραδοσιακής Κινεζικής ιατρικής για τη διέγερση της πέψης και την ανακούφιση της διάρροιας. Το μαύρο πιπέρι έχει χρησιμοποιηθεί στην Κίνα ως λαϊκή θεραπεία για την επιληψία (Srinivasan, 2007).

Τα αντιοξειδωτικά είναι από τα πιο κρίσιμα βιοχημικά συστατικά στο ανθρώπινο οργανισμό που εξασφαλίζουν την καλή υγεία. Σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ενεργοποιούν πολλές δυσάρεστες βιοχημικές αντιδράσεις στο ανθρώπινο σύστημα, και ελέγχουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων στα θηλαστικά (Nair, 2011). Τα συνθετικά και τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι οι δύο ομάδες αντιοξειδωτικών που υπάρχουν, αλλά τα συνθετικά θεωρείται ότι δημιουργούν παρενέργειες. Το πιπέρι, όπως όλα τα μπαχαρικά και βότανα αποτελούν σημαντικές πηγές για την αναζήτηση φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών, τα οποία θεωρούνται μη τοξικά και φιλικά προς το περιβάλλον (Ahmad et al., 2010-Ahmad et al., 2011). Το μαύρο πιπέρι διατηρεί στην πραγματικότητα και ενισχύει τα επίπεδα και την αποτελεσματικότητα των σημαντικών αντιοξειδωτικών ενώσεων. Περιέχει αρκετά ισχυρά αντιοξειδωτικά και έτσι αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά μπαχαρικά για την πρόληψη και τον περιορισμό του οξειδωτικού στρες. Εκτός από τις άμεσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες του, αρκετές από αυτές τις ενώσεις δρουν

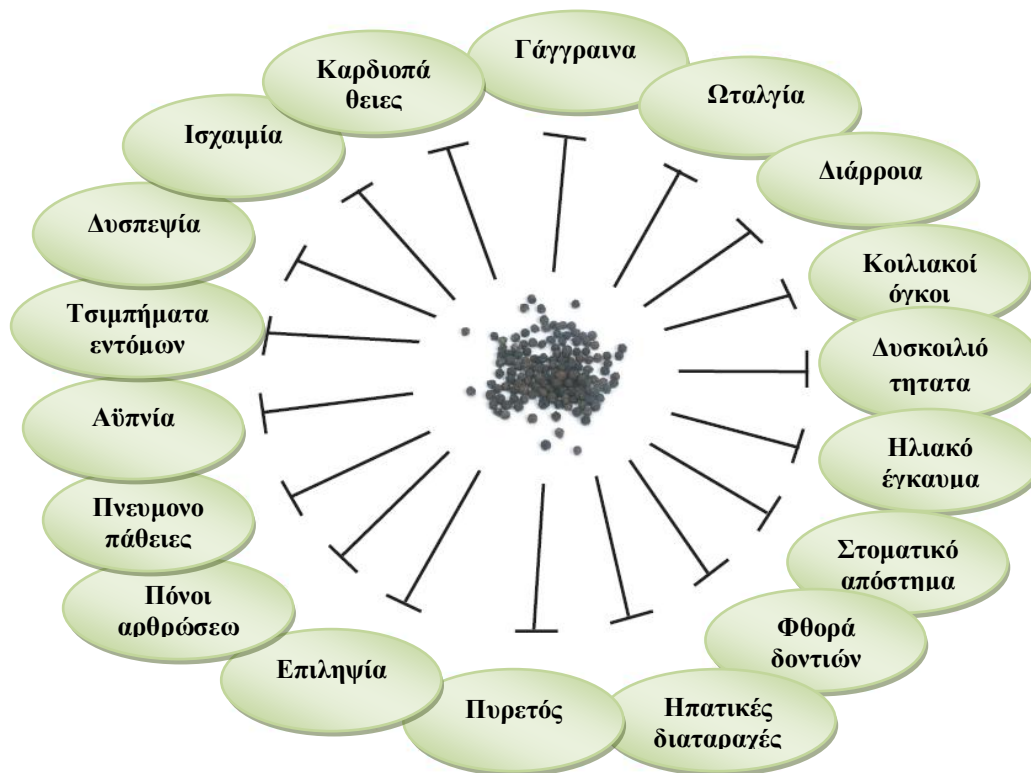
έμμεσα με αύξηση της δράσης των άλλων αντιοξειδωτικών. Το μαύρο πιπέρι ελαχιστοποιεί το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από κορεσμένα λίπη στα τρόφιμα. Τα υψηλά επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες αναστέλλουν την αποτελεσματικότητα σημαντικών αντιοξειδωτικών (π.χ.. γλουταθειόνη, υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης, βιταμίνη C και E) (Meghwal, Goswami, 2012).

Το *Piper nigrum* έχει μια πληθώρα ιδιοτήτων λόγω των αντιοξειδωτικών του. Βοηθάει στη δέσμευση ελεύθερων ριζών, ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και δρα κατά της δημιουργίας όγκων. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών δείχνει ότι το πιπέρι παρουσιάζει αντικαρκινικές και αντι-μεταλλαξιογόνες ιδιότητες. Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει ότι χαρακτηρίζεται από αντικαταθλιπτικές, αντεθυρεοειδικές, αντιπερτασικές, αντιαποπρωτικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες. Βρίσκει εφαρμογές στη θεραπεία πνευμονικών ασθενειών, του πυρετού, των κολικών και γαστρικών διαταραχών. Τέλος, δρα κατά της διάρροιας, προστατεύει το ήπαρ, βελτιώνει την πέψη και προάγει την υγεία του εντέρου (El Hamss et al., 2003-Srinivasan, 2007-Nair, 2011-Meghwal, Goswami, 2012- Ahmad et al., 2012- Vasavirama, Upender, 2014).

Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων, το πιπέρι βρίσκει πολλές παραδοσιακές αλλά και σύγχρονες εφαρμογές.

Χρησιμοποιείται ως καρύκευμα σε αρτύματα και βελτιωτικά γεύσης σε όλο τον κόσμο (Nelson, Eger, 2011) και έχει ένα ευρύ πεδίο αντιμικροβιακής δραστηριότητας, περιλαμβάνοντας βακτηριοκτόνες και βακτηριοστατικές ιδιότητες (Souza, et al., 2005-Pundir, Jain, 2010). Ακόμη και το εκχύλισμα φύλλων του πιπεριού κατέχει αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση. Αυτές οι ιδιότητες συνεισφέρουν στην αύξηση της ζωής των τροφίμων στα οποία έχει προστεθεί πιπέρι (Nair, 2011-Lim, 2012).

Εξωτερικά χρησιμοποιείτε για τις «θερμαντικές» ιδιότητές του στο κρύωμα και για τοπική εφαρμογή για την αντιμετώπιση του βήχα, του πονόλαιμου, των αιμορροΐδων και ορισμένων δερματικών ασθενειών.



**Εικόνα 1.8:** Παραδοσιακές χρήσεις του μαύρου πιπεριού (Aggarwal, Kunnumakkara, 2009)

### 1.4.3 Επιπτώσεις στον οργανισμό

Απ' όσα αναφέρθηκαν παραπάνω φαίνεται ότι το πιπέρι και τα ενεργά συστατικά του δρουν ευεργετικά στην υγεία του ανθρώπου.

Οι δημοσιευμένες αναφορές δεν περιγράφουν λεπτομερώς οποιοσδήποτε τοξικές επιδράσεις του πιπεριού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις σχετικά μικρές ποσότητες που χρησιμοποιούνται σε πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα καθώς και στην περιορισμένη καθημερινή κατανάλωσή του. Στην πραγματικότητα, η ίδια η οξύτητα της πιπερίνης και η έντονη γεύση των πτητικών ελαίων, δρουν ως αποτρεπτικά κατά της υπερβολικής κατανάλωση από τον άνθρωπο. Οι διάφοροι οργανισμοί όπως FAO/WHO, δεν προβλέπουν κανένα όριο για τη λήψη πιπερίνης και αιθέριων ελαίων (Nair, 2011).

Η κύρια επιβλαβής συνέπεια του πιπεριού όταν καταναλώνεται σε μεγάλες δόσεις, της τάξης 1,5 g/kg τροφίμου, είναι η βλάβη του γαστρικού βλεννογόνου (Nair, 2011). Μελέτες σε ζώα έχουν αξιολογήσει την τοξικότητα του μαύρου πιπεριού ή της πιπερίνης και αναφέρουν ανάμεικτα αποτελέσματα. Σε κάποιες μελέτες παρατηρήθηκε ότι το μαύρο πιπέρι προκαλεί οξεία τοξικότητα σε



αρουραίους και ποντίκια, ενώ σε άλλες δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες του μαύρου πιπεριού όταν χορηγήθηκε σε αρουραίους. Ο λόγος για αυτά τα ανόμοια αποτελέσματα είναι άγνωστος και θα πρέπει να επισυμανθεί ότι οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν αντιπροσωπευτικές της συνήθους ανθρώπινης πρόσληψης. Οι περισσότερες αναφορές δείχνουν ότι το μαύρο πιπέρι και η πιπερίνη δεν είναι γονιδιοτοξικά ή ανοσοτοξικά (Singletary, 2010). Ωστόσο, εργαστηριακές έρευνες σε κύτταρα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα πιπεριού αυξάνουν τη συχνότητα εμφάνισης όγκου σε ποντικούς και εντοπίστηκε ότι η πιπερίνη αυξάνει τη μετάλλαξη στο DNA.

Τέλος, έχει αναφερθεί ότι υπερβολική τοπική χρήση του αιθέριου ελαίου του μαύρου πιπεριού μπορεί να προκαλέσει υπερδιέγερση των νεφρών. Η κατανάλωση μαύρου πιπεριού θα πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, καθώς ανάλυση του μητρικού γάλακτος έδειξε ότι η πιπερίνη «περνάει» στο γάλα μετά την πρόσληψη του πιπεριού. Η επαφή του δέρματος με σκόνη μαύρου πιπεριού μπορεί να προκαλέσει ερυθρότητα (Meghwal, Goswami, 2012).

## 1.5 ΙΣΧΥΟΥΣΑ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η ισχύουσα νομοθεσία της Ελλάδας σχετικά με το πιπέρι στηρίζεται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) που αναφέρει στο Κεφάλαιο 4, άρθρο 42 με τίτλο "Είδη Κυρίως Αρτυμάτων", παράγραφος 1, ότι ως "Πιπέρι" (Pepper) χαρακτηρίζονται οι αποξηραμένοι καρποί του φυτού *Piper nigrum L.* που περιέχουν αιθέριο έλαιο σε ποσοστό τουλάχιστον 0,7% και υγρασία σε ποσοστό όχι μεγαλύτερο από 15% και που ανάλογα με το βαθμό ωριμότητας και την επεξεργασία τους διακρίνονται στα εξής είδη:

α) "Μαύρο πιπέρι" που αποτελείται από καρπούς που έχουν συλλεχθεί σε άγουρη κατάσταση και έχουν ξηρανθεί γρήγορα και είναι δυνατόν να περιέχουν τέφρα σε ποσοστό 6% κατά ανώτατο όριο και αδιάλυτα σε υδροχλωρικό οξύ συστατικά της τέφρας, σε ποσοστό 2% κατά ανώτατο όριο.

β) "Άσπρο πιπέρι" που αποτελείται από τελείως ώριμους καρπούς, από τους οποίους με ζύμωση και ξήρανση έχει απομακρυνθεί η εξωτερική και μεσαία στιβάδα του καρπικού φλοιού και είναι δυνατόν να περιέχουν τέφρα σε ποσοστό 2,5% κατά ανώτατο όριο και αδιάλυτα σε υδροχλωρικό οξύ συστατικά της τέφρας σε ποσοστό 1% κατά ανώτατο όριο.

Δεν αναφέρεται κάποια διάκριση μεταξύ των ολόκληρων καρπών του πιπεριού και του τριμμένου, καθώς επίσης δεν υπάρχει αναφορά για την πιπερίνη που αποτελεί το σημαντικότερο ποιοτικό χαρακτηριστικό του πιπεριού.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση δεν έχει εκδώσει κάποιο σαφή κανονισμό σχετικά με το διαχωρισμό των διάφορων ειδών πιπεριού καθώς και για τις ποιοτικές προδιαγραφές τους. Ο Ευρωπαϊκός Σύλλογος Μπαχαρικών (European Spice Association-ESA) αποτελεί την οργάνωση-ομπρέλα της Ευρωπαϊκής βιομηχανίας μπαχαρικών και αναφέρει τα όρια κάποιων ποιοτικών χαρακτηριστικών για το μαύρο και το λευκό πιπέρι όπως η τέφρα (ανώτατο όριο 7 και 3,5% αντίστοιχα), τα αδιάλυτα τέφρας σε οξύ (ανώτατο όριο 1,5 και 0,3% αντίστοιχα), την υγρασία (ανώτατο όριο 12% και για τα δύο είδη) και το αιθέριο έλαιο (κατώτατο όριο 2 και 1,5% αντίστοιχα) (ESA-2014). Γνωστός επίσης είναι ο Αμερικανικός Σύλλογος Εμπορίας Μπαχαρικών (American Spice Trade Association-ASTA) κατά τον οποίο τα ποιοτικά όρια των χαρακτηριστικών του πιπεριού συμπίπτουν με αυτά του ESA (ASTA-2011). Τέλος, ποιοτικές προδιαγραφές αναφέρονται και στη Διεθνή Κοινότητα Πιπεριού (International Pepper Community-IPC) που αποτελεί ένα διακυβερνητικός οργανισμός των χωρών που παράγουν πιπέρι. Η Κοινότητα πλέον περιλαμβάνει τη Βραζιλία, την Ινδία, την Ινδονησία, τη Μαλαισία, τη Σρι Λάνκα και το Βιετνάμ ως μόνιμα μέλη και την Παπούα Νέα Γουινέα, ως συνεργαζόμενο μέλος.

Ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (International Organization of Standardization-ISO) αποτελεί τον σύνδεσμο των εθνικών οργανισμών τυποποίησης, παρέχοντας τις ποιοτικές προδιαγραφές που κάνουν σαφή το διαχωρισμό ανάμεσα σε ολόκληρο και τριμμένο, μαύρο και λευκό πιπέρι (ISO 959-1:1998 και 959-2:1998 για το μαύρο και το λευκό πιπέρι αντίστοιχα) καθώς και επιπλέον παραμέτρους δίνοντας ξεχωριστές ποιοτικές προδιαγραφές. Τέτοιες παράμετροι είναι η περιεκτικότητα σε πιπερίνη (ISO 5564:1982 και 11027:1993), ακατέργαστες ίνες και μη πτητικά αιθέρια εκχυλίσματα. Επίσης, υπάρχει το ISO 105 της Σρι Λάνκα που καθορίζει τις προδιαγραφές για το μαύρο και το λευκό πιπέρι.

Στον πίνακα **1.4** παρουσιάζονται οι προδιαγραφές όλων των προαναφερθέντων οργανισμών σχετικά με την περιεκτικότητα % σε υγρασία και πιπερίνη στο μαύρο και το λευκό πιπέρι.

**Πίνακας 1.4:** Προδιαγραφές σχετικά με την υγρασία και την πιπερίνη κατά ΚΤΠ, ESA-ASTA, ISO και Σρι Λάνκα

Παράμετρος %	ΚΤΠ		ESA-ASTA		ISO*		Σρι Λάνκα*	
	Μ	Λ	Μ	Λ	Μ	Λ	Μ	Λ
<b>Υγρασία</b>	<15	<15	<12	<12	<13	<14	<13	<14
<b>Πιπερίνη</b>	-	-	-	-	>4	>4	>5	>5

\*Προδιαγραφές για το τριμμένο πιπέρι

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

### 2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΛΑΙΟΡΗΤΙΝΗΣ-ΠΙΠΕΡΙΝΗΣ

Το πρώτο βήμα για τη διερεύνηση των ενεργών συστατικών του φυτικού υλικού είναι η εκχύλιση. Ιδανικά, η διαδικασία της εκχύλισης θα πρέπει να είναι ολική σε σχέση με τα συστατικά που θα αναλυθούν, γρήγορη, απλή, φθηνή και να επιδέχεται αυτοματισμούς, ειδικά όταν πρόκειται για ανάλυση ρουτίνας.

Η ελαιορητίνη είναι εμπορικά σημαντική λόγω του αρώματος και της γεύσης της, των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της, της αυξημένης διάρκειας ζωής και του μικρότερου χώρου αποθήκευσης της, καθώς είναι ένα εξαιρετικά συμπυκνωμένο προϊόν. Όλα τα παραπάνω αυξάνουν το ενδιαφέρον για τη διαδικασία εκχύλισής της. Όπως προαναφέρθηκε, η ελαιορητίνη παραδοσιακά παράγεται με εκχύλιση με οργανικό διαλύτη όπως ακετόνη, αιθανόλη, διχλωριούχο αιθυλένιο, κ.λπ. Διατίθεται σε λιποδιαλυτή, υδατοδιαλυτή, ή σε ξηρή μορφή και ανακτάται μέσω μιας διαδικασίας ενός ή δύο σταδίων. Η μέθοδος περιλαμβάνει τη μείωση του μεγέθους του πιπεριού πριν την εκχύλιση που γίνεται σε απαγωγείς από ανοξείδωτο χάλυβα. (Nair, 2011-Attokaran, 2011-Dang, Phan, 2014).

Στη μέθοδο του ενός σταδίου, το έλαιο ανακτάται μαζί με τις ρητίνες από την εκχύλιση με διαλύτη. Συνήθως δημιουργείται μια αναλογία δείγματος προς διαλύτη 1:3 και εκχυλίζεται σε θερμοκρασία 55-60 °C. Ο διαλύτης συνεχώς ανακυκλώνεται για να εξασφαλίζεται η επαφή του στερεού με το διαλύτη και μετά από 3 ώρες το μείγμα διηθείται και συμπυκνώνεται υπό κενό (250 mm Hg) και σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 80 °C. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία και δεν ανακτάται άλλος διαλύτης από το συμπυκνωμένο μείγμα, η τελική συμπύκνωση γίνεται σε κενό μικρότερο των 20 mm Hg και σε κανένα στάδιο της διαδικασίας η θερμοκρασία δεν υπερβαίνει τους 100°C (Nair, 2011).

Στη διαδικασία των δύο σταδίων το έλαιο ανακτάται με απόσταξη και ακολουθείται από εκχύλιση με διαλύτη για την ανάκτηση της ελαιορητίνης. Αργότερα η ρητίνη και το έλαιο αναμειγνύονται για να πληρούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές. Ο οργανικός διαλύτης θα πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως από την ελαιορητίνη. Το ISO, καθώς και οι χώρες που την εισάγουν έχουν σταθερά ανώτατα επιτρεπτά όρια για τους εγκεκριμένους διαλύτες (<30 ppm). Η σύνθεση του ελαίου και το περιεχόμενο ελαιορητίνης που λαμβάνεται σε αμφοτέρες τις διαδικασίες διαφέρουν ελαφρώς η μία από την άλλη. Λόγω της υγρασίας που προκύπτει από τη

φάση της απόσταξης στο εναπομείναν δείγμα, υπάρχει η πιθανότητα η απόδοση της ελαιορητίνης που λαμβάνεται κατά τη διαδικασία δύο σταδίων να είναι μικρότερη σε σύγκριση με εκείνη που λαμβάνεται κατά τη διαδικασία ενός σταδίου (Nair, 2011-Attokaran, 2011).

Μόλις ανακτηθεί, η ελαιορητίνη έχει ένα σκούρο πράσινο χρώμα, είναι παχύρρευστη, με ισχυρό άρωμα και αποχρωματίζεται με προσθήκη ενεργού άνθρακα (Attokaran, 2011). Τα συστατικά και η ποιότητα του εκχυλίσματος εξαρτώνται από την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται, τη μέθοδο και την κατάσταση της επεξεργασίας και του χειρισμού των προϊόντων. (Ravindran, 2000-Peter, 2001- Nair, 2011).

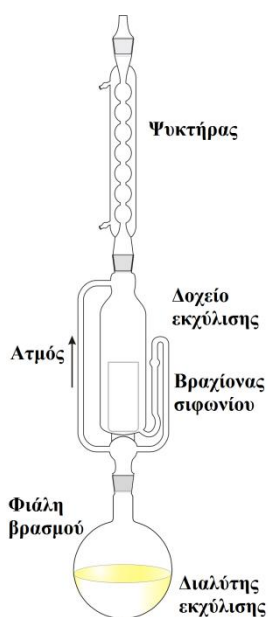
Η πιπερίνη αποτελεί σημαντικό συστατικό της ελαιορητίνης, καθώς βοηθά στην αύξηση της απορρόφησης και της βιοδιαθεσιμότητας των άλλων βιοδραστικών ενώσεων (Duangjai et al., 2012-Dang, Phan, 2014). Η ζήτησή της αυξάνεται συνεχώς και μπορεί να παραχθεί με φυγοκέντριση της συμπυκνωμένης ελαιορητίνης. Μετά το τέλος της φυγοκέντρισης, συλλέγεται μέρος του ελαίου μαζί με ρητίνη και περιέχει περίπου 60% πιπερίνη. Η συγκέντρωση της πιπερίνης μπορεί να αυξηθεί με έκπλυση του παραπάνω δείγματος και εκ νέου φυγοκέντριση (Nair, 2011).

Για την πιο γρήγορη απομόνωση πιπερίνης από καρπούς του *P.nigrum* έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι. Παραδοσιακά η εκχύλιση γίνεται με εμβάπτιση (maceration) και με συσκευή Soxhlet (P'eres et al., 2006).

Η εκχύλιση με συσκευή Soxhlet είναι μια καθιερωμένη τεχνική, η οποία ξεπερνά σε απόδοση άλλες συμβατικές τεχνικές εκχύλισης και παρουσιάζει κάποια πλεονεκτήματα. Το δείγμα επανειλημμένα έρχεται σε επαφή με τα φρέσκα μέρη του διαλύτη και διατηρείται σχετικά υψηλή θερμοκρασία εκχύλισης (Handa et al., 2008-Subramanian et al., 2011).

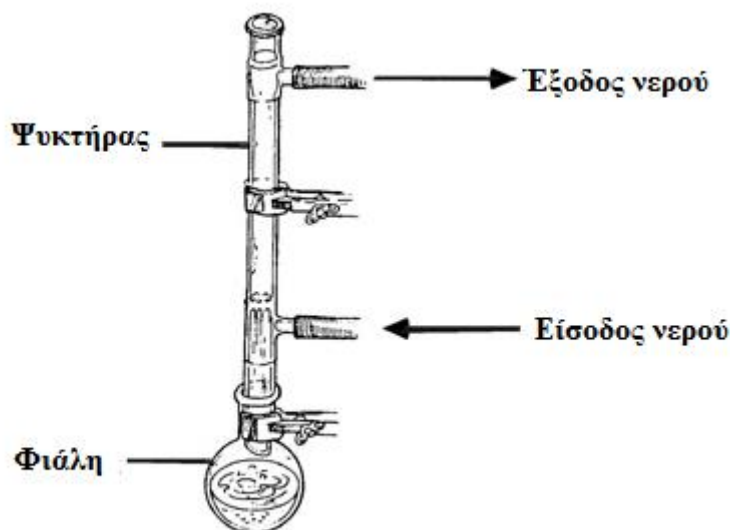
Σε αρκετές έρευνες έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της εκχύλισης με συσκευή Soxhlet χρησιμοποιώντας διάφορους διαλύτες όπως ακετόνη, αιθανόλη, μεθανόλη κ.α. με σκοπό την εκχύλιση της πιπερίνης από τριμμένο μαύρο πιπέρι (Catchpole et al., 2003-Chauhan et al., 2008-Karoor et al., 2009-Kolhe et al., 2011-Hamrapurkar et al., 2011). Οι Shingate et al., στην έρευνά τους, χρησιμοποίησαν αυτή τη μέθοδο, κατά την οποία ποσότητα τριμμένου μαύρου πιπεριού εκχυλίστηκε με αιθανόλη 95%, σε συσκευή Soxhlet για 2 h. Το διάλυμα διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε σε υδατόλουτρο στους 60°C. Στη συνέχεια ποσότητα 10% αλκοολικού υδροξειδίου του καλίου προστέθηκε στο διήθημα με συνεχή ανάδευση. Το αδιάλυτο ίζημα διηθήθηκε

και το αλκοολικό διάλυμα αφέθηκε όλη τη νύχτα και διηθήθηκε μέσω ενός φίλτρου μεμβράνης (Kolhe et al., 2011-Shingate et al., 2013).



**Σχήμα 2.1:** Συσκευή Soxhlet (<http://glossary.periodni.com/>)

Μια άλλη τεχνική που ακολούθησαν οι Madhavi et al., (2009) είναι η εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Αρχικά ποσότητα τριμμένου μαύρου πιπεριού θερμάνθηκε σε κάθετο ψυκτήρα με 20 ml διχλωρομεθάνιου επί 20 min σε μία στρογγυλή φιάλη. Ο ψυκτήρας συνδέθηκε και το νερό αφέθηκε να τρέξει για τη συμπύκνωση των ατμών του διχλωρομεθάνιου. Αργότερα η φιάλη αφέθηκε να κρυώσει και διηθήθηκε με χωνί Buchner. Το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ακετόνη και εξάνιο (Shingate et al., 2013).



**Σχήμα 2.2:** Θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) ([www.chem.wisc.edu](http://www.chem.wisc.edu))

Τέλος, η απομόνωση της πιπερίνης μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική της εκχύλισης με εμβάπτιση. Σε αυτή τη διαδικασία, σύνολο ή μέρος του τριμμένου πιπεριού τοποθετείται σε ένα πωματισμένο δοχείο με τον διαλύτη και αφήνεται να παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για μία καθορισμένη περίοδο με συχνή ανάδευση μέχρις ότου η διαλυτή ύλη έχει διαλυθεί. Το μίγμα στη συνέχεια στραγγίζεται και τα υπολείμματα του φυτικού υλικού διαχωρίζονται από το διαλύτη. Αυτό συνεπάγεται μια πρόχειρη διαύγαση με καθίζηση, η οποία συνήθως ακολουθείται από ένα στάδιο διήθησης (Handa et al., 2008-Tiwari et al., 2011-Sarker, Nahar, 2012).

### **2.1.1 Άλλες τεχνικές απομόνωσης**

Οι παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης όπως η εμβάπτιση, η υδροαπόσταξη και η εκχύλιση με συσκευή Soxhlet είναι χρονοβόρες και έχουν χαμηλή απόδοση. Επιπλέον, απαιτούν μεγάλους όγκους οργανικού διαλύτη και η χρήση τους συνεπάγεται πρόσθετο κόστος και περιβαλλοντικούς κινδύνους. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές τεχνικές εκχύλισης που μειώνουν τον όγκο του διαλύτη και το χρόνο εκχύλισης. Για παράδειγμα, κάποιες από τις νεότερες τεχνικές είναι η εκχύλιση με υπερήχους (Ultrasound-Assisted-USE), η εκχύλιση με υγρά υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction-PLE) και η εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction-MAE) (P'eres et al., 2006).

Στην εκχύλιση με υπερήχους, το θρυμματισμένο δείγμα αναμειγνύεται με τον κατάλληλο διαλύτη και τοποθετείται στη συσκευή υπερήχων όπου καθορίζεται η θερμοκρασία της εκχύλισης (Dobias et al., 2010). Πρόκειται για μια καλή μέθοδο εκχύλισης σε σύγκριση με τις πιο παραδοσιακές προσεγγίσεις λόγω της υψηλής απόδοσης της, τις χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και τη μικρή κατανάλωση διαλύτη. Η βελτίωση στη διαδικασία εκχύλισης με τη χρήση υπερήχων σχετίζεται με τη μηχανική καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων και τη μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη στις κυτταρικές μεμβράνες, διευκολύνοντας την εκχύλιση. Επιτυγχάνεται βελτίωση της μεταφοράς της μάζας διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος λόγω της κατάρρευσης των φυσαλίδων που δημιουργούνται από την ταλάντωση της ηχητικής πηγής (Maclas et al., 2009).



**Εικόνα 2.3:** Λουτρό υπερήχων (<http://www.progenlabonline.com>)

Η διαδικασία της εκχύλισης με μικροκύματα είναι επίσης μια μη συμβατική μέθοδος κατά την οποία η εκχύλιση εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της απορρόφησης των μικροκυμάτων από τα κύτταρα του φυτικού υλικού προκαλώντας κίνηση των μορίων, λόγω της κίνησης των ιόντων και της περιστροφής των διπόλων. Αυτή η διαδικασία θερμαίνει όλο τον όγκο του διαλύτη και εντοπισμένα μόνο τις περιοχές του φυτικού υλικού που περιέχουν νερό. Τελικά, αποκαθίσταται θερμική ισορροπία σε όλο το σύστημα γιατί η θερμότητα μεταφέρεται από το διαλύτη και τις περιοχές του φυτικού υλικού που υπερθερμαίνονται μέσω των συγκρούσεων, έτσι ώστε η



ενέργεια να διανέμεται ομοιόμορφα σε όλο το ακτινοβολημένο σύστημα (Chemat, Cravotto, 2013-Ταραντίλης, 2013).

Οι Raman και Gaikar χρησιμοποίησαν μια υβριδική μέθοδο, ακτινοβολία μικροκυμάτων με εκχύλιση με διαλύτη, για την ανάκτηση πιπερίνης από τους καρπούς του *P. nigrum*. Παρατήρησαν ότι αυτή η τεχνική, σε αντίθεση με τις συμβατικές εκχυλίσσεις, παρέχει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης και είναι γρηγορότερη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τον έλεγχο της ποιότητας στην ταχεία διαλογή των ακατέργαστων πιπεριών (Raman, Gaikar, 2002).

Η εκχύλιση με υπερήχους υπερτερεί της εκχύλιση με μικροκύματα λόγω της λειτουργίας της σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, αποφεύγοντας την έκθεση του δείγματος σε υψηλές θερμοκρασίες (Alurului et al., 2009).

Η εκχύλιση με υγρά υπό πίεση λειτουργεί σε υψηλές πιέσεις και σε θερμοκρασία πάνω από το σημείο βρασμού του οργανικού διαλύτη. Η χρήση της υψηλής θερμοκρασίας αυξάνει την ικανότητα του διαλύτη να διαλύει τον αναλύτη και να μειώνει το ιξώδες των υγρών διαλυτών, επιτρέποντας την καλύτερη διείσδυση του διαλύτη μέσα στο υλικό. Η χρήση υψηλότερης πίεσης διευκολύνει την εκχύλιση του αναλύτη από το δείγμα, βελτιώνοντας την πρόσβαση του διαλύτη στον αναλύτη, καθώς είναι παγιδευμένος μέσα στους πόρους του υλικού. Η χρήση της PLE μειώνει σημαντικά το συνολικό χρόνο της διαδικασίας. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος εκχύλισης μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική και επιλεκτική, αλλάζοντας κάποιες παραμέτρους όπως τη θερμοκρασία, το χρόνο και το διαλύτη (Pérez et al., 2006).

Σε βιομηχανική κλίμακα, το πιπέρι είτε θρυμματίζεται σε νιφάδες, είτε αλέθεται χοντρόκοκκα και μετά εκχυλίζεται επαναλαμβανόμενα με οργανικό διαλύτη. Η μεγάλη διάρκεια της επαναλαμβανόμενης εκχύλισης του ακατέργαστου πιπεριού καταλήγει στην εκχύλιση και άλλων συστατικών όπως κόμμεα, πολυσακχαρίτες και μη αρωματικά συστατικά. Αυτός ο τύπος εκχύλισης με διαλύτη συνήθως δίνει σύνθετα ακάθαρτα προϊόντα, τα οποία θα πρέπει να καθαριστούν περαιτέρω με πολλαπλών σταδίων τεχνικές, όπως η χρωματογραφία ή η κρυστάλλωση. Επεξεργασία με υψηλής πίεσης ατμό μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πιπερίνης με ωσμωτικό σοκ, ωστόσο, αυτή η τεχνική είναι σχετικά αργή και απαιτεί μια μεγάλη ποσότητα ατμού (Vasavirama, Upender, 2014).

Η εκχύλιση πιπερίνης χρησιμοποιώντας υδρότροπα είναι μια καλή εναλλακτική λύση για τη μέθοδο της εκχύλισης με διαλύτη. Το υδρότροπο διεισδύει στο κύτταρο και αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό

επιτρέπει την εύκολη μεταφορά της πιπερίνης εκτός των κυττάρων διευκολύνοντας την αύξηση του ρυθμού εκχύλισης της (Dongre et al., 2011). Έτσι, υδρότροπα όπως τα αλκυλο νάτριο βενζολοσουλφονικά δείχνει επιλεκτική και γρήγορη εκχύλιση της πιπερίνης από το μαύρο πιπέρι. Η ανάκτηση της πιπερίνης μπορεί να είναι 90% καθαρή (Shingate et al., 2013). Οι Raman και Gaikar εκχύλισαν πιπερίνη αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας υδρότροπα και έδειξαν την τεράστια δυνατότητα για κυτταρική διαπερατότητα και επιλεκτική εκχύλιση των βιοδραστικών ενώσεων σε εμπορική κλίμακα (Vasavirama, Upender, 2014).

Η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical Fluid Extraction, SCFE) είναι μια εναλλακτική τεχνική εκχύλισης δείγματος με γενικούς στόχους τη μείωση της χρήσης των οργανικών διαλυτών και την αυξημένη αποδοτικότητα (Handa et al., 2008). Η διαδικασία της εκχύλισης απαιτεί μικρότερο χρόνο, που μπορεί να περιοριστεί μέχρι και 30 min, διεξάγεται σε χαμηλές θερμοκρασίες και το εκχύλισμα δεν περιέχει διαλύτη μέσω της αποσυμπίεσης. Επιπροσθέτως, ο χειρισμός των παραμέτρων όπως η θερμοκρασία και η πίεση οδηγεί σε εκλεκτικότητα και, κατά συνέπεια, στην εκχύλιση διαφορετικών συστατικών. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι χρήσιμο όταν είναι επιθυμητό ένα συγκεκριμένο συστατικό (Atti-Santos et al., 2005- Grosso et al., 2007).

Οι Hamrapurkar et al., ανέφεραν ότι η παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση και μειωμένο χρόνο εκχύλισης από την εκχύλιση με συσκευή Soxhlet. Η % w/w απόδοση πιπερίνης από το *P. nigrum* στην εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά ήταν 8,8 με χρόνο εκχύλισης 30 min, ενώ στην περίπτωση της εκχύλισης με συσκευή Soxhlet η % w/w απόδοση πιπερίνης ήταν 8,1 σε 8 h (Hamrapurkar et al., 2011).

Η SCFE εφαρμόζεται χρησιμοποιώντας υγρό CO<sub>2</sub> ως διαλύτη, ο οποίος προσφέρει μια σειρά πλεονεκτημάτων σε σχέση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Πέραν των ευνοϊκών φυσικών ιδιοτήτων του, το CO<sub>2</sub> είναι μη-τοξικό, αδρανές, μη εύφλεκτο, μη εκρηκτικό και ανέξοδο. Επίσης, είναι άοσμο, άχρωμο, γενικά αποδεκτό ως GRAS διαλύτης για τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα τρόφιμα, χωρίς να αφήνει κατάλοιπα διαλύτη στο προϊόν. Το κύριο μειονέκτημα του υπερκρίσιμου CO<sub>2</sub> είναι η χαμηλή πολικότητα του, ένα πρόβλημα που μπορεί να ξεπεραστεί με την χρησιμοποίηση πολικών τροποποιητών ή συνδιαλυτών για να αλλάξει την πολικότητα του υπερκρίσιμου ρευστού και να αυξηθεί η ισχύς διάλυσης του αναλύτη (Hayes, 2012).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει προσπάθειες για την εκχύλιση ελαιορητίνης από το μαύρο πιπέρι με την τεχνολογία της εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά (Sonová et al., 1995-Perakis et al., 2005). Χρησιμοποιώντας την SCFE, μπορεί να επιτευχθεί κλασμάτωση της ελαιορητίνης παίρνοντας κλάσμα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πιπερίνη (Dang, Phan, 2014).

Όλες οι παραπάνω τεχνικές πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών τεχνικών εκχύλισης όσον αφορά την απόδοση, το χρόνο, την εκλεκτικότητα, την περιορισμένη χρήση οργανικών διαλυτών και τη διεξαγωγή της εκχύλισης σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά μειονεκτούν στο ότι απαιτούν ειδικό εξοπλισμό για να είναι λειτουργικές, συνεπώς το κόστος είναι μεγαλύτερο. (Djilani et al., 2006-Alurpului et al., 2009-Hayes, 2012).

## **2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΙΠΕΡΙΝΗΣ**

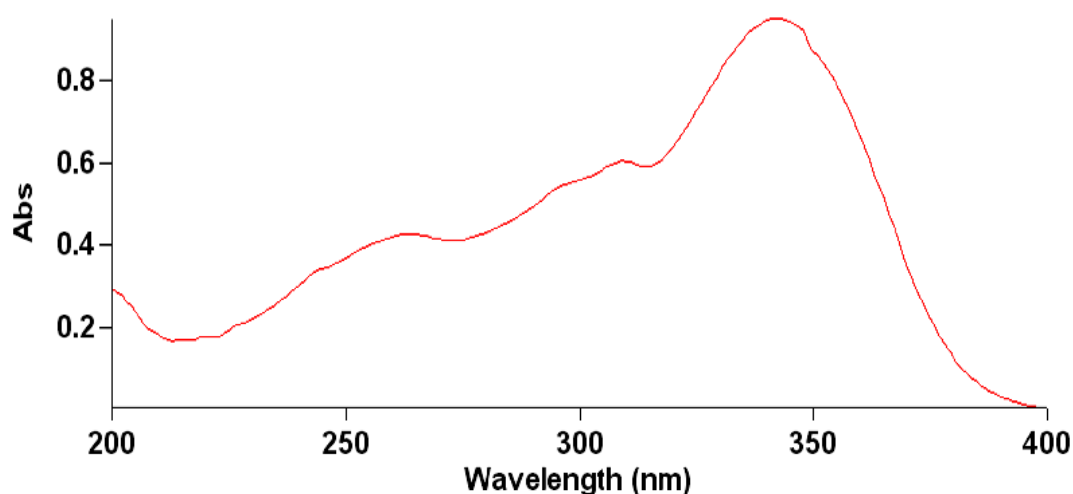
### **2.4.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)**

Η υπεριώδης και ορατή φασματοσκοπία ασχολείται με την καταγραφή της απορρόφησης των ακτινοβολιών στις υπεριώδεις και ορατές περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η υπεριώδης περιοχή εκτείνεται από 10 έως 400 nm. Υποδιαιρείται στο εγγύς υπεριώδες (200-400 nm) και το άπω υπεριώδες ή υπεριώδες του κενού (10-200 nm). Η ορατή περιοχή εκτείνεται από 400 έως 800 nm. Η απορρόφηση των ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών στο υπεριώδες και το ορατό επάγει την διέγερση ενός ηλεκτρονίου από ένα χαμηλότερο σε ένα υψηλότερο μοριακό τροχιακό.

Λίγες λειτουργικές ομάδες (χρωμοφόρα) μπορούν να ανιχνευθούν με την υπεριώδη και ορατή φασματοσκοπία, αλλά είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση και τη διευκρίνιση της φύσης των συζυγιακών συστημάτων συμπεριλαμβανομένων των αρωματικών δακτυλίων. (Yadav, 2005).

Ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) (ISO 5564, 1982), ο Αμερικανικός Εμπορικός Σύλλογος Μπαχαρικών (ASTA) (Official Analytical Methods, 1985), και η Ένωση Αναλυτικών Χημικών (AOAC) (Lupina, Cripps, 1987), έχουν δημοσιεύσει φασματοσκοπικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της πιπερίνης, που περιλαμβάνουν UV-Vis μετρήσεις απορρόφησης στο μέγιστο απορρόφησης της πιπερίνης, κοντά στα 343 nm. Επίσης, κάποιοι ερευνητές έχουν αναπτύξει μεθόδους προσδιορισμού της πιπερίνης, όχι μόνο στο μαύρο και το λευκό πιπέρι αλλά και σε

σκευάσματα βοτάνων που περιέχουν πιπερίνη, μετρώντας τη UV απορρόφηση στα 342 nm, δημιουργώντας την καμπύλη αναφοράς της πιπερίνης (Singh et al., 2011). Ωστόσο, στη UV-φασματοφωτομετρία μπορεί να συμβάλλουν στην απορρόφηση και άλλες ενώσεις όπως, η πιπεριλίνη και η πιπεριτίνη, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση σ' αυτό το μήκος κύματος. Αυτές οι μέθοδοι δίνουν τιμές που συσχετίζονται καλά με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης, είναι γρήγορες και φθηνές, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται ευρέως ως ανάλυση ρουτίνας για την εκτίμηση της καυστικότητας του πιπεριού (Wood et al., 1988- Scultz et al., 2005).



**Σχήμα 2.1:** UV φάσμα απορρόφησης της πιπερίνης (Singh et al., 2011)

Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες ένας ειδικότερος προσδιορισμός της πιπερίνης είναι απαραίτητος, όπως για παράδειγμα σε μελέτες ποικιλίας ή προέλευσης (Wood et al., 1988).

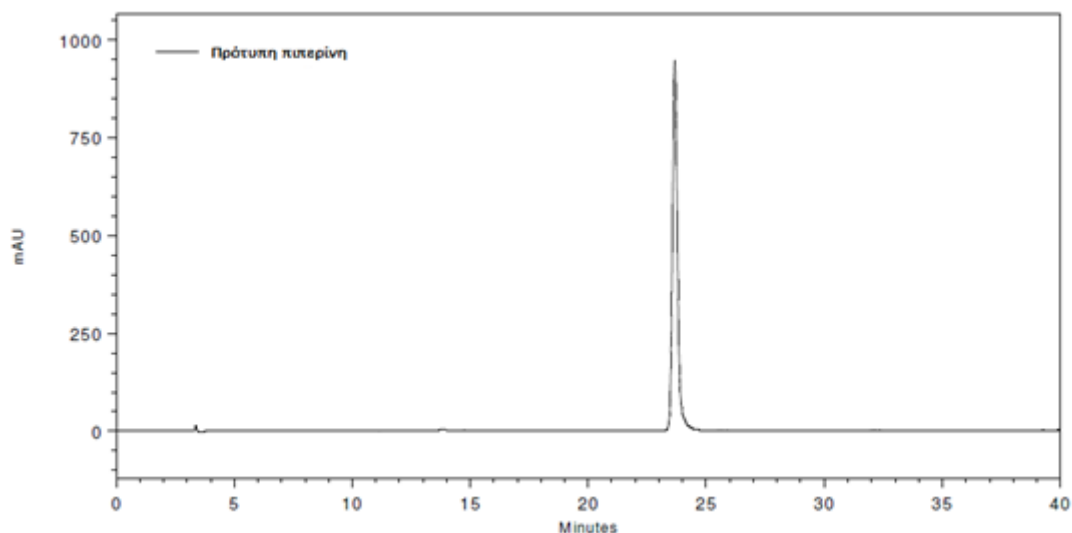
### **2.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

Η HPLC είναι η πιο διαδεδομένη χρωματογραφική τεχνική ανάλυσης και χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία και τη βιοχημεία για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των δραστικών ενώσεων (Martin, Guiochon, 2005). Ο διαχωρισμός των χημικών ενώσεων πραγματοποιείται με τη διαβίβαση της κινητής φάσης, που περιέχει το μίγμα των συστατικών, μέσω της στατικής φάσης, η οποία αποτελείται από μια στήλη από στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό

υπόστρωμα. Διάφοροι τύποι ανιχνευτών χρησιμοποιούνται για να δείξουν τους χρόνους συγκράτησης των μορίων. Ο χρόνος κατά τον οποίο ένας αναλύτης εκλύεται ονομάζεται ο χρόνος συγκράτησης και ποικίλει ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της στατικής φάσης, των μορίων που αναλύονται, και του διαλύτη που χρησιμοποιείται (Liu et al., 2006). Το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί εισάγεται σε μικρό όγκο στο ρεύμα της κινητής φάσης και επιβραδύνεται από συγκεκριμένες χημικές ή φυσικές αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Ο χρόνος καθυστέρησης εξαρτάται από τη φύση του αναλύτη και της σύνθεσης τόσο της στατικής και όσο και της κινητής φάσης (Kupiec, 2004-Malviya et al., 2009-Khan et al., 2012).

Από τη βιβλιογραφική έρευνα προκύπτει ότι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Variyar, Bandyopadhyay, 1994-Friedman et al., 2008-Kolhe et al., 2011-Namjoyan et al., 2012-Shingate et al., 2013) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) (Gawas et al., 1999-Suthar et al., 2003-Hamrapurkar et al., 2011-Vyas et al., 2013) έχουν αναφερθεί για το διαχωρισμό της πιπερίνης αλλά και τον ακριβέστερο προσδιορισμό τόσο αυτής, όσο και των ισομερών της.

Στην HPLC, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας διάφορα μείγματα (π.χ. ακετονιτρίλιο-υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 0,5%, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα-ακετονιτρίλιο, μεθανόλη-νερό κ.α). Ο ανιχνευτής UV ρυθμίζεται σε διάφορα μήκη κύματος. Τα μικρότερα μήκη κύματος, 254 nm και 280 nm, επιλέγονται κάποιες φορές επειδή σε αυτή την περιοχή λειτουργούν οι περισσότεροι ανιχνευτές και τα μεγαλύτερα μήκη κύματος, 343 nm και 364 nm, αντιπροσωπεύουν τα μέγιστα απορρόφησης της πιπερίνης και της πιπεριτίνης αντίστοιχα (Wood et al., 1988). Ο προσδιορισμός της πιπερίνης γίνεται συγκρίνοντας το εμβαδόν της κορυφής, με την αντίστοιχη κορυφή του πρότυπου δείγματος καθώς και το χρόνο συγκράτησής τους (Sandosh et al., 2005-Shingate et al., 2013).



**Σχήμα 2.2:** HPLC χρωματογράφημα πρότυπης πιπερίνης (Sandosh et al., 2005)

Όλες οι μέθοδοι που διατίθενται σήμερα για την εκτίμηση της πιπερίνης στο πιπέρι και τα προϊόντα του είναι περισσότερο ή λιγότερο χρονοβόρες, παρουσιάζουν έλλειψη ευαισθησίας και απαιτούν την χρήση οργανικών διαλυτών. Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί ταχείες και μη καταστρεπτικές δονητικές μέθοδοι φασματοσκοπίας για τον ταχύ προσδιορισμό της πιπερίνης (Sculz et al., 2005).

### 2.2.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου IR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) είναι μια καθιερωμένη μέθοδος επιβεβαίωσης της ταυτότητας μιας ελεγχόμενης ουσίας. Η σύγχρονη τεχνολογία έχει εισάγει όργανα που μπορούν να λάβουν ένα φάσμα IR από ένα ενιαίο μόριο, εξαλείφοντας έτσι την ανάγκη για πολύπλοκες διαδικασίες εκχύλισης. Απαιτεί υψηλής καθαρότητας δείγματα και η πρόοδος της τεχνολογίας έχει μειώσει δραστικά τους χρόνους προετοιμασίας και ανάλυσης του δείγματος.

Η IR φασματοσκοπία συνίσταται στη μέτρηση των αλληλεπιδράσεων των κυμάτων του υπέρυθρου (IR) μέρους του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με την ύλη. Όλα τα άτομα σε ένα μόριο είναι σε συνεχή δόνηση μεταξύ τους. Ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR όταν η συχνότητα μιας συγκεκριμένης δόνησης είναι ίση με τη συχνότητα της ακτινοβολίας IR που κατευθύνεται προς το μόριο αυτό. Οι συχνότητες που απορροφώνται καταγράφονται και εμφανίζονται ως ζώνες σε ένα φάσμα IR.

Η ακτινοβολία IR περιλαμβάνει περιοχές συχνοτήτων μεταξύ 13.000 και 30  $\text{cm}^{-1}$  που βρίσκονται μεταξύ του ορατού φωτός και της ακτινοβολίας των

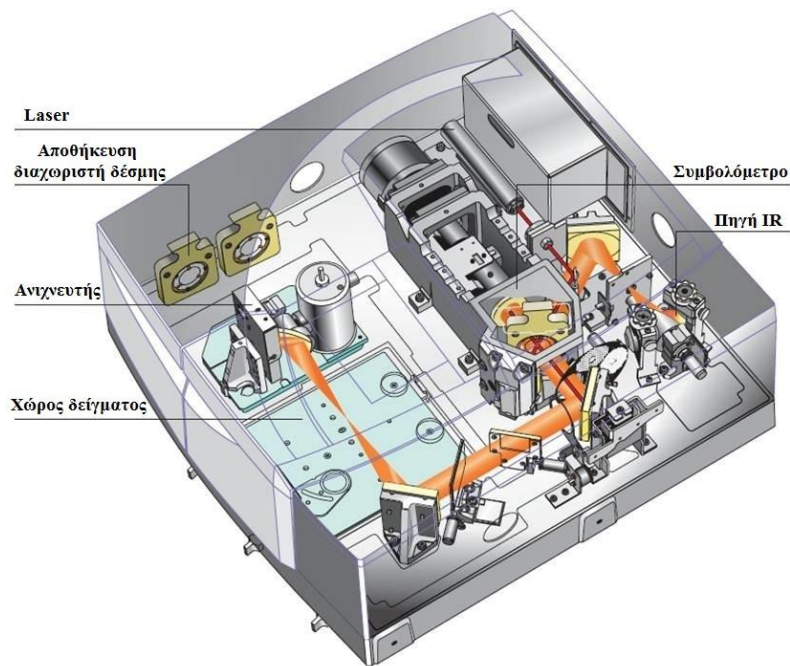
μικροκυμάτων του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η περιοχή που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή η οποία εκτείνεται περίπου από τα 4.000 έως και τα 400  $\text{cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή λαμβάνονται φάσματα εκπομπής, απορρόφησης και ανάκλασης, τόσο για ποιοτικούς όσο και για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Σ' ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας, διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Την περιοχή των **χαρακτηριστικών ομάδων** που εκτείνεται από τα 4000 έως τα 1500 $\text{cm}^{-1}$  (οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις των ομάδων) και αυτή των **δακτυλικών αποτυπωμάτων** που εκτείνεται από τα 1500 έως τα 400  $\text{cm}^{-1}$  (Khan et al., 2012).

### **2.2.3.1 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier**

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές και βρίσκει πολλές εφαρμογές λόγω της υψηλής ταχύτητας και της ευαισθησίας της. Έχει επεκτείνει σε μεγάλο βαθμό τις δυνατότητες της φασματοσκοπίας IR και εφαρμόζεται σε περιοχές που είναι πολύ δύσκολο ή σχεδόν αδύνατο να αναλυθούν με την κοινή φασματοσκοπία IR. Σε ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR, αντί να εμφανίζεται η συχνότητα κάθε συστατικού διαδοχικά, όπως σε ένα κοινό φασματόμετρο IR, όλες οι συχνότητες εξετάζονται συγχρόνως. Έτσι ένα πλήρες φάσμα μπορεί να ληφθεί κατά τη διάρκεια μιας σάρωσης, ενώ ο ανιχνευτής εξετάζει όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα (Khan et al., 2012).

Η καταγραφή φασμάτων με μετασχηματισμό κατά Fourier παρουσιάζει, εκτός των άλλων, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Ως «θόρυβος» ορίζονται εκείνα τα σήματα, τα οποία δεν αντιστοιχούν σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος και ο οποίος καθορίζει την ποιότητα και κατ' επέκταση την αξιολόγηση ενός φάσματος. Για την αξιολόγηση των σημάτων, χρησιμοποιείται ο όρος «λόγος σήματος προς θόρυβο, Signal to Noise Ratio, RSN» (Παππάς, 2013).

Ένα τυπικό φασματόμετρο FT-IR, αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα : **α)** την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, **β)** την πηγή λέιζερ, **γ)** το συμβολόμετρο Michelson και **δ)** τον ανιχνευτή.



**Εικόνα 2.4:** Οργανολογία ενός φασματοφωτόμετρου FT-IR  
(<http://www.applidyne.com.au/>)

Το συμβολόγραμμα που λαμβάνεται με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (στην παρούσα μελέτη με το OMNIC 7.3 της Thermo Electron Corporation, USA), υφίσταται μετασχηματισμό κατά Fourier και τελικά εμφανίζεται σαν τυπικό φάσμα FT-IR.

### 2.2.3.2 Φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης

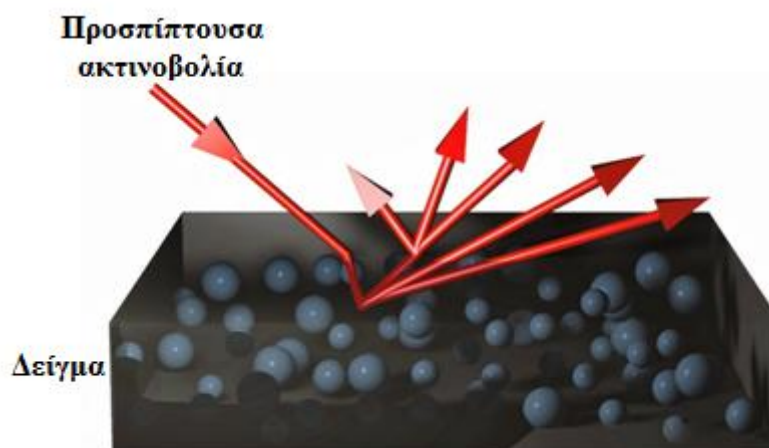
Στη φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που ανακλάται από τις τραχείες επιφάνειες συλλέγεται και αναλύεται. Η τεχνική αυτή που εφαρμόζεται στην περιοχή (FT) IR, ονομάζεται φασματοσκοπία FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS). Πρόκειται για μία από τις τεχνικές λήψης φασμάτων FT-IR από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως υπό τη μορφή σκόνης και χωρίς την προσθήκη άλλου υλικού. Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος (εικόνα 2.5).





**Εικόνα 2.5:** Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος και καψίδια για τη λήψη φασμάτων με τεχνική DRIFTS ([www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com))

Όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία πέσει πάνω στο δείγμα ένα τμήμα της αντανακλάται κανονικά (κατοπτρική ανάκλαση) από την επιφάνεια του δείγματος, ένα τμήμα σκεδάζεται διάχυτα και ένα άλλο θα απορροφηθεί από το δείγμα. Το τελευταίο τμήμα μπορεί να απορροφηθεί εντός των σωματιδίων ή να διαθλάται στα όρια των κόκκων, δίνοντας αφορμή για διάχυτη σκέδαση του φωτός προς όλες τις κατευθύνσεις. Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης σχετίζεται με την ανάκλαση που παράγεται από τη διάχυτη σκέδαση. Δεδομένου ότι η κανονική ανάκλαση διαστρεβλώνει τα φάσματα DRS, το στοιχείο της κανονικής ανάκλασης θα πρέπει να εξαιρεθεί στη μέτρηση της διάχυτης ανάκλασης. Το εξάρτημα DRIFTS έχει σχεδιαστεί για να εξαλείφει την ανακλώμενη ακτινοβολία.

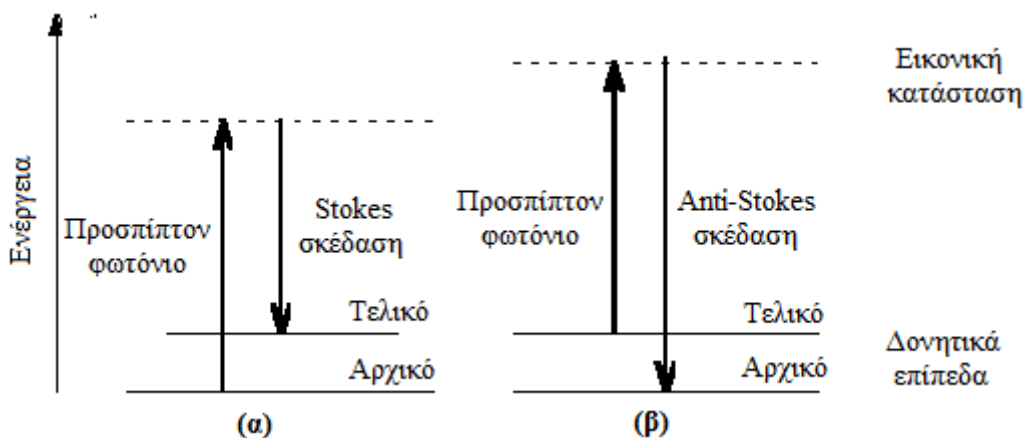


**Εικόνα 2.6:** Αναπαράσταση της διάχυτης ανάκλασης (<http://specac.blogspot.gr/>)

Στην τεχνική διάχυτης ανάκλασης, το μέγεθος των σωματιδίων, η ομοιογένεια και η πυκνότητα πακεταρίσματος του κονιορτοποιημένου δείγματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του φάσματος. Έτσι, προκειμένου να ληφθεί ένα εξειδικευμένο φάσμα, το δείγμα πρέπει να αλέθεται σε μικρότερο μέγεθος. Η λήψη των φασμάτων γίνεται είτε με το δείγμα ως έχει, είτε με ανάμειξη με βρωμιούχο ή χλωριούχο κάλιο, καθώς αυτές οι δύο ενώσεις απορροφούν στα 320 και 400  $\text{cm}^{-1}$  αντίστοιχα, εκτός δηλαδή της μέσης υπέρυθρης περιοχής (Theophanides, 2012).

#### 2.2.4 Φασματοσκοπία Raman

Όταν μια δέσμη ισχυρής ακτινοβολίας καθορισμένης συχνότητας διέρχεται μέσω μιας διαφανούς ουσίας (αέριο, υγρό ή στερεό), η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε ορθές γωνίες έχει όχι μόνο την αρχική συχνότητα αλλά επίσης και ορισμένες άλλες συχνότητες οι οποίες είναι γενικά χαμηλότερες και περιστασιακά υψηλότερες από εκείνη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Αυτό είναι γνωστό ως σκέδαση Raman. Οι φασματικές γραμμές που προκύπτουν από τις χαμηλότερες συχνότητες απ' ότι της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ονομάζονται γραμμές Stokes και εκείνες που προέρχονται από υψηλότερες συχνότητες ονομάζονται γραμμές anti-Stokes (Yadav, 2005).

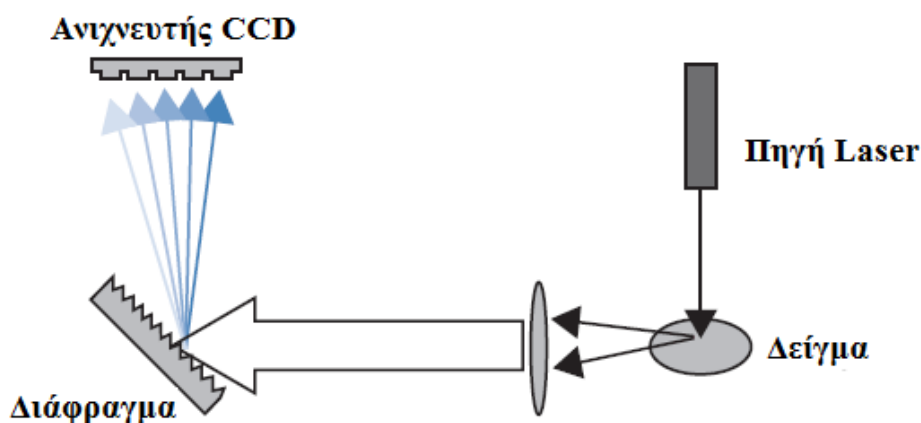


**Σχήμα 2.3:** Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων για τη σκέδαση Raman (α) Stokes σκέδαση Raman (β) anti-Stokes σκέδαση Raman (Παπάς, 2013)

Τα φασματόμετρα Raman βασίζονται σε μία από τις δύο τεχνολογίες: στη φασματοσκοπία διασποράς Raman και στη φασματοσκοπία Raman με

μετασχηματισμό κατά Fourier. Κάθε τεχνική έχει μοναδικά πλεονεκτήματα και καθεμία είναι κατάλληλη για συγκεκριμένους τύπους ανάλυσης.

Για να παρατηρηθεί το φάσμα Raman, είναι απαραίτητο να διαχωριστεί το συλλεγόμενο σκεδαζόμενο φως Raman στα μήκη κύματος του. Στα φασματόμετρα διασποράς Raman, αυτό επιτυγχάνεται με την εστίαση του σκεδαζόμενου φωτός Raman σε ένα φράγμα περίθλασης, το οποίο χωρίζει τη δέσμη στα μήκη κύματος του. Αυτές κατευθύνονται πάνω σε έναν ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (charge-coupled device) ή CCD. Αυτά τα φασματόμετρα συνήθως χρησιμοποιούν λέιζερ ορατής ακτινοβολίας. Τα τυπικά μήκη κύματος λέιζερ είναι: 780 nm, 633 nm, 532 nm και 473 nm, καθώς χρησιμοποιούνται και άλλα. Η ένταση της σκέδασης Raman είναι ανάλογη με  $1 / \lambda^4$ . Λέιζερ μήκους κύματος τόσο σύντομης διέγερσης δίνουν ένα πολύ ισχυρότερο σήμα Raman. Παρά το γεγονός ότι αυτό θα σήμαινε πως όλα τα φάσματα Raman θα πρέπει να συλλέγονται χρησιμοποιώντας λέιζερ μικρότερου μήκους κύματος, το φαινόμενο του φθορισμού είναι πολύ πιο πιθανό να συμβεί κάτω από αυτές τις συνθήκες (Thermo Fisher Scientific Inc, 2008).



**Εικόνα 2.7: Φασματόμετρο Διασποράς Raman**

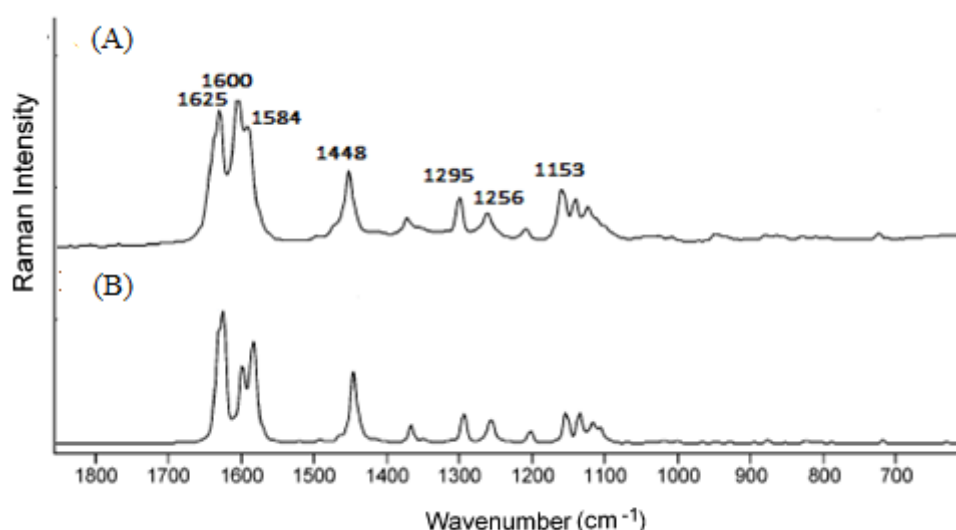
Τα φασματόμετρα FT-Raman, που χρησιμοποιούν ως πηγές διέγερσης το εγγύς υπέρυθρο, ήταν για πρώτη φορά εμπορικά διαθέσιμα το 1987. Η χρήση ως πηγή ακτινοβολίας λέιζερ, ιόντων νεοδυμίου και πυριτικών αλάτων υτρίου-αργιλίου ( $\text{Nd}^{+3}/\text{YAG}$ ) με εκπομπή στα 1064 nm, εξάλειψε ή ελάττωσε το πρόβλημα του φθορισμού που αντιμετώπιζε η ανάλυση Raman δειγμάτων που περιέχουν βιολογικά συστατικά όπως οι πρωτεΐνες. Άλλα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν την υψηλή φασματική ανάλυση, την ακριβή βαθμονόμηση (καλιμπράρισμα) των κυματαριθμών

του οργάνου, τη σταθερή διαχωριστική ικανότητα και τη δυνατότητα να καταγράφονται φάσματα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας με επαναλαμβανόμενο τρόπο (Παππάς, 2013-Li, Church, 2014).

### 2.2.5 Εφαρμογές φασματοσκοπίας IR και Raman στον προσδιορισμό πιπερίνης

Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία, λίγες είναι οι έρευνες για τον προσδιορισμό της πιπερίνης με τη χρήση της φασματοσκοπίας IR και Raman. Ενδεικτικά μπορεί να αναφερθεί αυτή των Scultz και Baranska (2007), όπου λαμβάνονται φάσματα FT-IR και FT-Raman από τριμμένο μαύρο πιπέρι και πρότυπο πιπερίνης. Τα φάσματα κυρίως παρουσιάζουν σημαντικά σήματα πιπερίνης.

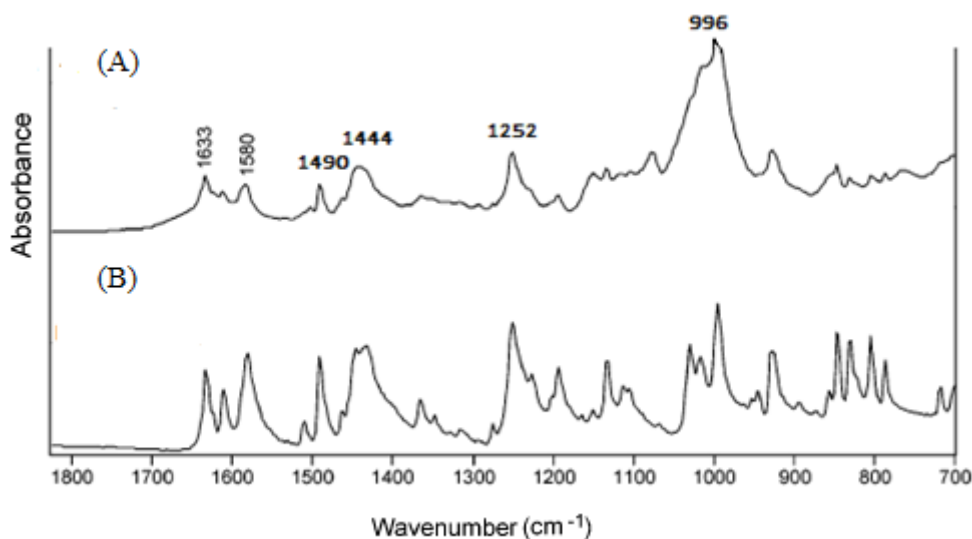
Στο FT-Raman φάσμα (σχήμα 2.5) εκτός από την έντονη τάση δόνησης -C-H μεταξύ  $2800-3100\text{ cm}^{-1}$ , τα κύρια σήματα βρίσκονται στο εύρος των δακτυλικών αποτυπωμάτων μεταξύ  $1100-1630\text{ cm}^{-1}$ , όπως οι δονήσεις τάσεις που οφείλονται στις αρωματικές και αλειφατικές -C=C- και >N-C=O μεταξύ  $1580-1635\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1448\text{ cm}^{-1}$  που συνδέονται μάλλον με δονήσεις κάμψης -CH<sub>2</sub>. Στην περιοχή 1100 και  $1400\text{ cm}^{-1}$  πιθανόν να υπάρχουν δονήσεις τάσης -C-C στα  $1153\text{ cm}^{-1}$  και δονήσεις στρέψης στα  $1295\text{ cm}^{-1}$  και αιώρησης στα  $1256\text{ cm}^{-1}$  των μορίων της πιπερίνης.



**Σχήμα 2.5:** Φάσμα FT-Raman τριμμένου μαύρου πιπεριού (A) και καθαρής πιπερίνης (B) (Scultz et al., 2005)

Το αντίστοιχο FT-IR φάσμα (σχήμα 2.6) του τριμμένου μαύρου πιπεριού δείχνει σήματα κυρίως λόγω των δονήσεων τάσεως =C-O-C στα  $1194$  και  $1252\text{ cm}^{-1}$ ,

καθώς και δονήσεις σείσης CH<sub>2</sub> στα 996 cm<sup>-1</sup>. Το FT-IR μειονεκτεί συγκριτικά με το FT-Raman, επειδή το λαμβανόμενο φάσμα χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ανάλυση (Sultz et al., 2005, Sultz, Baranska, 2007).



**Σχήμα 2.6:** Φάσμα FT- Φάσμα FT-Raman τριμμένου μαύρου πιπεριού (A) και καθαρής πιπερίνης (B) (Sultz,Baranska, 2007)

### 2.2.6 Χημειομετρία και μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων

Τα τελευταία χρόνια, οι χημειομετρικές μέθοδοι ανάλυσης αποτελούν σημαντικό τμήμα της σύγχρονης αναλυτικής χημείας. Αυτό οφείλεται στη δυνατότητα ψηφιακής καταγραφής και επεξεργασίας ευρύτατων συνόλων δεδομένων από κάθε παρατηρούμενο αντικείμενο και για μεγάλο αριθμό αντικειμένων. Ως χημειομετρία καλείται η επιστημονική μεθοδολογία που συνδυάζει την εφαρμογή της στατιστικής και της γραμμικής άλγεβρας με σκοπό τη βελτίωση της κατανόησης των χημικών πληροφοριών αναλύοντας τα χημικά δεδομένα (Bu, 2007, Vončina, 2009). Επιτρέπει τον εντοπισμό εκείνου του υποσυνόλου των δεδομένων, που σχετίζεται με την ιδιότητα του αντικειμένου που μας ενδιαφέρει και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του αντικειμένου ή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής. Σχετίζεται με τον κλάδο της αναλυτικής χημείας που χρησιμοποιεί στατιστικές μεθόδους ανάλυσης, με τη βοήθεια πολλών μεταβλητών (Σιδερούδη, 2006).

Η μέθοδος των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS) είναι ένα νέο στατιστικό εργαλείο με πολλές παραλλαγές και χρησιμοποιείται ευρέως στην πολυμεταβλητή ανάλυση, ιδιαίτερα στον τομέα της φασματοσκοπίας. Αυτό

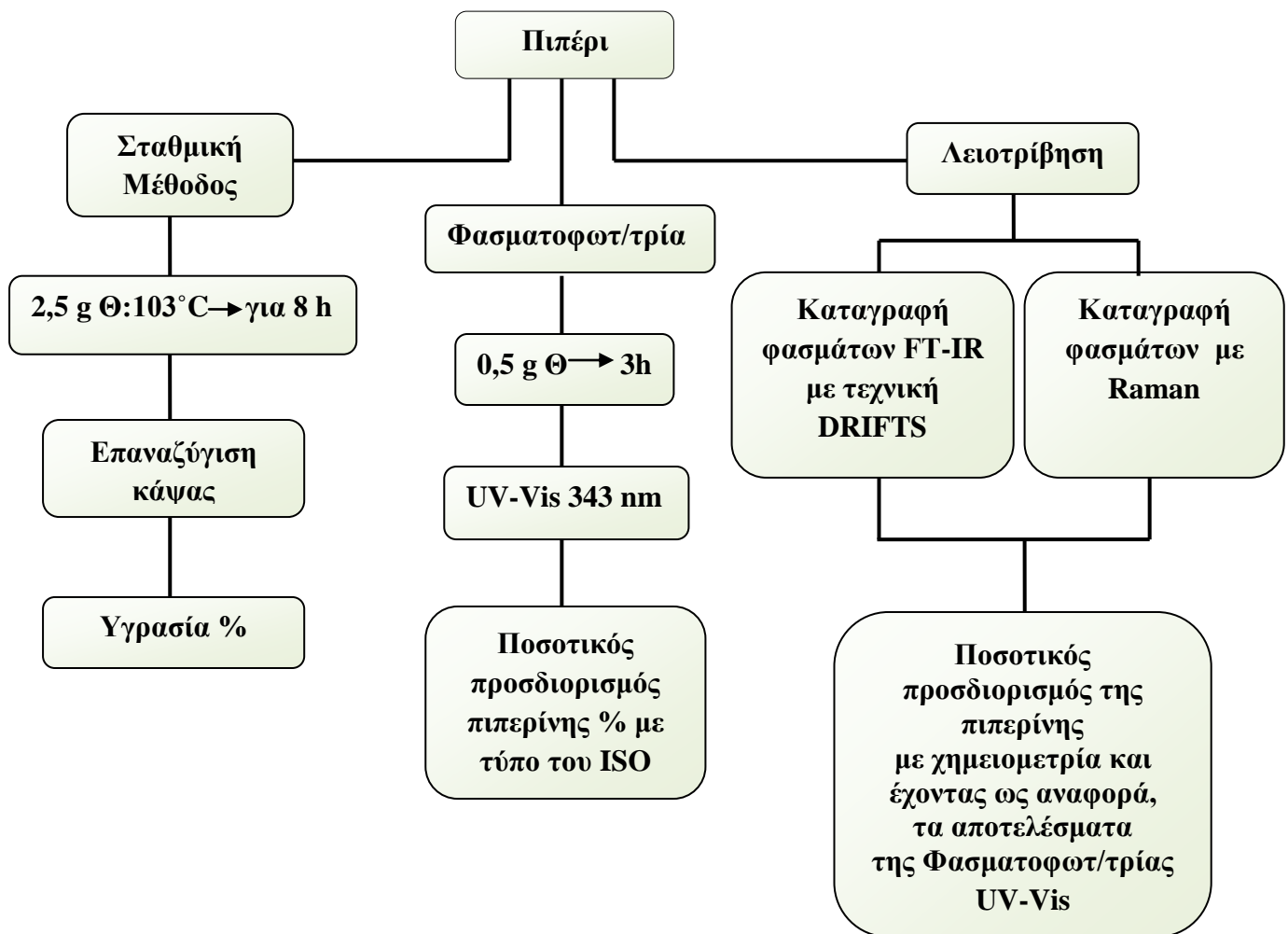
οφείλεται στο ότι το PLS είναι σε θέση να χειριστεί αποτελεσματικά το πρόβλημα της πολυσυγγραμμικότητας, που παρουσιάζεται στην περίπτωση των φασματοσκοπικών δεδομένων (Nicolaou et al., 2010). Το λογισμικό PLS έχει γίνει διαθέσιμο από αρκετούς κατασκευαστές οργάνων FT-IR για ποσοτικές φασματικές αναλύσεις. Στην παρούσα μελέτη ήταν ενσωματωμένο στο λογισμικό TQ Analyst Professional Edition (7.2.0.161 Release, Thermo Electron Corp.).

### 2.3 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν **α)** ο ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης, σε αιθανολικά εκχυλίσματα μαύρων και λευκών πιπεριών της Ελληνικής αγοράς καθώς και κάποιων πιπεριών που προήλθαν από σημαντικές χώρες παραγωγής πιπεριού (Ινδία, Βιετνάμ, Μαλαισία και Ινδονησία), με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας UV-Vis και **β)** ο ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης στα λειοτριβημένα πιπέρια με τη βοήθεια των φασματοσκοπικών τεχνικών IR και Raman, με ανάπτυξη μεθόδων PLS που θα συνδυάζει τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της φασματοσκοπίας UV-Vis και αυτά της φασματοσκοπίας IR και Raman.

Πέραν της προσπάθειας της μελέτης της ποιότητας των πιπεριών μέσω της περιεκτικότητας τους σε πιπερίνη, που αποτελεί το βασικότερο ποιοτικό χαρακτηριστικό του πιπεριού, βασικός στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι να επιχειρηθεί η εφαρμογή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας IR με την τεχνική DRIFTS και της φασματοσκοπίας Raman στον ποσοτικό προσδιορισμό της πιπερίνης, καθώς αυτές οι δύο τεχνικές αποτελούν πολύ πιο γρήγορες και οικονομικές μεθόδους σε σύγκριση με τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές που προτείνει ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) (φασματοσκοπία UV-Vis και HPLC) και παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες και δεδομένα για το συγκεκριμένο προϊόν.

Το διάγραμμα ροής του πειραματικού μέρους όπου αποδίδονται σχηματικά τα στάδια της μελέτης φαίνεται στο σχήμα **2.7**.



Σχήμα 2.7: Στάδια της πειραματικής διαδικασίας

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΥΛΙΚΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν 18 «επώνυμα» πιπέρια (14 μαύρα και 4 λευκά) που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά. Η αγορά των συγκεκριμένων δειγμάτων έγινε σε διάφορα σημεία πώλησης (σούπερ μάρκετ). Επίσης εξετάστηκαν 4 πιπέρια που στάλθηκαν από τη Σουηδία, 2 μαύρα από την Ινδία και το Βιετνάμ και 2 λευκά από τη Μαλαισία και την Ινδονησία.

Τα στοιχεία των εξεταζόμενων πιπεριών παρουσιάζονται στους πίνακες 3.1 και 3.2.

**Πίνακας 3.1** : Στοιχεία πιπεριών της ελληνικής αγοράς

<b>Μαύρο Πιπέρι</b>			
<b>Προϊόν</b>	<b>Συσκευασία (g)</b>	<b>Ημ. Λήξεως</b>	<b>Πρόσθετα Στοιχεία</b>
Appetito	50	31/12/2017	Φακελάκι
McCormick	35	4/07/2016	Πλαστικός Μύλος
Anatoli (peppercorn)	45	30/09/2016	Πλαστικός Μύλος
Anatoli (ground)	50	30/09/2017	Φακελάκι
Captain's	50	3/12/2018	Φακελάκι
Σήμαντρο	50	31/12/2018	Φακελάκι
Carrefour	50	31/01/2019	Φακελάκι
365	50	31/12/2019	Φακελάκι
Ήλιος	40	31/12/2019	Πλαστική Φιάλη
AB	40	31/11/2016	Πλαστική Φιάλη
Σκλαβενίτης	50	30/05/2015	Φακελάκι
Καγιά	50	31/12/2018	Φακελάκι
Spar	50	31/12/2019	Φακελάκι
Saman	100	1/05/2016	Φακελάκι



<b>Λευκό Πιπέρι</b>			
<b>Προϊόν</b>	<b>Συσκευασία (g)</b>	<b>Ημ. Λήξεως</b>	<b>Πρόσθετα Στοιχεία</b>
Anatoli	45	8/01/2015	Πλαστικός Μύλος
AB	45	31/12/2016	Πλαστική Φιάλη
Σκλαβενίτης	50	30/04/2015	Φακελάκι
365	35	31/12/2019	Φακελάκι

**Πίνακας 3.2 :** Στοιχεία πιπεριών από τη Σουηδία

<b>Μαύρο Πιπέρι</b>	<b>Λευκό Πιπέρι</b>
<b>Προέλευση</b>	
Ινδία	Ινδονησία
Βιετνάμ	Μαλαισία

## **3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.2.1 Προσδιορισμός φυσικοχημικών χαρακτηριστικών**

#### **3.2.1.1 Προσδιορισμός υγρασίας**

Ο προσδιορισμός της υγρασίας έγινε σταθμικά ζυγίζοντας περίπου 2,5 g προϊόντος σε προζυγισμένες πορσελάνινες κάψες. Οι κάψες μαζί με το δείγμα παρέμειναν σε φούρνο στους 103 °C για 8 h και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα μέχρι η θερμοκρασία τους να φτάσει αυτή του περιβάλλοντος. Έπειτα ακολούθησε νέα ζύγιση και από τη διαφορά βάρους υπολογίστηκε η % υγρασία.

#### **3.2.1.2 Προσδιορισμός πιπερίνης**

Ο προσδιορισμός της πιπερίνης στηρίχθηκε στη φασματοφωτομετρική μέθοδο ISO 5564. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, ζυγίζονται περίπου 0,5 g προϊόντος (με ακρίβεια 0,0001 g) σε σκουρόχρωμη σφαιρική φιάλη των 100 ml. Προσθέτονται 50 ml αιθανόλης 96% μαζί με μερικά σφαιρίδια βρασμού, η φιάλη συνδέεται με τον ψυκτήρα και το όλο σύστημα θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 3 h. Στη συνέχεια, αφήνεται η φιάλη να κρυώσει και ακολουθεί διήθηση του περιεχόμενου της σε

ογκομετρική φιάλη των 100ml, συμπληρώνοντάς τη μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη. Με τη βοήθεια σιφωνίου, 5 ml διαλύματος μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml η οποία συμπληρώνεται πάλι μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη. Τέλος, από το διάλυμα των 50ml μεταφέρονται 5 ml σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και συμπληρώνεται ξανά μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη.

Ποσότητα του τελευταίου διαλύματος μεταφέρεται σε κυψελίδα υπεριώδους, πάχους 1 cm και τοποθετείται σε φασματοφωτόμετρο για μέτρηση της απορρόφησης στα 343 nm, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα αιθανόλη. Η περιεκτικότητα της πιπερίνης υπολογίζεται βάσει του παρακάτω τύπου:

$$\frac{A}{A'} \times \frac{50}{5} \times \frac{25}{5} \times \frac{100}{m} \times \frac{100}{100 - H}$$

όπου, m, η μάζα του δείγματος σε γραμμάρια

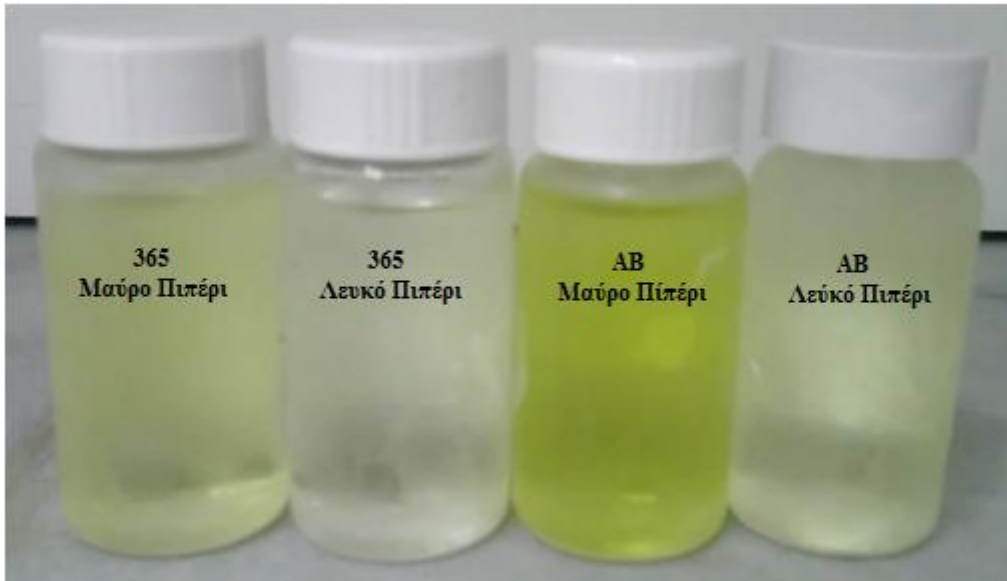
H, η υγρασία του δείγματος

A, η απορρόφηση του διαλύματος του δείγματος

A', η απορρόφηση διαλύματος πιπερίνης 1% στις ίδιες συνθήκες (343 nm, κυψελίδα πάχους 1 cm), που ισοδυναμεί με 1238.

Για τον προσδιορισμό της πιπερίνης στα δείγματά μας, χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες και οι όγκοι που αναφέρονται στο παραπάνω πρωτόκολλο. Επίσης, για τη θέρμανση του συστήματος φιάλη-ψυκτήρα χρησιμοποιήθηκε θερμομανδύας, και ελείψει σκουρόχρωμης φιάλης, η φιάλη τυλίχτηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή έκθεσης του διαλύματος στο φως.

Οι μετρήσεις της απορρόφησης έγιναν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης, της Jasco V-555 UV-Vis spectrometer.



**Εικόνα 3.1 :** Εκχυλίσματα από τυχαία δείγματα πιπεριού

### **3.2.2 Φασματοσκοπική μελέτη με FT-IR και Raman**

Όλα τα πιπέρια εξετάστηκαν στο υπέρυθρο φάσμα, τόσο στο φασματοφωτόμετρο FT-IR με την τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Spectroscopy-DRIFTS), όσο και σε Raman.

Το μοντέλο του φασματόμετρου που χρησιμοποιήθηκε για το IR (DRIFTS) ήταν το Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Electron Corporation, USA) και ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία των φασμάτων (εικόνα 3.2).



**Εικόνα 3.2:** Το σύστημα IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις

Το μοντέλο του φασματόμετρου που χρησιμοποιήθηκε για το Raman ήταν το Advantage NIR της DeltaNu, με πηγή ακτινοβολίας στα 785 nm και ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και το λογισμικό NuSpec της DeltaNu που παρέχει τα εργαλεία για την απεικόνιση και την επεξεργασία των φασμάτων (εικόνα 3.3).



**Εικόνα 3.3:** Το σύστημα Raman που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις

Η μόνη προεπεξεργασία η οποία υπέστη κάθε δείγμα και στις δύο περιπτώσεις, ήταν να λειοτριβηθεί σε ιγδίο προκειμένου να γίνει όσο το δυνατόν πιο λεπτόκοκκο. Έπειτα τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος στον εκάστοτε δειγματολήπτη, με όσο το δυνατόν πιο ομαλή μετωπική επιφάνεια, και καταγράφηκε το αντίστοιχο φάσμα. Για κάθε δείγμα ελήφθη ένα φάσματα και στην περίπτωση του IR, ανά τρία φάσματα κάθε φορά, λαμβανόταν το υπόβαθρο (background) με KBr ως φάσμα αναφοράς.

### **3.2.3 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR και Raman**

Όλα τα φάσματα FT-IR και Raman που ελήφθησαν, εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής. Επίσης, στα φάσματα IR έγινε αφαίρεση της κορυφής του CO<sub>2</sub>. Η επεξεργασία των φασμάτων, έγινε με την επιλογή των αντίστοιχων λειτουργιών από το λογισμικό OMNIC 7.3.

**Αφαίρεση (straight line) της κορυφής CO<sub>2</sub>** : Η αφαίρεση της κορυφής (~2385-2285) η οποία οφείλεται στο CO<sub>2</sub> γίνεται για λόγους εμφάνισης του φάσματος.

**Αυτόματη εξομάλυνση (Automatic Smooth)** : Επειδή οι κορυφές του θορύβου δεν περιέχουν χημικές πληροφορίες, γίνεται εξομάλυνση του φάσματος. Με την εξομάλυνση δεν εξαλείφεται ο θόρυβος, αλλά μειώνεται σε μεγάλο βαθμό, χωρίς να αλλοιώνεται η εικόνα του φάσματος, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται ο λόγος RSN. Επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός αλγόριθμου, ο οποίος χρησιμοποιεί τις πληροφορίες για το RSN κάποιων επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων προσαρμόζει την καμπύλη του φάσματος. Η λειτουργία «αυτόματη εξομάλυνση» του λογισμικού OMNIC 7.3 εταιρίας Nicolet, εκτελεί αυτόματα την παραπάνω διαδικασία.

**Αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (Automatic baseline correct)** : Η βασική γραμμή των φασμάτων FT-IR περιλαμβάνει εκείνα τα σημεία τα οποία δεν έχουν αξιόλογη απορρόφηση, γι' αυτό είναι απαραίτητο να γίνει διόρθωση της. Η διόρθωση της βασικής γραμμής δεν γίνεται μόνο για λόγους εμφάνισης των φασμάτων, αλλά είναι αναγκαία όταν πρόκειται να συγκριθούν δύο φάσματα ή να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση. Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται με αυτόματη διαδικασία, από το λογισμικό OMNIC 7.3 (Σάλλτας 2012-Παππάς, 2013).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Τα αποτελέσματα όλων των αναλύσεων που αφορούν τις φυσικοχημικές παραμέτρους, παρουσιάζονται στους πίνακες 3.1 και 3.2 με τη στήλη της πιπερίνης να έχει αναχθεί επί ξηρού προϊόντος. Επίσης, όλες οι μετρήσεις των συγκεκριμένων αναλύσεων (περιεκτικότητα σε υγρασία και πιπερίνη), παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Ι.

**Πίνακας 4.1 :** Συνολικά αποτελέσματα αναλύσεων των πιπεριών της Ελληνικής αγοράς

Μαύρο Πιπέρι		
Προϊόν	Υγρασία (%)	Πιπερίνη επί ξηρού (%)
Appetito	11,1	5,3
McCormick	9,1	6,5
Anatoli (τριμμένο)	9,9	5
Anatoli (κόκκοι)	11,2	5,7
Captain's	11,5	8,9
Σήμαντρο	10,4	5,8
Carrefour	11,1	5,6
365	11,5	5,2
Ήλιος	11,3	6,4
AB	10,1	6,5
Σκλαβενίτης	11,3	7,3
Καγιά	11,3	6,8
Spar	11,5	7,3
Saman	11,5	6,4

<b>Λευκό Πιπέρι</b>		
<b>Προϊόν</b>	<b>Υγρασία (%)</b>	<b>Πιπερίνη επί ξηρού (%)</b>
Ανατολι (κόκκοι)	11	6,5
AB	10,6	6,3
Σκλαβενίτης	11,2	6,2
365	11,8	6,3

**Πίνακας 4.2 :** Συνολικά αποτελέσματα αναλύσεων των πιπεριών από τη Σουηδία

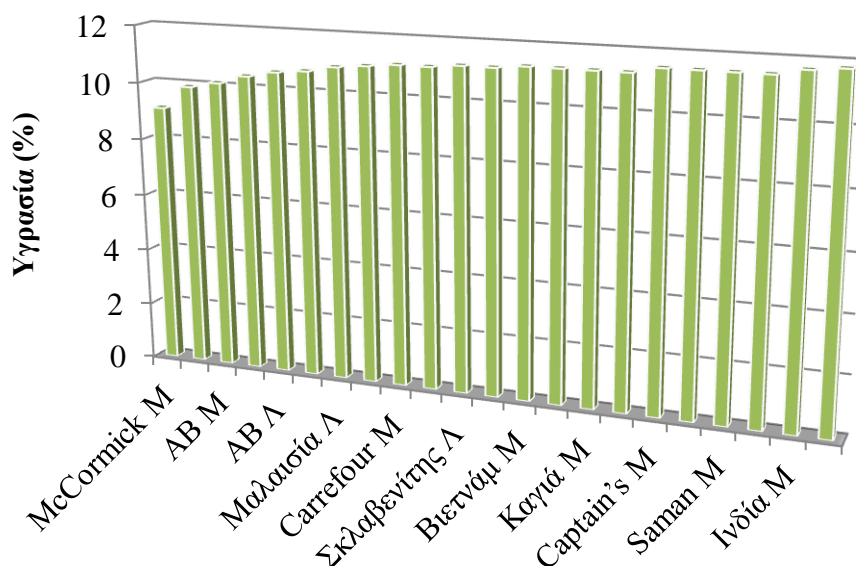
<b>Μαύρο Πιπέρι</b>		
<b>Προέλευση</b>	<b>Υγρασία (%)</b>	<b>Πιπερίνη επί ξηρού (%)</b>
Ινδία	11,7	5,5
Βιετνάμ	11,3	8,4
<b>Λευκό Πιπέρι</b>		
<b>Προέλευση</b>	<b>Υγρασία (%)</b>	<b>Πιπερίνη επί ξηρού (%)</b>
Ινδονησία	10,7	5,9
Μαλαισία	10,9	4,6

#### 4.1.1 Περιεκτικότητα υγρασίας

Η υγρασία των πιπεριών κυμαίνεται από 9,1 ("McCormick" μαύρο) έως 11,8% ("365" λευκό), έχοντας μέση τιμή  $11 \pm 0,6\%$ . Τα μαύρα πιπέρια με τιμές από 9,1 ("McCormick") έως 11,7% ("Ινδία") και μέση τιμή  $10,98 \pm 0,7\%$ , φαίνεται να περιέχουν λιγότερη υγρασία από τα λευκά πιπέρια που έχουν εύρος τιμών από 10,6 ("AB") έως 11,8% ("365") υγρασία και μέση τιμή  $11,03 \pm 0,4\%$ . Αυτό βέβαια δεν αποκλείει την ύπαρξη λευκών πιπεριών με μικρότερη υγρασία από τα μαύρα, όπως τα λευκά "Ινδονησία" και "Μαλαισία" με υγρασία 10,7 και 10,9% αντίστοιχα.

Τα ποσοστά υγρασίας που καταγράφηκαν φαίνεται να είναι παρόμοια με αυτά που συναντάμε στη βιβλιογραφία. Ο Nair (2011) αναφέρει ότι το πιπέρι μετά τη διαδικασία της ξήρανσης περιέχει 8,7–14 % υγρασία. Οι Parthasarathy et al., (2008) προτείνουν τα ανώτατα όρια υγρασίας για το τριμμένο πιπέρι, 12% για το μαύρο και 15% για το λευκό. Επίσης, οι Nelson και Eger (2011) στα πλαίσια των διεθνών φυτοϋγειονομικών απαιτήσεων αναφέρουν ότι το μαύρο και λευκό πιπέρι για να είναι αποδεκτά πρέπει να έχουν υγρασία που να μην ξεπερνά το 12 και 14% αντίστοιχως. Ο ISO αναφέρει ως ανώτατο όριο υγρασίας για το μαύρο πιπέρι το 13% και για το λευκό πιπέρι το 14%. Σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται η τάση των μαύρων πιπεριών

να περιέχουν λιγότερη υγρασία από τα λευκά. Τέλος, κρίνοντας τα προϊόντα με βάση της Ελληνικής νομοθεσίας, διαπιστώνεται ότι είναι σύμφωνα με τον ΚΤΠ κατά τον οποίο το μέγιστο όριο υγρασίας είναι 15%.



**Διάγραμμα 4.1:** Κατάταξη των πιπεριών βάσει της υγρασίας

Συνοψίζοντας, διαπιστώνεται ότι η υγρασία των δειγμάτων των πιπεριών κρίνεται φυσιολογική και εντός των αποδεκτών ορίων τόσο της Ελληνικής νομοθεσίας και των διεθνών προδιαγραφών, όσο και της βιβλιογραφίας. Τα μαύρα πιπέρια περιέχουν γενικά λιγότερη υγρασία από τα λευκά, με κάποιες περιπτώσεις όπου συμβαίνει το αντίθετο. Το ανώτατο όριο 15% που ορίζει ο ΚΤΠ είναι το υψηλότερο σε σύγκριση με τα όρια των άλλων οργανισμών (ESA-ASTA, ISO και Σρι Λάνκα) και ενδεχομένως να πρέπει να επανεξεταστεί για την καλύτερη διασφάλιση του προϊόντος.

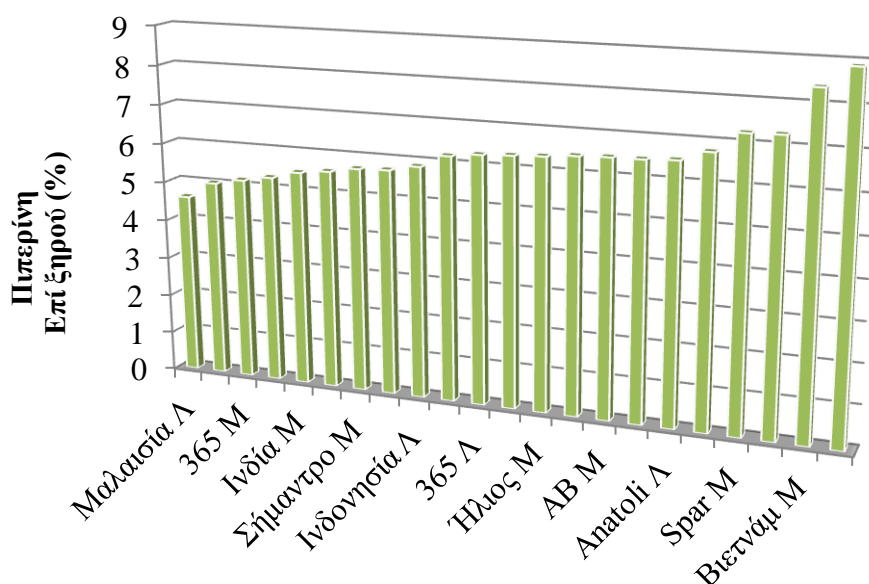
#### 4.1.2 Περιεκτικότητα πιπερίνης

Η πιπερίνη κυμαίνεται σε ποσοστά 4,6% ("Μαλαισία" λευκό) με 8,9% ("Captain's" μαύρο). Οι διαφορές μεταξύ μαύρων και λευκών πιπεριών είναι μικρές αν και τα μαύρα πιπέρια δείχνουν να έχουν έστω και ελάχιστα περισσότερη πιπερίνη από τα λευκά. Στα μαύρα πιπέρια κυμαίνεται μεταξύ 5 ("Anatoli-τριμμένο") και 8,9



("Captain's") με μέση τιμή  $6,5 \pm 1,2\%$  και στα λευκά πιπέρια κυμαίνεται μεταξύ 4,6% ("Μαλαισία") και 6,5% ("Anatoli-κόκκοι) με μέση τιμή  $6 \pm 0,7\%$ . Το γεγονός ότι τα μαύρα και τα λευκά πιπέρια έχουν παρόμοιες συγκεντρώσεις πιπερίνης έχει αποδειχτεί με αναλύσεις αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (GC-MS) ότι οφείλεται στο ότι τα δυο είδη πιπεριών (προερχόμενα από το *Piper Nigrum*) περιέχουν σχεδόν τα ίδια αλκαλοειδή (Srinivasan, 2005-Chen et al., 2011).

Οι περιεκτικότητες πιπερίνης που συναντώνται στη βιβλιογραφία κυμαίνονται από 1,7 μέχρι 9% (Santosh et al., 2005-Perakis et al. 2005-Kanaki et al., 2008-Chauhan et al., 2008-Attokaran, 2011- Hamrapurkar et al., 2011-Shingate et al., 2013), αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις κυμαίνεται μεταξύ 3-7%. Επομένως, βάσει των παραπάνω τα δείγματα των πιπεριών που μελετήθηκαν είναι αρκετά πλούσια σε πιπερίνη. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μέθοδος φασματοφωτομετρίας UV παρουσιάζει σταθερά υψηλά ποσοστά πιπερίνης λόγω της συνεισφοράς στην απορρόφηση από άλλα αλκαλοειδή όπως η πιπερίλίνη και η πιπεριτίνη (Wood et al. 1988). Σε αυτό ίσως οφείλεται η μεγάλη περιεκτικότητα πιπερίνης που παρουσιάζουν δύο από τα μαύρα πιπέρια (8,9 % "Captain's" και 8,4 "Βιετνάμ").



**Διάγραμμα 4.2:** Κατάταξη των πιπεριών βάσει της πιπερίνης επί ξηρού (%)

Τα πιπέρια που μελετήθηκαν, φαίνεται να πληρούν τις διάφορες ποιοτικές προδιαγραφές σε ότι αφορά την περιεκτικότητα πιπερίνης. Το ISO αναφέρει ως

κατώτατο όριο πιπερίνης επί ξηρού το 4% για το μαύρο και το λευκό πιπέρι, ενώ το αντίστοιχο όριο των ποιοτικών προδιαγραφών της Σρι Λάνκα είναι κατά μία μονάδα υψηλότερο, 5% και για τα δύο είδη πιπεριού. Οι διεθνούς κύρους οργανισμοί ESA και ASTA δεν παρουσιάζουν όρια σχετικά με την πιπερίνη, όπως και το ΚΤΠ.

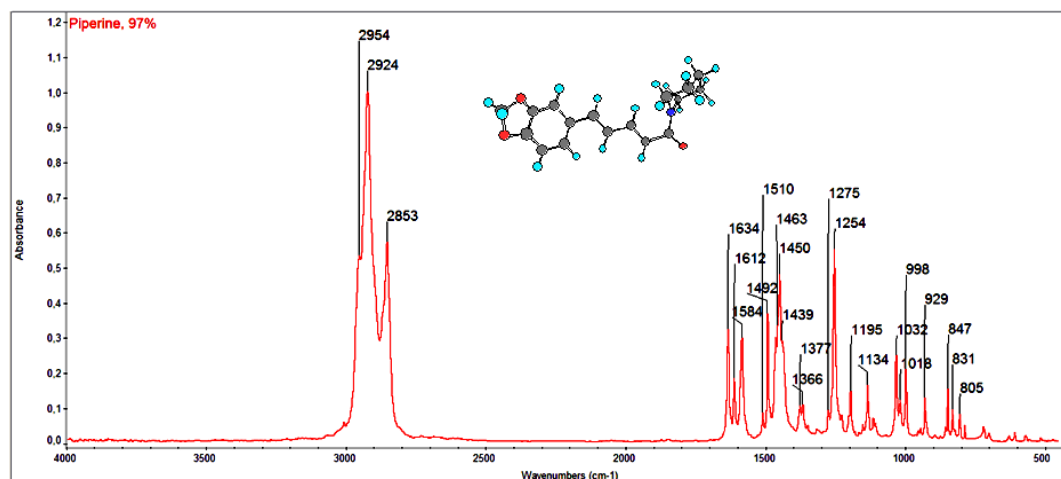
Συμπερασματικά, τα μαύρα και τα λευκά πιπέρια που εξετάστηκαν παρουσιάζουν παρόμοια ποσοστά πιπερίνης με μέσο όρο 6%. Οι περιεκτικότητες που καταγράφηκαν είναι ικανοποιητικές με βάση τη βιβλιογραφία αν και ίσως στην "πραγματικότητα" να είναι χαμηλότερες απ' ό,τι παρουσιάζονται λόγω πιθανής απορρόφησης στο ίδιο μήκος κύματος και άλλων αλκαλοειδών, παρόμοιας χημικής δομής. Η πιπερίνη αποτελεί το σημαντικότερο ποιοτικό δείκτη του πιπεριού, επομένως ποιοτικές προδιαγραφές όπως ο ISO κρίνονται αναγκαίες.

### 4.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ FT-IR

Η IR φασματοσκοπία παρέχει ένα γρήγορο και αποτελεσματικό τρόπο για τον εντοπισμό λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν σε ένα μόριο, κοιτάζοντας τις απορροφήσεις (κορυφές) που αντιστοιχούν στους τύπους των δεσμών των λειτουργικών ομάδων.

Πολλές λειτουργικές ομάδες, όπως καρβονύλια, υδροξύλια και διπλοί δεσμοί, προκαλούν χαρακτηριστικές απορροφήσεις στην περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων ( $4000-1500\text{ cm}^{-1}$ ) του φάσματος IR. Δονήσεις τάσεις των απλών δεσμών O-H, N-H, και C-H συμβαίνουν στην περιοχή  $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ . Οι τριπλοί δεσμοί  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C}\equiv\text{N}$  απορροφούν στην περιοχή  $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ . Οι διπλοί δεσμοί  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}=\text{N}$  απορροφούν στην περιοχή  $2000-1500\text{ cm}^{-1}$ . Η περιοχή  $1500-650\text{ cm}^{-1}$  καλείται περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος και απορροφούν οι απλοί δεσμοί C-C, C-O, C-N και C-X. Τα φάσματα τείνουν να είναι περίπλοκα στην περιοχή αυτή, καθώς η αναγνώριση όλων των κορυφών είναι αδύνατη δεδομένου ότι συμβαίνουν πολλές δονήσεις παραμορφώσεως και τάσης. Οι κορυφές αυτές είναι πιο χαρακτηριστικές για την πιπερίνη από τις κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων.

Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων με την φασματοσκοπία υπερύθρου, στο σημείο αυτό παρατίθεται το φάσμα FT-IR καθαρής πιπερίνης (σχήμα 4.1) καθώς και ορισμένα φασματοσκοπικά δεδομένα (πίνακας 4.3). Έπειτα ακολουθούν τα φάσματα των δειγμάτων.



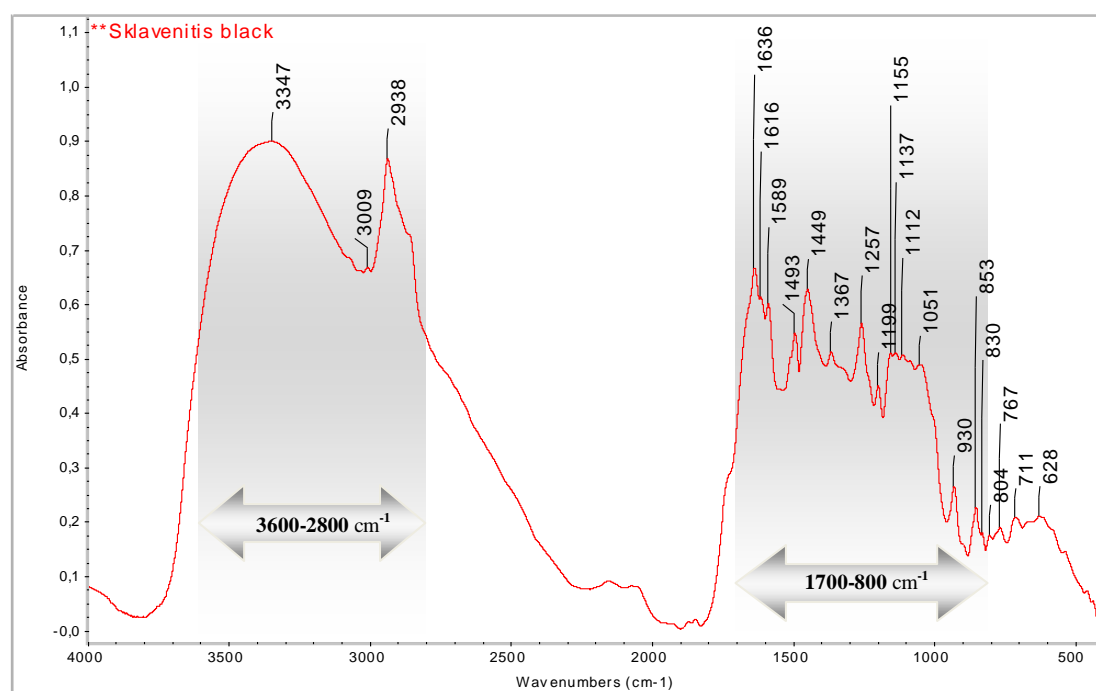
Σχήμα 4.1: Φάσμα FT-IR καθαρής πιπερίνης (Omnisc 7.3 library)

Πίνακας 4.3: Δονήσεις της πιπερίνης στο IR

Είδος Δονήσεων	Κοματαριθμός (cm <sup>-1</sup> )
Αρωματική C-H τάση	2954
Συμμετρική και ασύμμετρη τάση διενικών C = C	1634-1612
Τάση αρωματικών C = C (δακτύλιος βενζολίου)	1612-1584-1492
Τάση -CO-N	1634
Ασύμμετρη και συμμετρική CH <sub>2</sub> τάση, τάση αλειφατικών CH	2924-2853
Κάμψη CH <sub>2</sub>	1450
Ασύμμετρη τάση = C-O-C	1254-1195
Συμμετρική τάση = C-O-C	1032
Τάση C-O	929
Κάμψη εντός πεδίου των φαινολικών C-H	1134
Κάμψη των C-H του trans-CH = CH-	998
Κάμψη εκτός πεδίου των φαινολικών C-H	847-831-805

Τα καταγραφόμενα φάσματα πιπεριών χαρακτηρίζονται «ομαλά», χωρίς πολλές και έντονες κορυφές, με ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους. Παρατηρούνται δύο βασικές περιοχές κορυφών, η πρώτη μεταξύ 3600-2800 cm<sup>-1</sup> και η δεύτερη μεταξύ 1700-800 cm<sup>-1</sup> (σχήμα 4.2). Στις περιοχές 1700-1550 και 1150-950 οι κορυφές είναι

φαρδιές και δε διαχωρίζονται ξεκάθαρα. Αυτό οφείλεται στην αλληλοεπικάλυψη των κορυφών των διάφορων συστατικών του πιπεριού. Από τη σύγκριση όμως του φάσματος της πιπερίνης με τα φάσματα των μαύρων και λευκών πιπεριών παρατηρείται ότι αρκετές κορυφές των φασμάτων των πιπεριών αποδίδονται στην περιεχόμενη πιπερίνη.



**Σχήμα 4.2:** Οι δύο βασικές περιοχές κορυφών σε φάσμα IR μαύρου πιπεριού

Στην πρώτη φασματική περιοχή ( $3600-2800\text{ cm}^{-1}$ ) παρατηρείται σε όλα τα φάσματα μια ευρεία πλατιά κορυφή που οφείλεται σε δονήσεις τάσης του O-H, κυρίως λόγω της περιεχόμενης υγρασίας, αλλά και λόγω των υδροξυλίων των περιεχόμενων αλκοολών. Επίσης, παρατηρείται απορρόφηση τάσης των αρωματικών C-H στα  $3009\text{ cm}^{-1}$  και καταγράφονται οξείες κορυφές στην περιοχή κοντά στα  $3000\text{ cm}^{-1}$  ( $2938-2860\text{ cm}^{-1}$ ) που οφείλονται σε δονήσεις τάσης των ασύμμετρων και συμμετρικών  $\text{CH}_2$  και αλειφατικών C-H.

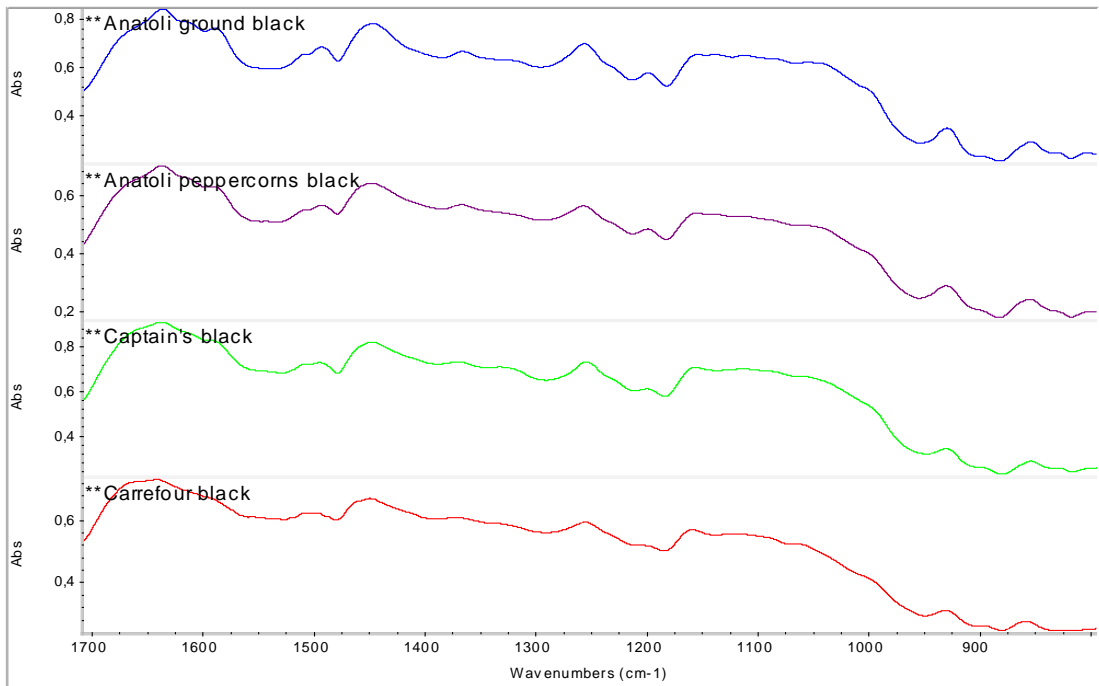
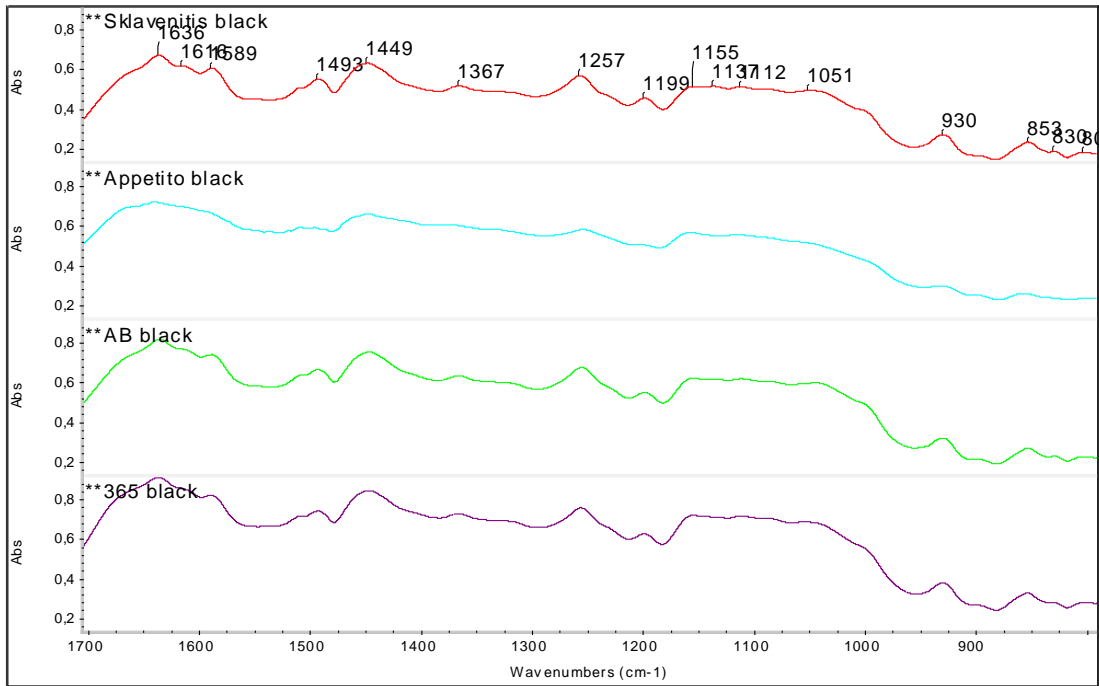
Οι κύριες διαφορές των φασμάτων των πιπεριών εντοπίζονται στη δεύτερη περιοχή ( $1700-800\text{ cm}^{-1}$ ). Περιοχή, όπου υπάρχουν έντονες απορροφήσεις λειτουργικών ομάδων στο φάσμα IR της πιπερίνης. Για παράδειγμα, υπάρχουν χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης των συμμετρικών και ασύμμετρων C = C στα  $1636$  και  $1616\text{ cm}^{-1}$  που οφείλονται στην περιεχόμενη πιπερίνη. Σύμφωνα με τους Scultz et al., (2005), οι χαρακτηριστικές κορυφές των φασμάτων του μαύρου πιπεριού που δίνουν σημαντικά σήματα

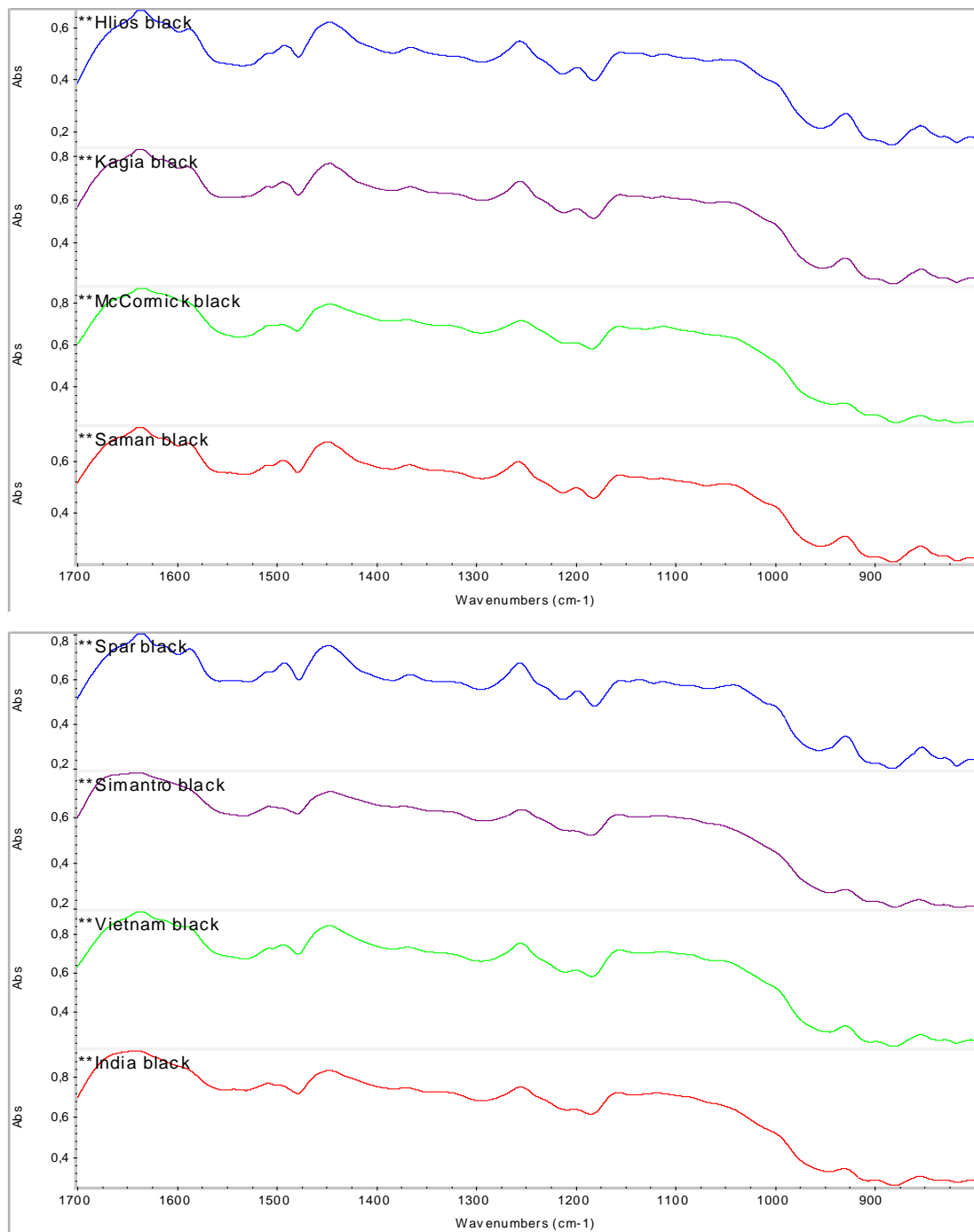
πιπερίνης είναι στα  $1636\text{ cm}^{-1}$  που οφείλεται σε δονήσεις τάσης των  $-\text{CO}-\text{N}$ , στα  $1589$  και  $1493\text{ cm}^{-1}$  που υπάρχουν απορροφήσεις τάσεις των αρωματικών  $\text{C} = \text{C}$  και στα  $1257$  και  $1199\text{ cm}^{-1}$  δονήσεις τάσης των  $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ . Επίσης, στα  $1449\text{ cm}^{-1}$  απορροφούν δονήσεις κάμψης των  $\text{CH}_2$  και στα  $930\text{ cm}^{-1}$  δονήσεις τάσης των  $\text{C}-\text{O}$ . Τέλος, στα  $1137\text{ cm}^{-1}$  απορροφούν δονήσεις κάμψης των εντός πεδίου φαινολικών  $\text{C}-\text{H}$ , ενώ στα  $853$ ,  $830$  και  $804\text{ cm}^{-1}$  απορροφούν δονήσεις κάμψης των εκτός πεδίου φαινολικών  $\text{C}-\text{H}$ .

Στον πίνακα **4.4** αναφέρονται οι παρατηρούμενες κορυφές στα IR φάσματα των πιπεριών και στα παρακάτω σχήματα γίνεται σύγκριση των φασμάτων των μαύρων και των λευκών πιπεριών που μελετήθηκαν, στην περιοχή  $1700-800\text{ cm}^{-1}$ .

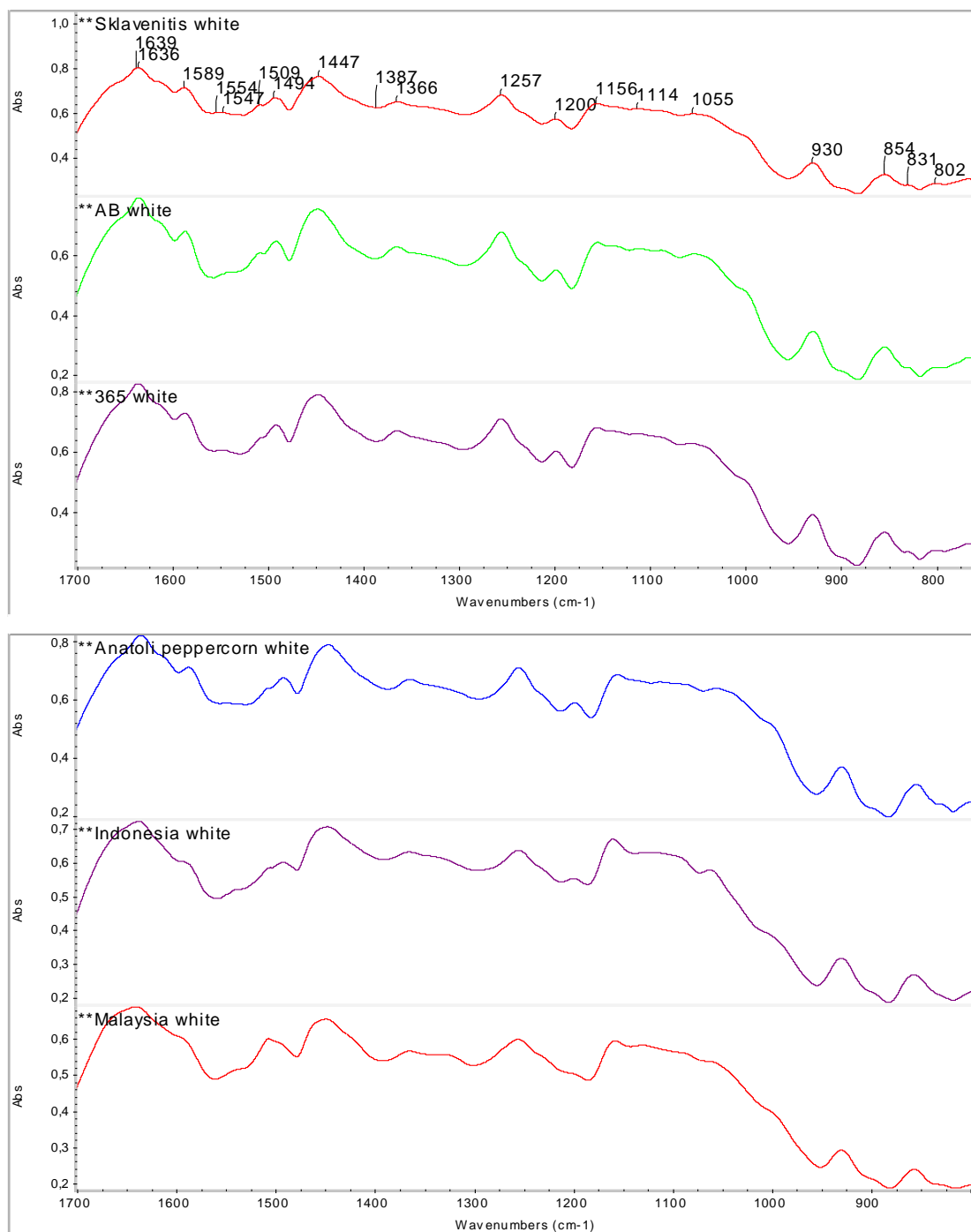
**Πίνακας 4.4:** Παρατηρούμενες κορυφές στα IR φάσματα των πιπεριών

Κυματριθμός ( $\text{cm}^{-1}$ )	Ομάδες	Είδος δόνησης
3600-3300	O-H	τάση
3009	αρωματική C-H	τάση
2938-2860	C-H	τάση
1636-1616	Συμμετρικά και ασύμμετρα $\text{C} = \text{C}$	τάση
1616-1589-1493	αρωματικά $\text{C} = \text{C}$	τάση
1636	$-\text{CO}-\text{N}$	τάση
1449	$\text{CH}_2$	κάμψη
1257-1199	$=\text{C}-\text{O}-\text{C}$	τάση
1051	$\text{C}-\text{O}-\text{C}$	τάση
930	$\text{C}-\text{O}$	τάση
1137	Εντός πεδίου φαινολικά C-H	κάμψη
853-830-804	Εκτός πεδίου φαινολικά C-H	κάμψη





**Σχήμα 4.3:** Σύγκριση των φασμάτων IR των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 1700-800 cm<sup>-1</sup>



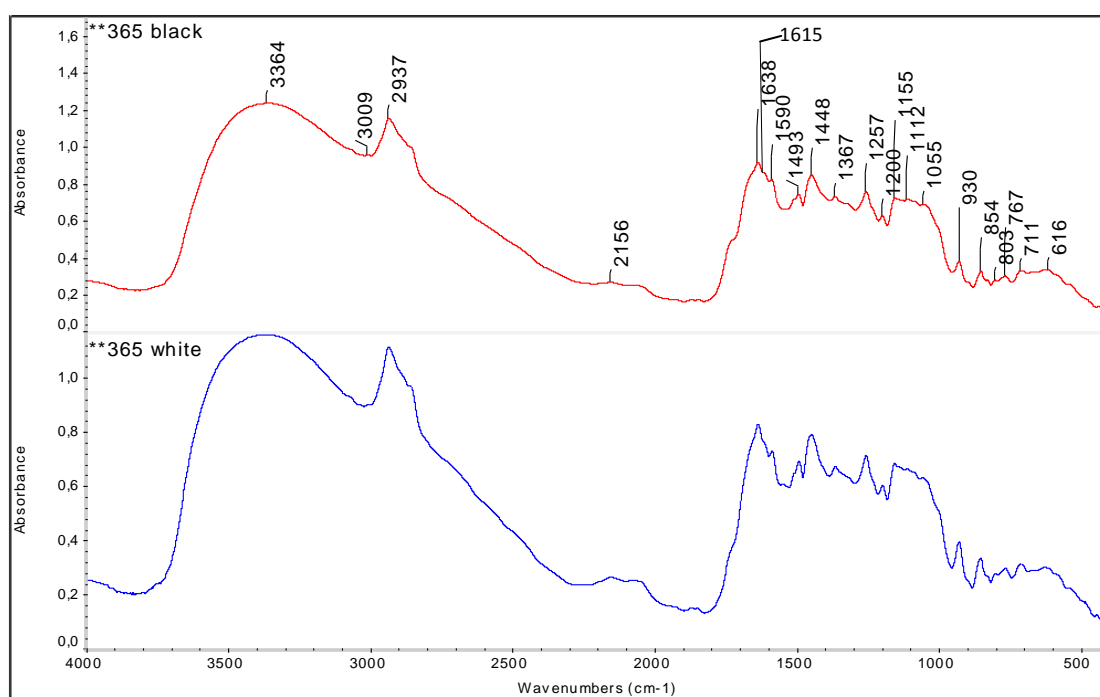
**Σχήμα 4.4:** Σύγκριση των φασμάτων IR των λευκών πιπεριών στην περιοχή 1700-800  $\text{cm}^{-1}$

Συγκρίνοντας τα φάσματα των μαύρων και των λευκών πιπεριών, διακρίνεται ότι τα φάσματα των λευκών πιπεριών παρουσιάζουν πιο έντονες και καλά διαχωρισμένες κορυφές. Ένα παράδειγμα αποτελεί η κορυφή κοντά στα 1051  $\text{cm}^{-1}$  που οφείλεται σε δονήσεις τάσης C-O-C των αλκαλοειδών, όπου στα μαύρα πιπέρια δεν καταγράφονται ιδιαίτερες απορροφήσεις ενώ στα λευκά υπάρχει μια αρκετά διακριτή κορυφή



σ' αυτή την περιοχή. Παρακάτω στο σχήμα 4.5 γίνεται σύγκριση δύο IR φασμάτων μαύρου και λευκού πιπεριού όπου φαίνεται στο λευκό πιπέρι ένας καλύτερος διαχωρισμός των τριών κορυφών 1636, 1615 και 1590  $\text{cm}^{-1}$ , καθώς και στην περιοχή 1155-1055  $\text{cm}^{-1}$  όπου είναι ευδιάκριτες οι δύο κορυφές στα 1155 και 1055  $\text{cm}^{-1}$  και τέλος υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών της περιοχής 854-803  $\text{cm}^{-1}$ .

Αυτή η διαφορά το φασμάτων ίσως οφείλεται στο περικάρπιο που απομακρύνεται στα λευκά πιπέρια, ενώ η ύπαρξή του στα μαύρα μπορεί να αυξάνει το θόρυβο και να παρεμποδίζει την καταγραφή καθαρότερων φασμάτων (Παπαϊωάννου, 2011).



Σχήμα 4.5: Σύγκριση των φασμάτων IR του μαύρου και του λευκού πιπεριού "365"

Συνοψίζοντας, τα φάσματα IR των πιπεριών εμφανίζονται παρόμοια μεταξύ και παρά την πολυπλοκότητά τους, παρουσιάζουν ορισμένες απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης χαρακτηριστικών ομάδων της πιπερίνης. Διακρίνονται δύο βασικές περιοχές κορυφών. Η πρώτη στα 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$  που χαρακτηρίζεται από μία ευρεία πλατειά κορυφή που οφείλεται στην υγρασία και σε δονήσεις τάσης των O-H, αλλά και από οξείες κορυφές στα 2938 και 2860  $\text{cm}^{-1}$  που απορροφούν δονήσεις τάσης C-H. Η δεύτερη στα 1700-800  $\text{cm}^{-1}$  χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία κορυφών που οφείλεται σε δονήσεις τάσης και κάμψης ομάδων όπως C=C (1636-1589  $\text{cm}^{-1}$ ), CH<sub>2</sub> (1449  $\text{cm}^{-1}$ ), = C-O-C (1257-1199  $\text{cm}^{-1}$ ), C-O (930  $\text{cm}^{-1}$ ), C-

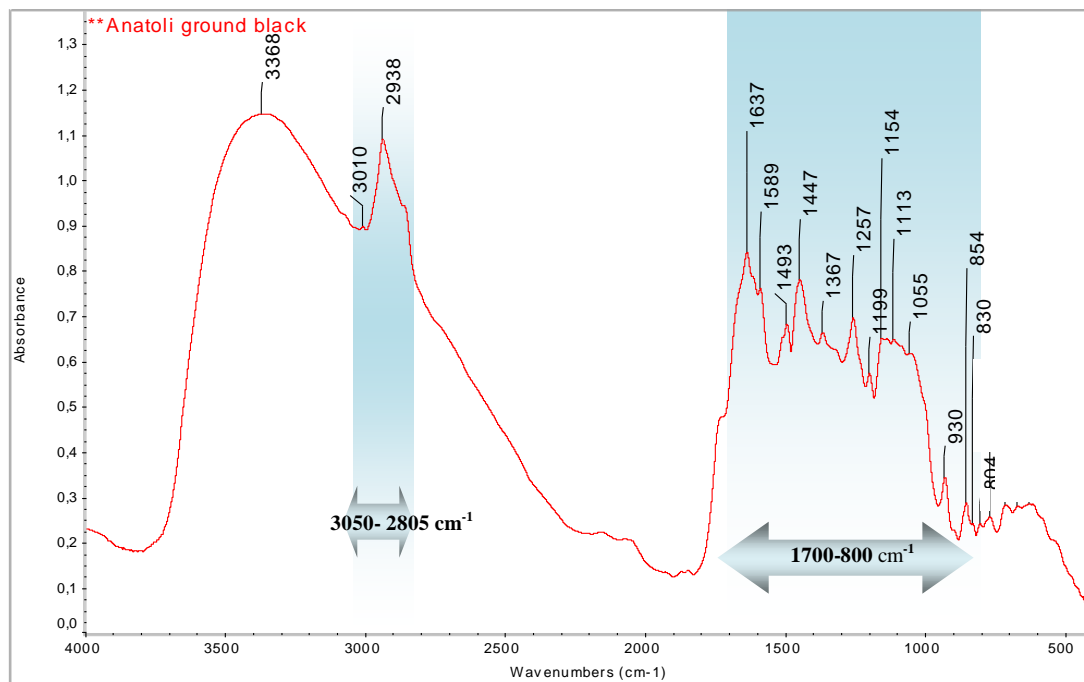
O-C ( $1051\text{ cm}^{-1}$ ), εντός πεδίου φαινολικά C-H ( $1137\text{ cm}^{-1}$ ) και εκτός πεδίου φαινολικά C-H ( $853\text{-}804\text{ cm}^{-1}$ ). Τέλος τα λευκά πιπέρια δίνουν καλύτερα φάσματα από τα μαύρα, με καλύτερα διαχωριζόμενες και πιο ευκρινείς κορυφές, γεγονός που ίσως οφείλεται στην απουσία του περικαρπίου.

#### **4.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με χημειομετρική ανάλυση στα φάσματα IR**

Το επόμενο βήμα ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με χημειομετρική μέθοδο. Η δημιουργία μοντέλων PLS ποσοτικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας «ειδικά» εργαλεία του λογισμικού TQ Analyst (8.0.0.245, Thermo Fisher Scientific Inc).

##### **1<sup>η</sup> Μέθοδος**

Τα 16 επεξεργασμένα φάσματα των μαύρων πιπεριών εισήχθησαν στο λογισμικό και αναζητήθηκε εκείνη η φασματική περιοχή η οποία έδινε το χαμηλότερο σφάλμα (μέση τετραγωνική ρίζα των σφαλμάτων βαθμονόμησης, Root Mean Square Error of Calibration, RMSEC) με τον ιδανικότερο αριθμό των factors (το σύνολο των κυριότερων απαιτούμενων στοιχείων που περιέχουν φασματικές και ποσοτικές πληροφορίες). Έγιναν δοκιμές σε διάφορες φασματικές περιοχές και η μέθοδος όπου επιλέχθηκαν οι περιοχές  $3050\text{-}2805\text{ cm}^{-1}$  και  $1700\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  (σχήμα 4.6) έδωσε το βέλτιστο αποτέλεσμα (RMSEC = 0,11 και συντελεστή συσχέτισης R = 0,99), χρησιμοποιώντας από τα 16 φάσματα, τα 4 ως φάσματα επικύρωσης. Επίσης οι factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 7 και χωρίς να εντοπιστούν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers).

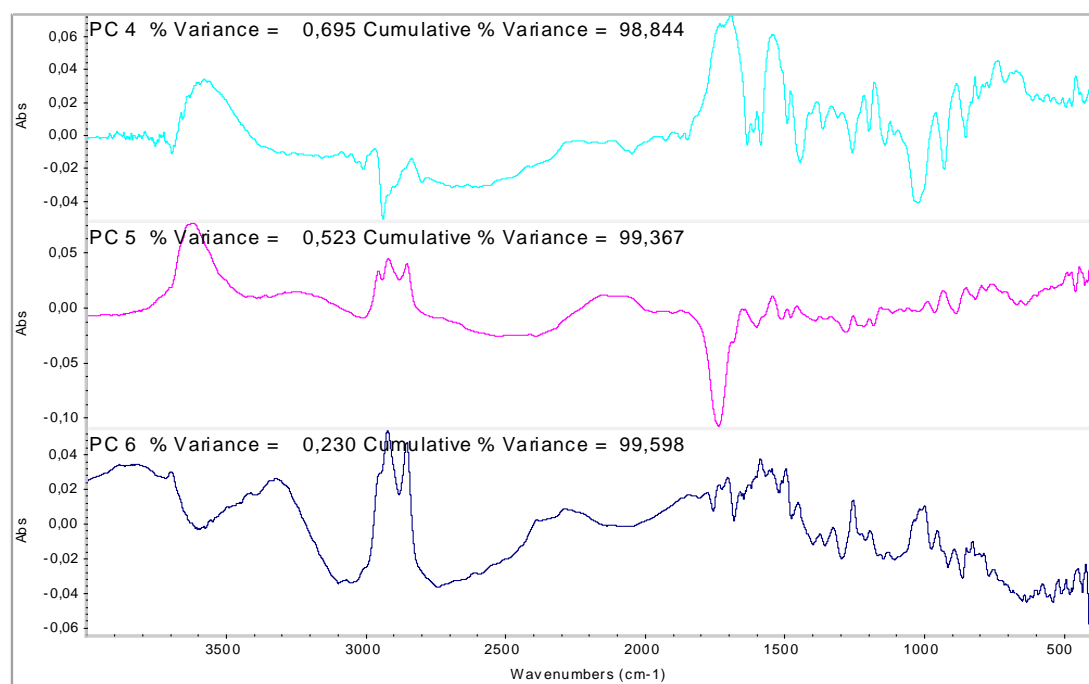
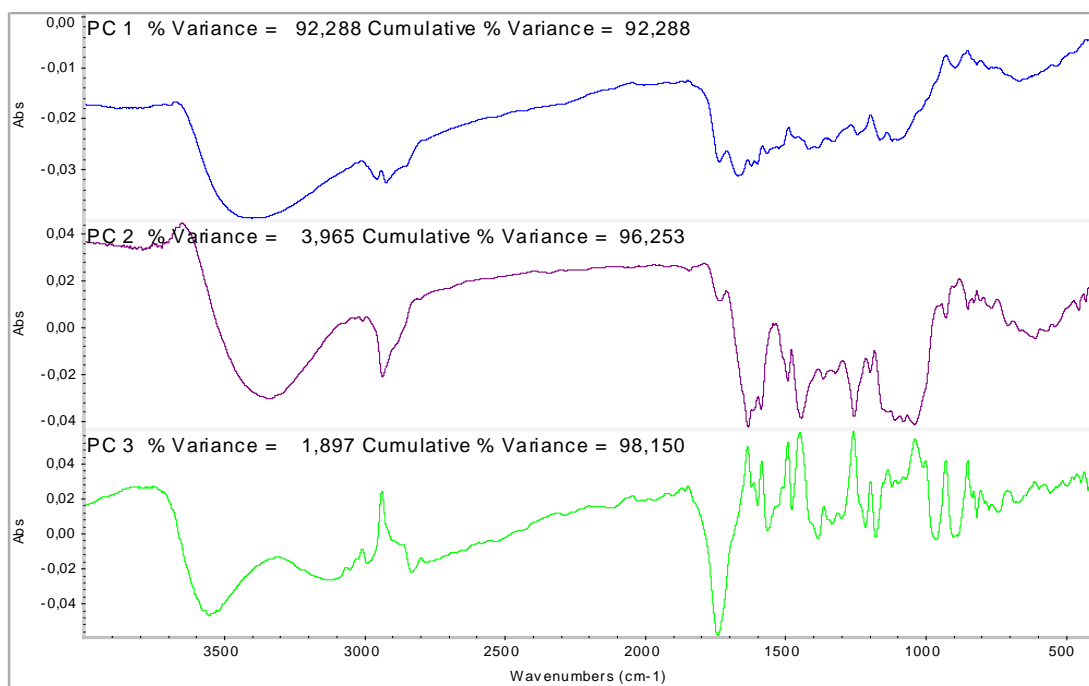


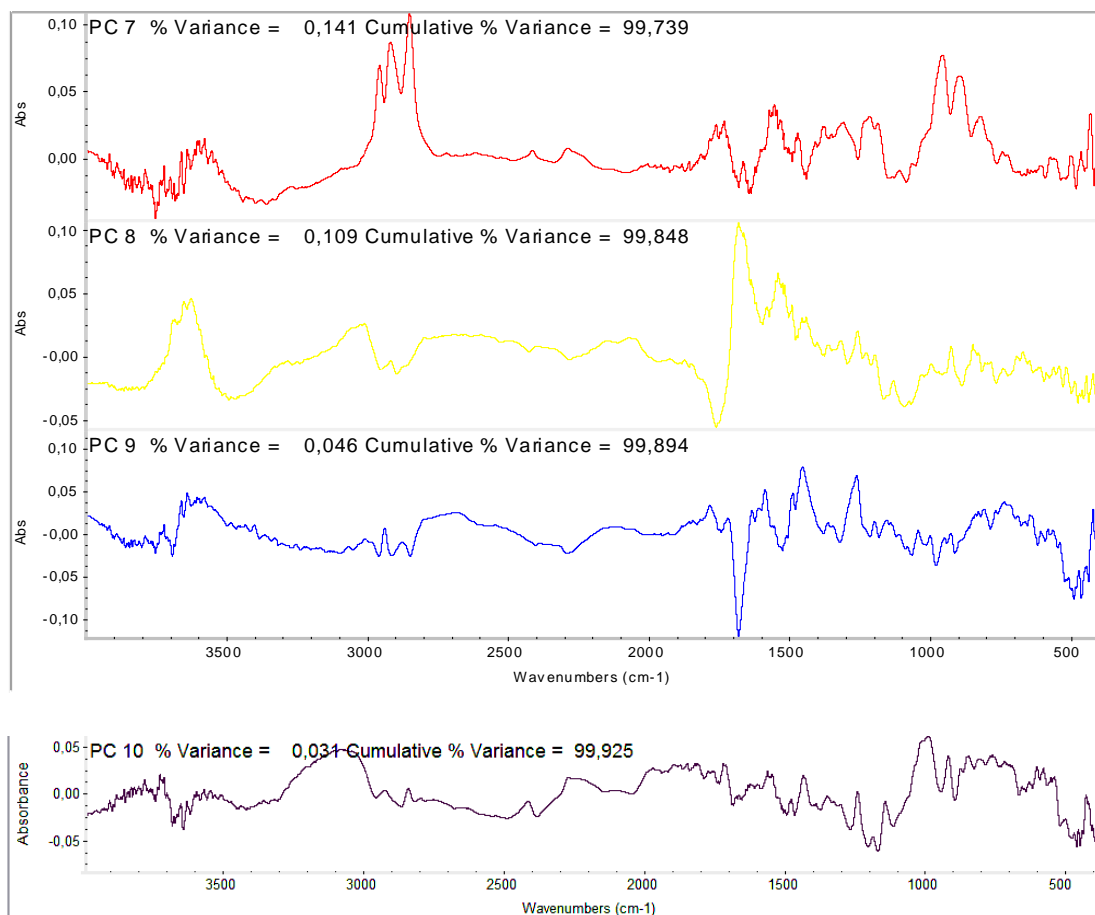
**Σχήμα 4.6:** Οι φασματικές περιοχές ( $3050-2805\text{ cm}^{-1}$ ) και ( $1700-800\text{ cm}^{-1}$ ) που επιλέχθηκαν σε ένα φάσμα FT-IR από μαύρο πιπέρι, για εφαρμογή του μοντέλου PLS.

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κύριων συνιστωσών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων κύριας συνιστώσας (**Principal Component Spectra**). Το φάσμα κύριας συνιστώσας δείχνει τον τρόπο με τον οποίο οι φασματικές πληροφορίες σε ένα σύνολο φασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την βαθμονόμηση της μεθόδου, αντιπροσωπεύονται από τις κύριες συνιστώσες και τι ποσοστό της φασματικής διακύμανσης, κάθε συνιστώσα περιγράφει.

Το φάσμα της κύριας συνιστώσας είναι το ορθογώνιο φάσμα (φάσμα που αποτελεί μια ανεξάρτητη πηγή διακύμανσης σε ένα σύνολο δεδομένων) που αντιπροσωπεύει το ποσοστό της μεταβλητότητας και περιγράφεται από μία συνιστώσα που μετράται σε ολόκληρο το φασματικό εύρος των προτύπων.

Στο σχήμα 4.7 δίνονται τα φάσματα για τις 10 κύριες συνιστώσες που βρέθηκαν στα δεδομένα του συγκεκριμένου μοντέλου PLS.



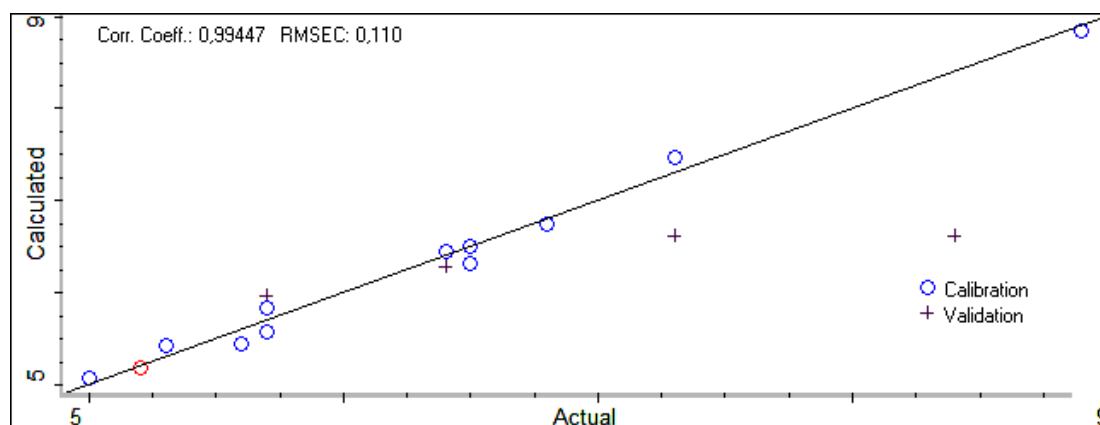


**Σχήμα 4.7:** Φάσματα κύριων συνιστωσών για την 1<sup>η</sup> μέθοδο

Οι πηγές της διακύμανσης στα φάσματα βαθμονόμησης παράγουν διακριτά χαρακτηριστικά στα φάσματα των κύριων συνιστωσών. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να εμφανίζονται σαν μια φασματική κορυφή ή σαν κορυφή παραγώγου. Ένα θορυβώδες ή ιδιαίτερον χαρακτηριστικών φάσμα κύριας συνιστώσας δείχνει ότι η αντίστοιχη (και κάθε επόμενη με ανάλογα χαρακτηριστικά) κύρια συνιστώσα συμβάλλει ελάχιστα στις πληροφορίες του μοντέλου βαθμονόμησης.

Οι περισσότερες πληροφορίες στα φάσματα των κύριων συνιστωσών που φαίνονται στο παραπάνω σχήμα αποδίδονται σε απορροφούσες ζώνες κοντά στα 3000-2800 cm<sup>-1</sup> και στα 1700-800 cm<sup>-1</sup>. Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κύρια συνιστώσα περιγράφει το 99,739% της συνολικής φασματικής μεταβολής (βλέπε "Cumulative Variance %" στον τίτλο του φάσματος 7). Τα φάσματα των κύριων συνιστωσών 8, 9 και 10 περιέχουν μια μικρή ποσότητα φασματικής πληροφορίας για τις φασματικές περιοχές κοντά στα 3000-2800 cm<sup>-1</sup> και 1700-800 cm<sup>-1</sup>.

Στο σχήμα 4.8 φαίνονται τα αποτελέσματα του μοντέλου βαθμονόμησης PLS που αναπτύχθηκε.



**Σχήμα 4.8 :** Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης πιπερίνης (%) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων του UV-Vis) στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης, με PLS.

Με (○) συμβολίζονται τα σημεία βαθμονόμησης και με (+) τα σημεία επικύρωσης μέσα στο σχήμα. Όσο πιο κοντά είναι στην καμπύλη οι μετρήσεις των δειγμάτων επικύρωσης (+), τόσο πιο ισότιμες είναι σε σχέση με αυτές από τη μέθοδο αναφοράς (UV-Vis).

**Πίνακας 4.5 :** Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στις περιοχές 3050- 2805  $\text{cm}^{-1}$  και 1700-800  $\text{cm}^{-1}$

Μαύρα πιπέρια	Συγκέντρωση πιπερίνης (%)	Προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS	Σφάλμα
B. 365	5,2	5,2	0
B. AB	6,5	6,3	-0,2
B. Anatoli ground	5	5,1	0,1
B. Anatoli peppercorns	5,7	5,6	-0,1
B. Appetito	5,3	5,4	0,1
B. Captain's	8,9	8,9	0
B. Carrefour	5,6	5,5	-0,1
B. Hlios	6,4	6,4	0
B. India	5,5	6	0,5
B. Kagia	6,8	6,8	0
B. McCormick	6,5	6,5	0
B. Saman	6,4	6,3	-0,1
B. Simantro	5,7	5,8	0,1
B. Sklavenitis	7,3	6,6	-0,7
B. Spar	7,3	7,5	0,2
B. Vietnam	8,4	6,6	-1,8

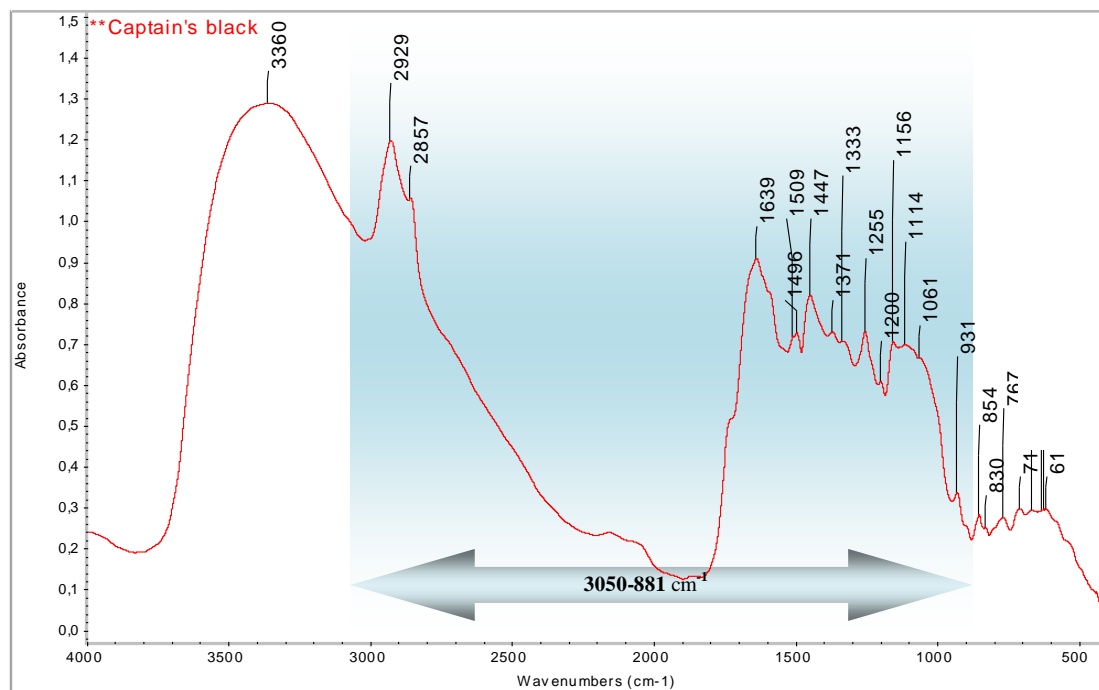
Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα οι τιμές των προβλεπόμενων συγκεντρώσεων πιπερίνης αποκλίνουν σε πολύ μικρό βαθμό από κείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα του UV-Vis (μηδενική απόκλιση στα "365", "McCormick", "Captain's" και "Kagia").

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι αυτό το μοντέλο φαίνεται να λειτουργεί αρκετά ικανοποιητικά για τις φασματικές περιοχές 3050-2805  $\text{cm}^{-1}$  και 1700-800  $\text{cm}^{-1}$  με αποτέλεσμα, να καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας της πιπερίνης σε δείγματα πιπεριού με μία υψηλή ποιότητα εκτίμησης.

## 2<sup>η</sup> Μέθοδος

Μία άλλη μέθοδος δοκιμάστηκε εισάγοντας στο λογισμικό τα 16 φάσματα των μαύρων πιπεριών επιλέγοντας τη φασματική περιοχή **3050-881  $\text{cm}^{-1}$**  (σχήμα 4.9). Το μοντέλο που προέκυψε είχε πολύ χαμηλό σφάλμα, **RMSEC = 0,165** και

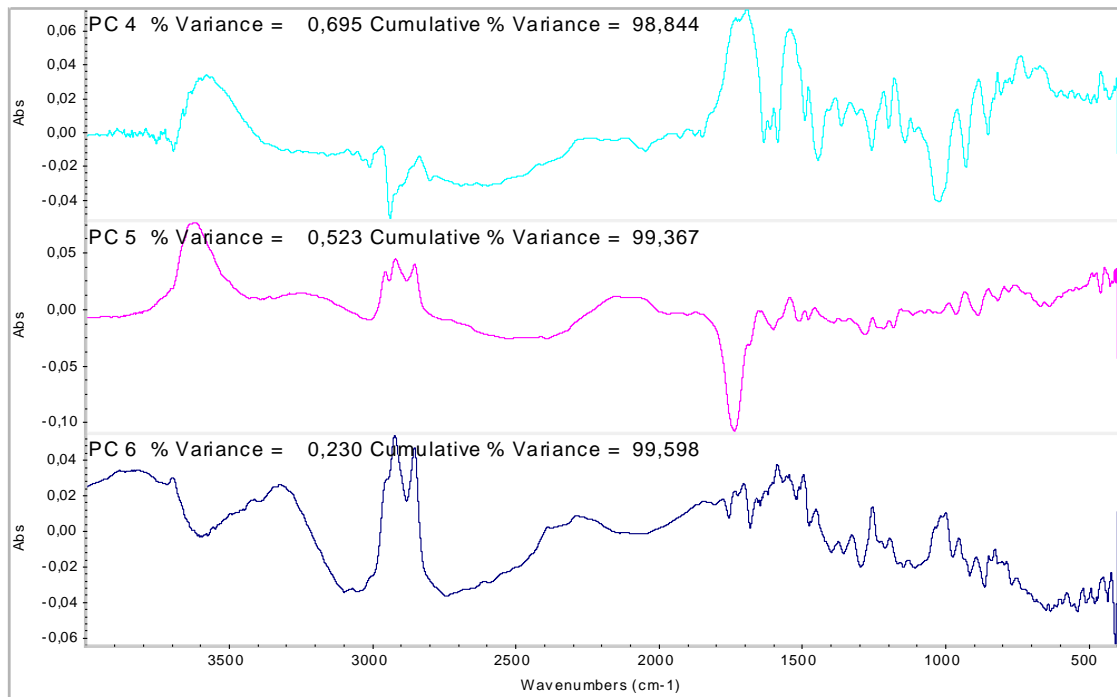
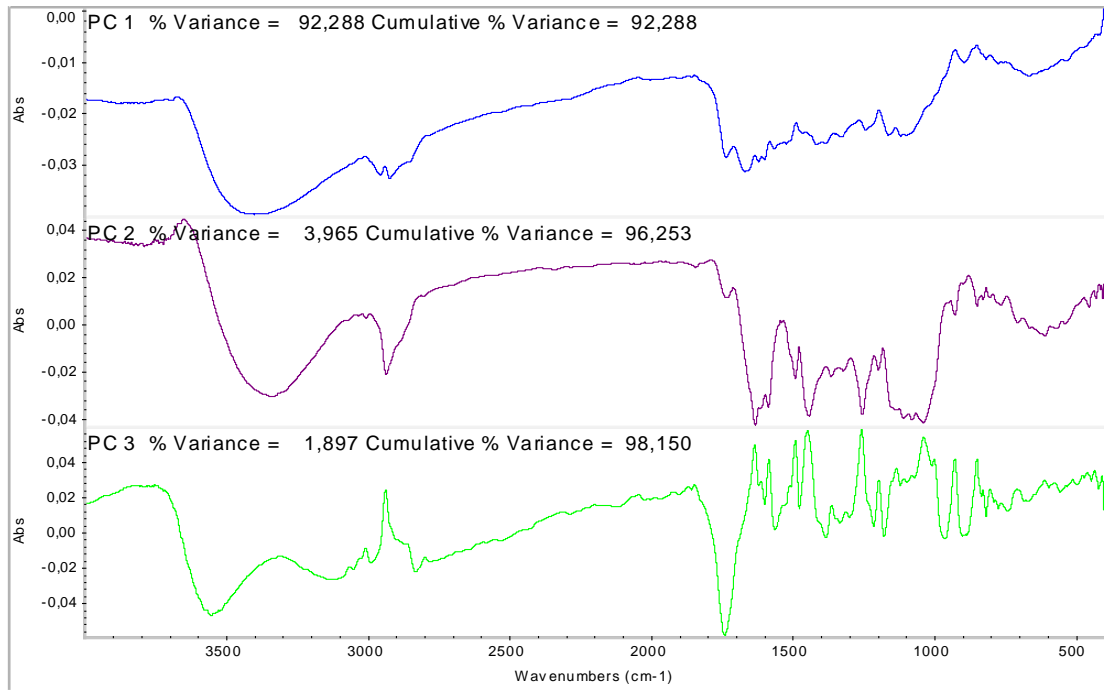
συντελεστή συσχέτισης  $R = 0.98$ . Χρησιμοποίησε από τα 16 φάσματα, τα 4 ως φάσματα επικύρωσης και ο βέλτιστος αριθμός των factors ήταν 7. Επίσης, δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers).

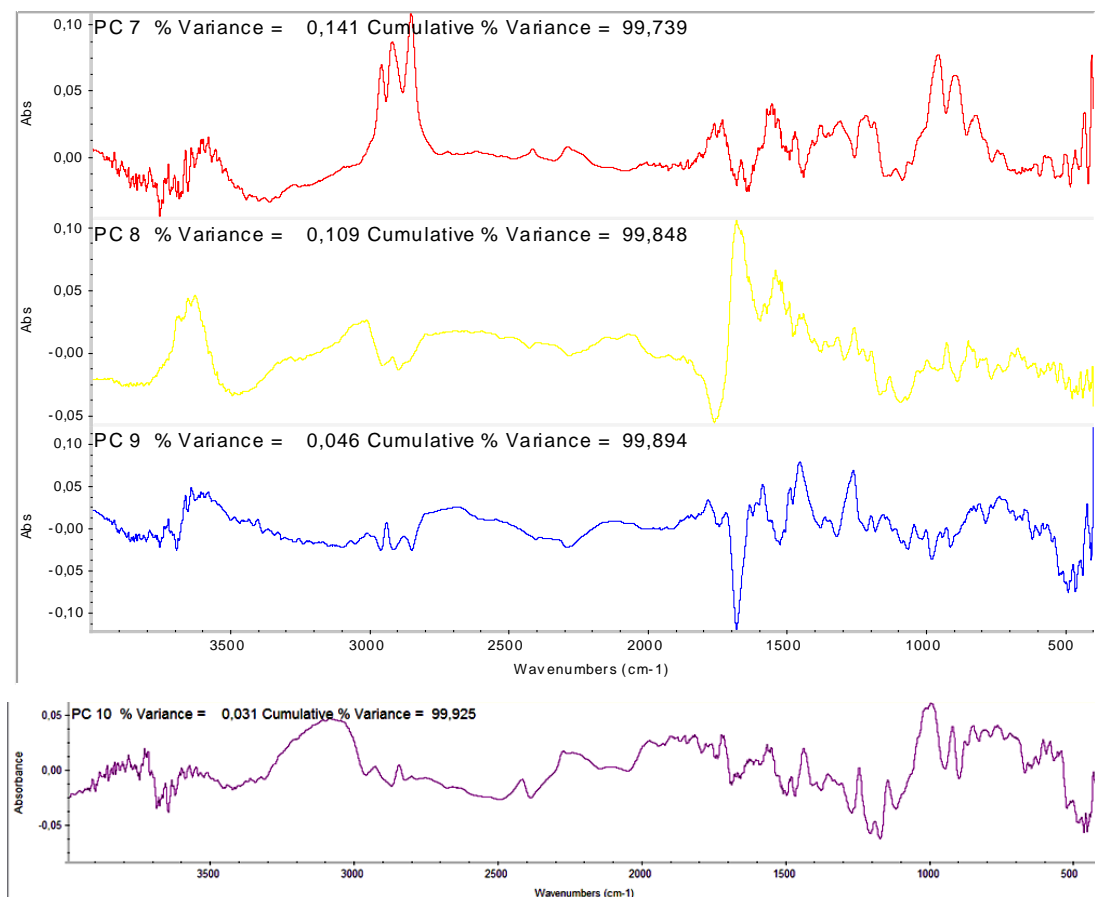


**Σχήμα 4.9:** Η φασματική περιοχή ( $3050-881 \text{ cm}^{-1}$ ) που επιλέχθηκε σε ένα φάσμα FT-IR από μαύρο πιπέρι, για εφαρμογή του μοντέλου PLS.

Στο σχήμα 4.10 δίνονται τα φάσματα για τις 10 κύριες συνιστώσες που βρέθηκαν στα δεδομένα του συγκεκριμένου μοντέλου PLS.



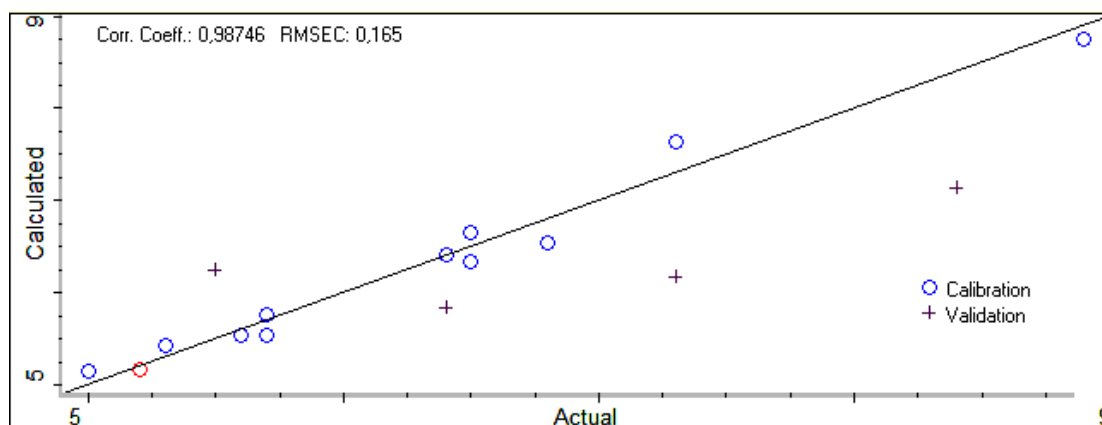




**Σχήμα 4.10:** Φάσματα κύριων συνιστωσών για την 2<sup>η</sup> μέθοδο

Όπως και στην πρώτη μέθοδο, οι περισσότερες πληροφορίες στα φάσματα των κύριων συνιστωσών αποδίδονται σε απορροφούσες ζώνες κοντά στα 3000-2800 cm<sup>-1</sup> και στα 1700-800 cm<sup>-1</sup>. Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κύρια συνιστώσα περιγράφει το 99,739% της συνολικής φασματικής μεταβολής (βλέπε "Cumulative Variance %" στον τίτλο του φάσματος 7). Τα φάσματα των κύριων συνιστωσών 8, 9 και 10 περιέχουν μια μικρή ποσότητα φασματικής πληροφορίας για τις φασματικές περιοχές κοντά στα 3000-2800 cm<sup>-1</sup> και 1700-800 cm<sup>-1</sup>.

Στο σχήμα 4.11 φαίνονται τα αποτελέσματα του μοντέλου βαθμονόμησης PLS που αναπτύχθηκε.



**Σχήμα 4.11** : Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης πιπερίνης (%) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων του UV-Vis) στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης, με PLS.

**Πίνακας 4.6** : Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 3050- 881  $\text{cm}^{-1}$

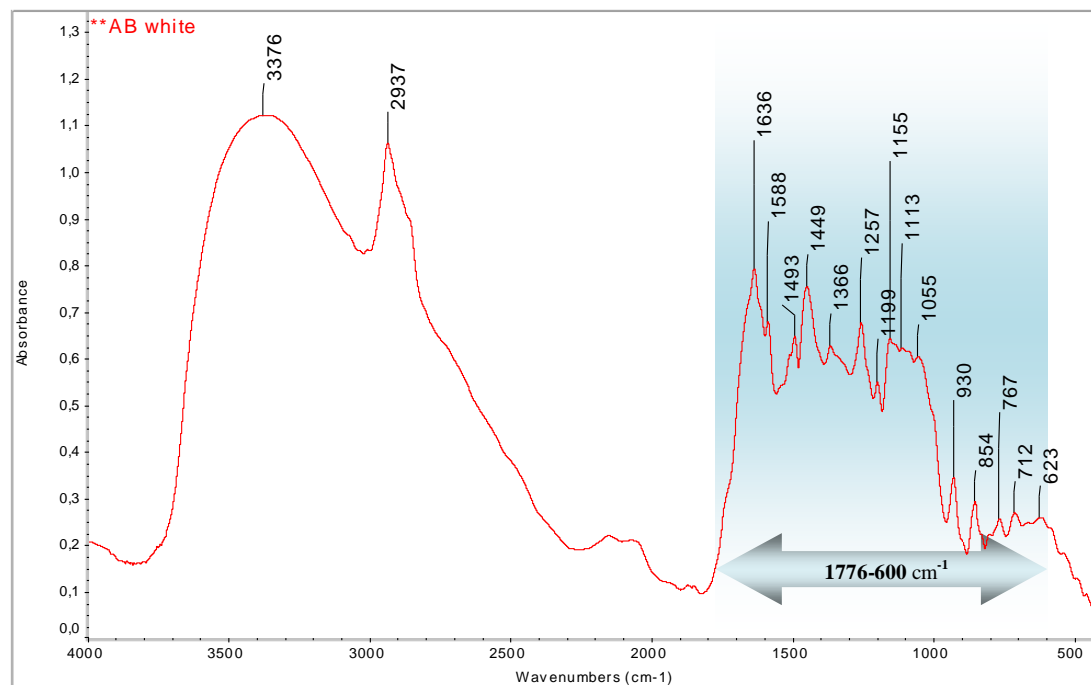
Μαύρα πιπέρια	Συγκέντρωση πιπερίνης (%)	Προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS	Σφάλμα
B. 365	5,2	5,2	0
B. AB	6,5	6,3	-0,2
B. Anatoli ground	5	5,1	0,1
B. Anatoli peppercorns	5,7	5,5	-0,2
B. Appetito	5,3	5,4	0,1
B. Captain's	8,9	8,8	-0,1
B. Carrefour	5,6	5,5	-0,1
B. Hlios	6,4	6,4	0
B. India	5,5	6,3	0,8
B. Kagia	6,7	6,5	-0,2
B. McCormick	6,9	6,7	0,2
B. Saman	6,4	5,8	-0,6
B. Simantro	5,7	5,8	0,1
B. Sklavenitis	7,3	6,2	-1,1
B. Spar	7,3	7,6	0,3
B. Vietnam	8,4	7,1	-1,3

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα οι τιμές των προβλεπόμενων συγκεντρώσεων πιπερίνης δεν αποκλίνουν πολύ από κείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα του UV-Vis (μηδενική απόκλιση στα "Hlios" και "365").

Επομένως και αυτό το μοντέλο φαίνεται να λειτουργεί ικανοποιητικά για τη φασματική περιοχή  $3050-881\text{ cm}^{-1}$ , ώστε με αυτή τη μέθοδο να καθίσταται, σε μεγάλο βαθμό, δυνατός ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας της πιπερίνης σε δείγματα πιπεριού.

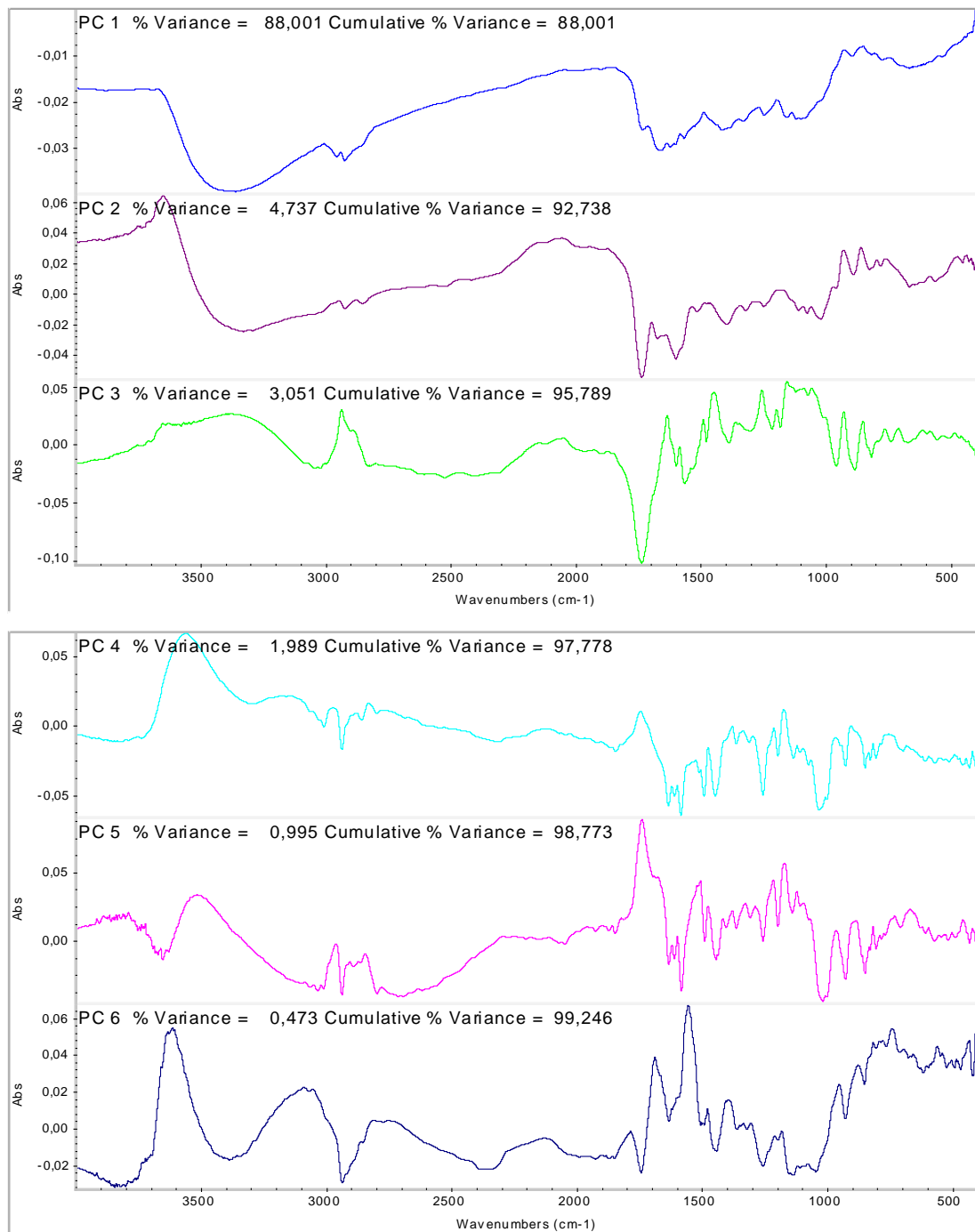
### 3<sup>η</sup> Μέθοδος

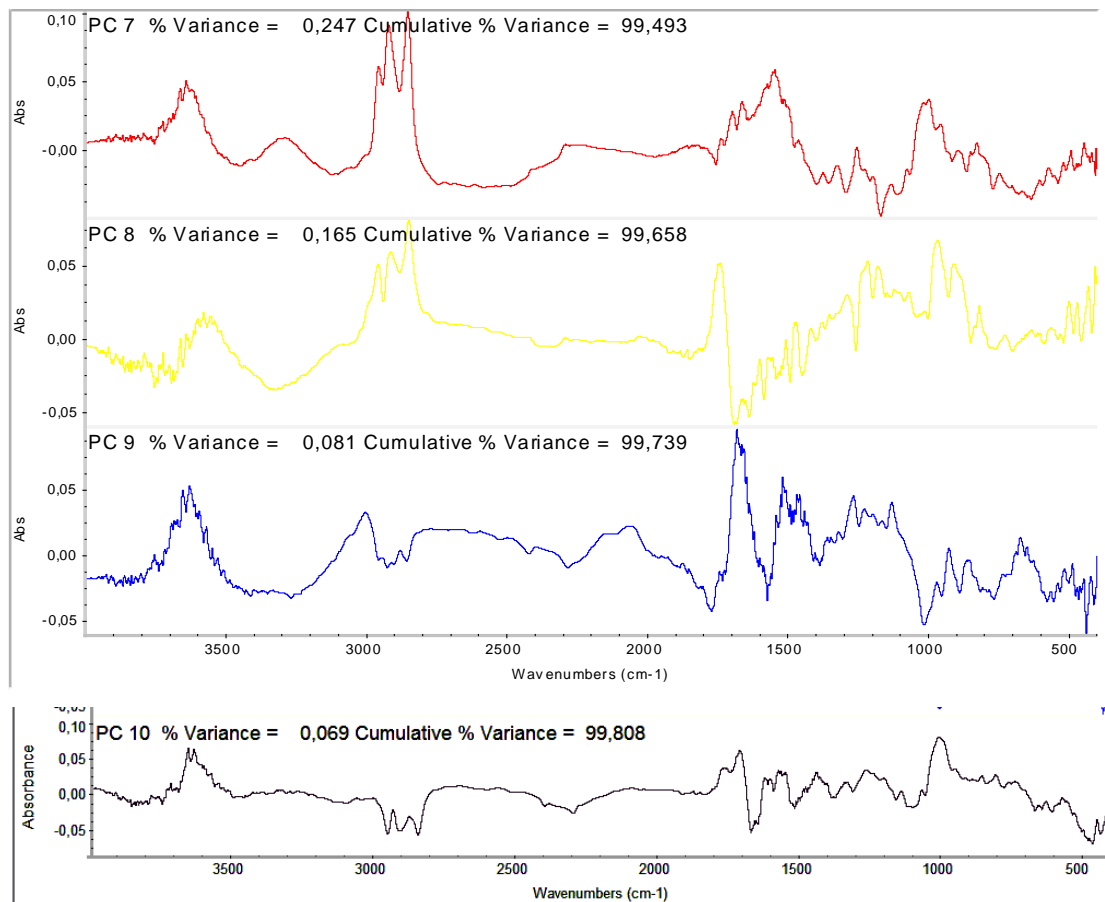
Τέλος, μία τρίτη μέθοδος δοκιμάστηκε εισάγοντας αυτή τη φορά 22 φάσματα (16 μαύρων και 6 λευκών πιπεριών) και επιλέχθηκε η φασματική περιοχή  **$1776-600\text{ cm}^{-1}$**  (σχήμα 4.12). Το μοντέλο που προέκυψε είχε χαμηλό σφάλμα, **RMSEC = 0,174** και συντελεστή συσχέτισης **R = 0.98**. Χρησιμοποίησε από τα 22 φάσματα, τα 5 ως φάσματα επικύρωσης και ο βέλτιστος αριθμός των factors ήταν και σε αυτή την περίπτωση **7**, καθώς δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers).



**Σχήμα 4.12:** Η φασματική περιοχή ( $1776-600\text{ cm}^{-1}$ ) που επιλέχθηκε σε ένα φάσμα FT-IR από λευκό πιπέρι, για εφαρμογή του μοντέλου PLS.

Στο σχήμα 4.13 δίνονται τα φάσματα για τις 10 κύριες συνιστώσες που βρέθηκαν στα δεδομένα του συγκεκριμένου μοντέλου PLS.

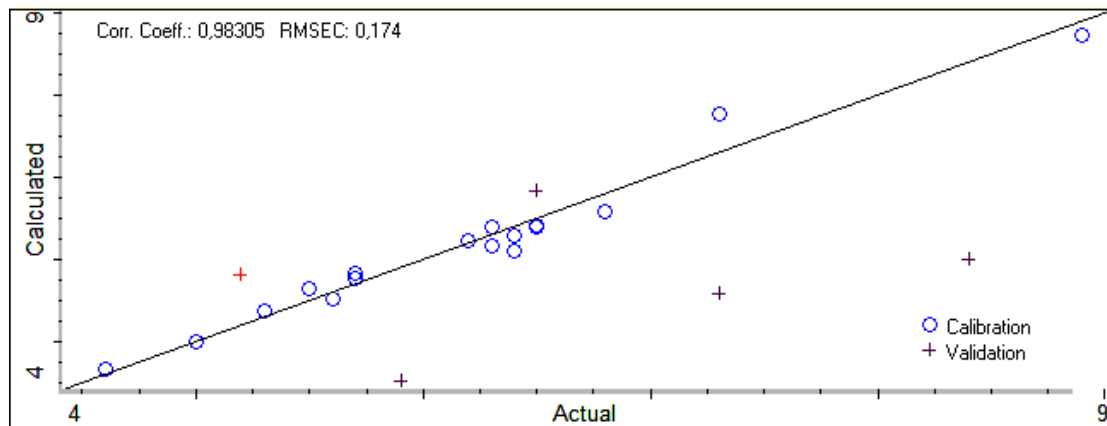




**Σχήμα 4.13:** Φάσματα κύριων συνιστωσών για την 3<sup>η</sup> μέθοδο

Παρομοίως με τις άλλες μεθόδους, οι περισσότερες πληροφορίες στα φάσματα των κύριων συνιστωσών αποδίδονται σε απορροφούσες ζώνες κοντά στα 3000-2800 cm<sup>-1</sup> και στα 1700-800 cm<sup>-1</sup>. Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κύρια συνιστώσα περιγράφει το 99,493% της συνολικής φασματικής μεταβολής (βλέπε "Cumulative Variance %" στον τίτλο του φάσματος 7). Τα φάσματα των κύριων συνιστωσών 8, 9 και 10 περιέχουν μια μικρή ποσότητα φασματικής πληροφορίας για τις φασματικές περιοχές κοντά στα 3000-2800 cm<sup>-1</sup> και 1700-800 cm<sup>-1</sup>.

Στο σχήμα 4.14 φαίνονται τα αποτελέσματα του μοντέλου βαθμονόμησης PLS που αναπτύχθηκε.



**Σχήμα 4.14** : Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης πιπερίνης (%) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων του UV-Vis) στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων βαθμονόμησης, με PLS.

**Πίνακας 4.7 :** Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 1776-600 cm<sup>-1</sup>

<b>Μαύρα πιπέρια &amp; Λευκά πιπέρια</b>	<b>Συγκέντρωση πιπερίνης (%)</b>	<b>Προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS</b>	<b>Σφάλμα</b>
B. 365	5,2	5,8	0,6
B. AB	6,5	6,4	-0,1
B. Anatoli peppercorn	5,7	5,9	0,2
B. Anatoli ground	5	5	0
B. Appetito	5,3	5,4	0,1
B. Captain's	8,9	8,7	-0,2
B. Carrefour	5,6	5,5	-0,1
B. Hlios	6,4	6,3	-0,1
B. India	5,5	5,6	0,1
B. Kagia	6,8	6,6	-0,2
B. McCormick	6,5	6,8	0,3
B. Saman	6,4	6,1	-0,3
B. Simantro	5,7	5,8	0,1
B. Sklavenitis	7,3	5,6	-1,7
B. Spar	7,7	7,7	0
B. Vietnam	8,4	6	-2,4
W. 365	6,3	6,2	-0,1
W. AB	6,3	6,5	0,2
W. Anatoli	6,5	6,4	-0,1
W. Indonesia	5,9	4,6	-1,3
W. Malaysia	4,6	4,7	0,1
W. Sklavenitis	6,2	6,2	0

Όπως δείχνει ο παραπάνω πίνακας σε αντίθεση με τις προηγούμενες δύο μεθόδους, οι τιμές των προβλεπόμενων συγκεντρώσεων πιπερίνης αποκλίνουν από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα UV-Vis (μηδενική απόκλιση στα "B. Anatoli ground", " B. Spar" και " W. Sklavenitis"), όχι όμως σε τέτοιο βαθμό που να καθίσταται αμφίβολου ένας αξιόπιστος υπολογισμός της συγκέντρωσης της πιπερίνης σε ένα μαύρο ή λευκό πιπέρι.

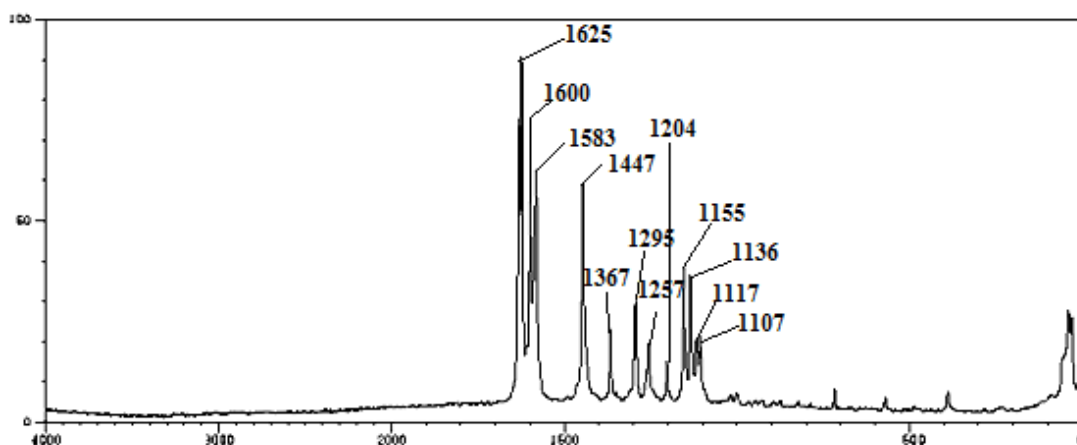


Εν τέλει, φαίνεται να λειτουργεί ικανοποιητικά για τη φασματική περιοχή 1776-600  $\text{cm}^{-1}$ , ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των μαύρων και των λευκών πιπεριών σε πιπερίνη.

Ανακεφαλαιώνοντας, αναπτύχθηκαν τρεις μέθοδοι χημειομετρίας με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της πιπερίνης στα μαύρα και τα λευκά πιπέρια. Στην πρώτη μέθοδο εισήχθηκαν 16 μαύρα πιπέρια και οι περιοχές που επιλέχθηκαν ήταν στα **3050-2805  $\text{cm}^{-1}$**  και **1700-800  $\text{cm}^{-1}$** . Αυτή η μέθοδος έδωσε το βέλτιστο αποτελέσματα με RMSEC = 0,110 και συντελεστή συσχέτισης R = 0.99. Στη δεύτερη μέθοδο εισήχθηκαν 16 μαύρα πιπέρια και η περιοχή που επιλέχτηκε ήταν στα **3050-882  $\text{cm}^{-1}$** . Το μοντέλο που προέκυψε είχε πολύ χαμηλό σφάλμα, RMSEC = 0,165 και συντελεστή συσχέτισης R = 0.98. Στην τρίτη μέθοδο εισήχθηκαν 22 πιπέρια (16 μαύρα και 6 λευκά) και η περιοχή που επιλέχτηκε ήταν στα **1776-600  $\text{cm}^{-1}$** . Αυτή η μέθοδος έδωσε χαμηλό σφάλμα, RMSEC = 0,174 και συντελεστή συσχέτισης R = 0.98. Πρέπει να σημειωθεί ότι και στις τρεις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 7 factors και δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers). Η προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS και στις τρεις μεθόδους δεν αποκλίνει πολύ από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα UV-Vis, πράγμα το οποίο δηλώνει ότι αυτά τα μοντέλα μπορούν να δώσουν μια καλή εκτίμηση της περιεκτικότητας ενός άγνωστου πιπεριού (*Piper nigrum*) σε πιπερίνη.

#### 4.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ RAMAN

Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων με την φασματοσκοπία Raman, παρατίθεται το φάσμα Raman καθαρής πιπερίνης (σχήμα 4.15) καθώς και ορισμένα φασματοσκοπικά δεδομένα (πίνακας 4.8). Έπειτα ακολουθούν τα φάσματα των δειγμάτων.



Σχήμα 4.15: Πλήρες φάσμα Raman της πιπερίνης (4000-200  $\text{cm}^{-1}$ )

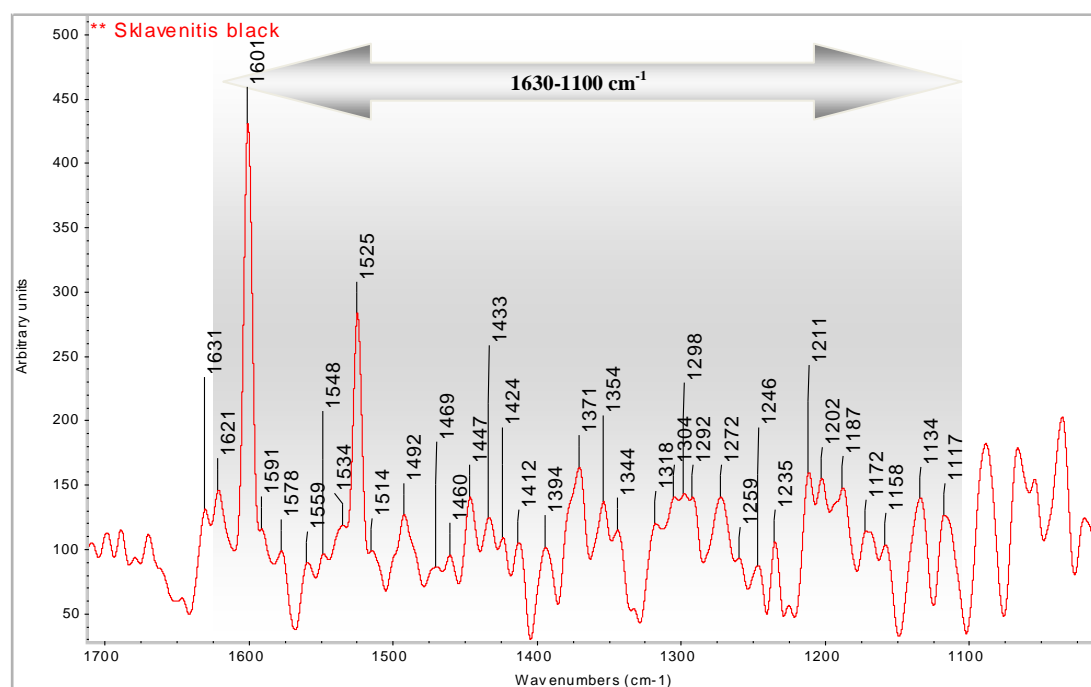
(<http://www.chemicalbook.com>)

Στο Raman φάσμα της πιπερίνης τα κύρια σήματα βρίσκονται στο εύρος των δακτυλικών αποτυπωμάτων μεταξύ 1630-1100  $\text{cm}^{-1}$ , όπως οι δονήσεις τάσεις που οφείλονται στα αρωματικά και αλειφατικά  $\text{-C=C-}$  και  $\text{>N-C=O}$  μεταξύ 1635-1583  $\text{cm}^{-1}$  και στα 1447  $\text{cm}^{-1}$  που συνδέονται μάλλον με δονήσεις κάμψης των  $\text{-CH}_2$ . Επίσης, μεταξύ των 1155 και 1117  $\text{cm}^{-1}$  υπάρχουν εντάσεις λόγω δονήσεων τάσης των  $\text{-C-O-C-}$ . Στην περιοχή 1100 και 1400  $\text{cm}^{-1}$  πιθανόν να υπάρχουν δονήσεις τάσης των  $\text{-C-C-}$  στα 1155  $\text{cm}^{-1}$  και δονήσεις στρέψης στα 1295  $\text{cm}^{-1}$  και αιώρησης στα 1257  $\text{cm}^{-1}$  των μορίων της πιπερίνης.

Πίνακας 4.8: Χαρακτηριστικές εντάσεις Raman καθαρής πιπερίνης (Schulz eta al., 2005)

Κυματριθμός $\text{cm}^{-1}$	Ομάδες	Είδος δόνησης
1635-1583	$\text{-C=C-}$ , $\text{>N-C=O}$	τάση
1155-1117	$\text{-C-O-C-}$	τάση
1155	$\text{-C-C-}$	τάση
1447-1295-1257	$\text{CH}_2$	κάμψη, στρέψη, αιώρηση

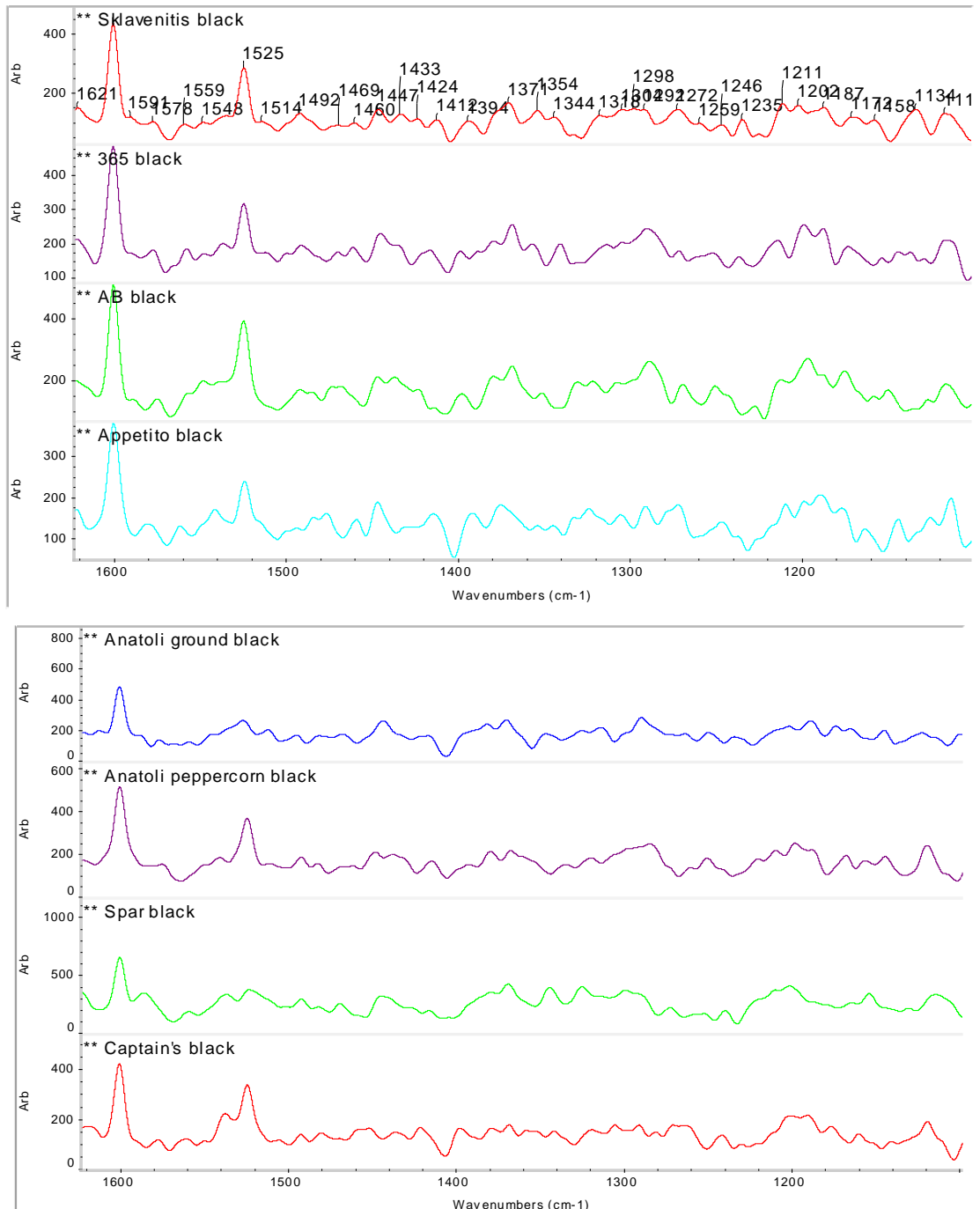
Τα φάσματα των πιπεριών που λήφθηκαν παρουσίασαν ισχυρό θόρυβο, με αποτέλεσμα αξιόλογες εντάσεις να καταγραφούν μόνο στην περιοχή  $1630-1100\text{ cm}^{-1}$ . Σ' αυτή την περιοχή πολλά από τα σήματα Raman που ανιχνεύτηκαν μπορούν να αποδοθούν στην περιεχόμενη πιπερίνη αλλά οι εντάσεις των σημάτων ήταν πολύ ασθενείς. Για παράδειγμα στην περιοχή  $1630-1578\text{ cm}^{-1}$  οι κορυφές στα  $1621$ ,  $1601\text{ cm}^{-1}$  και η μικρής έντασης  $1591\text{ cm}^{-1}$  οφείλονται σε δονήσεις τάσης των αρωματικών και αλειφατικών  $-C=C-$  και  $>N-C=O$ , ενώ στα  $1447\text{ cm}^{-1}$  σε δονήσεις κάμψης των  $\text{CH}_2$ . Επίσης, η μικρή κορυφή στα  $1158\text{ cm}^{-1}$  θα μπορούσε να αποδοθεί σε δονήσεις τάσης των  $-C-C-$ .

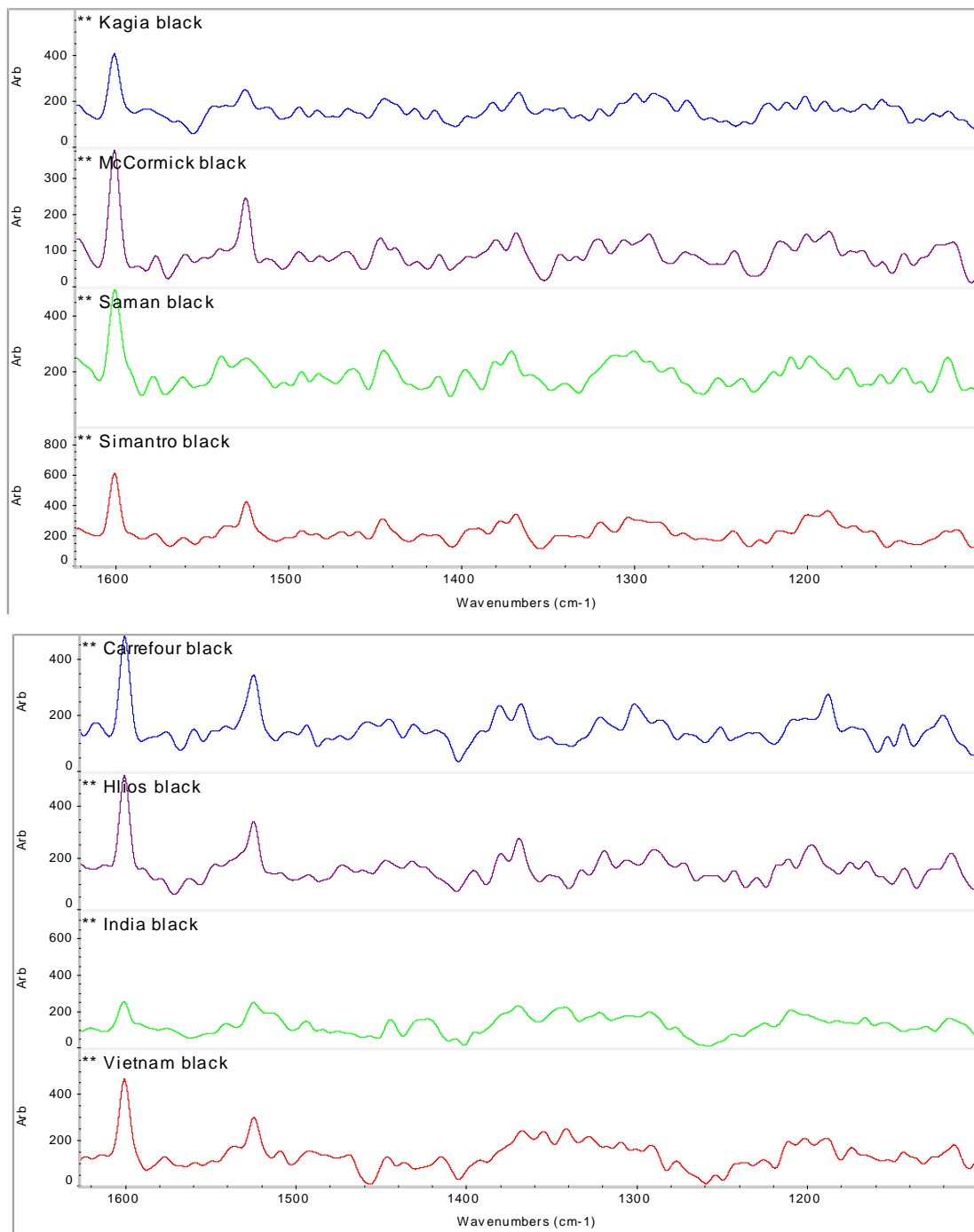


**Σχήμα 4.16:** Η περιοχή του φάσματος με τα κύρια σήματα πιπερίνης σε φάσμα Raman μαύρου πιπεριού

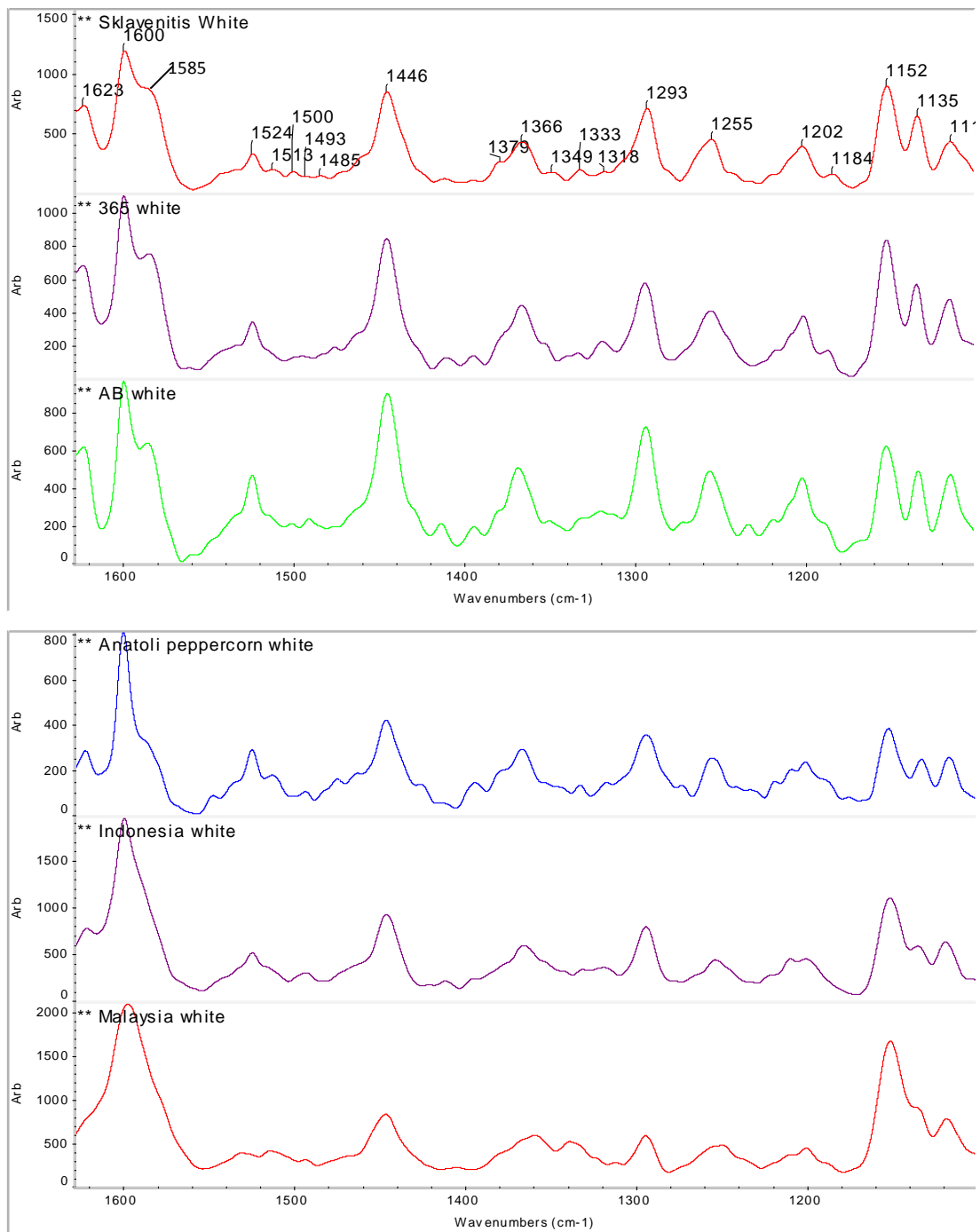
Παρατηρώντας τα φάσματα των μαύρων (σχήμα **4.16**) και των λευκών (σχήμα **4.17**) πιπεριών διαπιστώνεται ότι τα λευκά πιπέρια δίνουν πολύ καλύτερα φάσματα από τα μαύρα. Όπως αναφέρθηκε στη φασματοσκοπία IR, το περικάρπιο που υπάρχει στο μαύρο πιπέρι φαίνεται να επηρεάζει ακόμη περισσότερο την καταγραφή φάσματος Raman σε σχέση με το IR, καθώς κατά τη λειοτριβήση των δειγμάτων είναι δύσκολη η μηχανική καταστροφή του περικαρπίου λόγω της ύπαρξης των λιγνινών, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μεγάλα, ακανόνιστα τμήματα λειοτριβημένου

δείγματος που δίνουν φάσματα με έντονο θόρυβο. Η απουσία περικαρπίου από τα λευκά πιπέρια έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη πιο "καθαρών" φασμάτων και τον καλύτερο διαχωρισμό όλων των χαρακτηριστικών κορυφών που οφείλονται στην πιπερίνη.

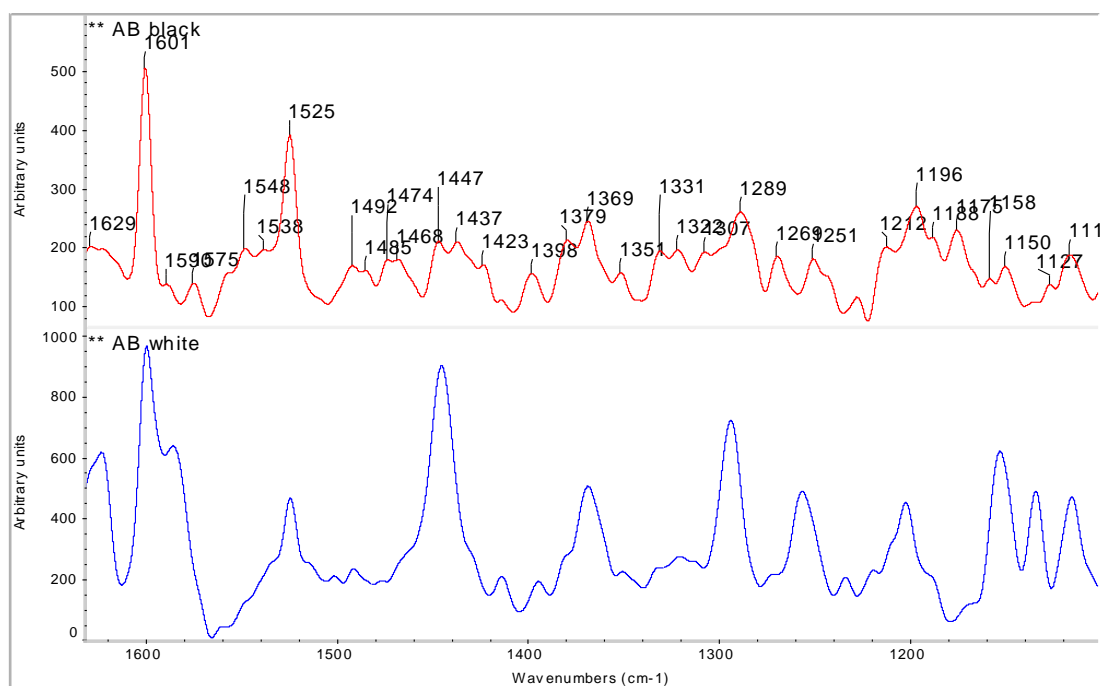




**Σχήμα 4.17:** Σύγκριση των φασμάτων Raman των μαύρων πιπεριών στην περιοχή  $1630-1100 \text{ cm}^{-1}$



**Σχήμα 4.18:** Σύγκριση των φασμάτων Raman των λευκών πιπεριών στην περιοχή 1630-1100 cm<sup>-1</sup>



**Σχήμα 4.19:** Σύγκριση των φασμάτων Raman μαύρου και λευκού πιπεριού "AB" στην περιοχή 1630-1100 cm<sup>-1</sup>

Ο έντονος θόρυβος που παρουσιάζουν τα φάσματα Raman ίσως να δικαιολογείται από τη χαμηλή ευαισθησία αυτής της τεχνικής σε σχέση με τις τεχνικές χρωματογραφίας και από το γεγονός ότι οι κορυφές των συστατικών που εξετάζονται μπορεί να συμπίπτουν με κορυφές άλλων συστατικών εξαιτίας των ισχυρών σημάτων φθορισμού που παράγουν (Baranska, Schulz, 2009).

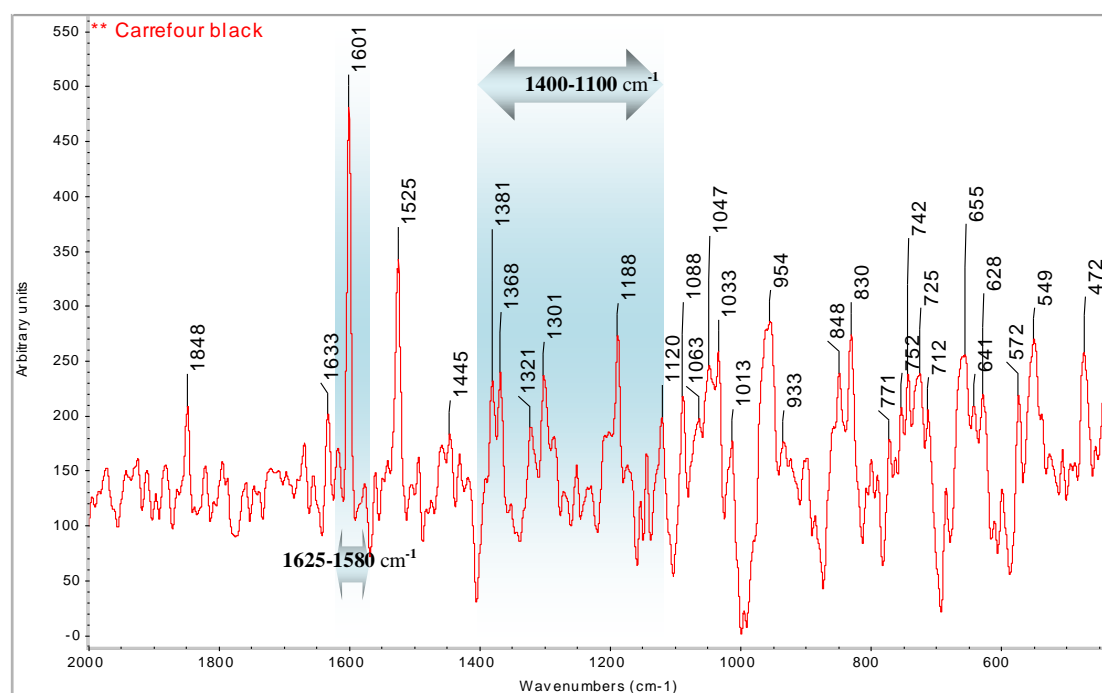
Συνοπτικά, η μελέτη των πιπεριών με φασματοσκοπία Raman έδωσε φάσματα που χαρακτηρίζονται από υψηλό θόρυβο. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μελέτη μιας περιοχής (1630-1100 cm<sup>-1</sup>) και όχι του πλήρους φάσματος. Τα φάσματα των μαύρων, αλλά ακόμη περισσότερο αυτών των λευκών πιπεριών (λόγω της απουσίας του περικαρπίου) παρουσιάζουν κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές που οφείλονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης ομάδων της πιπερίνης (1630-1578 cm<sup>-1</sup>, -C=C-, >N-C=O), (1447-1292-1259 cm<sup>-1</sup>, CH<sub>2</sub>), (1158 cm<sup>-1</sup>, -C-C-), (1158-1117 cm<sup>-1</sup>, -C-O-C-). Τέλος, ο υψηλός θόρυβος θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με τη χρήση οργάνου με μεγαλύτερες δυνατότητες ανάλυσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η χρήση FT-Raman πηγής ακτινοβολίας στα 1064 nm, ενδεχομένως να έδινε πιο σαφή αποτελέσματα (Schulz et al., 2005).

### 4.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με χημειομετρική ανάλυση στα φάσματα Raman

Όπως στη μελέτη των πιπεριών με φασματοσκοπία IR, έτσι και σε αυτή την περίπτωση το επόμενο βήμα ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός της πιπερίνης με χημειομετρική μέθοδο χρησιμοποιώντας τα «ειδικά» εργαλεία του λογισμικού TQ Analyst.

#### 1<sup>η</sup> Μέθοδος

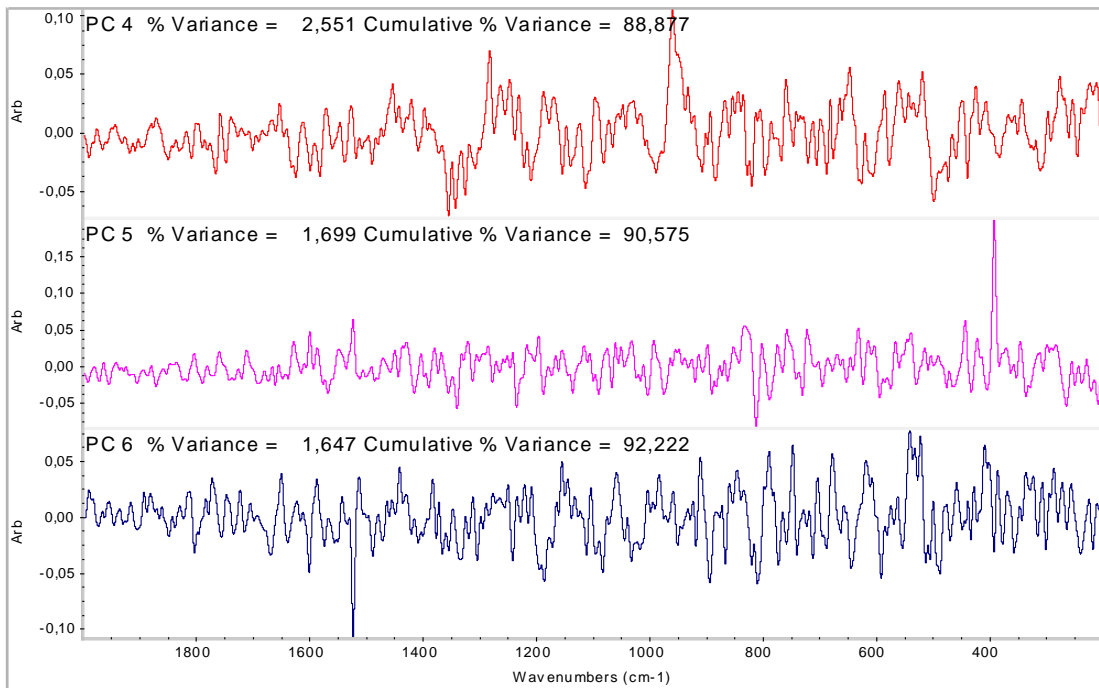
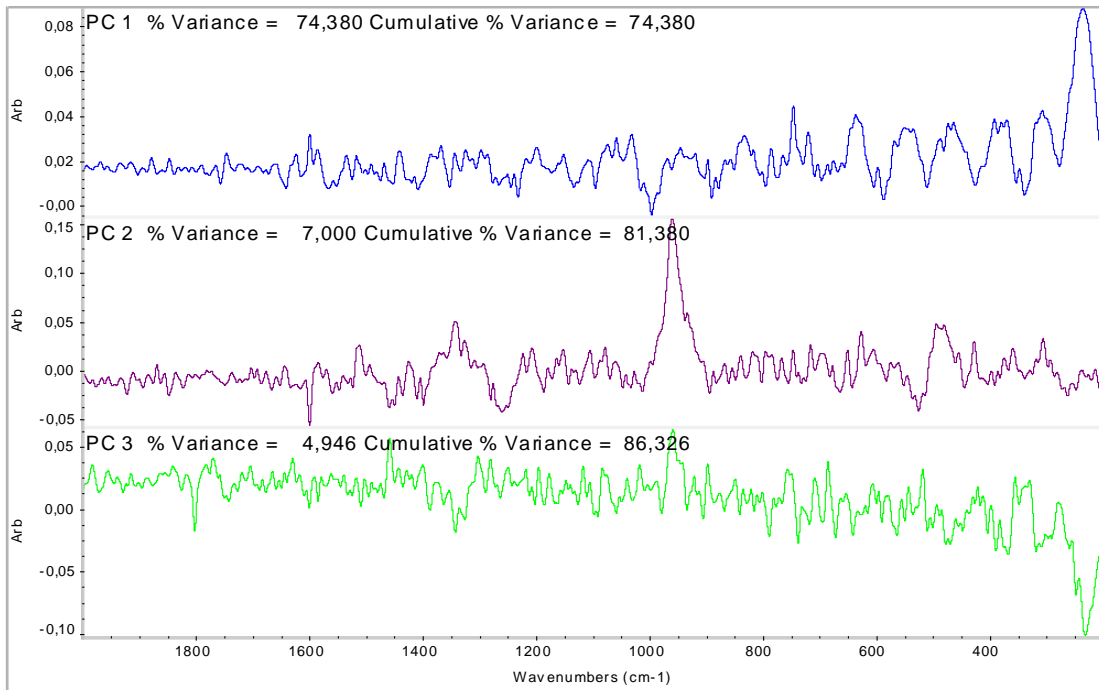
Στο λογισμικό εισήχθησαν τα 16 φάσματα των μαύρων πιπεριών επιλέγοντας δύο φασματικές περιοχές  $1625-1580\text{ cm}^{-1}$  και  $1400-1100\text{ cm}^{-1}$  (σχήμα 4.20). Το μοντέλο που προέκυψε είχε χαμηλό σφάλμα,  $\text{RMSEC} = 0,103$  και συντελεστή συσχέτισης  $R = 0,99$ . Χρησιμοποίησε από τα 16 φάσματα, τα 4 ως φάσματα επικύρωσης και ο βέλτιστος αριθμός των factors ήταν 4. Επίσης, δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers).

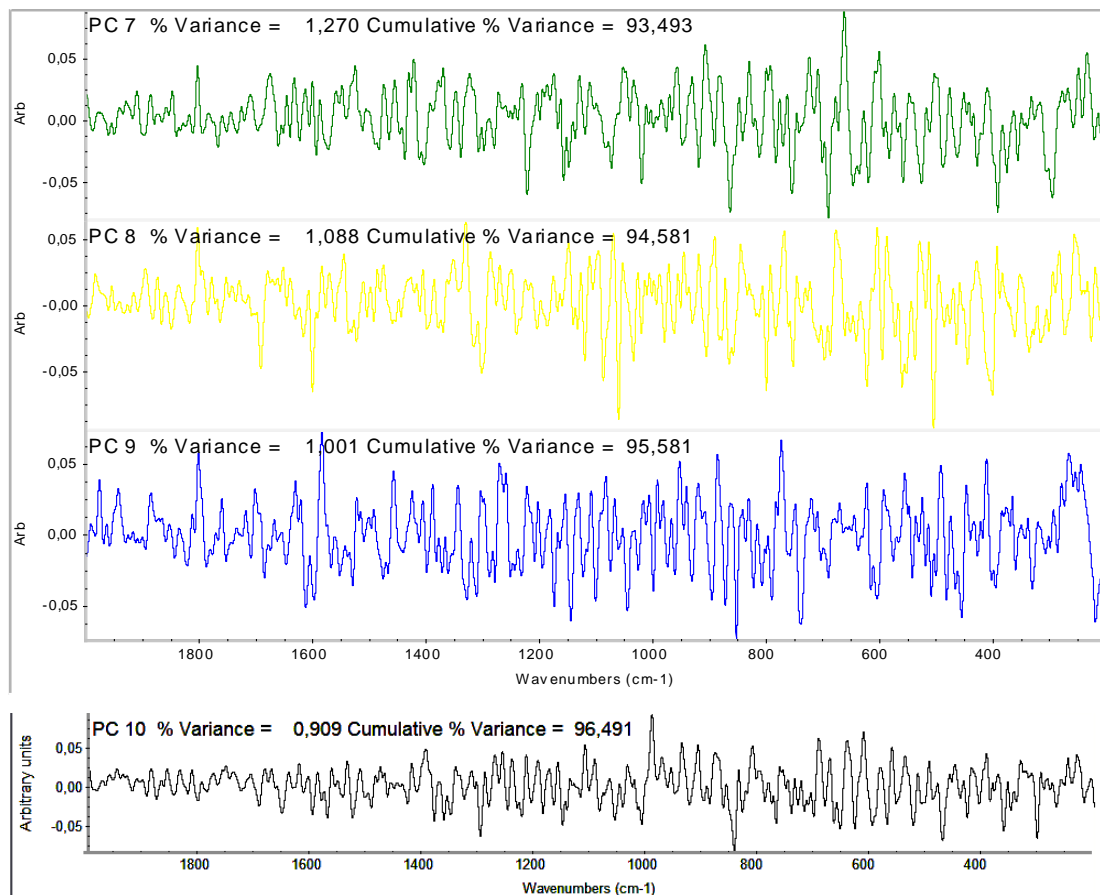


**Σχήμα 4.20:** Οι φασματικές περιοχές ( $1625-1580\text{ cm}^{-1}$ ) και ( $1400-1100\text{ cm}^{-1}$ ) που επιλέχθηκε σε ένα φάσμα Raman από μαύρο πιπέρι, για εφαρμογή του μοντέλου PLS.

Στο σχήμα 4.21 δίνονται τα φάσματα για τις 10 κύριες συνιστώσες που βρέθηκαν στα δεδομένα του συγκεκριμένου μοντέλου PLS.



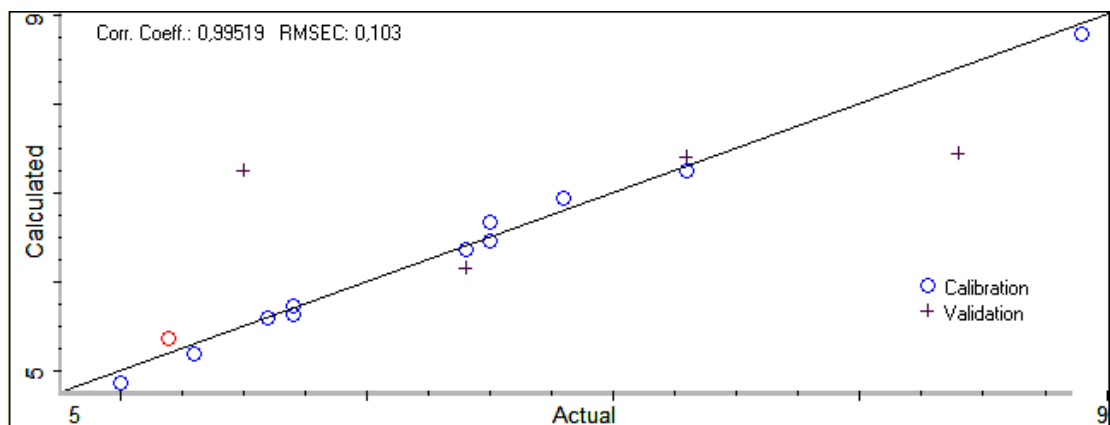




**Σχήμα 4.21:** Φάσματα κύριων συνιστωσών για την 1<sup>η</sup> μέθοδο

Τα φάσματα κύριας συνιστώσας αυτής της μεθόδου παρουσιάζουν έντονο θόρυβο και είναι δύσκολο να βρεθούν οι φασματικές περιοχές στις οποίες αποδίδονται οι περισσότερες πληροφορίες. Παρ' όλα αυτά, η απορροφούσα ζώνη κοντά στα  $1700-1100\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται να περιέχουν τις περισσότερες πληροφορίες. Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κύρια συνιστώσα περιγράφει το 88,877% της συνολικής φασματικής μεταβολής (βλέπε "Cumulative Variance %" στον τίτλο του φάσματος 4). Τα υπόλοιπα φάσματα των κύριων συνιστωσών χαρακτηρίζονται από ισχυρό θόρυβο και συμβάλλουν ελάχιστα στις πληροφορίες του μοντέλου βαθμονόμησης.

Στο σχήμα 4.22 φαίνονται τα αποτελέσματα του μοντέλου βαθμονόμησης PLS που αναπτύχθηκε.



**Σχήμα 4.22** : Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης πιπερίνης (%) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων του UV-Vis) στα φάσματα Raman των δειγμάτων βαθμονόμησης, με PLS.

**Πίνακας 4.9** : Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στις περιοχές  $1625-1580\text{ cm}^{-1}$  και  $1400-1100\text{ cm}^{-1}$

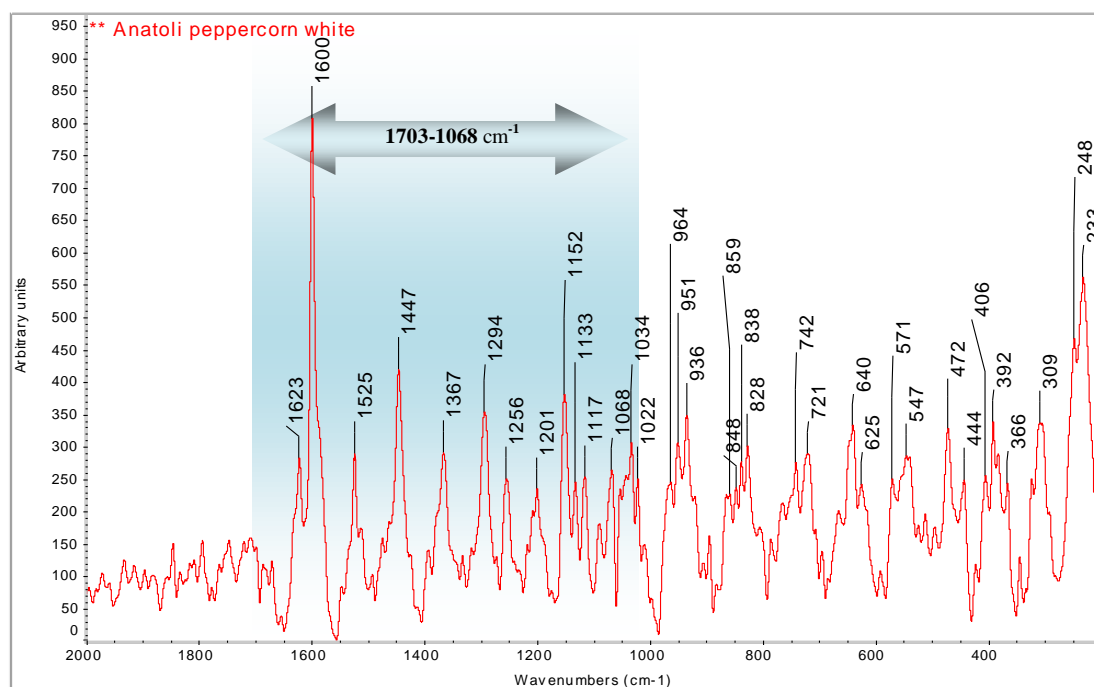
Μαύρα πιπέρια	Συγκέντρωση πιπερίνης (%)	Προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS	Σφάλμα
B. 365	5,2	5,4	0,2
B. AB	6,5	6,7	0,2
B. Appetito	5,3	5,2	-0,1
B. Captain's	8,9	8,8	-0,1
B. Carrefour	5,6	5,6	0
B. Hlios	6,4	6,4	0
B. India	5,5	7,3	1,8
B. Kagia	6,8	6,9	0,1
B. McCormick	6,5	6,5	0
B. Saman	6,4	6,2	0,2
B. Simantro	5,7	5,6	-0,1
B. Sklavenitis	7,3	7,4	0,1
B. Vietnam	8,4	7,4	-1
B. Anatoli ground	5	4,9	-0,1
B. Anatoli peppercorn	5,7	5,7	0
B. Spar	7,3	7,3	0

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα οι τιμές των προβλεπόμενων συγκεντρώσεων πιπερίνης αποκλίνουν ελάχιστα από κείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα του UV-Vis (μηδενική απόκλιση στα " B. Carrefour ", "B. Spar", "B. Anatoli peppercorn", "B. McCormick" και "B. Hlios").

Επομένως, αυτό το μοντέλο φαίνεται να λειτουργεί αρκετά ικανοποιητικά για τη φασματική περιοχή  $1700-1100\text{ cm}^{-1}$  με αποτέλεσμα, με αυτή τη μέθοδο να καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας της πιπερίνης σε δείγματα πιπεριού με μία υψηλή ποιότητα εκτίμησης.

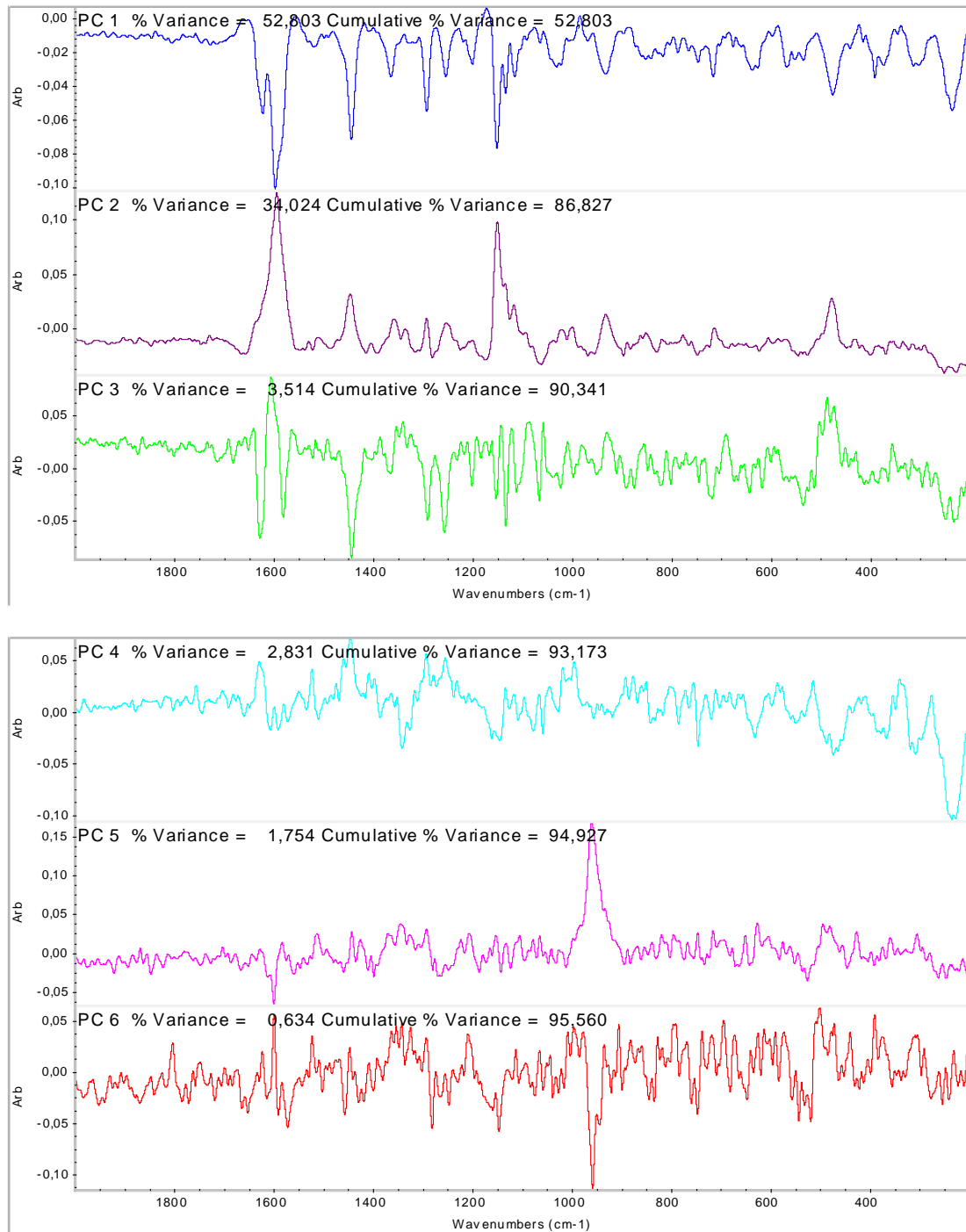
## 2<sup>η</sup> Μέθοδος

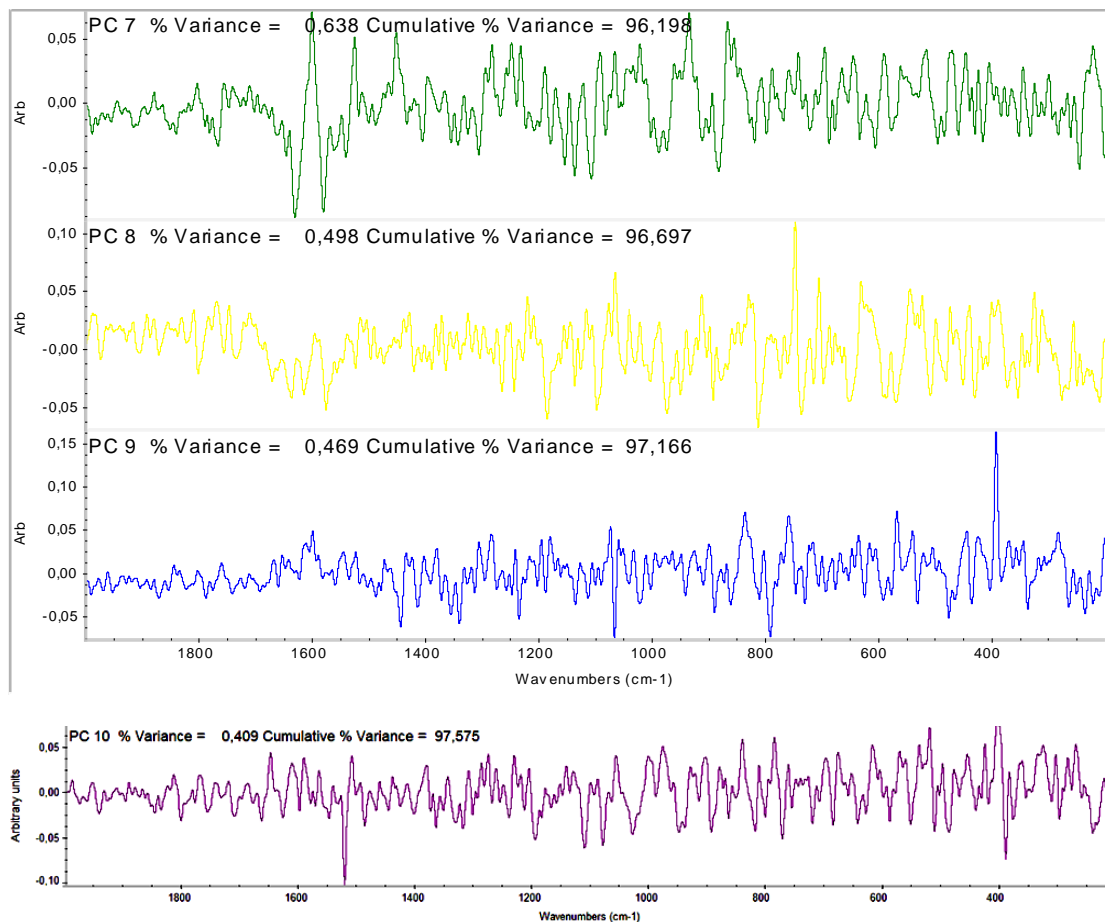
Μία δεύτερη μέθοδος δοκιμάστηκε εισάγοντας αυτή τη φορά 22 φάσματα (16 μαύρων και 6 λευκών πιπεριών) και επιλέχθηκε η φασματική περιοχή  $1703-1068\text{ cm}^{-1}$  (σχήμα 4.23). Το μοντέλο που προέκυψε είχε χαμηλό σφάλμα, **RMSEC = 0,101** και συντελεστή συσχέτισης **R = 0.99**. Χρησιμοποίησε από τα 22 φάσματα, τα 5 ως φάσματα επικύρωσης και ο βέλτιστος αριθμός των factors σε αυτή την περίπτωση ήταν **6**, καθώς δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers).



**Σχήμα 4.23:** Η φασματική περιοχή ( $1703-1068\text{ cm}^{-1}$ ) που επιλέχθηκε σε ένα φάσμα Raman από μαύρο πιπέρι, για εφαρμογή του μοντέλου PLS.

Στο σχήμα 4.24 δίνονται τα φάσματα για τις 10 κύριες συνιστώσες που βρέθηκαν στα δεδομένα του συγκεκριμένου μοντέλου PLS.

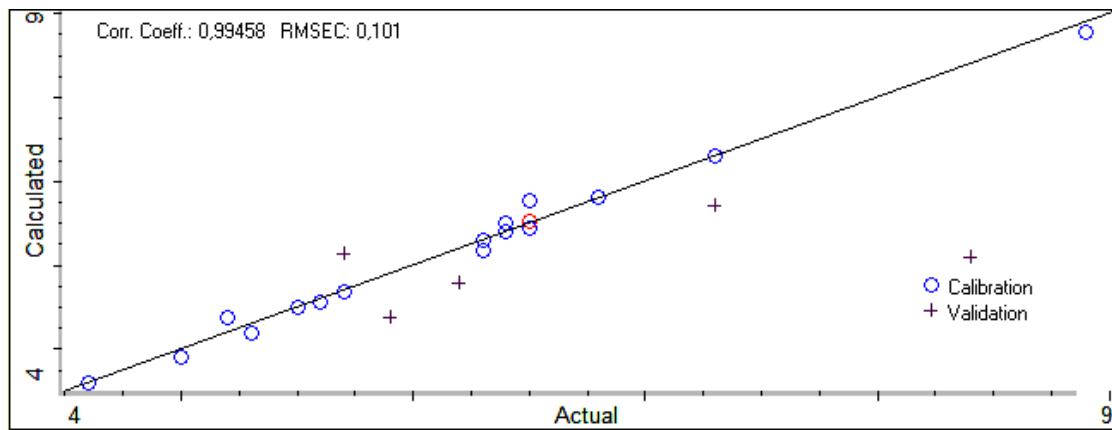




**Σχήμα 4.24:** Φάσματα κύριων συνιστωσών για την 2<sup>η</sup> μέθοδο

Τα φάσματα κύριας συνιστώσας αυτής της μεθόδου όπως και της προηγούμενης παρουσιάζουν έντονο θόρυβο με αποτέλεσμα ο εντοπισμός των φασματικών περιοχών στις οποίες αποδίδονται οι περισσότερες πληροφορίες να είναι δύσκολος. Ωστόσο, σε αυτά τα φάσματα κύριας συνιστώσας η απορροφούσα ζώνη κοντά στα  $1700\text{ cm}^{-1}$  και μέχρι τα  $1100\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται να περιέχει τις περισσότερες πληροφορίες. Τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν ότι η κύρια συνιστώσα περιγράφει το 95,560% της συνολικής φασματικής μεταβολής (βλέπε "Cumulative Variance %" στον τίτλο του φάσματος 6). Τα υπόλοιπα φάσματα των κύριων συνιστωσών χαρακτηρίζονται από ισχυρό θόρυβο και δε συμβάλλουν σημαντικά στις πληροφορίες του μοντέλου βαθμονόμησης.

Στο σχήμα 4.25 φαίνονται τα αποτελέσματα του μοντέλου βαθμονόμησης PLS που αναπτύχθηκε.



**Σχήμα 4.25** : Καμπύλη συσχέτισης προβλεπόμενης συγκέντρωσης πιπερίνης (%) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση (βάση των αποτελεσμάτων του UV-Vis) στα φάσματα Raman των δειγμάτων βαθμονόμησης, με PLS.

**Πίνακας 4.10** : Αποτελέσματα της PLS στα δείγματα των μαύρων πιπεριών στην περιοχή 1703-1608 cm<sup>-1</sup>

Μαύρα πιπέρια	Συγκέντρωση πιπερίνης (%)	Προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS	Σφάλμα
B. 365	5,2	5,4	0,1
B. AB	6,5	6,5	0
B. Appetito	5,3	5,2	-0,1
B. Captain's	8,9	8,8	-0,1
B. Carrefour	5,6	5,6	0
B. Hlios	6,4	6,5	0,1
B. India	5,5	5,5	0
B. kagia	6,8	6,8	0
B. McCormick	6,5	6,4	-0,1
B. Saman	6,4	6,4	0
B. Simantro	5,7	5,7	0
B. Sklavenitis	7,3	6,7	-0,6
B. Vietnam	8,4	6,1	-2,3
B. Anatoli ground	5	5	0
B. Anatoli peppercorn	5,7	6,1	0,4
B. Spar	7,3	7,3	0
W. 365	6,3	6,2	-0,1
W. AB	6,3	6,3	0
W. Anatoli	6,5	6,9	0,3
W. Indonesia	5,9	5,4	-0,5
W. Malaysia	4,6	4,6	0
W. Sklavenitis	6,2	5,8	-0,4

Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι σχεδόν οι μισές τιμές των προβλεπόμενων συγκεντρώσεων πιπερίνης δεν αποκλίνουν από κείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα του UV-Vis, ενώ οι υπόλοιπες αποκλίνουν ελάχιστα.

Αυτό το μοντέλο, εμφανίζει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα, για τη φασματική περιοχή 1703-1608 cm<sup>-1</sup>. Επομένως, με αυτή τη



μέθοδο καθίσταται με αρκετή ακρίβεια, δυνατός ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας της πιπερίνης σε δείγματα πιπεριού.

Συνοψίζοντας, αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι χημειομετρίας με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της πιπερίνης στα μαύρα και τα λευκά πιπέρια. Στην πρώτη μέθοδο εισήχθηκαν 16 μαύρα πιπέρια και οι περιοχές που επιλέχθηκαν ήταν στα **1625-1580  $\text{cm}^{-1}$**  και **1400-1100  $\text{cm}^{-1}$** . Αυτή η μέθοδος έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα με  $\text{RMSEC} = 0,103$  και συντελεστή συσχέτισης  $R = 0.99$ . Χρησιμοποιήθηκαν 4 factors και δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers). Στην δεύτερη μέθοδο εισήχθηκαν 22 πιπέρια (16 μαύρα και 6 λευκά) και η περιοχή που επιλέχθηκε ήταν στα **1703-1608  $\text{cm}^{-1}$** . Το αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου ήταν το με  $\text{RMSEC} = 0,101$  και συντελεστή συσχέτισης  $R = 0.99$ . Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 6 factors και εδώ επίσης δεν εντοπίστηκαν φάσματα με ακραίες τιμές (outliers). Η προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS και στις δύο μεθόδους αποκλίνει ελάχιστα από τα αποτελέσματα της μεθόδου κατά ISO 5564, ειδικότερα στη δεύτερη μέθοδο όπου η απόκλιση ήταν μηδενική σχεδόν στα μισά δείγματα, πράγμα το οποίο δηλώνει ότι αυτά τα μοντέλα μπορούν να δώσουν μια αξιόπιστη εκτίμηση της περιεκτικότητας δείγματος πιπεριού (*Piper nigrum*) σε πιπερίνη.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή τη διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη του σημαντικότερου συστατικού του καρπού του μαύρου πιπεριού (*Piper nigrum*), της πιπερίνης, δηλαδή της παραμέτρου που σχετίζεται άμεσα με την καυστικότητα του. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 18 πιπέρια (μαύρα και λευκά) που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά και 4 πιπέρια που στάλθηκαν από τη Σουηδία. Η εξέταση αφορούσε τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της πιπερίνης στα πιπέρια μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 5564 και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από τις φασματοσκοπικές τεχνικές IR και Raman σε συνδυασμό με χημειομετρικά μοντέλα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έρευνα των πιπεριών με φασματοσκοπία IR (DRIFT) και Raman, μελετώντας χαρακτηριστικές απορροφήσεις και εντάσεις που οφείλονται στην πιπερίνη.

Τα αποτελέσματα και των δύο τύπων προσδιορισμού (UV-Vis - IR και Raman) στο σύνολό τους χαρακτηρίζονται φυσιολογικά, χωρίς ιδιαίτερες αποκλίσεις από αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και τις εγχώριες και διεθνείς προδιαγραφές. Οι διαφορές οι οποίες παρατηρήθηκαν κρίνονται λογικές και δικαιολογούνται από τους ερευνητές.

Η υγρασία κυμαίνεται στα επίπεδα του 11%, με τα μαύρα πιπέρια να παρουσιάζουν σε γενικές γραμμές χαμηλότερη υγρασία από τα λευκά (μέση τιμή  $10,98 \pm 0,7\%$  έναντι  $11,03 \pm 0,4\%$ ), με κάποιες εξαιρέσεις στις οποίες συμβαίνει το αντίθετο.

Οι διαφορές στα ποσοστά πιπερίνης μεταξύ μαύρων και λευκών πιπεριών είναι μικρές αν και τα μαύρα πιπέρια δείχνουν να έχουν έστω και ελάχιστα περισσότερη πιπερίνη από τα λευκά ( $6,5 \pm 1,2\%$  έναντι  $6 \pm 0,7\%$ ). Ορισμένες ενώσεις όπως η πιπεριλίνη και η πιπεριτίνη, απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος με την πιπερίνη και ενδέχεται να οδηγούν σε μεγαλύτερες μετρήσεις από την πραγματική και επομένως σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα πιπερίνης.

Από τη μελέτη των πιπεριών με φασματοσκοπία IR και Raman, προέκυψαν ενδιαφέροντα φάσματα παρά τη μικρότερη ευαισθησία που παρουσιάζουν οι τεχνικές αυτές σε σχέση με τις χρωματογραφικές (HPLC).

Τα φάσματα των πιπεριών στο IR (DRIFTS) χαρακτηρίζονται «ομαλά» και παρουσιάζουν δύο περιοχές κορυφών στα  $3600-2800 \text{ cm}^{-1}$  και  $1700-800 \text{ cm}^{-1}$ . Στην

πρώτη περιοχή συμβαίνουν δονήσεις τάσης των O-H, αρωματικών και αλειφατικών C-H, ασύμμετρων και συμμετρικών CH<sub>2</sub>, με χαρακτηριστική την ευρεία και πλατιά κορυφή των O-H λόγω της υγρασίας. Στη δεύτερη περιοχή παρατηρούνται χαρακτηριστικές απορροφήσεις δονήσεων τάσης και κάμψης διάφορων ομάδων (συμμετρικών και ασύμμετρων C = C, -CO-N, αρωματικών C = C, CH<sub>2</sub>, = C-O-C, C-O, εντός και εκτός πεδίου φαινολικών C-H) που αποδίδονται στην πιπερίνη (1636, 1616, 1589, 1493, 1449, 1257, 1199, 1137, 930, 853, 830 και 804 cm<sup>-1</sup>).

Τα φάσματα Raman των μαύρων πιπεριών χαρακτηρίζονται από έντονο θόρυβο που οφείλεται στο περικάρπιο. Αντίθετα, τα φάσματα των λευκών πιπεριών, που στερούνται περικαρπίου, είναι πιο "καθαρά" και με καλύτερο διαχωρισμό των χαρακτηριστικών κορυφών που οφείλονται στην πιπερίνη. Η περιοχή στην οποία τα πιπέρια δίνουν χαρακτηριστικές εκπομπές είναι στα 1630-1100 cm<sup>-1</sup> που οφείλονται σε δονήσεις τάσης και την κάμψης ομάδων της πιπερίνης (αρωματικών και αλειφατικών -C=C-, >N-C=O, -CH<sub>2</sub>, -C-C- στα 1621, 1601, 1591, 1447 και 1158 cm<sup>-1</sup>). Η χρήση FT-Raman πηγής ακτινοβολίας στα 1064 nm πιθανόν να δίνει περισσότερες πληροφορίες στην ανάλυση των πιπεριών.

Αναπτύχθηκαν εναλλακτικές μέθοδοι προσδιορισμού της περιεκτικότητας της πιπερίνης με χημειομετρικές αναλύσεις στα φάσματα IR και Raman χρησιμοποιώντας το λογισμικό TQ Analyst. Με τη φασματοσκοπία IR αναπτύχθηκαν **τρεις μέθοδοι PLS**. Η πρώτη μέθοδος λειτουργεί σε δύο φασματικές περιοχές, 3050-2805 cm<sup>-1</sup> και 1700-800 cm<sup>-1</sup>. Η δεύτερη μέθοδος λειτουργεί σε μία φασματική περιοχή από τα 3050 έως τα 882 cm<sup>-1</sup> και η τρίτη μέθοδος επίσης σε μία φασματική περιοχή από τα 1776 έως τα 600 cm<sup>-1</sup>. Με τη φασματοσκοπία Raman αναπτύχθηκαν **δύο μέθοδοι PLS**. Η πρώτη μέθοδος λειτουργεί σε δύο φασματικές περιοχές, 1625-1580 cm<sup>-1</sup> και 1400-1100 cm<sup>-1</sup> και η δεύτερη μέθοδος λειτουργεί σε μία φασματική περιοχή από τα 1703 έως τα 1608 cm<sup>-1</sup>. Σε όλες τις μεθόδους που αναφέρθηκαν, η προβλεπόμενη συγκέντρωση πιπερίνης (%) με PLS δεν αποκλίνει πολύ από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί έχοντας ως αναφορά τα αποτελέσματα UV-Vis. Επιπλέον, οι δύο μέθοδοι με τα φάσματα Raman παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα από τις αντίστοιχες τρεις μεθόδους με τα φάσματα IR. Αυτό οφείλεται στο ότι στις δύο μεθόδους οι αποκλίσεις μεταξύ των προβλεπόμενων και των προσδιοριζόμενων με UV-Vis συγκεντρώσεων πιπερίνης (%) ήταν πολύ μικρότερες. Καταλήγοντας, όλα τα παραπάνω μοντέλα, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της μεθόδου κατά ISO

5564, καταφέρνουν να δώσουν μια ικανοποιητική εκτίμηση της περιεκτικότητας ενός δείγματος άγνωστου πιπεριού (*Piper nigrum*), με μια απόκλιση από 0 έως 2,4% σε πιπερίνη.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι δύο τεχνικές φασματοσκοπίας IR (DRIFT) και Raman θα μπορούσαμε να πούμε ότι έχουν τη δυνατότητα να αντικαταστήσουν τα ισχύοντα πρότυπα των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται σήμερα (UV-Vis και HPLC) για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας της πιπερίνης σε μαύρα και λευκά πιπέρια. Επίσης, οι τεχνικές αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα γρήγορο και καινοτόμο τρόπο ελέγχου της ποιότητας του πιπεριού, καθώς πρόκειται για τεχνικές πολλά υποσχόμενες, οικονομικές και γρήγορης ανάλυσης. Τέλος, θα ήταν δυνατόν να γίνει διαχωρισμός των πιπεριών σε κατηγορίες ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε πιπερίνη αλλά και σε αιθέριο έλαιο.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### *Ελληνική Βιβλιογραφία*

Ιγνατιάδου-Ραγκούση Β. (2009). Χημεία Φυσικών Προϊόντων. Εκδόσεις Συμμετρία, σελ. 233.

**Σιδερούδη Θεοχαρία** (2006). Φασματοσκοπική Μελέτη Οφθαλμικών Παθήσεων και Ανίχνευση Μορίων Φαρμάκων. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

**Παππός Χρήστος** (2013). Αυτοματοποιημένες Μέθοδοι Ανάλυση Φυσικών Προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Παπαϊωάννου Ανδρέας Λ.** (2011). Σύγκριση των συστατικών του αρώματος μαύρου και άσπρου πιπεριού (*Piper Nigrum* L.). Αξιολόγηση προϊόντων της ελληνικής αγοράς. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Σάλτας Δημήτριος Κ.** (2012). Προσδιορισμός του Ροσμαρινικού Οξέος σε Βότανα με την Εφαρμογή της Υγρής Χρωματογραφίας, της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου και της Χημειομετρίας. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**Ταραντίλης Πέτρος** (2013). Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός φυσικών προϊόντων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

### *Διεθνής Βιβλιογραφία*

#### A

**Abbasi, B.H., Ahmad, N., Fazal, H. and Mahmood, T.** (2010). Conventional and modern propagation techniques in *Piper nigrum*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(1), pp. 7-12.

Aggarwal, B.B. and Kunnumakkara, A.B. (2009). Molecular targets and therapeutic uses of spices. Modern uses for ancient medicine. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, pp. 2.

**Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B.H., Farooq, S., Ali, M. and Ali, Khan M.K.** (2012). Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S1945-S1953.

**Ahmad, N., Fazal, H., Ayaz, M., Mohammad, I. and Fazal, L.** (2011). Dengue fever treatment with *Carica papaya* leaves extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 330-333.

**Alupului, A., Calinescu, J. and Lavric, V. (2009).** Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active Principles from medical plants. *AIDIC Conference Series*, 09, 1-8.

**Appiah, I., Milovanovic, S., Radojicic, A., Nikolic-Kokic, A., Orescanin-Dusic, Z., Slavic, M., Trbojevic, S., Skrbic, R., Spasic, M.B. and Blagojevic, D. (2009).** Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. *Br. J. Pharmacol.*, 158: 1932-1941.

Atti-Santos, A.C., Rossato, M., Serafini, L.A., Cassel, E. AND Moyna P. (2005). Extraction of essential oils of lime (*Citrus latifolia Tanaka*) by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 48 no 1, 155-160.

**Attokaran, M. (2011).** Natural food flavors and colorants. *Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists*, pp. 89.

## **B**

**Bandyopadhyay, C., Narayan, V.S. and Variyar, P.S. (1990).** Phenolics of green pepper berries (*Piper nigrum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(8), 1696–1699.

**Baranska, M. and Schulz, H. (2009).** Chapter 4. Determination of Alkaloids through Infrared and Raman Spectroscopy. *The Alkaloids, Elsevier*, Volume 67.

**Bhardwaj, R.K., Glaeser, H., Becquemont, L., Klotz, U., Gupta, S.K. and Fromm, M.F. (2007).** Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 302: 645–650.

**Bhat, S.R., Chandel, K.P.S and Malik, S.K. (1995).** Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. *Plant Cell Rep.*, 14: 398-402.

**Bu, D. (2007).** Chemometric analysis for spectroscopy. *Advantage Business Media*.

## **C**

**Carol, W.** Infrared Analysis of Piperine in Black Pepper. Collection of Laboratory Activities, Developed through the National Science Foundation-funded Chemical Technology Education Collaborative (ChemTEC), Athens Technical College, Athens, GA.

**Catchpole, O.J., Grey, J.B., Perry, N.B., Burgess, E.J., Redmond, W.A. and Porter, N.G. (2003).** Extraction of chili, black pepper, and ginger with near-critical CO<sub>2</sub>, propane, and dimethyl ether: Analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4853-4860.

**Chaveerach, A., Mokkal, P., Sudmoon, R., and Tanee, T. (2006).** Ethnobotany of the genus Piper (Piperaceae) in Thailand. *Ethnobotany Research & Applications*, **4:223-231**.

**Chauhan, R., Dwivedi, J. and Siddiqui, A.A. (2008).** Chemical standardization and quantification of piperine from methanolic extract of *Piper Nigrum* by HPLC method on the basis of isolated markers. *Int. J. Chem. Sci.:* 6(4), 1726-1733.

**Chemat, F. and Cravotto, G. (2013).** Microwave-assisted extraction for bioactive 15 compounds: Theory and practice. Food Engineering Series 4, *Springer Science and Business Media*, New York, pp. 15.

**Chen, W., Dou, H., Ge, C. et al., (2011).** Comparison of volatile compounds in pepper (*P. Nigrum* L.) by simultaneous distillation extraction (SDE) and GC-MS. *Adv Mater Res*, 236: 2643–2646.

**Chonpathompikunlert, P., Wattanathorn, J., and Muchimapura, S. (2010).** Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 798-802.

**Chun, H., Shin, D.H., Hong, B.S., Cho, W.D., Cho, H.Y. and Yang, H.C. (2002).** Biochemical properties of polysaccharides from black pepper. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(9), 1203–1208.

## D

**Dang, Q.T. and Phan, N.N. (2014).** Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oleoresin from black pepper (*Piper nigrum* L.) and antioxidant capacity of the oleoresin. *International Food Research Journal* 21(4): 1489-1493.

**Deepthi, S.P., Junis, V., Shibin, P., Senthil, S. and Rajesh, R.S. (2012).** Isolation, identification and antimycobacterial evaluation of piperine from *Piper longum*. *Der Pharmacia Letter*, 863-868.

**Djilani, A., Legseir, B., Soulimani, R., Dickob, A. and Younos, C. (2006).** New extraction technique for alkaloids. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 17, No. 3, 518-520.

**Dongre, P.P., Kannur, D.M., Kosambiya, V. and Desai, M. (2011).** Significant role of Hydrotropes in extraction of phytoconstituents-A review. *International Journal Pharma Sciences and Research*, 2(4):730-734.

**Duangjai**, A., Ingkaninan, K., Praputbut, S. and Limpeanchob, N. (2012). Black pepper and piperine reduce cholesterol uptake and enhance translocation of cholesterol transporter proteins. *Journal of Natural Medicines* 67(2): 303-310.

## E

**El-Hamss**, R., Idaomar, M., Alonso-Moraga, A. and Munoz-Serra, A. (2003). Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food Chem. Toxicol.* 41: 41-47.

## F

**Friedman**, M., Levin, C.E., Lee, S.U., Lee, J.S., Kameyama, M.O. and Kozukue, N. (2008). Analysis by HPLC and LC/MS of pungent piperamides in commercial black, white, green, and red whole and ground peppercorns. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3028–3036.

## G

**Gawas**, S. and Grampurohit, N. D. (1999). HPTLC Analysis of some ayurvedic formulations containing vasaka and pepper. *Indian Drugs*, 36(3), 175-180.

**Grosso**, C., Cardoso, M.T.C., Figueiredo, A.T., Moldão-Martins, M., Burillo, J., Urieta, J.S., Barroso, J.G., Coelho, J.A. and Palavra, A.M. (2007). Supercritical fluid extraction, hydrodistillation and soxhlet extraction of the aerial part of winter savory. Comparative evaluation of the extraction method on the chemical composition. *Congress of Chemical Engineering (ECCE-6) Copenhagen*, 16-20.

## H

**Hamrapurkar**, P.D., Jadhav, K. and Zine S.M. (2011). Quantitative estimation of piperine in *Piper nigrum* and *Piper longum* using high performance thin layer chromatography. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(03): 117-120.

**Handa**, S.S, Khanuja, S.P.S, Longo, G. and Rakes, D.D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology*, pp. 22-26.

**Hema**, M., Kumar, R. and Singh, N.P. (2007). Volatile price and declining profitability of black pepper in India: Disquieting future. *Agricultural Economics Research Review* Vol. 20, pp 61-76.

**Howard**, R.A. (1973). Notes on the Piperaceae of Lesser Antilles. *J. Arnold Arb*, 54:377-411.

**Hayes**, M. (2012). Marine bioactive compounds. Sources, characterization and applications. *Springer Science and Business Media, LLC*, pp.65.



## J

**Jaramillo**, M.A. and Manos, P.S. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, 88(4): 706–716.

## K

**Kanaki**, N., Dave, M., Padh, H. and Rajani, M. (2008). A rapid method for isolation of piperine from the fruits of *Piper nigrum* Linn. *J. Nat. Med.*, 62:281–283.

**Kang**, M.J., Cho, J.Y., Shim, B.H., Kim, D.K. and Lee, J. (2009) Bioavailability enhancing activities of natural compounds from medicinal plants. *J. Med. Plants Res.*, 3: 1204-1211.

**Kapoor**, I.P.S., Singh, B., Singh, G., S. De Heluani, C., P. De Lampasona, M. and Catalan C.S. (2009). Chemistry and in vitro antioxidant activity of volatile oil and oleoresins of black pepper (*Piper nigrum*). *J. Agric. Food Chem.*, 57, 5358–5364.

**Khan**, J.I., Kennedy, T.J. and Christian, D.R. (2012). Basic principles of forensic chemistry. *Springer Science and Business Media, LLC*, pp. 111, 127-132.

**Kolhe**, S.R., Borole, P. and Patel, U. (2011). Extraction and evaluation of piperine from *Piper nigrum* Linn. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(2):144-149.

**Kozukue**, N., Park, M.S, Choi, S.H, et al. (2007). Kinetics of light-induced cis-trans isomerization of four piperines and their levels in ground black peppers as determined by HPLC and LC/MS, *J. Agric. Food Chem.* 55(17): 7131–7139.

**Kupiec**, T. (2004). Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, Vol. 8 No. 3.

## L

**Li**, Y-S. and Church J.S. (2014). Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 29-48.

**Lin**, Z., Liao, Y., Venkatasamy, R., Hider, R.C. and Soumyanath, A. (2007). Amides from *Piper nigrum* L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in-vitro. *J. Pharma. Pharmaco.*, 59: 529-536.

**Liu**, T., Sui, X., Zhang, R., Yang, L., Zu, Y., Zhang, L., Zhang, Y. and Zhang, Z. (2011). Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1218: 8480-8489.

**Lupina, T. and Cripps, H. (1987).** UV spectrophotometric determination of piperine in pepper preparations: collaborative study *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70, 112-113.

## M

**Maclas, S.M.D., Mantell, C., Rodrlguez, M., Martinez, D.L.O.E., Lubian, L.M. and Montero, O. (2009).** Comparison of supercritical fluid and ultrasoundassisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*, *Talanta*. 77: 948-952.

**Madhavi, B.B., Nath, R.A., Banji, D., Madhu, M.N., Ramalingam, R. and Swetha, D. (2009).** Extraction, identification, formulation and evaluation of piperine in alginate beads. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 1(2):156-161.

**Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P. and Sharma, P.K. (2009).** High Performace Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5): 22-26.

**Martin, M. and Guiochon, G. (2005).** Effects of high pressures in liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, (1-2)7: 16-38.

**Meghwal, M. and Goswami, T. K. (2013).** *Piper nigrum* and piperine: An update. *Phytother. Res.*, 27: 1121–1130.

## N

**Nair, K.P.P. (2011).** The agronomy and economy of black pepper and cardamon. The “King” and “Queen” of spices. *Elsevier Inc.*, pp. 1-5, 12-15, 46-51, 56, 57, 65, 84.

**Nair, R.R. and Gupta, S.D. (2003).** Somatic embryogenesis and plant regeneration in black pepper (*Piper nigrum* L.). *J. Hortic. Sci. Biotchnol*, 78:416-421.

**Nam, T.N.T. (2008).** Market and quality assessment of pepper in Vietnam, sustainable management of natural resources in central Vietnam. Report.

**Namjoyan, F., Hejazi, H, and Ramezani, Z. (2012).** Evaluation of drying process on the composition of black pepper ethanolic extract by high performance liquid chromarography with diode array detector. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, 7(4): 163-167.

**Nelson, S.C and Cannon-Eger, K.T. (2011).** Farm and forestry, production and marketing profile for black pepper (*Piper Nigrum*). *Permanent Agriculture Resources (PAR)*, USA.

**Nicolaou, N., Xu, Y. and Goodacre, R. (2010).** Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *J. Dairy Sci.* 93 :5651–5660.

**Nisha, P., Singhal, R.S. and Pandit, A.B. (2009).** The degradation kinetics of flavor in black pepper (*Piper nigrum* L). *J. Food Eng.* 92: 44–49.

## O

**Official Analytical Methods, (1985).** 3rd ed., American Spice Trade Association: Englewood Cliffs, NJ, Method 12.1.

**Okwute, S.K. and Egharevba, H.O. (2013).** Piperine-type amides: Review of the chemical and biological characteristic. *International Journal of Chemistry*, Vol. 5, No. 3.

## P

**Parthasarathy, V.A., Chempakam, B. and Zachariah T.J (2008).** Chemistry of spices. *CAB International*, pp. 25, 33-35.

**Peter, K. V. (2001).** Handbook of herbs and spices. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*, pp. 73, 74, 82.

**Perakis, C., Louli, V. and Magoulas, K. (2005).** Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *J Food Eng.*, 71: 386–393.

**P´eres, V.F., Saffi, J., Melecchi, M.I.S., Abad, F.C., Jacques, RdA., Martinez, M.M, Oliveira, E.C. and Caram˜ao, E.B. (2006).** Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Journal of Chromatography A*, 1105, 115–118.

**Plessi, M., Bertelli, D. and Miglietta, F. (2002).** Effect of microwaves on volatile compounds in white and black pepper. *LWT- Food Sci Technol*, 35(3): 260–264.

**Pundir, R.K. and Jain, P. (2010).** Comparative studies of the antimicrobial activity of black pepper (*Piper Nigrum*) and turmeric (*Curcuma Longa*). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, Vol. I: Issue-2, pp. 491.

## R

**Raman, G. and Gaikar, V.G. (2002).** Microwave-assisted extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41, 2521-2528.

**Ravingdran, P.N. (2000).** Black pepper: *Piper nigrum*. Medical and aromatic plants-industrial profiles. *Harwood Academic Publishers*, Vol. 13, pp. 4-9, 13, 18, 23, 36, 46, 143, 152, 340-343, 368, 371-375.

**Reshmi**, S.K., Sathya, E. and Devi, P.S. (2010). Isolation of piperidine from *Piper nigrum* and its antiproliferative activity. *African. J. Pharma. Pharmacol.*, 4: 562-573.

**Risch**, S.J. (1997). Spices: sources, processing, and chemistry. *American Chemical Society*, pp. 2, 3.

## S

**Saha**, K.C., Seal, H.P. and Noor, M. A. (2013). Isolation and characterization of piperine from the fruits of black pepper (*Piper nigrum*). *J. Bangladesh Agril. Univ.*, 11(1): 11–16.

**Santosh**, M. K., Shaila, D., Rajyalakshmi, I. and Sanjeeva and Rao, I. (2005). RP - HPLC method for determination of piperine from *Piper longum* Linn. and *Piper nigrum* Linn. *E-Journal of Chemistry*, Vol. 2, No. 2, pp 131 -135.

**Sarker**, S.D. and Nahar, L. (2012),. Methods in molecular biology, *Springer Science and Business Media, LLC*, Vol. 864, pp. 32.

**Scott**, I.M., Gagnon, N., Lesage, L., Philogène, B.J.R. and Arnason, J.T (2005a). Efficacy of botanical insecticides from Piper spp. (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.*, 98:845–855.

**Scott**, I.M., Helson, B.V., Strunz, G.M., Finlay, H., Sa´nchez-Vindas, P.E., Poveda, L., Lyons, B.L., Philogène, B.J.R. and Arnason, J.T. (2007) Efficacy of Piper extracts (Piperaceae) for control of insect defoliators of forest and ornamental trees. *Can. Entomol.*, (Revised and resubmitted Dec. 4 2006).

**Scott**, I.M., Jensen, H., Nicol, R., Lesage, L., Bradbury, R., Sa´nchez-Vindas, P., Poveda, L., Arnason, J.T. and Philogène, B.J.R. (2004) Efficacy of Piper (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. *J. Econ. Entomol.* 97:1390–1403.

**Scott**, I.M., Jensen, H.R., Philogène, B.J.R and Arnason, J.T. (2008). A review of Piper spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem Rev*, 7:65–75.

**Scott**, I.M., Puniani, E., Jensen, H., Livesey, J.F., Poveda, L., Sa´nchez-Vindas, P., Durst, T. and Arnason, J.T. (2005b). Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: A method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts. *J Agric Food Chem* 53:1907–1913.

**Schulz**, H. and Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43, 13–25.

- Schultz**, H., Baranska, M., Quilitzsch, R., Schultze, W. and LoSing G. (2005). Characterization of peppercorn, pepper oil, and pepper oleoresin by vibrational spectroscopy methods. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3358-3363.
- Selvendiran**, K., Singh, J.P., Krishnan, K.B. and Sakthisekaran, D. (2003). Cytoprotective effect of piperine against benzo[a]pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. *Fitoterapia* 74:109–115.
- Sharon**, M.H. (2002). Herb-drug interaction handbook. *Church Street Books*: NY, 12, 123-0527.
- Shingate**, P.N., Dongre, P.P. and Kannur, D.M. (2013). New method development for extraction and isolation of piperine from black pepper. *IJPSR*, Vol. 4(8): 3165-3170.
- Silverstein**, R.M., Webster, F.X. and Kiemle, D.J. (2005). Spectrometric identification of organic compounds. *John Wiley & Sons*, Edition 7:80-108.
- Singh**, A. and Duggal, S. (2009). Piperine-review of advances in pharmacology. *Inter. J. Pharma. Sci. Nanotech.*, 2: 615-620.
- Singh**, N.K., Kumar, P., Gupta, D.K., Singh, S. and Singh, V.K. (2011). UV-spectrophotometric method development for estimation of piperine in Chitrakadi Vati. *Der Pharmacia Lettre*, 3(3): 178-182.
- Singleton**, K. (2010). Black pepper. Overview of health benefits. *Nutrition Today*, Vol. 45, Number 1.
- Souza**, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N. and Filho, J. B. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Vol.48 549-558.
- Srinivasan**, K. (2005). Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Res Int*, 38: 77–86.
- Subramanian**, R., Subramaniyan, P., Noorul Ameen J. and Raj, V. (2011). Double bypasses Soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Sunila, E.S. and Kuttan, G. (2004). Immunomodulatory and antitumor activity of *P. Longum* Linn. and piperine. *J. Ethnofarmacol*, 90:339-346.
- Suresh**, D., Manjunatha, H. and Srinivasan, K. (2007). Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (*Curcuma longa*),

red pepper (*Capsicum annuum*) and black pepper (*Piper nigrum*). *J Food Compos Anal* 20: 346–351.

**Suthar**, A.C., Sohoni, D.P., Banavalikar, M.M and Biyani, M.K. (2003). HPTLC method for identification of different piper species and their mixtures. *Indian Drugs*, 40 (12), 692-694.

**Szallasi**, A. (2005). Piperine: researchers discover new flavor in an ancient spice. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, 437–439.

## T

**Tarté**, R. (2009). Ingredients in meat products: properties, functionality and applications. *Springer Science and Business Media*, pp. 199.

**Thankamani**, C. K., Srinivasan, V., Dinesh, R., Santhosh , J. Eapen and Rajeev P. (2009). Black pepper (extension pamphlet). *Spices Board Ministry of Commerce & Industry Government of India Cochin – 682 025*, pp. 24.

**Theophanides**, T. (2012). Infrared spectroscopy-materials science, engineering and Technology. *InTech*, pp. 242.

**Thermo** Fisher Scientific Inc. (2008). Introduction to Raman spectroscopy.

**Tiwari**, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. and Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, Vol. 1, Issue 1.

## U

**UNIDO**, FAO (2005). Herbs, spices and essential oils. Post-harvest operations in developing countries.

## V

**Variyar**, P. S. and Bandyopadhyay, C. (1994). Estimation of phenolic compounds in green pepper berries (*Piper nigrum L.*) by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 39, 743-746.

**Vasavirama**, K. and Upender, M. (2014). Piperine: a valuable alkaloid from Piper Species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 6, Issue 4, 0975-1491.

**Vončina**, D.B. (2009). Chemometrics in analytical chemistry. *Nova Biotechnologica*, 9-2.

**Vyas**, J., Itankar, P., Tauqeer, M., Kelkar, A. and Agrawal M. (2013). Development of HPTLC method for estimation of piperine, guggulsterone E and Z in polyherbal formulation. *Pharmacognosy Journal*, 1-6.

## W

**Weiss**, E. A. (2002). Spice crops. *CAB International*, pp. 158.

**Wiert**, C. (2006). Medicinal plants of Asia and the Pacific. *CRC Press*, pp. 23.

**Wood**, A. B., Barrow, M. L. and James, D. J. (1988). Piperine determination in pepper (*Piper nigrum* L.) and its oleoresins-a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method. *FlaVour Fragrance J.*, 3, 55-64.

## Y

**Yadav**, L.D.S. (2005). Organic spectroscopy. *Springer Science and Business Media Dordrecht*, pp.7, 43, 107, 108.

**Yogesh**, M. S. and Mokshapathy, Dr. S. (2013). Production and export performance of black pepper. *International Journal of Humanities and Social Science Invention*, Vol. 2 Issue 4, pp.36-44.

## Z

**Zarai**, Z., Boujelbene, E., Salem, N.B, Gargouri, Y. and Sayari, A. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Science and Technology* 50, 634-641.

## Διαδίκτυο

<http://blogs.reading.ac.uk/tropical-biodiversity/>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Black\\_pepper](http://en.wikipedia.org/wiki/Black_pepper)

<https://www.dmt-nexus.me> <http://glossary.periodni.com/>

<http://brazil-trade-business.com>

<http://depedkto12.blogspot.gr>

<http://www.applidyne.com.au/>

<http://specac.blogspot.gr/>

<http://www.ministryofjustice.gr>

<http://www.ipcnet.org>

[www.junero.com](http://www.junero.com)

[www.chem.wisc.edu](http://www.chem.wisc.edu)

[www.cnseed.org](http://www.cnseed.org)

[www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### I. Μετρήσεις

#### 1. Υγρασία

<b>Μαύρα Πιπέρια</b>				
<b>Προϊόν</b>	<b>Αρχικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Βάρος κάψας +δείγματος</b>	<b>Τελικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Υγρασία (%)</b>
<b>Appetito</b>	8,6965	11,1963	10,9179	11,1
<b>McCormick</b>	8,6966	11,1958	10,9685	9,1
<b>Anatoli (τριμμένο)</b>	9,6104	12,1107	11,8625	9,9
<b>Anatoli (κόκκοι)</b>	9,2313	11,7313	11,4511	11,2
<b>Captain's</b>	9,2315	11,7311	11,4414	11,5
<b>Σήμαντρο</b>	10,0129	12,5124	12,2524	10,4
<b>Carrefour</b>	8,6963	11,1955	10,9173	11,1
<b>365</b>	10,013	12,5129	12,2251	11,5
<b>Ήλιος</b>	9,2314	11,7308	11,449	11,3
<b>AB</b>	10,0129	12,5125	12,2608	10,1
<b>Σκλαβενίτης</b>	9,2415	11,7414	11,458	11,3
<b>Καγιά</b>	8,6963	11,1963	10,9139	11,3
<b>Spar</b>	9,2315	11,7314	11,4442	11,5
<b>Saman</b>	9,6101	12,1051	11,8186	11,5

<b>Μαύρα Πιπέρια</b>				
<b>Προέλευση</b>	<b>Αρχικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Βάρος κάψας +δείγματος</b>	<b>Τελικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Υγρασία (%)</b>
<b>Ινδία</b>	10,3814	12,8833	12,5901	11,7
<b>Βιετνάμ</b>	10,0128	12,5125	12,230	11,3



<b>Λευκά Πιπέρια</b>				
<b>Προϊόν</b>	<b>Αρχικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Βάρος κάψας+δείγματος</b>	<b>Τελικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Υγρασία (%)</b>
<b>Ανατολι (κόκκοι)</b>	10,0129	12,5129	12,2394	11
<b>ΑΒ</b>	8,6964	11,1963	10,9322	10,6
<b>Σκλαβενίτης</b>	9,2474	11,7469	11,4668	11,2
<b>365</b>	10,0127	12,5127	12,2184	11,8

<b>Λευκά Πιπέρια</b>				
<b>Προέλευση</b>	<b>Αρχικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Βάρος κάψας +δείγματος</b>	<b>Τελικό βάρος κάψας (g)</b>	<b>Υγρασία (%)</b>
<b>Ινδονησία</b>	9,2315	11,7313	11,4646	10,7
<b>Μαλαισία</b>	8,6962	11,1985	10,9268	10,9

## 2. Πιπερίνη επί ξηρού (%)

<b>Μαύρα Πιπέρια</b>			
<b>Προϊόν</b>	<b>Βάρος δείγματος (g)</b>	<b>Απορρόφηση (343 nm)</b>	<b>Πιπερίνη (%)</b>
Appetito	0,5003	0,58	5,3
McCormick	0,5	0,73	6,5
Anatoli (τριμμένο)	0,5001	0,56	5
Anatoli (κόκκοι)	0,5001	0,63	5,7
Captain's	0,5	1,09	8,9
Σήμαντρο	0,5001	0,63	5,8
Carrefour	0,5	0,61	5,6
365	0,5014	0,57	5,2
Ήλιος	0,5	0,7	6,4
AB	0,5001	0,72	6,5
Σκλαβενίτης	0,5003	0,8	7,3
Καγιά	0,5	0,66	6,8
Spar	0,5004	0,89	7,3
Saman	0,5	0,7	6,4

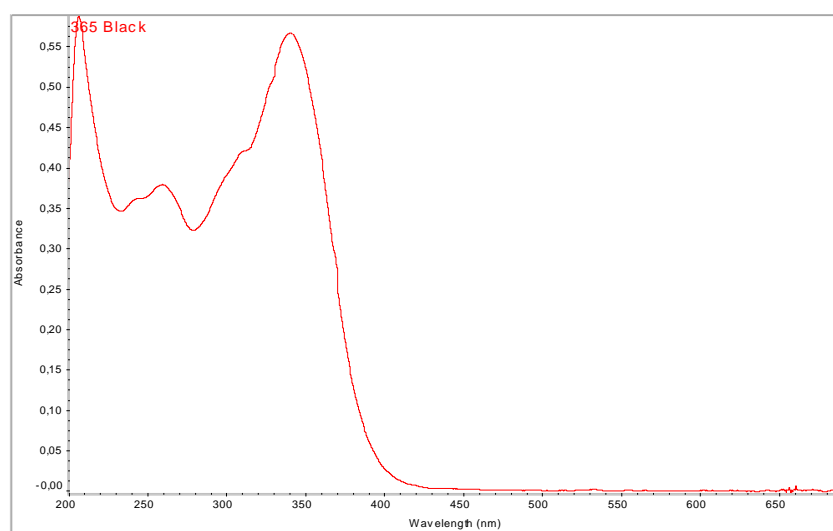
<b>Μαύρα Πιπέρια</b>			
<b>Προέλευση</b>	<b>Βάρος δείγματος (g)</b>	<b>Απορρόφηση (343 nm)</b>	<b>Πιπερίνη (%)</b>
Ινδία	0,5001	0,6	5,5
Βιετνάμ	0,5004	0,92	8,4

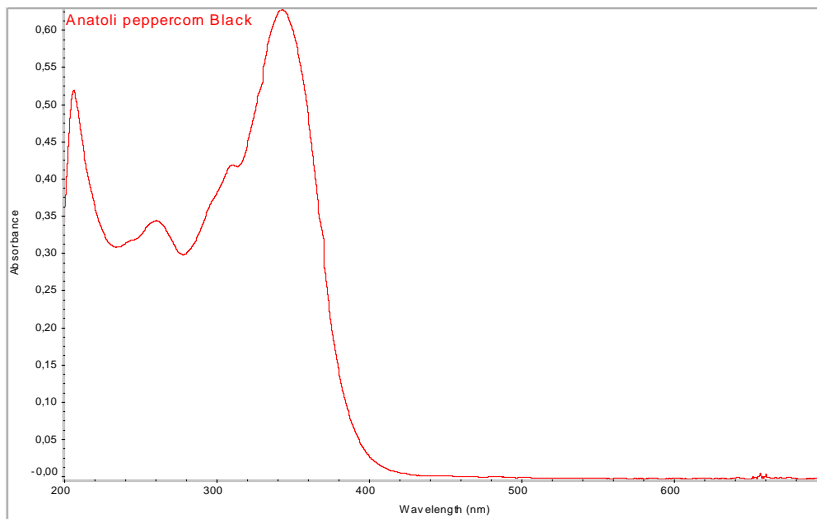
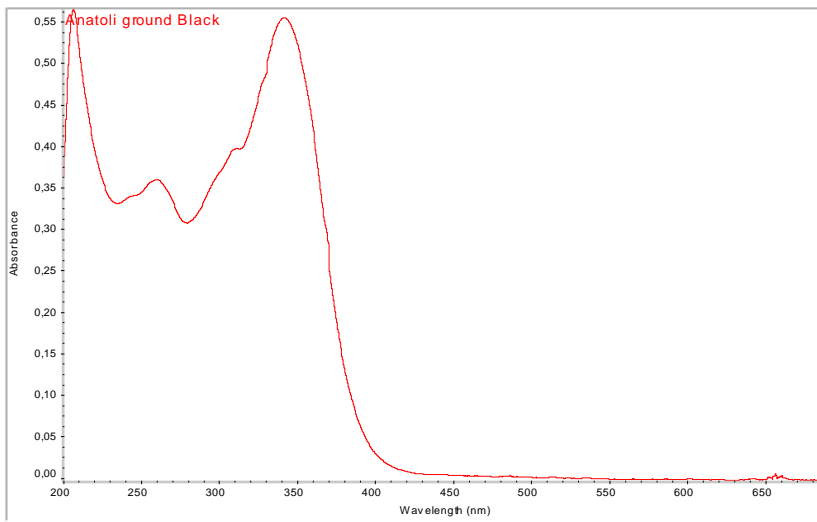
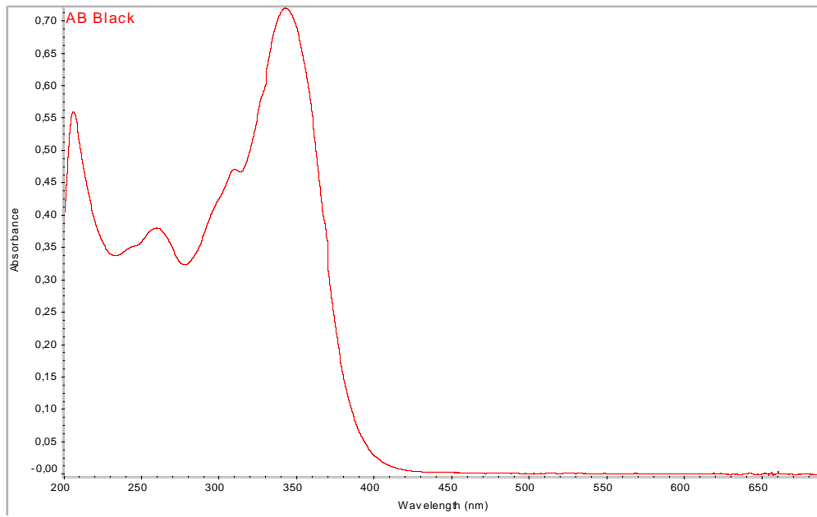
Λευκά Πιπέρια			
Προϊόν	Βάρος δείγματος (g)	Απορρόφηση (343 nm)	Πιπερίνη (%)
Αnatoli (κόκκοι)	0,5002	0,72	6,5
ΑΒ	0,5	0,7	6,3
Σκλαβενίτης	0,5	0,68	6,2
365	0,5001	0,69	6,3

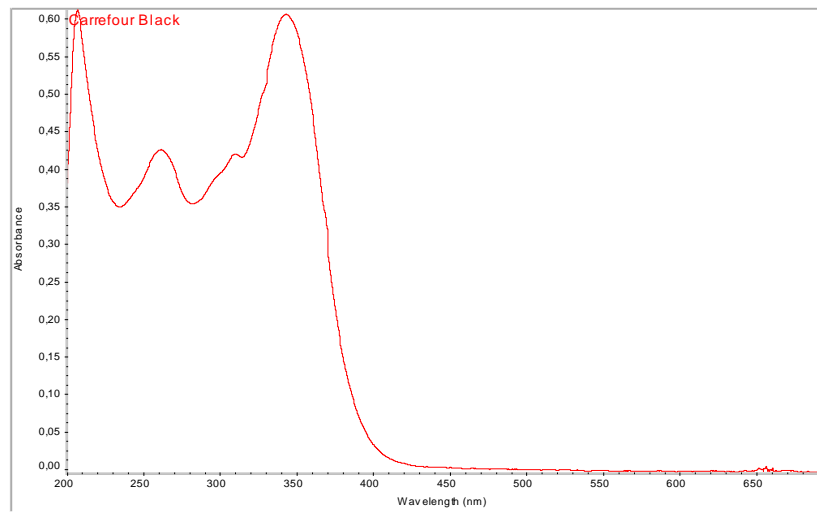
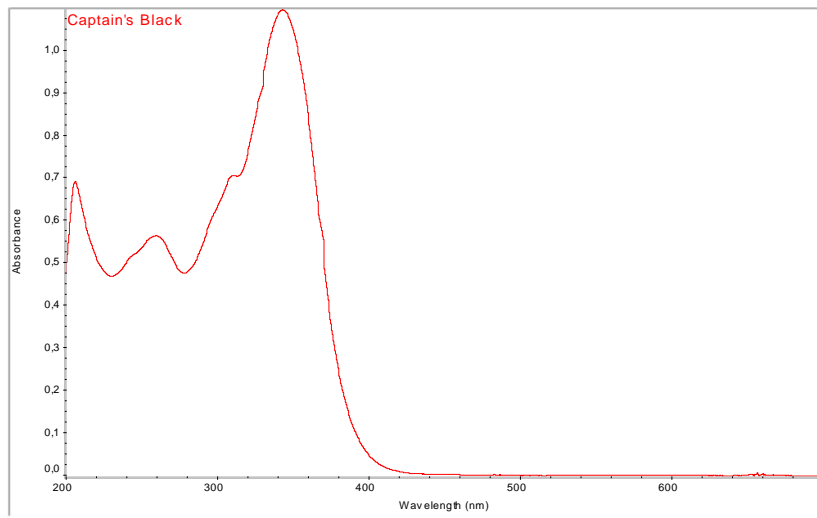
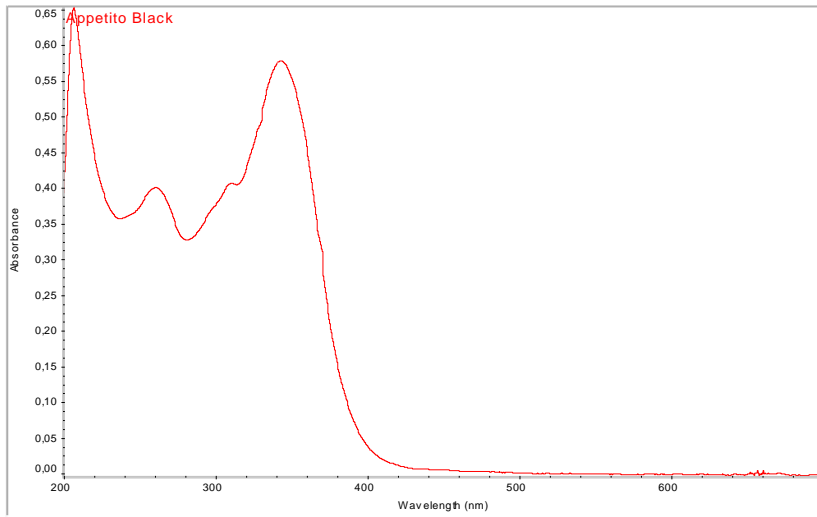
Λευκά Πιπέρια			
Προέλευση	Βάρος δείγματος (g)	Απορρόφηση (343 nm)	Πιπερίνη (%)
Ινδονησία	0,5	0,65	5,9
Μαλαισία	0,5	0,51	4,6

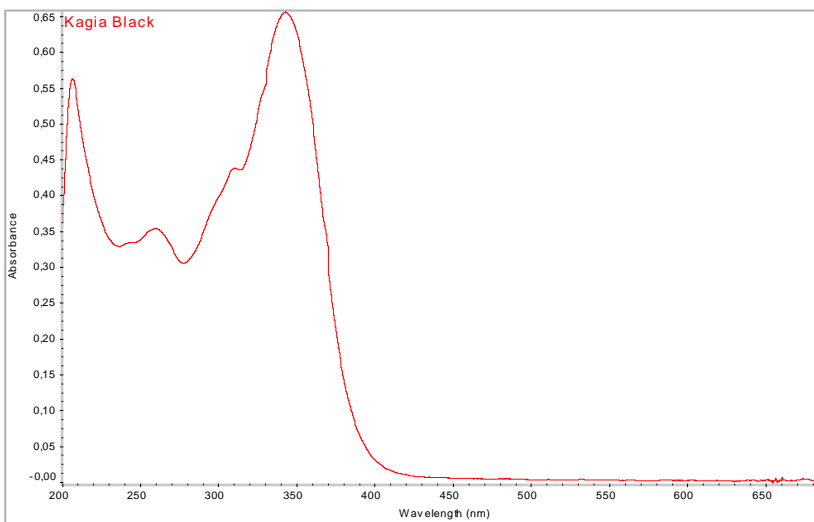
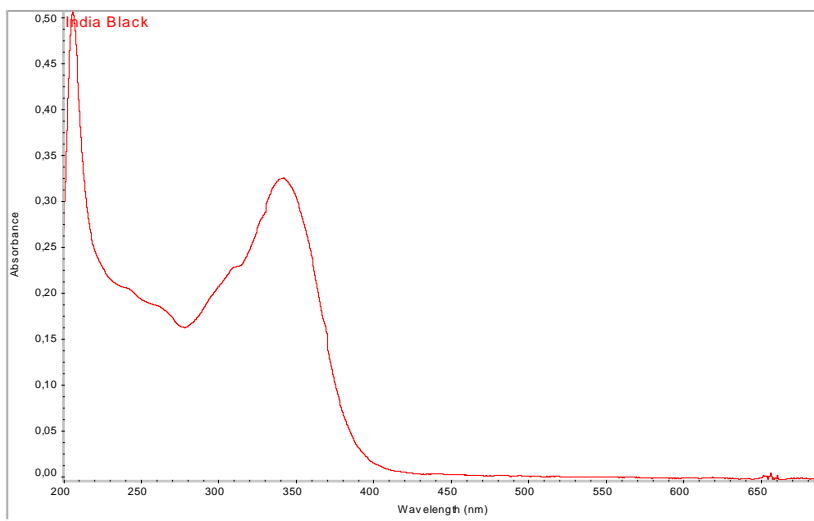
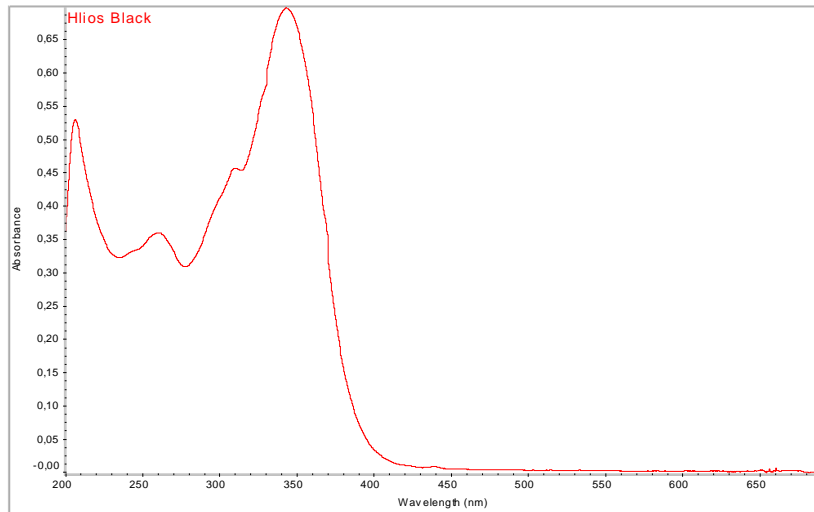
## II. Φάσματα UV-Vis

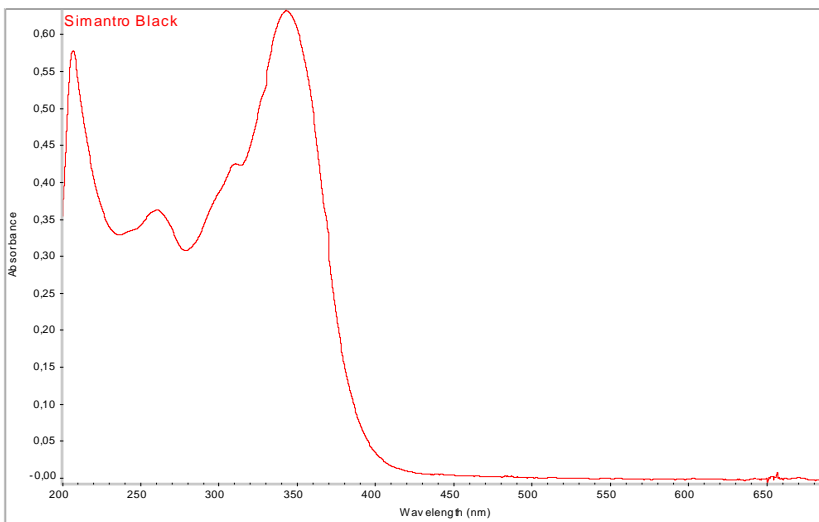
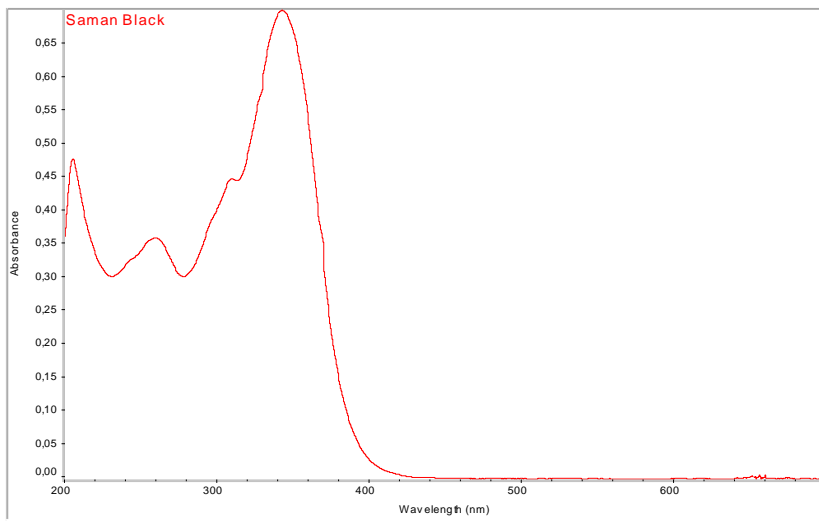
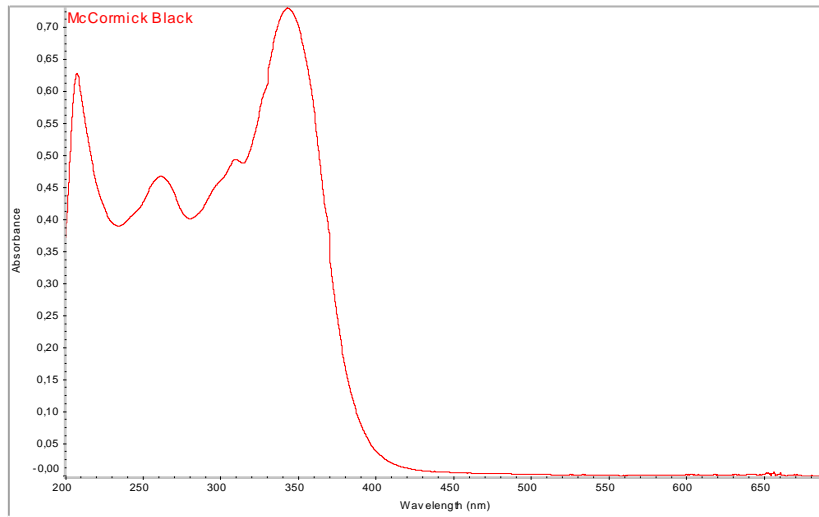
### 1. Μαύρα Πιπέρια

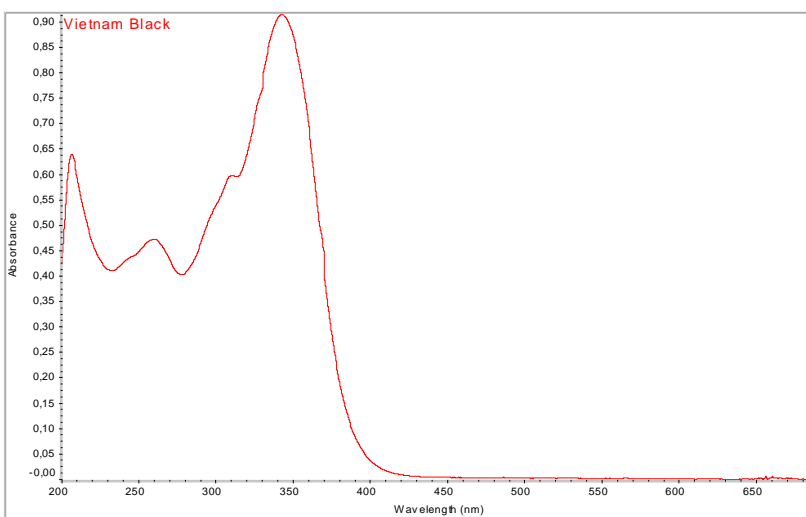
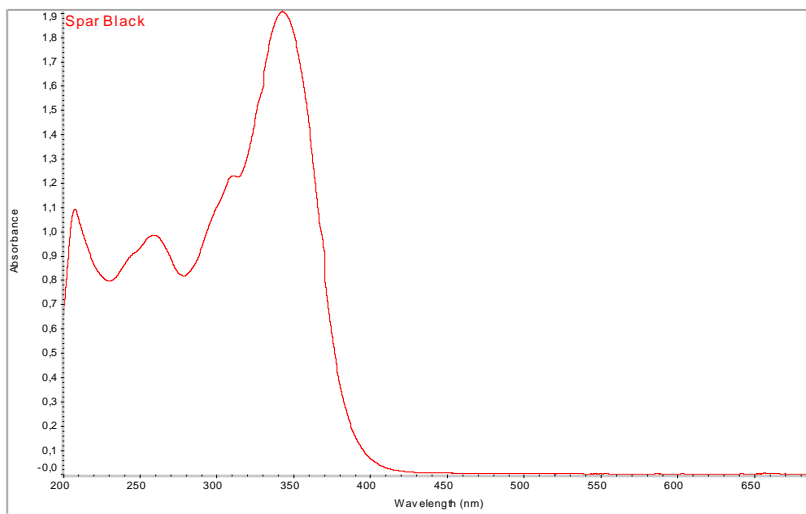
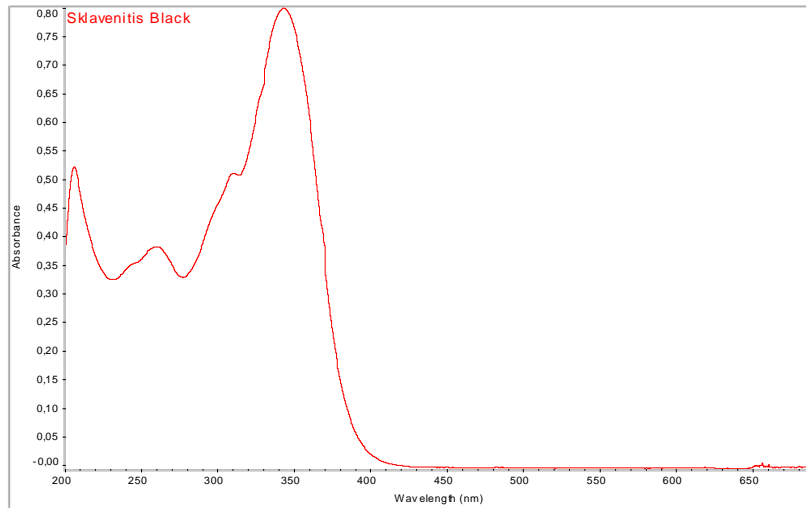














## 2. Λευκά Πιπέρια

