

分担研究報告書

分担研究課題 量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究

研究分担者 内山 奈穂子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部第二室長

研究協力者 辻本 恭 国立医薬品食品衛生研究所 派遣研究員

LC-MS を用いた *Cassia* 属ハネセンナおよびセンナの分析に関する研究

ハネセンナはキャンドルブッシュ、ゴールデンキャンドル等の名称で、瘦身、便秘の解消などの目的で健康食品として広く使用されている。一方、類似の植物として挙げられるセンナは、小葉が日本薬局方(日局)に記載されている医薬品であり、葉軸、葉柄、果実を含め「専ら医薬品として使用される成分本質」(「専ら医薬品」)として規制されている。センナにおいては、茎のみが医薬品として判断しない成分本質(非医薬品)として分類されている。しかしながら、センナ茎含有と表示された市販製品の中には、医療用医薬品の一日最小服用量で摂取される量に近い含量の *Sennoside* が検出され、製品中には「専ら医薬品」であるセンナの小葉や葉軸、果実などが混入していた例が報告されている。そこで、センナ茎およびハネセンナ(キャンドルブッシュ、ゴールデンキャンドル)を含む製品中の *Sennoside* の検出・定量を目的とし UPLC-MS を用いた分析法の検討を行った。まず、日局センナと国産ハネセンナ葉を試料として既報の条件を参考に分析を行ったところ、*Sennoside*B のピークに近い保持時間を持つピークが重なっており、分離が不十分であった。そこで移動相及びグラジエント条件の検討を行った結果、*Sennoside*B を単独のピークとして検出することが可能となった。また、得られた LC-MS データを用いてセンナおよびハネセンナの判別分析を行い、*Vicenin-II* がセンナ特有の指標成分と成り得る可能性が示唆された。しかし、現時点ではハネセンナのサンプル数が少ないため、今後サンプル数を増やし解析を行う予定である。

研究協力者

丸山卓郎:国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
第一室長

徳本廣子:国立医薬品食品衛生研究所 非常勤
職員

川原信夫:国立研究開発法人 医薬基盤・健康・
栄養研究所 薬用植物資源研究センター長

林 茂樹:国立研究開発法人 医薬基盤・健康・
栄養研究所 薬用植物資源研究センター 種子
島研究部 主任研究員

安食菜穂子:国立研究開発法人 医薬基盤・健
康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 種
子島研究部 研究員

A. 研究目的

ハネセンナはキャンドルブッシュ、ゴールデンキ
ャンドル等の名称で、瘦身、便秘の解消などの目
的で、健康食品として広く流通している。

一方、類似の植物として挙げられるセンナは、
小葉が日本薬局方(日局)に記載されている医薬
品であり、葉軸、葉柄、果実を含め「専ら医薬品と
して使用される成分本質」(「専ら医薬品」)として
規制されている。センナにおいては、茎のみが医
薬品として判断しない成分本質(非医薬品)として
扱うことができる。しかしながら、センナ茎含有と表
示された市販製品の中には、医療用医薬品の一

日最小服用量で摂取される量に近い含量の Sennoside が検出され、製品中には「専ら医薬品」であるセンナの小葉や葉軸、果実などが混入していた例が報告されている [1]。

ハネセンナにおいても Sennoside が含まれているため、市販のハネセンナ(キャンドルブッシュ)を含む製品に関する健康被害事例も報告されている [2]。そこで本研究では UPLC-MS による Sennoside およびその類縁化合物の定量分析を目的とした条件検討を行った。

B. 研究方法

【実験材料】

栽培品:ハネセンナ *Cassia alata* は 2015 年 11 月および 2016 年 12 月に国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター 種子島研究部より供与された栽培品の植物体の一部(花、植物体上部の主茎と葉、植物体中部の主茎と側枝および側枝の葉、植物体下部の主茎)を使用した (Table 1)。

市販製品:日局センナは、国内メーカーを通じて入手したものを使用した (Table 1)。

【試料及び調製法】

市販の日局センナ(5 種)、ハネセンナ葉(2 種)、について分析を行った。各検体をミキサール MM400 (Verder Scientific 社製)にて粉碎した(20 Hz、30 sec)。得られた粉末試料 100 mg を秤量し、70% MeOH 2.5 ml に懸濁し、超音波処理(10 min)の後遠心分離した(2800 rpm、10 min)。上清を分離し、残渣を再度 70% MeOH 2.5 ml に懸濁し、超音波処理(10 min)の後遠心分離した(2800 rpm、10 min)。分離し併せた上清を 5 ml にメスアップし、20 mg/ml 溶液として測定に供した。

【試薬】

Sennoside A,B は和光純薬工業より購入した。Vicenin- II は Phytolab GmbH & Co., KG より購入し、Tinnevellin glucoside は Ark Pharm より購入した。

【分析条件】

[高分解能 LC-MS] 装置:UltiMate 3000 RS LC system 及び Q Exactive Quadrupole-Orbitrap ハイブリッド型質量分析計(Thermo Fisher Scientific 社製)、カラム:ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 x 2.1 mm、particle size 1.8 μ m、Waters 社製)

質量分析条件 イオン化:エレクトロスプレーイオン化(ESI)法、Positive and negative mode、Capillary temperature: 320 $^{\circ}$ C、Vaporizer temperature: 300 $^{\circ}$ C、Desolvation gas: helium、Splay voltage: 4.0 KV、Cone voltage: 35.0 V、Normalized collision energy: 30.0 V、mass spectral range: m/z 150-2000。キャリブレーション: LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 及び ESI Negative Ion Calibration Solution (何れも Pierce 社製)を使用した。

【判別分析】

測定データをメタボローム解析ソフトウェア Progenesis QI ver. 1.0 (Waters) で処理し、ピークの検出(ピーク強度、保持時間(RT)、質量数(m/z))、アライメントを行い、EzInfo (Waters)でデータマトリクスの作成を行った。このデータマトリクスを SIMCA Ver. 14 (Umetrics) を用いて判別分析を行った。

C. 研究結果

1. HPLC 条件の検討

まず、市販の日局センナ抽出物を用いて既報 [3]の条件を参考に分析を行った。

【分析条件 1】[3]

移動相:A = 0.1% ギ酸水溶液; B = 0.1% ギ酸アセトニトリル

グラジエント条件:82%A/18%B (0–2 min hold)、to 81%A/19%B (2–15 min hold)、to 70%A/30%B (15–32 min) to 50 %A/50%B (32–38 min)、to 82%A/18%B (38–40 min、6 min hold)。流速 0.3 ml/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C

上記の条件で分析した結果、SennosideB のピークに重なるピーク①が観測され、本条件では分

離が不十分であった (Fig. 1, 2)。

そこで、ギ酸水-アセトニトリル系を用いて以下の4種の分析条件で検討を行った。

【分析条件 2】移動相: A = 0.1% ギ酸水溶液; B = アセトニトリル

【分析条件 2-1】: 90%A/10%B to 80%A/20%B (0-45min)、to 5%A/95%B (45-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-1)

【分析条件 2-2】: 90%A/10%B to 85%A/15%B (0-15min、15min hold)、to 80%A/20%B (30-37.5min)、to 5%A/95%B (37.5-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-2)

【分析条件 2-3】: 90%A/10%B to 85%A/15%B (0-10min、20min hold)、to 80%A/20%B (30-37.5min)、to 5%A/95%B (37.5-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-3)

【分析条件 2-4】: 90%A/10%B to 85%A/15%B (0-5min、20min hold)、to 80%A/20%B (25-37.5min)、to 5%A/95%B (37.5-52.5min、3min hold)、0.1 ml/min (Fig. 3-4)

分析の結果、いずれの条件においても Sennoside B とピーク①を分離することは困難であった (Fig. 3)。また、精密質量分析より、ピーク①の分子式は $C_{42}H_{40}O_{19}$ (分子量 848.21) と推測された (calcd. for $C_{42}H_{40}O_{19}$ (M-H) 847.2080, found. 847.2086) (Fig. 4b)。また MS/MS のフラグメントより2つのヘキソースが O-グリコシドとして含まれ、1つのカルボン酸が含まれているものと考えられた (Fig. 4c)。また、ピーク①は、Sennoside A 及び B と同様に、ビスアントラキノン骨格に由来する 354nm の吸収をもつことから、Sennoside 類縁体である事が予測された (Fig. 5)。

次に、ギ酸-水-アセトニトリル系では、Sennoside B のピークの分離が困難であったため、溶出液 B にメタノール系を用いてさらに以下のグラジエント条件で検討を行った。

【分析条件 3】

移動相: A:0.1%ギ酸水溶液、B:0.1%ギ酸-メタノール

【分析条件 3-1】: 95%A/5%B to 65%A/35%B (0-10 min)、to 35%A/65%B (10-40 min)、to 5%A/95%B (40-40.1 min、5 min hold)、0.1ml/min (Fig. 6-1)

【分析条件 3-2】: 95%A/5%B to 60%A/40%B (0-10 min)、to 35%A/65%B (10-40 min)、to 5%A/95%B (40-40.1 min、5 min hold)、0.1ml/min (Fig. 6-2)

【分析条件 3-3】: 95%A/5%B to 65%A/35%B (0-10 min)、to 35%A/65%B (10-40 min)、to 5%A/95%B (40-40.1 min、5 min hold)、0.1ml/min (Fig. 6-3)

その結果、Sennoside B に重なっていたと考えられるピークは分離し、条件 3-3 が最も良い分離を示した (Fig. 6)。

2. センナ・ハネセンナの判別分析 (LC-ESI(+)-MS、LC-ESI(-)-MS)

市販のセンナ 5 種および種子島産ハネセンナ 2 種を切断、粉碎し得られた粉末の 70%メタノール溶液を LC-MS の条件 3-3 に附した。その結果、センナ及びハネセンナいずれの試料においても Sennoside A、B は良好に分離した (data not shown)。次に、これらのサンプルより得られた LCMS データについてセンナ・ハネセンナのグループで判別分析 (Scalling: palato)を行った。その結果、LC-ESI(+)-MS、LC-ESI(-)-MS それぞれのスコアプロット上でいずれもセンナ、ハネセンナの2つのグループに分かれる事が確認できた (Fig. 7、11)。

LC-ESI(+)-MS (Fig. 7) の S-Plot (Fig. 8) より、センナの指標成分として 28.93_408 (RT_m/z) の成分と、19.33_594 (RT_m/z) の成分が観測された。各マススペクトルパターンから、前者は Tinnevellin glucoside (Tiv-Glc)、後者は Vicenin-II であると考えられ (Fig. 9、10)、両成分は、標品との直接比較により同定した (data not shown)。

LC-ESI(-)-MS (Fig. 11) の S-Plot (Fig. 12) からは、さらにセンナの判別に 30.88_862 (RT_m/z)

の成分と 26.88_862 (RT_{m/z}) の成分が寄与していると考えられた (Fig. 13, 14)。これら寄与成分 (Fig. 15) については、標品との直接比較により、30.88_862 (RT_{m/z}) の成分は Sennoside A、26.88_862 (RT_{m/z}) の成分は Sennoside B と同定した。

D. 考察

LC-MS データを用いてセンナおよびハネセンナの判別分析を行った結果、Tinnevellin glucoside (Tiv-Glc)、Vicenin-II、Sennoside A、Sennoside B の 4 化合物がセンナの寄与成分であることが明らかになった (Fig. 15)。また、LC-ESI(-)-MS データの S-plot から推定される寄与成分としては、センナのグループには 28.44_640 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Isorhamnetin 3-O-gentiobioside (IR-Gtb) であると推定された (Fig. 13, 16)。また、26.17_847 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Sennoside C または D であると推定された (Fig. 13, 16)。一方ハネセンナのグループには 37.57_286 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Kameferol であると推定された。また、27.43_610 (RT_{m/z}) の成分が観測され、これは Kameferol 配糖体の寄与が考えられた (Fig. 14, 16)。これらの化合物については、今後同定を行う予定である。

E. 結論

Sennoside A、B の定量分析に向けた LC 条件の検討において、Sennoside B に近接したピークを分離する条件を見出すことができた。その条件下で日局センナとハネセンナ葉を試料として LCMS データを用いた判別分析を行い、センナの寄与成分として 4 種の化合物を同定した。これまで、センナの指標成分として Isorhamnetin 3-O-gentiobioside および Tinnevellin glucoside が報告されているが [3]、今回見出された Vicenin-II もその化学的安定性から有効な指標成分と成り得る可能性が示された。また、現時点ではハネセン

ナのサンプル数が少ないため、今後サンプル数を増やし解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 学会発表
該当無し
2. 誌上発表
該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

H. 参考文献

- [1] 国民生活センター; ダイエットなどをうたった「健康食品」ーセンナ茎を使った茶類を中心にー、2005 年 9 月 7 日、http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20050907_1.html (accessed: March 2018)。
- [2] 国民生活センター; キャンドルブッシュを含む健康茶ー下剤成分 (Sennoside) を含むため過剰摂取に注意ー、2014 年 1 月 23 日、http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20140123_1.html (accessed: March 2018)。
- [3] Takahashi, M.; Sakurai, K.; Fujii, H.; Saito, K. J. AOAC Int. 2014, 97 (4), 1195-1201.

Table 1. 使用サンプル

No.	試料	形態	産地	入手時期
S-1	日局センナ	刻み	インド	2015年7月
S-2	日局センナ	刻み	インド	2016年
S-3	日局センナ	粉末	インド	2015年8月
S-4	日局センナ	刻み	インド	2016年
S-5	日局センナ	刻み	インド	不明
HS-1	ハネセンナ葉	全形	日本	2016年12月
HS-2	ハネセンナ葉	全形	日本	2015年12月

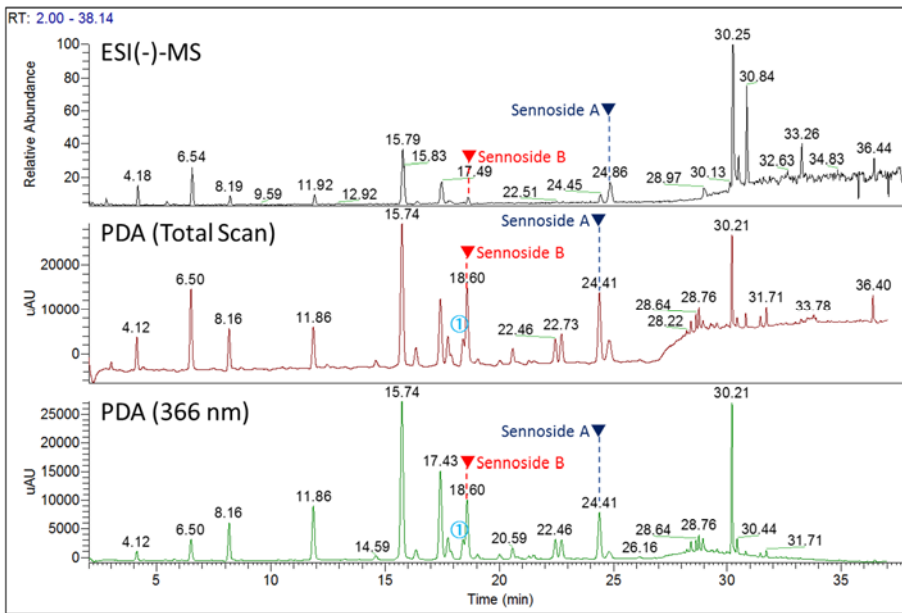


Fig. 1. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(分析条件1[3])

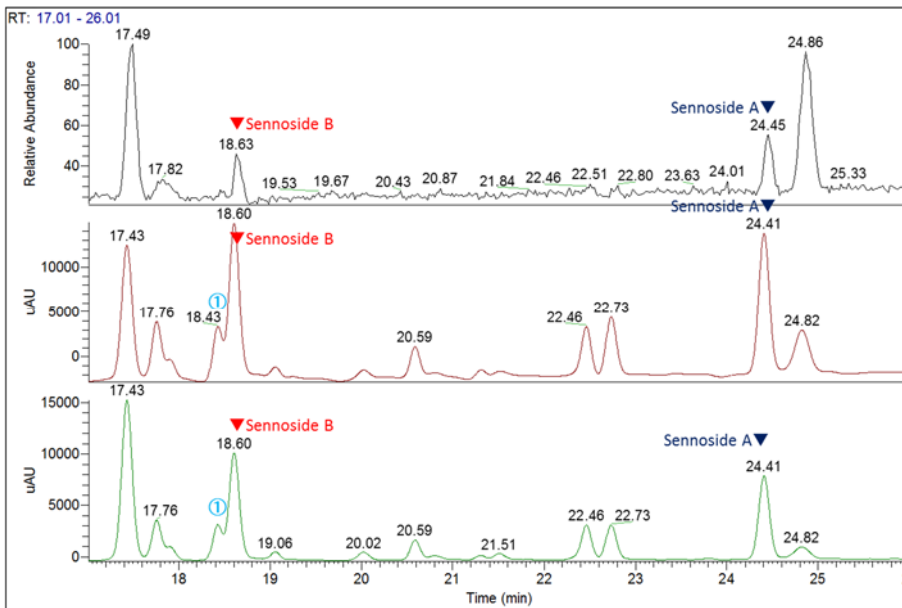


Fig. 2. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(拡大図、分析条件1[3])

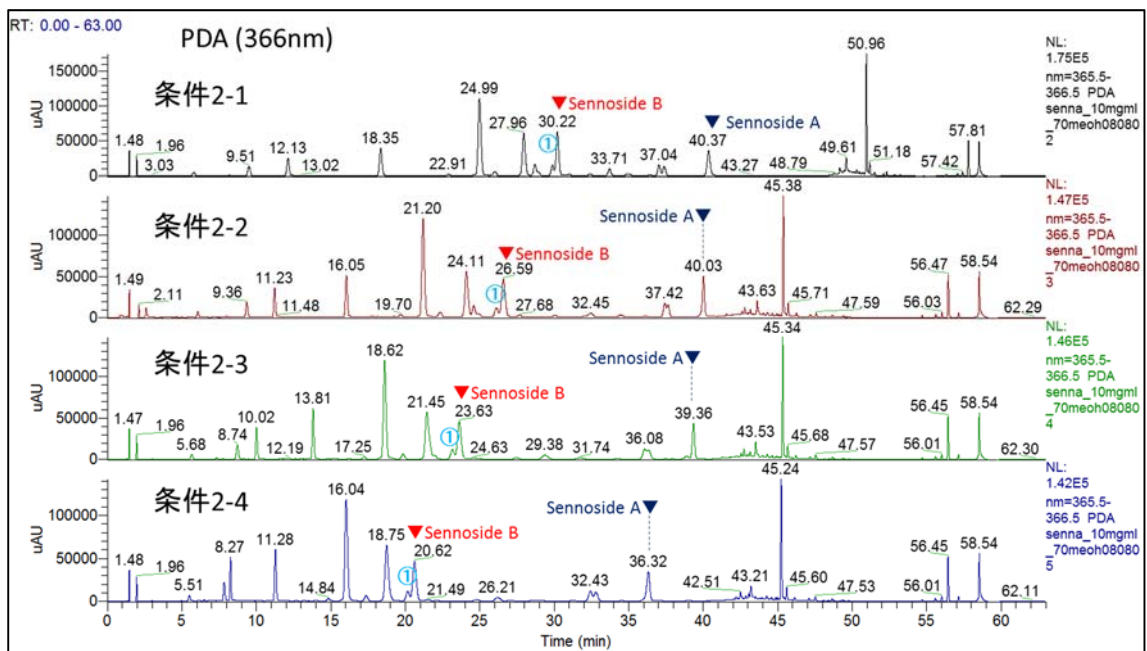


Fig. 3. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(分析条件 2)

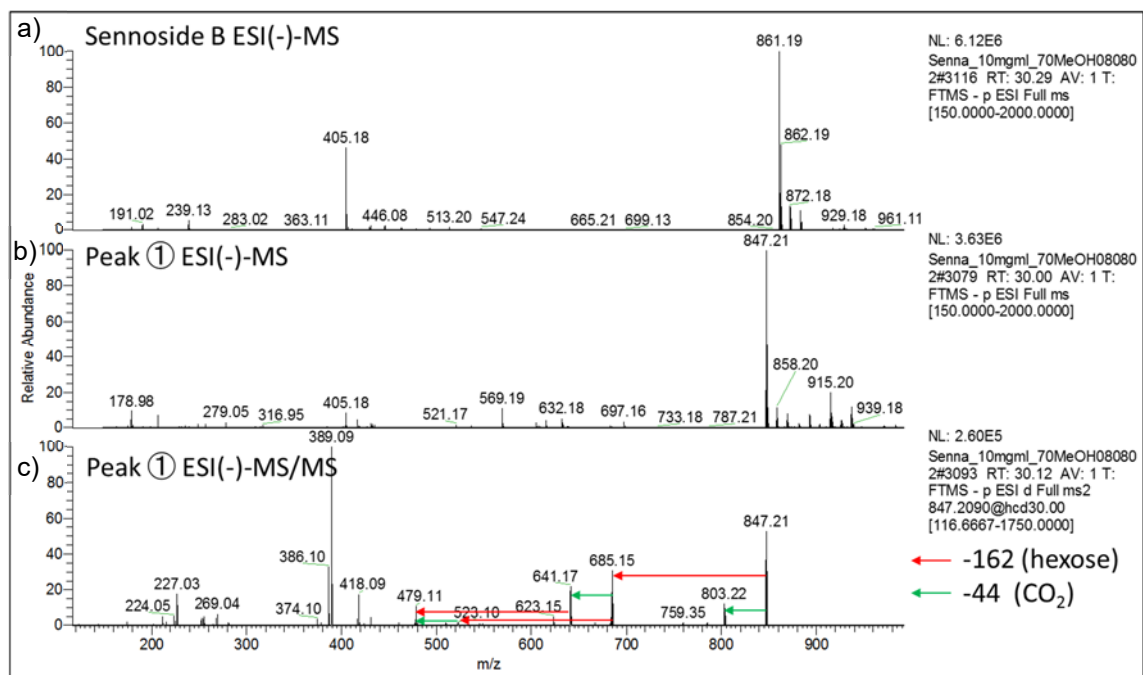


Fig. 4. ピーク①と Sennoside B のマスペクトルの比較 (分析条件 2-1)

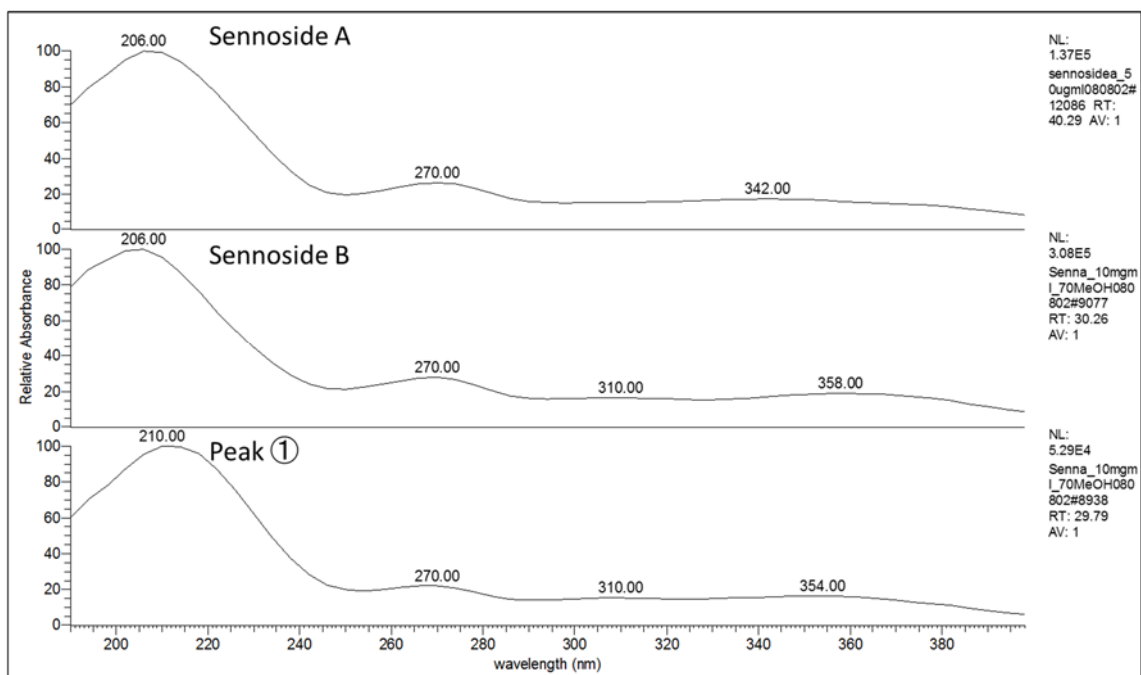


Fig. 5. Sennoside A, Sennoside B とピーク①との UV スペクトルの比較 (分析条件 2-1)

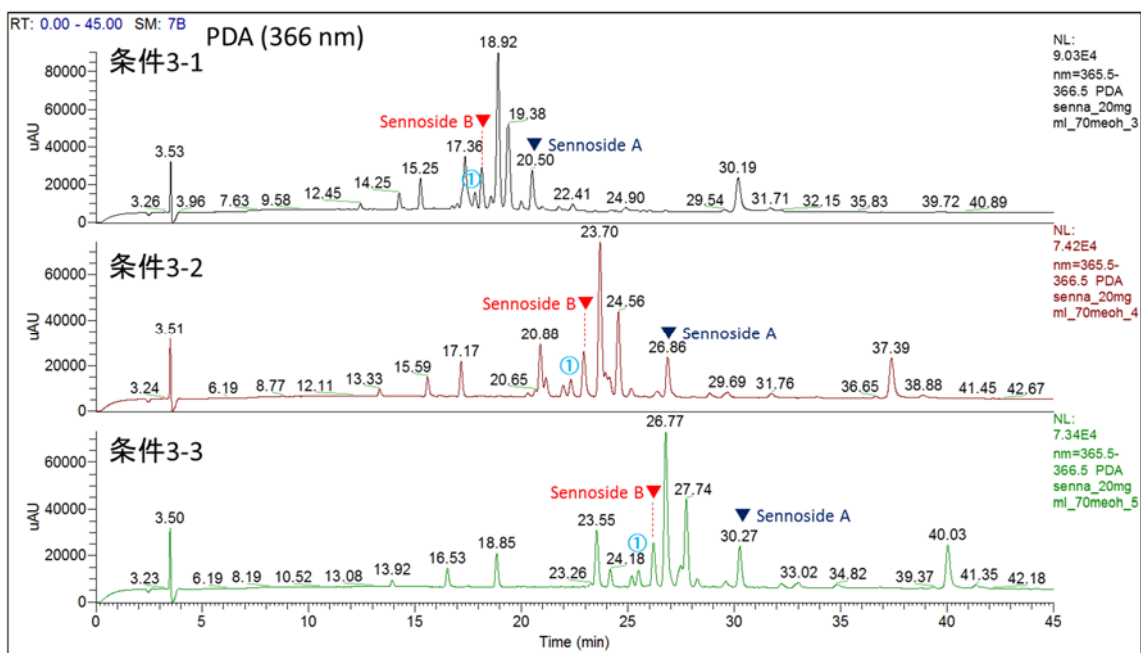


Fig. 6. 日局センナ S-1 の LC-MS クロマトグラム(分析条件 3)

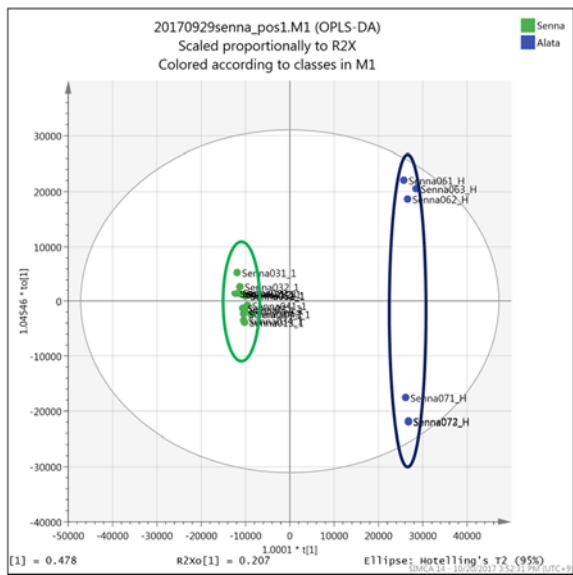


Fig. 7. LC-ESI(+)-MS データからの OPLS-DA プロット

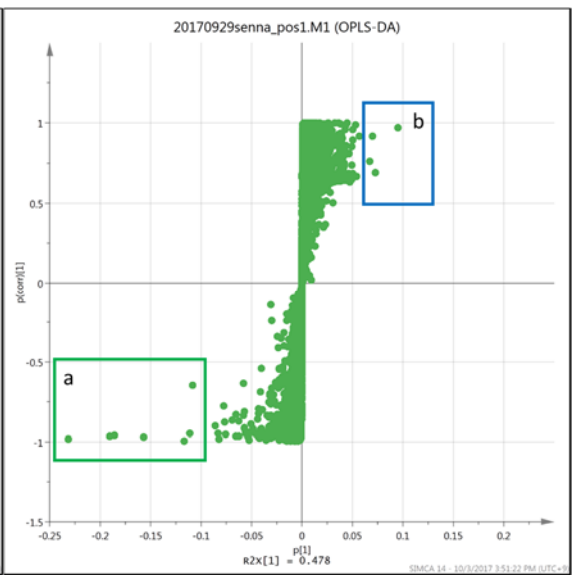


Fig. 8. LC-ESI(+)-MS データからの S-Plot

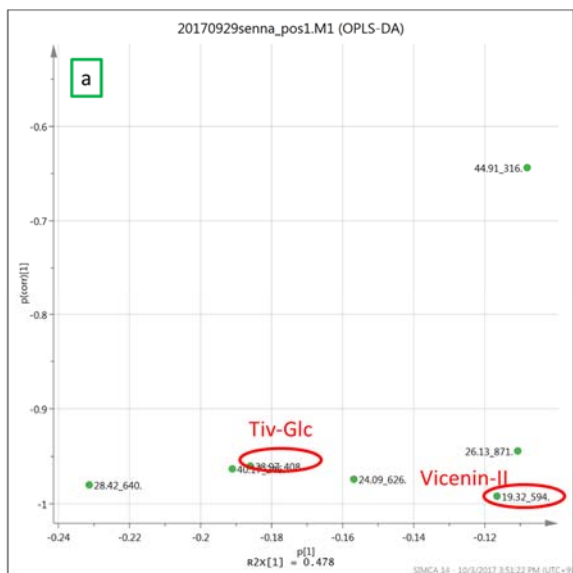


Fig. 9. S-Plot 範囲 a の拡大図

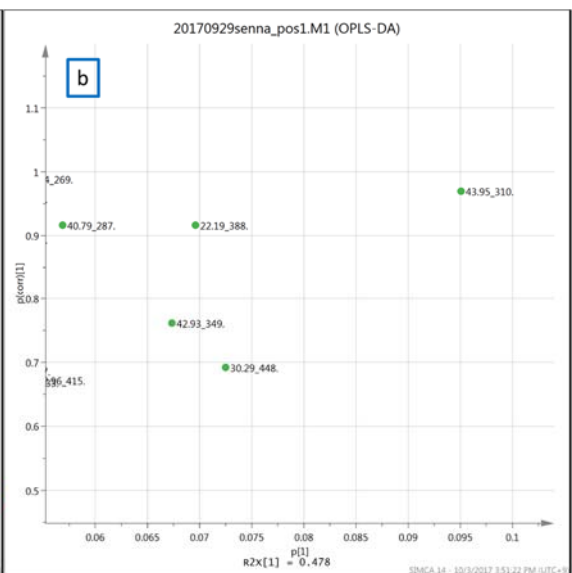


Fig. 10. S-Plot 範囲 b の拡大図

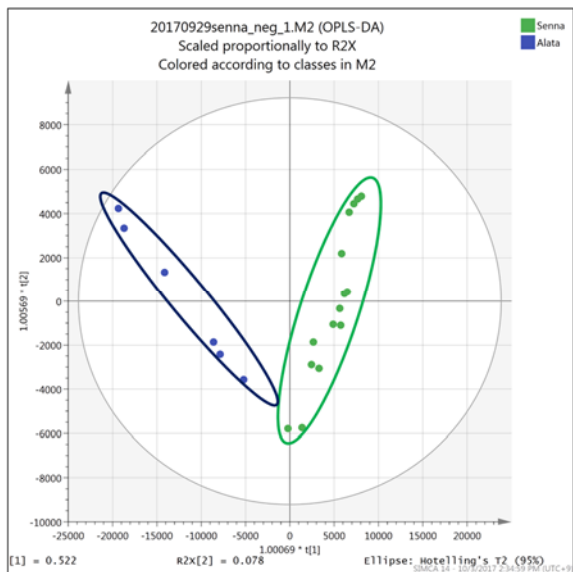


Fig. 11. LC-ESI(-)-MS データからの OPLS-DA プロット

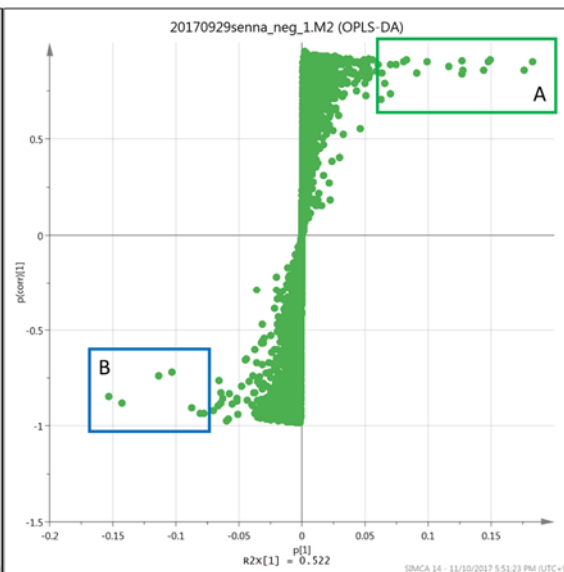


Fig. 12. LC-ESI(-)-MS データからの S-Plot

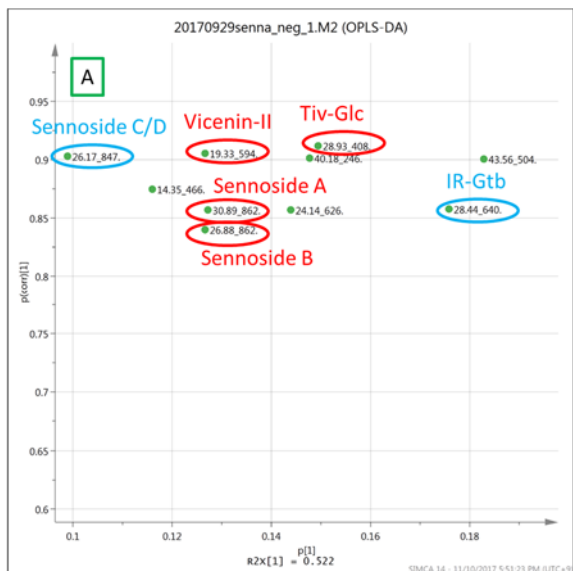


Fig. 13. S-Plot 範囲 A の拡大図

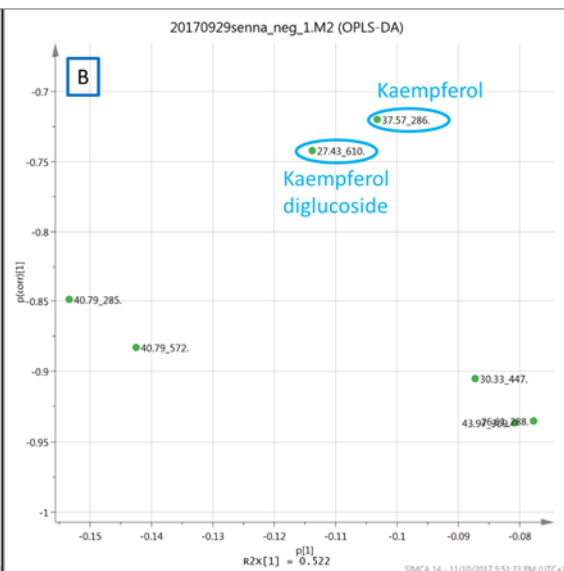


Fig. 14. S-Plot 範囲 B の拡大図

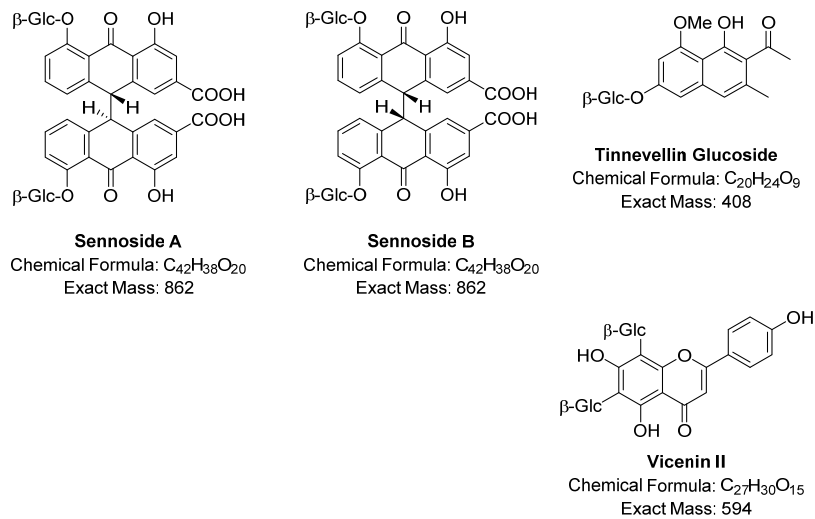


Fig. 15. 判別分析より見出され、同定したセンナの寄与成分

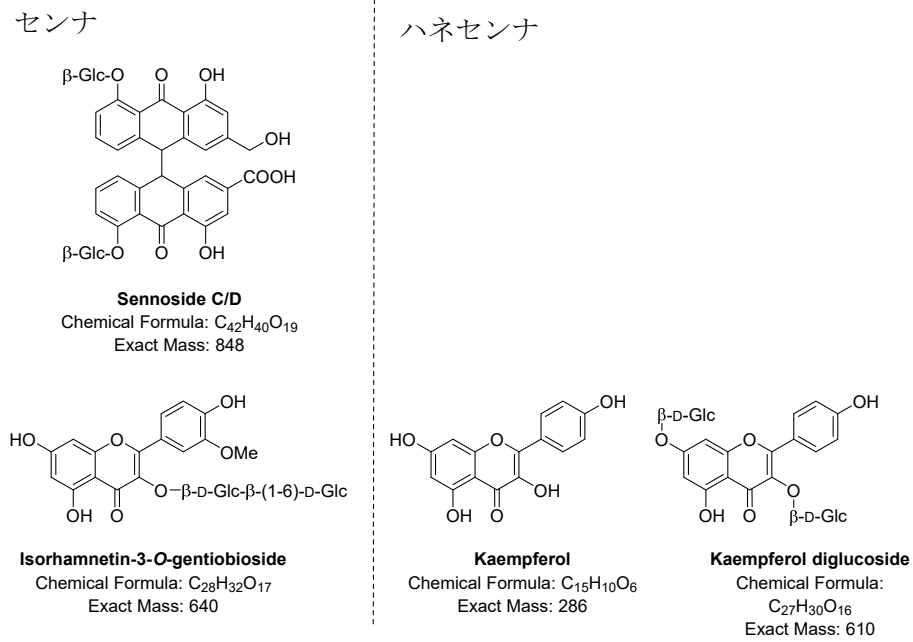


Fig. 16. 判別分析より見出されたセンナ・ハネセンナの推定寄与成分