

黒コショウを含有したいわゆる健康食品におけるピペリン含有量について

長谷川貴志、高橋市長、西條雅明、吹譯友秀、小倉誠、元木裕二

Determination of Piperine in Dietary Supplements Containing Black Peppers Using UPLC

Takashi HASEGAWA, Kazunaga TAKAHASHI, Masaaki SAIJO, Tomohide FUKIWAKE, Makoto OGURA and Yuji MOTOKI

要旨

黒コショウを含有したいわゆる健康食品中のピペリンの分析法を構築した。ピペリンの抽出は、抽出溶媒としてメタノールを用い、20 分間超音波抽出を行った。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 を用い、移動相は 0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (6 : 4) を用いた。添加回収試験の結果、回収率は 98.2–99.8% であり良好な結果となった。本法を市販の健康食品に適用した結果 1 錠 (またはカプセル、包) 当たりのピペリン含有量は 0.21–17.1 mg であった。

キーワード：ピペリン、黒コショウ、いわゆる健康食品、超高速液体クロマトグラフィー

Keywords: piperine, black pepper, dietary supplement, UPLC

はじめに

近年、消費者の健康に関する関心が高く、いわゆる健康食品が広く用いられるようになった。それに伴い、アマメシバやアリストロキア属の植物、コンフリー、雪茶等を含有した健康食品による健康被害が報告されている^{1), 2)}。また、いわゆる健康食品の中には効果を高めようと医薬品成分を混入した製品も見られ³⁾、これらの製品によると思われる健康被害も発生している^{4)–6)}。

黒コショウはコショウ (*Piper nigrum* L.) の未熟果実を乾燥させたものであり、脂肪燃焼作用やエネルギー代謝の亢進、他のサプリメント成分の吸収率を高めるなどの効果があるとして、いわゆる健康食品の原材料として用いられている。コショウの果実は医薬品の範囲に関する基準 (食薬区分) において医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質 (原材料) とされており、食品中に含まれている量を経口摂取する場合おそらく安全であると考えられているが、フェニトイン、プロプラノロールやテオフィリン等との薬物相互作用が報告されている⁷⁾。

ピペリンはコショウの果実に含有されている成分であり、抗がん作用^{8), 9)}、抗酸化作用¹⁰⁾、止瀉作用¹¹⁾と共にシトクロム P450 等の酵素を阻害する作用があり、一緒に摂取した医薬品等の作用を増強することが報告されている^{12), 13)}。また、いわゆる健康食品には黒コショウ抽出物が用いられていることが多く、成分が濃縮されている可能性があり、ピペリンを多量に含有した製品が流通していることが考えられる。ピペリンが医薬品との相互作用を示すことから、これら製品による健康被害の発生は否定できない。

今回、いわゆる健康食品中のピペリンの分析法を構築し、市販の健康食品中のピペリン含有量の実態調査を実施したので報告する。なお、ピペリンにはシス・トランス異性体 (Fig. 1) があり、光によって容易に異性化が進むことが知られている¹⁴⁾が、シス・トランス異性体の標準品が市販されていないことから含有量調査の対象外とした。

実験方法

1. 試薬および標準品

1) 標準品：ピペリンは和光純薬工業製生化学用を用いた。

2) 標準溶液：ピペリン 20 mg をメタノールに溶解し 20 mL としたものを標準原液とした。標準溶液は標準原液をメタノールで希釈し、0.5、1、5、10、50、100、500 µg/mL に調製したものを使用した。

3) 試薬：アセトニトリルは HPLC 用を用い、その他試薬は市販特級品を用いた。

2. 試料

1) 黒コショウ：千葉市内のスーパーマーケットで購入した市販品を使用した。

2) 検体：黒コショウまたは黒コショウ抽出物の含

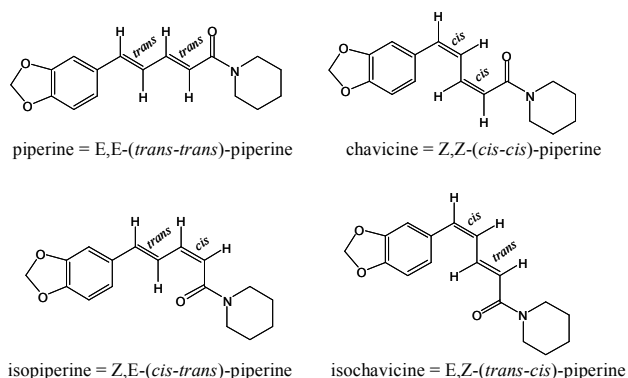


Fig.1. Structures of piperine isomers

Table 1. Operating conditions of UPLC for analysis of piperine

Column	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 1.7 μm)
Mobile phase	0.1% formic acid aqueous solution/acetonitrile (6:4)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temperature	40°C
Injection volume	1 μL
Detection	UV 210–400 nm (monitor 340 nm)

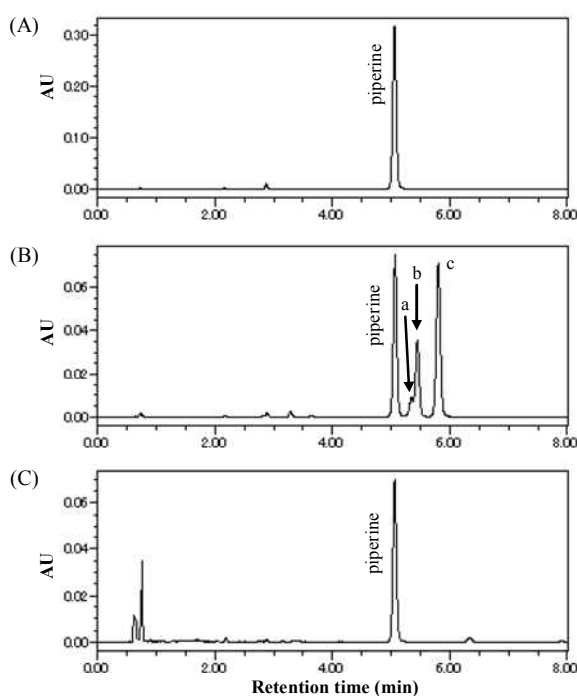


Fig. 2. UPLC chromatograms of (A) standard solution (100 μg/mL), (B) standard solution (UV irradiated) and (C) typical sample extract (Sample No. 3)

有を表示したいいわゆる健康食品 8 製品をインターネットまたはドラッグストアで購入したものを使用した。

3. 装置および超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) 条件

装置は Waters 製 ACQUITY UPLC シリーズ、ポンプ、デガッサー、恒温槽、オートサンプラー、フォトダイオードアレイ検出器およびデーター処理装置から構成されるシステムを用いた。Table 1 に UPLC 条件を示した。

4. ピペリン紫外線 (UV) 照射溶液の作成

ピペリン標準溶液 (100 μg/mL) を透明なガラス製の共栓試験管に入れ、UV (254 nm) を 16 時間照射した。

5. 抽出条件の検討

黒コショウを粉砕機で粉末とし、その粉末 100 mg を、メタノール、エタノール、80%メタノール、80%エタノール、50%メタノール、50%エタノールの 6 種類の抽出液 10 mL で 15 分間超音波抽出を行った後、遠心分離し、上澄液を分取した。残渣は同様に処理し、各溶液を 0.20 μm メンブランフィルターで

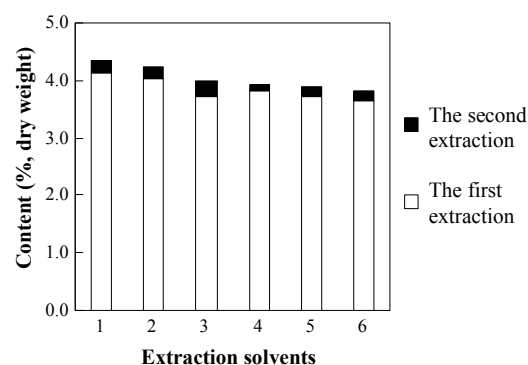


Fig. 3. Extraction behavior of piperine in black pepper for the 6 extraction solvents
1: methanol, 2: 80% methanol, 3: 50% methanol, 4: ethanol, 5: 80% ethanol, 6: 50% ethanol

ろ過し、UPLC で分析した。

6. 試験溶液の調製

カプセルは内容物を取り出し、錠剤は乳鉢または粉砕機で粉末とした。粉末試料約 100 mg を遮光の共栓試験管に精密に量り取り、メタノール 10 mL を加え、20 分間超音波抽出を行った。抽出後、0.20 μm メンブランフィルターでろ過し UPLC で分析を行った。

結果および考察

1. UPLC 条件の検討

UPLC 条件の検討に際し、ピペリンとシーストランス異性体の分離を確認するため、ピペリン UV 照射溶液を使用した。そのクロマトグラムを Fig. 2 に示した。ピペリンおよびそのシーストランス異性体は UV スペクトルが異なっており、Ternes らの報告¹⁵⁾からピーク a はチャビシン、ピーク b はイソピペリン、ピーク c はイソチャビシンと推定され、ピペリンとは十分分離することができた。また、検体においても定量の妨害となるピークは確認されなかった。

2. 検量線および定量下限

0.5–500 μg/mL の範囲で良好な直線性 ($r^2 = 0.999$) が得られた。また、本法における定量下限 ($S/N = 10$) は試料中濃度として、12.5 μg/g であった。

3. 抽出条件の検討

Fig. 3 に示したとおり、ピペリンの抽出率はメタノールが最も高いことが明らかとなった。また、抽出回数は 1 回より 2 回抽出のほうが優れていたが、抽出操作の過程でピペリンが他の異性体になることが確認されたため、メタノールの 1 回抽出で試験を

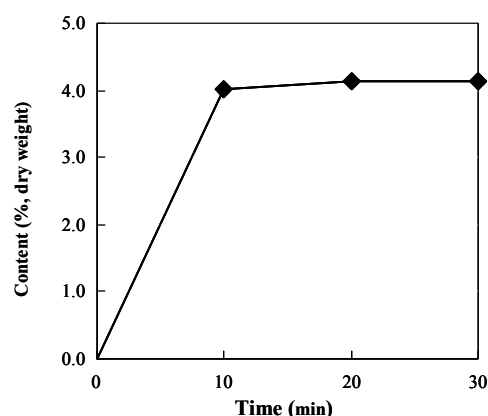


Fig. 4. Effect of sonication time on piperine content in black pepper extracted with methanol

Table 2. Recoveries of piperine from two dietary supplements

Sample	Added (mg/g)	Recovery ^{*1} (%)
A	2.5	99.5 ± 0.23
	0.25	99.8 ± 1.56
B	2.5	98.2 ± 0.95
	0.25	99.3 ± 1.70

^{*1} Values are means ± standard deviation (n = 6)

Table 3. Contents of piperine in dietary supplements containing black pepper

Sample No.	Dosage form	Content ^{*1} (mg/unit)	Indicated dosage (unit/day)	Maximum intake (mg/day)
1	Powder	0.21	1-2	0.42
2	Capsule	0.57	2	1.14
3	Capsule	0.72	3-5	3.60
4	Tablet	0.24	3	0.72
5	Capsule	11.5	1-2	23.0
6	Tablet	0.29	3	0.87
7	Powder	17.1	1-3	51.3
8	Capsule	9.88	1-2	19.8

^{*1} Values are means (n = 3)

実施することとした。

次に抽出時間の検討を行った。ピペリンの抽出率は 10 分でほぼ平衡に達していることが判明した (Fig. 4)。

以上の結果より、溶媒としてメタノールを用い、20 分間超音波抽出することとした。

4. 添加回収実験

あらかじめピペリンを含有しないことを確認した 2 製品を使用した。添加量は 0.25 および 2.5 mg/g とした。その結果、回収率は 98.2-99.8%、標準偏差は 2%以内であり、良好な結果となった (Table 2)。

5. 検体への適用

本法を用い、市販の製品に適用した結果、1 錠 (またはカプセル、包) 当たりのピペリン含有量は 0.21-17.1 mg であった (Table 3)。また、製品に記載されている摂取目安量の最大量を摂取した場合、ピペリンを一日あたり 0.42-51.3 mg 摂取することが明らかとなった。ピペリン含有量が最も高かった Sample No.7 の一日あたりのピペリン最大摂取量 (51.3 mg/day) は黒コショウに換算すると約 1.4 g (約 28 粒) に相当する量であった。黒コショウの一日あたりの摂取量は不明であるが、黒コショウを含む「香辛料・その他」として一人一日あたり 0.3 g 摂取していることが報告されている¹⁶⁾。仮に黒コショウを

一日あたり 0.1-0.3 g 摂取していると仮定すると、Sample No.7 の摂取目安量の最大量を摂取した場合、食事から摂取するピペリンの約 5-14 倍に相当することが判明した。Sample No.5、7 及び 8 のようにピペリンを比較的少量に含有したいわゆる健康食品は、ピペリンが医薬品と相互作用を示すことから、健康被害が発生する可能性を否定できず注意が必要と思われる。

まとめ

UPLC および超音波抽出法を用い、いわゆる健康食品中における簡便なピペリンの分析法を構築することができた。本法を市販の黒コショウ含有を表示した健康食品に適用したところ、1 錠 (またはカプセル、包) 当たりのピペリン含有量は 0.21-17.1 mg であった。

いわゆる健康食品の中には、表示された原材料とは異なる原材料が用いられている製品¹⁷⁾もあり、黒コショウの含有を表示していない製品にも黒コショウが使用されている可能性も否定できない。いわゆる健康食品は数多く市販されており、今回調査した健康食品以外にも多量のピペリンを含有した製品が流通している可能性が考えられることから、引き続き調査を実施する必要がある。

文献

- 1) 健康被害情報・無承認無許可医薬品情報, 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課 (<http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet.html>)
- 2) 梅垣敬三: 健康食品の実態とその安全性・有効性, 食品衛生学雑誌, 51, 396-401 (2010)
- 3) 西條雅明, 石井俊靖, 長谷川貴志, 高橋市長, 永田知子: 「いわゆる健康食品」から検出された医薬品成分について (平成 16 年度から平成 20 年度), 千葉県衛生研究所年報, 57, 44-47 (2008)
- 4) 長谷川貴志, 石井俊靖, 宮本文夫, 伊藤浩三: 健康被害を起こした中国製ダイエット用健康食品から検出された医薬品成分について, 千葉県衛生研究所研究報告, 29, 37-40 (2005)
- 5) 守安貴子, 岸本清子, 中嶋順一, 重岡捨身, 蓑輪佳子, 上村尚, 他: 健康被害を起こした中国製ダイエット健康食品における検査結果, 東京都健康安全研究センター研究年報, 54, 69-73 (2003)
- 6) 土井崇広, 梶村計志, 高取聡, 田口修三, 岩上正蔵: グリベンクラミドとシルデナフィルが検出された健康食品について, 大阪府公衆衛生研究所報, 46, 55-60 (2008)
- 7) Pharmacist's Letter, Prescriber's Letter. (独立行政法人 国立健康・栄養研究所 監訳) Natural medicines comprehensive database (健康食品データベース), 第一出版, 68-69 (2007)
- 8) Sunila, E. S., Kuttan, G.: Immunomodulatory and antitumor activity of piper longum Linn. and piperine. J Ethnopharmacol., 90, 339-346 (2004).
- 9) Bezerra, D. P., Castro, F. O., Alves, A. P., Pessoa, C., Moraes, M. O., Silveira, E. R. et al.: In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper., Braz. J. Med. Biol. Res., 39, 801-807 (2006).
- 10) Vijayakumar, R. S., Surya, D., Nalini, N.: Antioxidant efficacy of black pepper (Piper nigrum L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress., Redox. Rep., 9, 105-110 (2004).
- 11) Bajad, S., Bedi, K. L., Singla, A. K., Johri. R. K.: Antidiarrhoeal activity of piperine in mice., Planta Med., 67, 284-287 (2001).
- 12) Hu, Z., Yang, X., Ho, P. C., Chan, S. Y., Heng, P. W., Chan, E., Duan, W. et al.: Herb-drug interactions: a literature review., Drugs, 65, 1239-1282 (2005) .
- 13) Bhardwaj, R. K., Glaeser, H., Becquemont, L., Klotz, U., Gupta, S. K., Fromm, M. F.: Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4., J. Pharmacol. Exp. Ther., 32, 645-650 (2002).
- 14) Kozukue, N., Park, M. S., Choi, S. H., Lee, S. U., Ohnishi-Kameyama, M., Levin, C. E., Friedman, M.: 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, 7131-7139 (2007).
- 15) Ternes, W., Krause, E. L.: Characterization and determination of pieprine and piperine isomers in eggs., Anal. Bioanal. Chem., 374, 155-160 (2002).
- 16) 平成 20 年度国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省健康局総務課 (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h20-houkoku.html>)
- 17) 合田幸広: 健康食品の安全性確保と基原の重要性, 薬学雑誌, 128, 837-838 (2008)