

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)  
分担研究報告書

分担研究課題 グレーズーンの植物体に関する研究及び食薬区分の量的規制に関する研究

研究分担者 辻本 恭 東京農工大学工学部特任助教

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

研究分担者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究分担者 合田 幸広 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究分担者 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員

研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

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 (2)

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リスト」(専ら医薬品リスト)に掲載されているが、茎は「医薬品として判断しない成分本質リスト」(非医薬品リスト)に掲載されている。しかしながら、原材料にセンナ茎と表示されている市販製品の中には医薬品の常用量に近い含量の **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。これまでに、分離条件の検討を行い、**Sennoside A** 及び **B** を単独のピークとして検出する条件を見出している。また昨年度には、この分離条件を用いて、市販製品中の **Sennoside**(**Sennoside A** 及び **B** の合計)の定量分析を行った。

今回、市販の日局センナおよびハネセンナ葉を検体として、両者の識別に適した化学成分の探索を目的として LC-MS データによる多変量解析を行った。判別分析の結果、センナの指標成分として **Sennoside A、B、C** および **D、Tinnevellin glucoside、Isorhamnetin 3-O-gentiobioside、Vicenin-II** の 7 化合物、ハネセンナの指標成分として **Kaempferol、Kaempferol diglucoside** の 2 化合物を見出した。

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

三宅克典:東京薬科大学 薬学部 薬用植物園  
助教

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、「医薬品の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)リスト」(非医薬品リスト)に掲載されており、キャンドルブッシュ、ゴールド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る。センナは、小葉、葉軸、葉柄、果実が、「専ら医薬品として使用される成分本質リスト」(専ら医薬品リスト)に掲載されており、茎は非医薬品リストに掲載されているため、茎のみが非医薬品として扱うことができる。しかしながら、原材料にセンナ茎と表示された市販製品の中には医薬品の常用量に近い含量の 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、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い、Sennoside A および B が良好に分離する条件を設定することが可能になった [3]。また昨年度には、この分離条件を用いて、市販製品中の Sennoside の定量分析を行った [4]。

今回、日局センナとハネセンナをサンプルとして、その両者を化学的に識別する成分の探索を LC-MS データの多変量解析によって行った。

## 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)および 2017 年 10 月に東京薬科大学薬用植物園より供与された乾燥葉を使用した (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(3 種)について分析を行った。各検体をミキサーミル 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(1500×g、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(1500×g、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 (1)、B (2)は和光純薬工業より購入した。Sennoside C (3)、Sennoside D (4)、Tinnevellin glucoside (6)は Ark Pharm より購入した。Isorhamnetin 3-O-gentiobioside (5)は AK Scientific より購入し、Vicenin-II (7)は Phytolab GmbH & Co.KG より購入した。Kaempferol (9)は t 東京化成より購入した。

### 【分析条件】

[高分解能 LC-MS] 装置: UltiMate 3000 RS LC system 及び Q Exactive Quadrupole および 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 × 2.1 mm、particle size 1.8 μm、Waters 社製)

グラジエント条件 移動相: A: 0.1%ギ酸水溶液, B: 0.1%ギ酸-メタノール

5%B to 35%B (0-10 min), to 65%B (10-40 min), to 95%B (40-40.1 min, 5 min hold), 0.1 mL/min

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 °C, Vaporizer

temperature: 300 °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. 2.0 (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. センナ・ハネセンナの LC-MS クロマトグラム

市販の日局センナ 5 種、種子島産および東京産ハネセンナ 3 種を切断、粉碎し得られた粉末の 70%メタノール溶液を  $n = 3$  で LC-MS 分析を行った。まず、Sennoside A (1)、B (2)、C (3) および D (4) の標準品を測定し、それぞれのピークが良好に分離していることを確認した (Fig. 1)。次に、日局センナ 5 検体の LC-ESI(+)-MS クロマトグラムを Fig. 2 に示した。TIC からは Sennoside D (4)、Isorhamnetin 3-*O*-gentiobioside (IR-Gtb, 5)、Tinnevellin glucoside (Tiv-Glc, 6) を同定した。さらに、Sennoside A (1)、B (2) のナトリウム付加物 ( $m/z = 885$ )、Sennoside C (3)、D (4) のナトリウム付加物 ( $m/z = 871$ ) を確認することにより、すべての検体に Sennoside A~D を含むセンナグルコシド化合物が含有されていることを確認した (Fig. 3、4)。日局センナ 5 検体の LC-ESI(-)-MS についても同様の解析を行い、すべての検体に Sennoside A~D を含むセンナグルコシド化合物が含有されていることを確認した (Fig. 5)。同時に、Isorhamnetin 3-*O*-gentiobioside (5)、Tinnevellin glucoside (6) および Vicenin II (7) が同

定され、さらに推定成分として Cassiaphenone B-2-glucoside (8) も検出された。

次に、ハネセンナ 3 検体の LC-ESI(+)-MS クロマトグラムを Fig. 6 に示した。ここからは、センナ同様 Cassiaphenone B 2-glucoside (8) は確認されたが、Sennoside 類のピークは明確に見られなかった。このクロマトグラムについて、 $m/z = 885$  (Sennoside A、B のナトリウム付加物) についてマスキング表示したところ (Fig. 7)、すべての検体に Sennoside A、B が含有されていることを確認した。同様に、 $m/z = 871$  (Sennoside C、D のナトリウム付加物) についてマスキング表示したところ (Fig. 8)、すべての検体に Sennoside C、D が含有されていることを確認した。LC-ESI(-)-MS クロマトグラムについても同様の解析を行い、すべての検体に Sennoside A~D を含むセンナグルコシド化合物及び Cassiaphenone B 2-glucoside (8) が含有されていることをさらに確認した (Fig. 9、10、11)。

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

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 (OPLS-DA、Scaling: palato) を行った。その結果、LC-ESI(+)-MS 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. 12)。ハネセンナのグループにおいては、種子島産のサンプルと東京産のグループが分離されていた。これは、産地の差異が反映されている可能性が見られるため、さらにサンプル数を増やして検討を行う必要があると考えられる。

LC-ESI(+)-MS の S-Plot (Fig. 13) より、センナの指標成分として Sennoside C (3)、Isorhamnetin 3-*O*-gentiobioside (5)、Tinnevellin glucoside (6) および Vicenin-II (7) が見出された (Fig. 14)。ハネセンナの指標成分としては、Kaempferol (9) が見出された (Fig. 15)。さらに、その配糖体 Kaempferol diglucoside (10) が推定された。

一方、LC-ESI(-)-MS の OPLS-DA スコアプロット上でもセンナ、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. 16)。ここでも、ハネセンナのグループにおいては、種子島産のサンプルと東京産のグループが分離されていた。LC-ESI(-)-MS の S-Plot (Fig. 17)からは、さらにセンナの判別に Sennoside A (1)、B (2)、C (3)、Isorhamnetin 3-O-gentiobioside (5)、Tinnevellin glucoside (6) および Vicenin-II (7) が寄与しているものと考えられた(Fig. 18)。ハネセンナの判別には、Kaempferol diglucoside (10) が寄与しているものと考えられたが、その構造については今後の課題である(Fig. 19)。

#### D. 考察

日局センナ、ハネセンナ葉サンプル抽出物の LC-MS クロマトグラム (TIC) においては Sennoside 類の検出が困難であった。当該化合物の分子量に由来する付加物イオンのマスクロマトグラムにより Sennoside 類の検出を行うことが可能であったが、イオン化条件の設定などの検討の必要性が考えられた。ハネセンナのマスクロマトグラムからも、Sennoside 類を確認する事が可能であったが、種子島産ハネセンナと東京産ハネセンナに含有成分の差異が見られた。東京産ハネセンナには Sennoside C、D のような還元化合物が多く含まれていた。これが地域差によるものか他の要因に由来するものなのかは現在不明であるので、さらにサンプルを増やし検討を重ねる必要があるものと考えられる。

得られた LC-MS データを用いた OPLS-DA から、Sennoside A (1)、Sennoside B (2)、Sennoside C (3)、Sennoside D (4)、Isorhamnetin 3-O-gentiobioside (5)、Tinnevellin glucoside (6)、Vicenin-II (7) の 7 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. 20)。一方ハネセンナのグループには Kamepferol (9) および Kamepferol 配糖体 (10)

の寄与が考えられた(Fig. 21)。Vicenin-II (7) はセンナ・ハネセンナ間においてはセンナのクロマトグラムにのみ見られるので、両者の判別に有効な成分となる可能性が考えられた。なお、今回同定もしくは推定された成分(1~10)の ESI(-)-MS スペクトルおよび UV スペクトルを Fig. 22-1~22-3 に示した。

#### E. 結論

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、寄与成分として 9 種の化合物を同定した。センナについて 7 種、ハネセンナについて 2 種の化合物が寄与成分として見出されたが、その中でも Vicenin-II がセンナ・ハネセンナ間においてセンナ特有の指標成分となる可能性が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

1) 辻本 恭、内山奈穂子、丸山卓郎、徳本廣子、安食菜穂子、林 茂樹、三宅克典、川原信夫、袴塚高志

高分解能 LC-MS を用いた Cassia 属ハネセンナ及びセンナの分析に関する研究  
日本生薬学会 第 65 回年会(2018 年 9 月、広島)

2) 辻本 恭、徳本廣子、細江潤子、丸山卓郎、川原信夫、林 茂樹、安食菜穂子、小関良宏、袴塚高志、内山奈穂子

センナ及びハネセンナ含有健康食品に関する Sennoside の定量分析

日本薬学会 第 140 年会(2020 年 3 月、京都)

##### 2. 誌上発表

該当無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

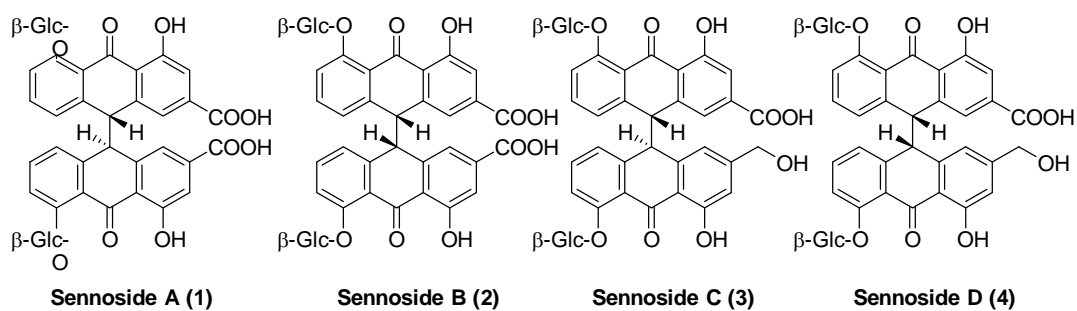
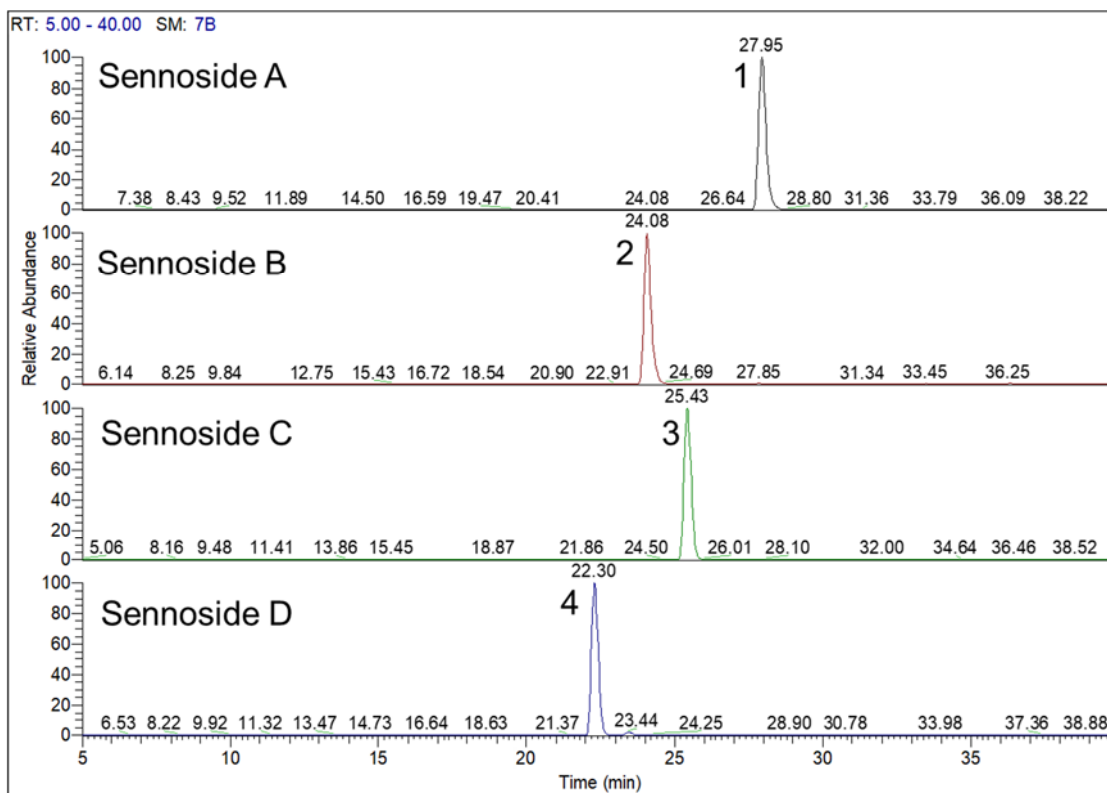
該当無し

## H. 参考文献

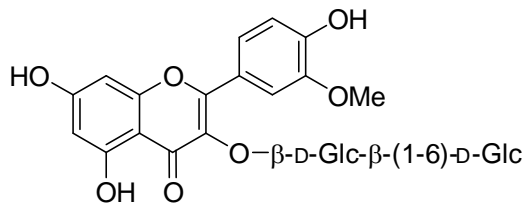
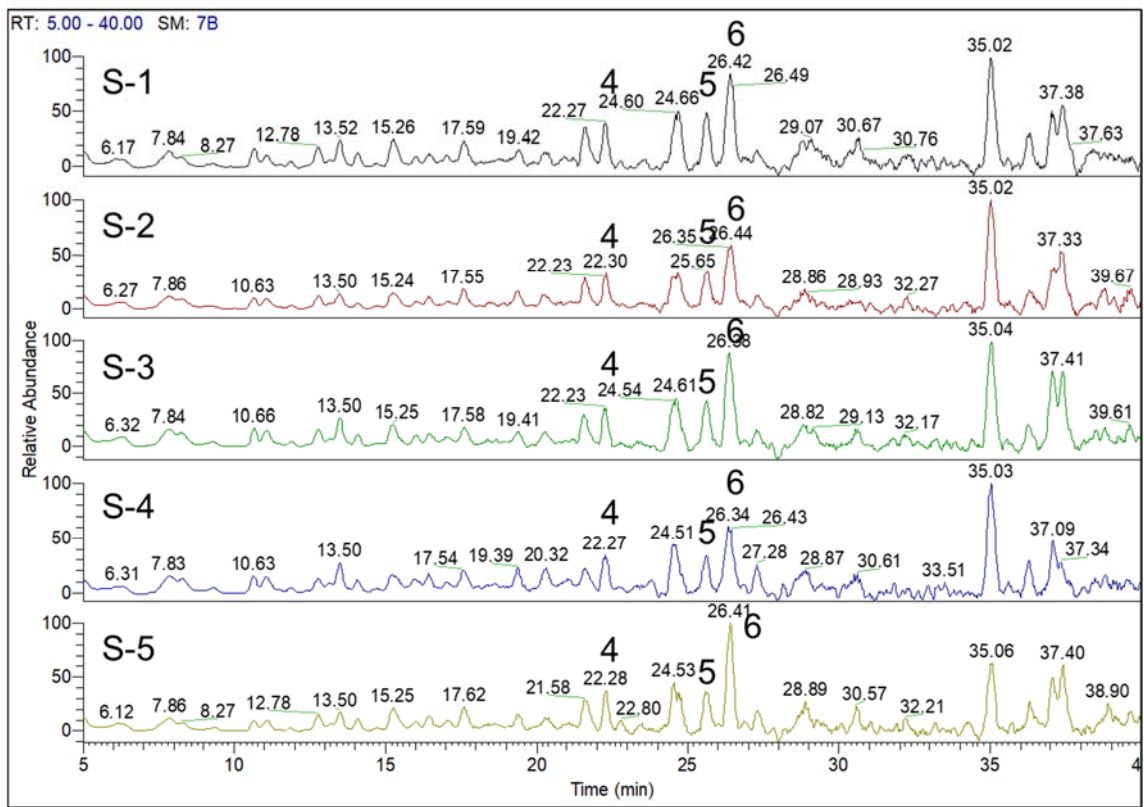
- [1] 国民生活センター; ダイエットなどをうたった「健康食品」ーセンナ茎を使った茶類を中心にー、2005年9月7日、[http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20050907\\_1.html](http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20050907_1.html) (accessed: November 2018)。
- [2] 国民生活センター; キャンドルブッシュを含む健康茶ー下剤成分(Sennoside)を含むため過剰摂取に注意ー、2014年1月23日、[http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20140123\\_1.html](http://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20140123_1.html) (accessed: November 2018)。
- [3] 内山奈穂子ら, 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. 厚生労働行政推進調査事業費補助金 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業. 無承認無許可医薬品の調査・分析及び量的概念を含む専ら医薬品の規制に関する研究. 平成 29 年度 総括・分担研究報告書(H27-医薬-指定-010)研究代表者 袴塚 高志, 2018 年 3 月, pp. 69-78.
- [4] 内山奈穂子ら, センナ茎およびハネセンナ含有健康食品における Sennoside の定量分析. 厚生労働行政推進調査事業費補助金 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス政策研究事業「専ら医薬品」たる成分本質の判断のための調査・分析及びその判断基準・範囲の整備に関する研究. 平成 30 年度 総括・分担研究報告書(H30-医薬-指定-005)研究代表者 袴塚 高志, 2019 年 3 月, pp. 61-74.

**Table 1.** 使用サンプル

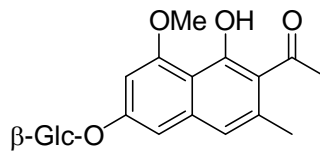
No.	試料	形態	産地	入手時期
S-1	日局センナ	刻み	インド	2015年7月
S-2	日局センナ	刻み	インド	2016年
S-3	日局センナ	粉末	インド	2015年8月
S-4	日局センナ	刻み	インド	2016年
S-5	日局センナ	刻み	インド	不明
HS-1	ハネセンナ葉	全形	日本 (種子島)	2016年12月
HS-2	ハネセンナ葉	全形	日本 (種子島)	2015年12月
HS-3	ハネセンナ葉	全形	日本 (東京)	2017年10月



**Fig. 1.** Sennoside A, B, C および D の LC-ESI(+)-MS クロマトグラム(TIC)



Isorhamnetin-3-O-gentiobioside (5)



Tinnevellin Glucoside (6)

Fig. 2. 日局センナの LC-ESI(+)-MS クロマトグラム (TIC)

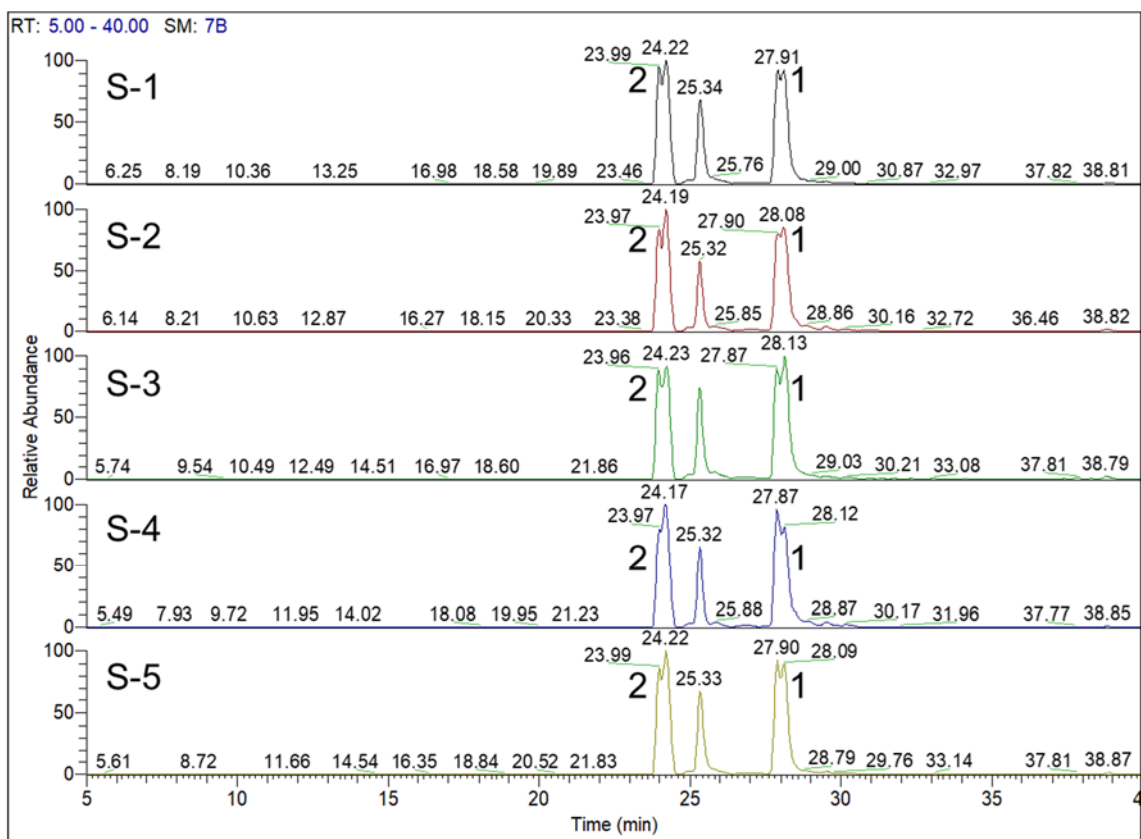


Fig. 3. 日局センナの LC-ESI(+)-MS クロマトグラム ( $m/z = 885$ )

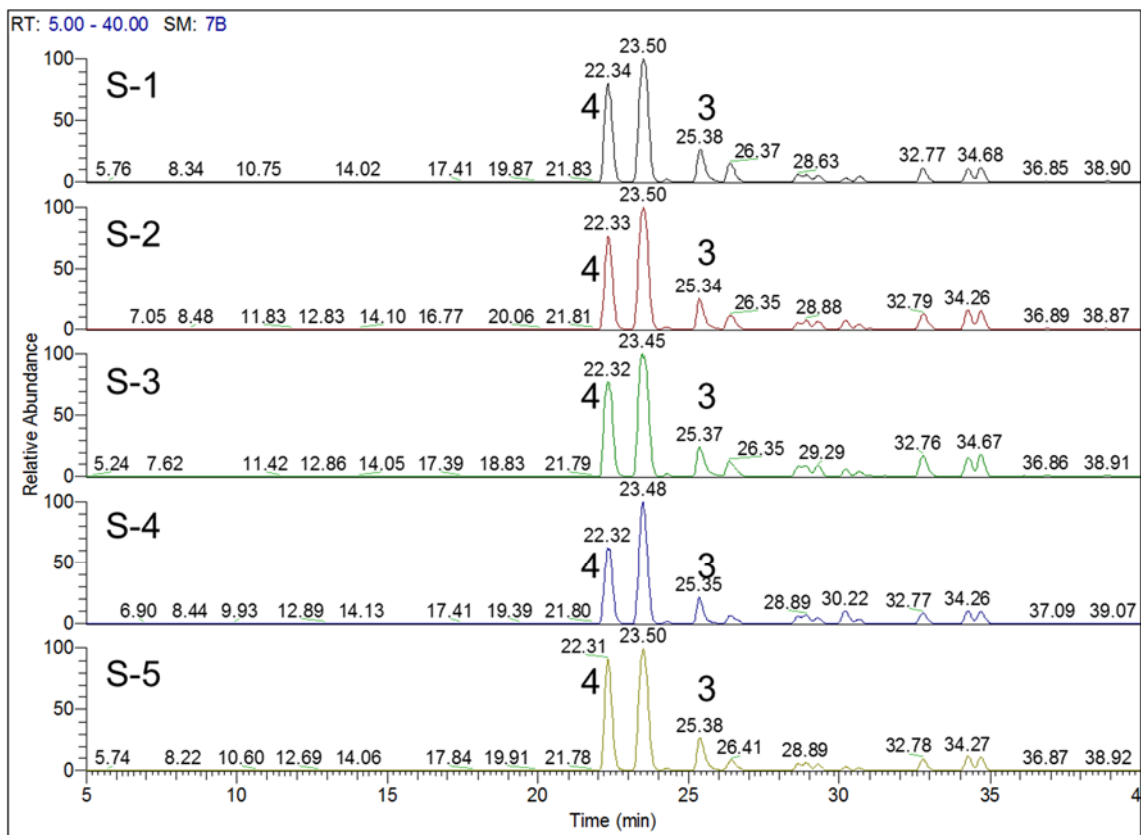
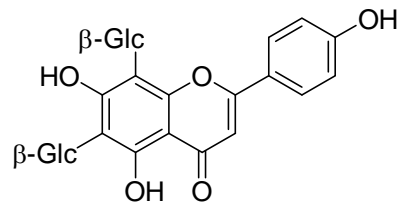
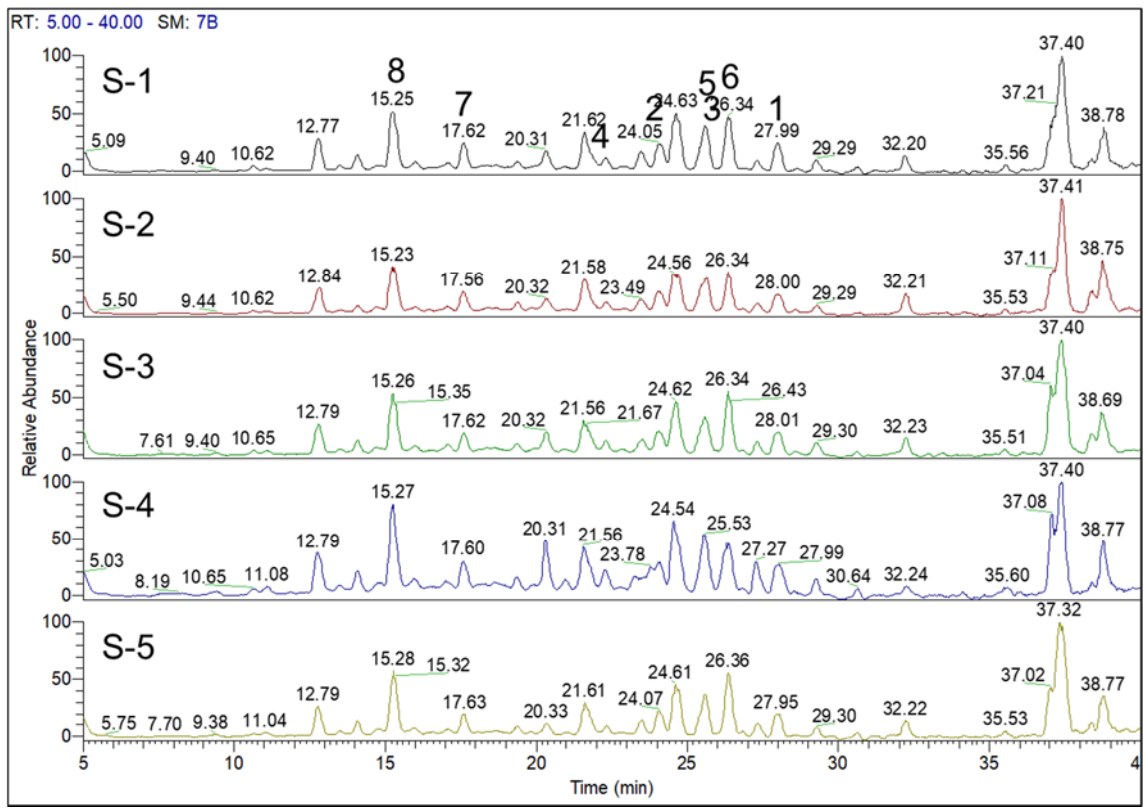
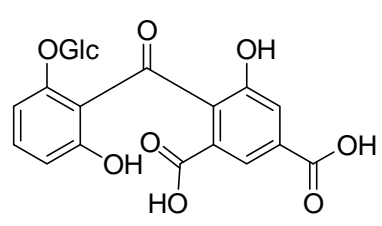


Fig. 4. 日局センナの LC-ESI(+)-MS クロマトグラム ( $m/z = 871$ )





Vicenin II (7)



Cassiaphenone B 2-glucoside (8)

Fig. 5. 日局センナの LC-ESI(-)-MS クロマトグラム(TIC)

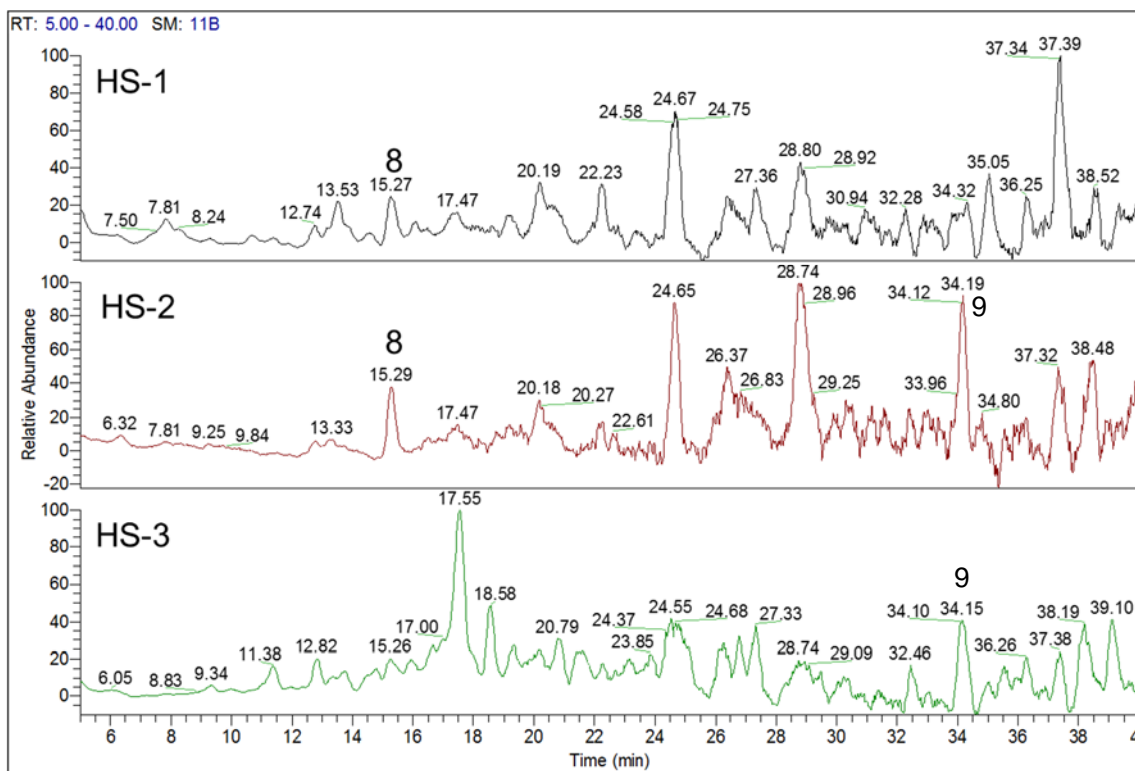


Fig. 6. ハネセンナの LC-ESI(+)-MS クロマトグラム(TIC)

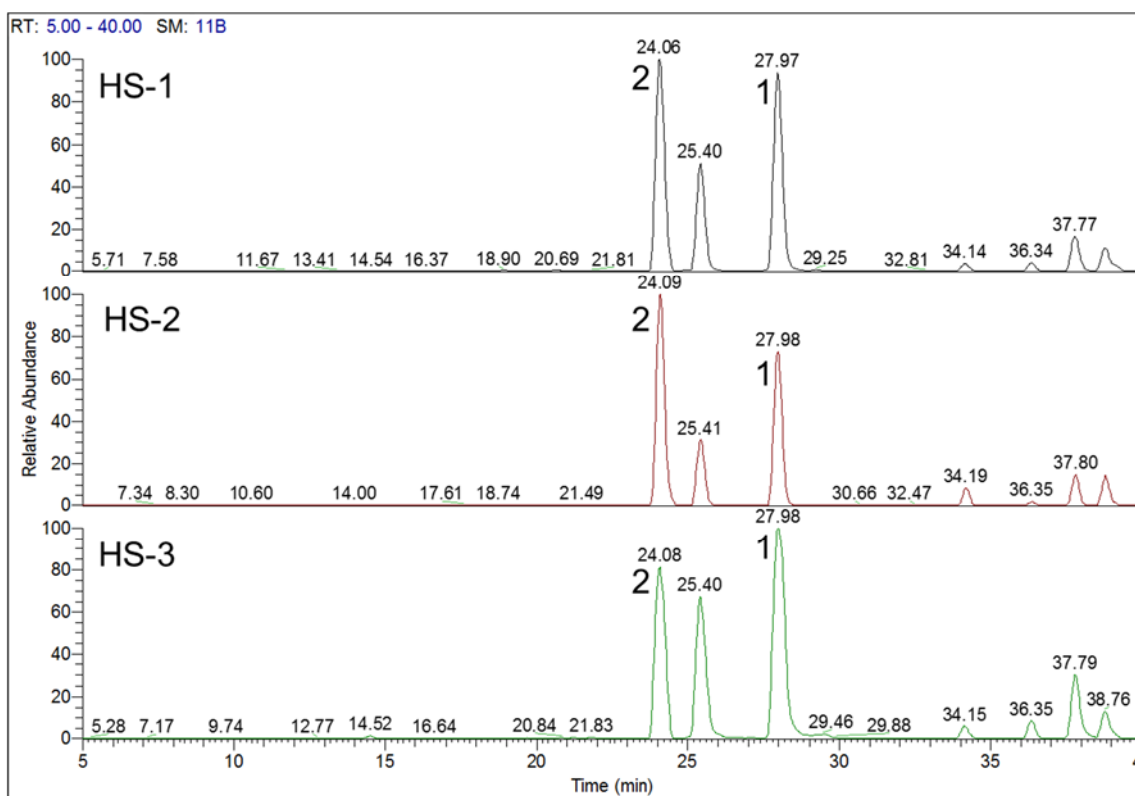


Fig. 7. ハネセンナの LC-ESI(+)-MS クロマトグラム( $m/z = 885$ )

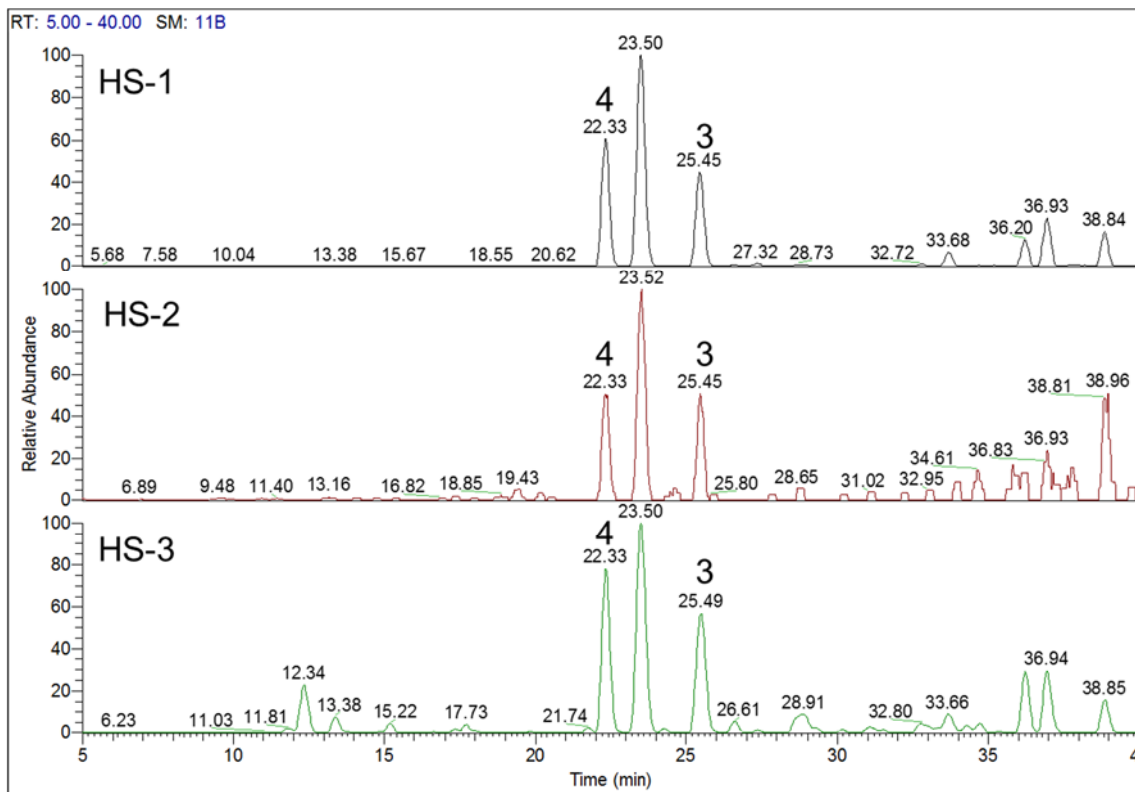


Fig. 8. ハネセンナの LC-ESI(+)-MS クロマトグラム ( $m/z = 871$ )

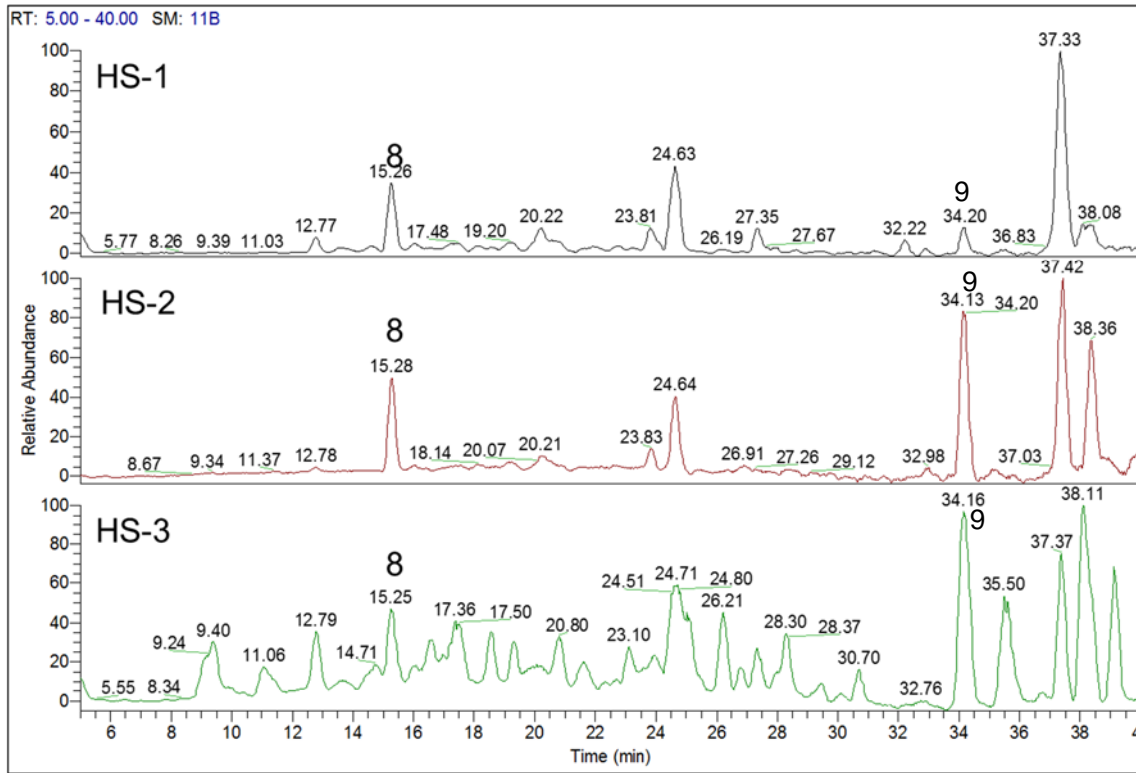


Fig. 9. ハネセンナの LC-ESI(-)-MS クロマトグラム(TIC)

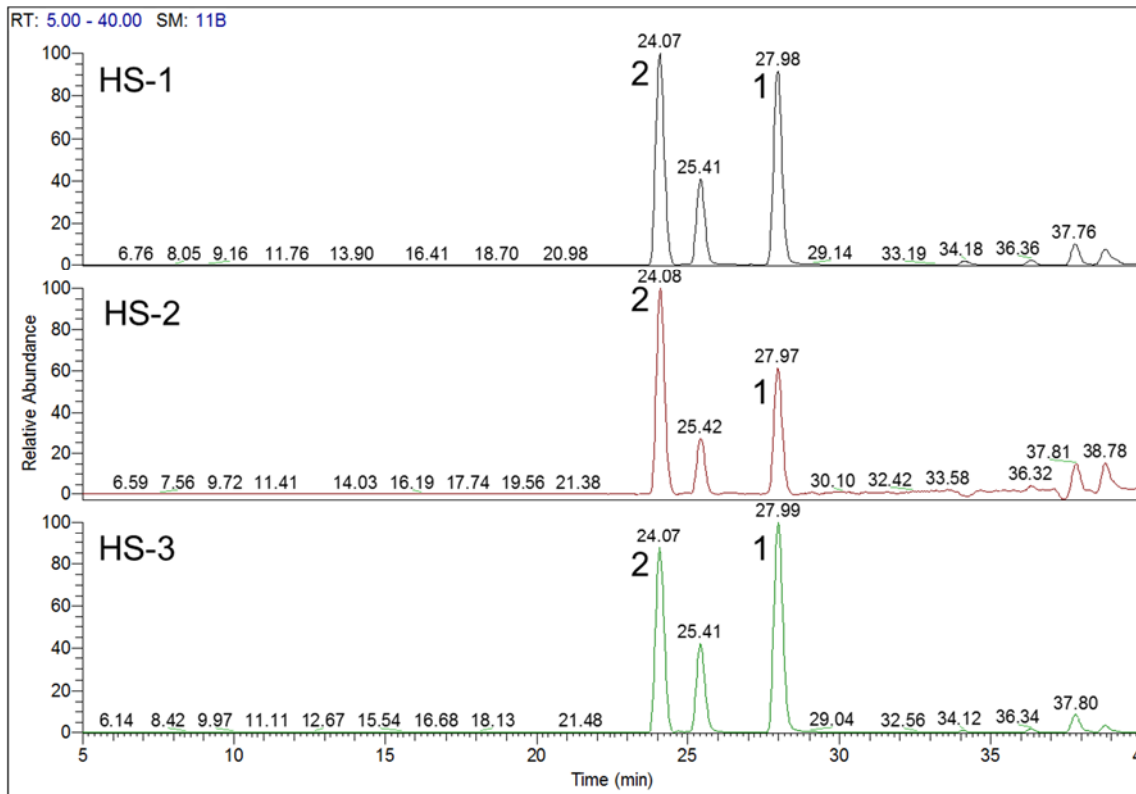


Fig. 10. ハネセンナの LC-ESI(-)-MS クロマトグラム( $m/z = 861$ )

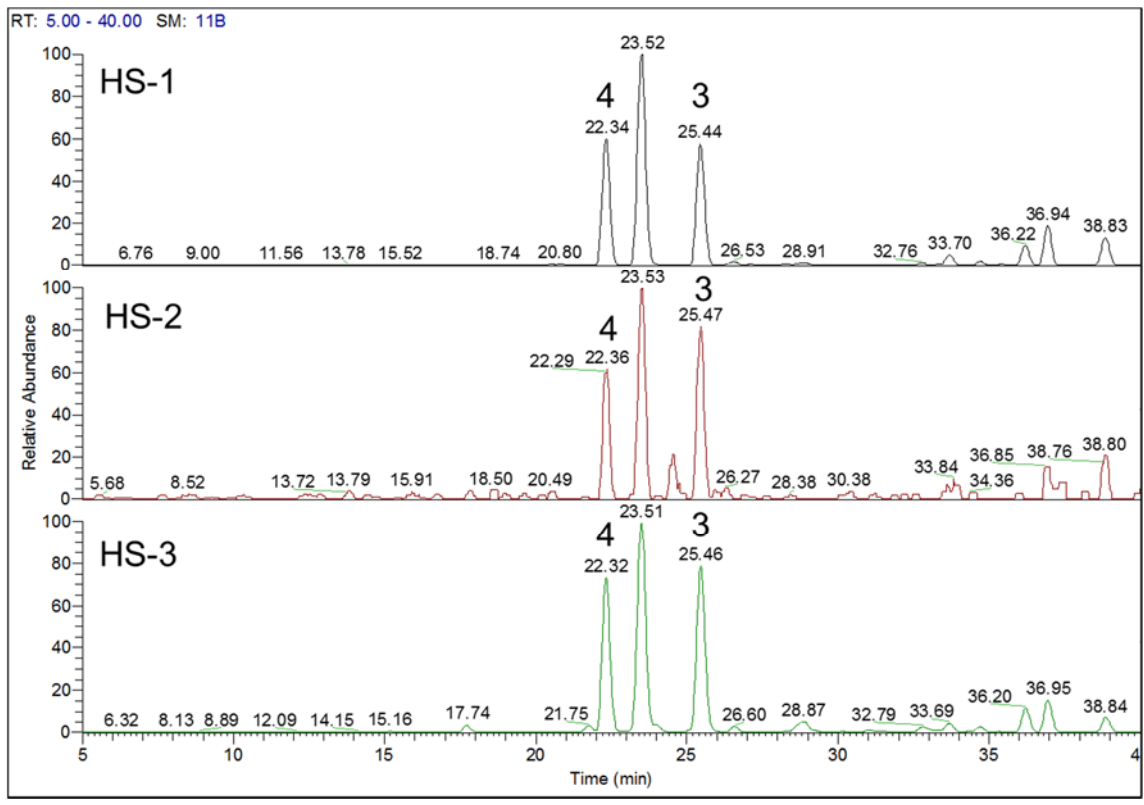


Fig. 11. ハネセンナの LC-ESI(-)-MS クロマトグラム ( $m/z = 847$ )

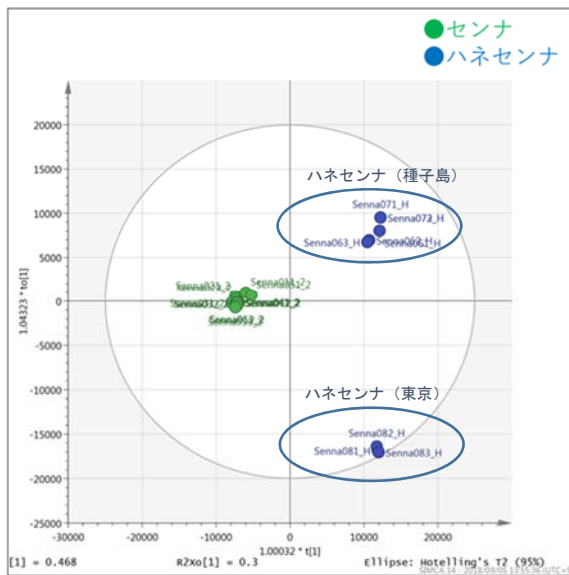


Fig. 12. LC-ESI(+)-MS データからの OPLS-DA プロット

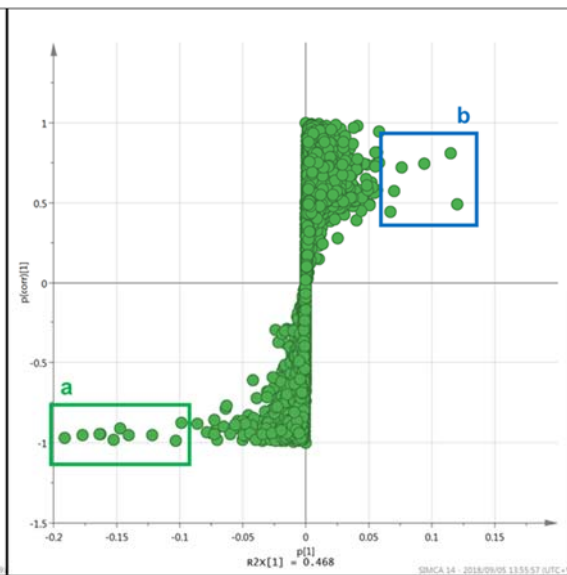


Fig. 13. LC-ESI(+)-MS データからの S-Plot

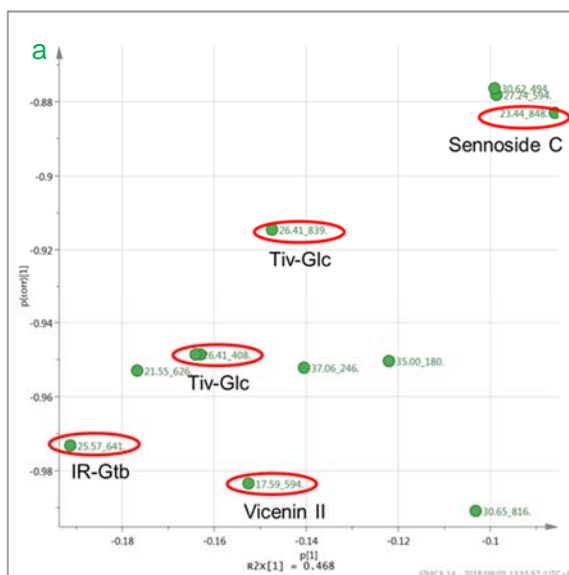


Fig. 14. S-Plot 範囲 a の拡大図

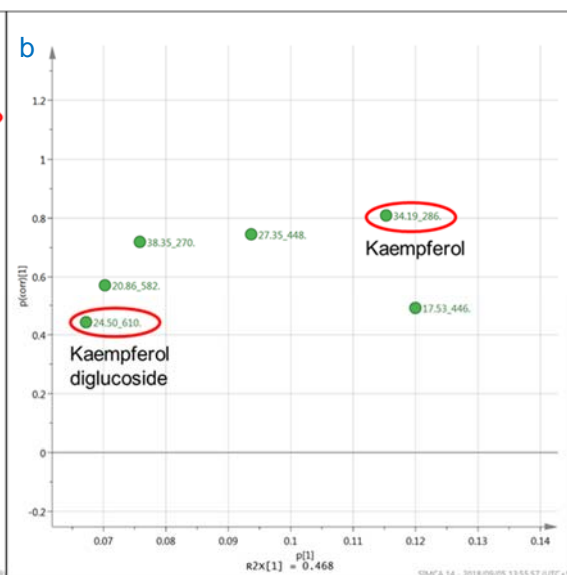


Fig. 15. S-Plot 範囲 b の拡大図

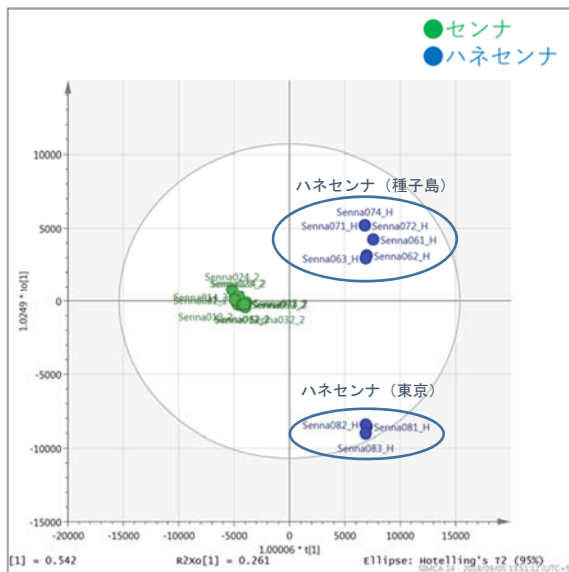


Fig. 16. LC-ESI(-)-MS データからの OPLS-DA プロット

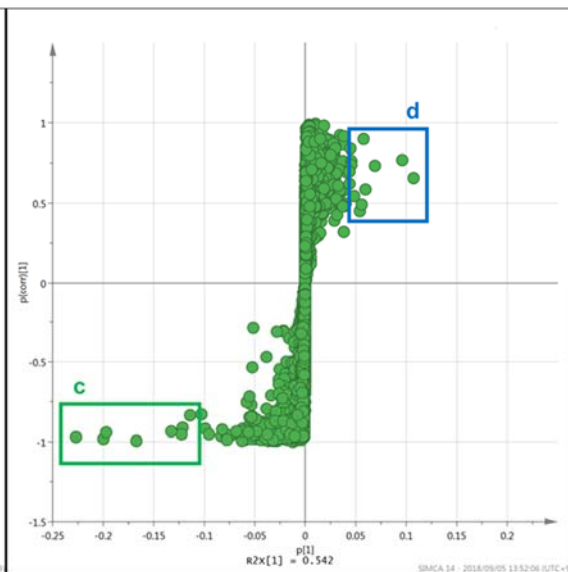


Fig. 17. LC-ESI(-)-MS データからの S-Plot

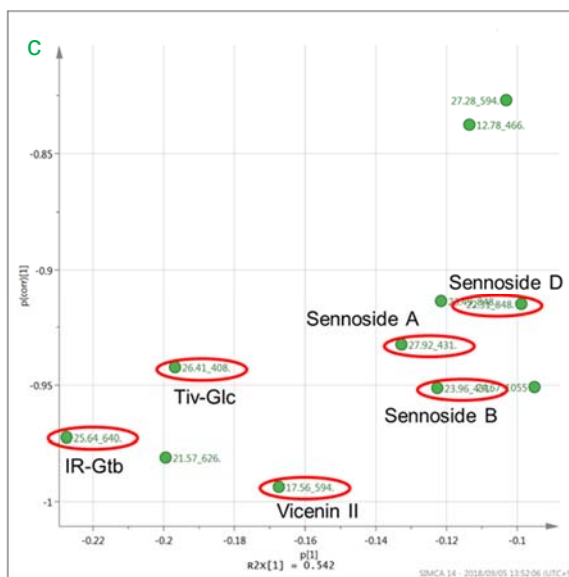


Fig. 18. S-Plot 範囲 c の拡大図

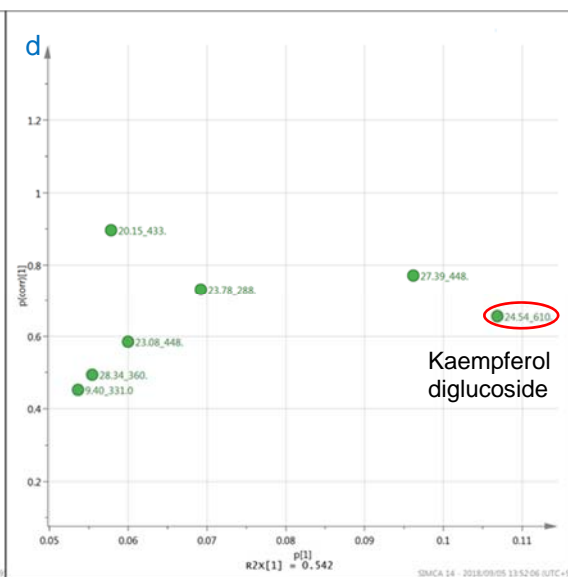
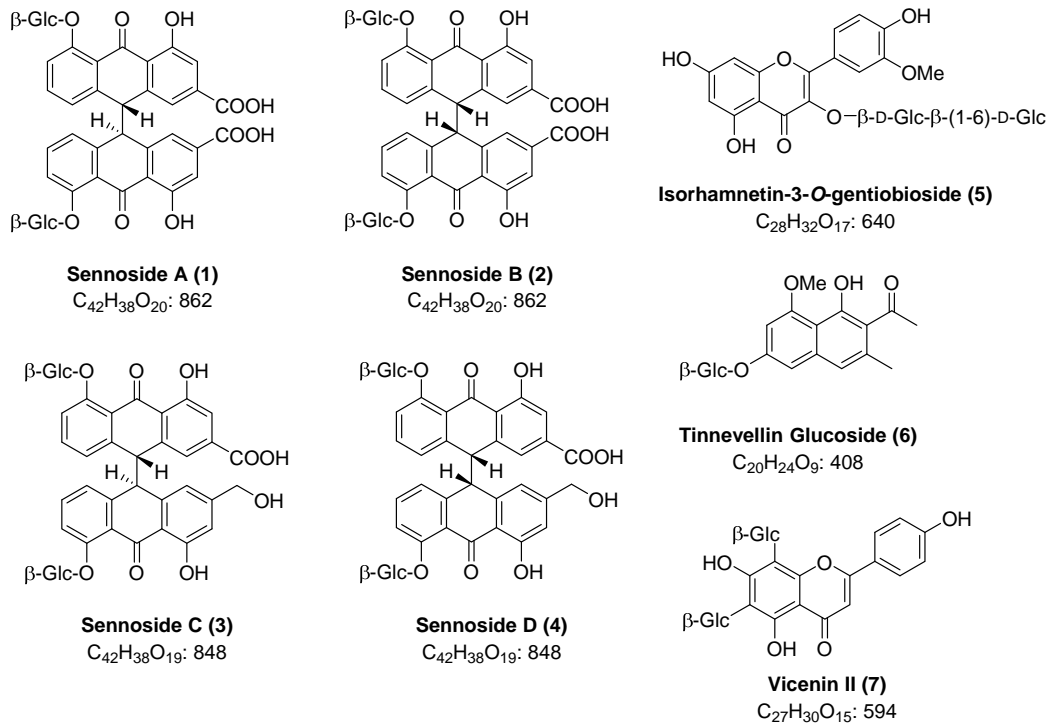
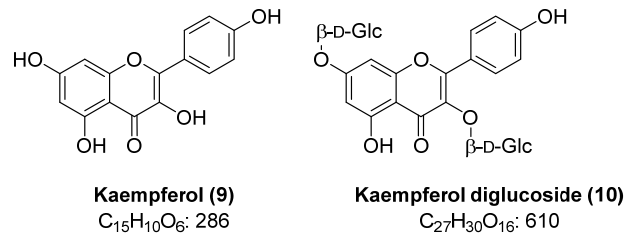


Fig. 19. S-Plot 範囲 d の拡大図



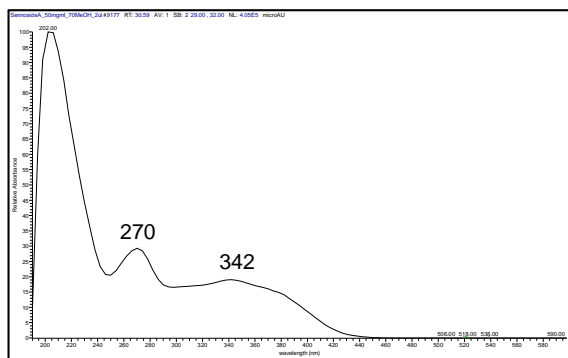
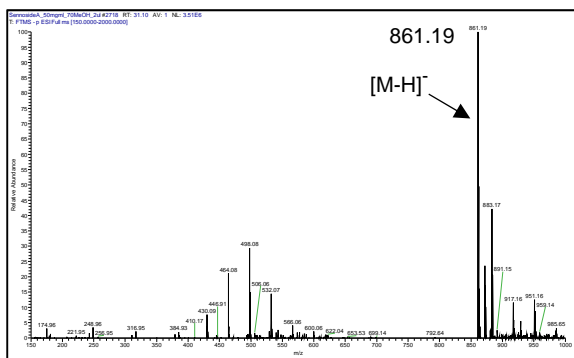
**Fig. 20.** 判別分析より見出され、同定したセンナの寄与成分



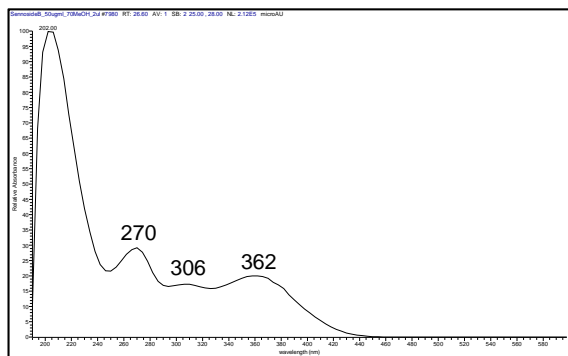
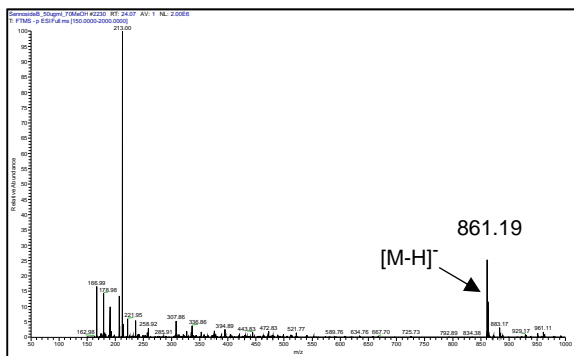
**Fig. 21.** 判別分析より同定されたハネセンナの寄与成分 (9) 及び推定されたハネセンナの寄与成分 (10)



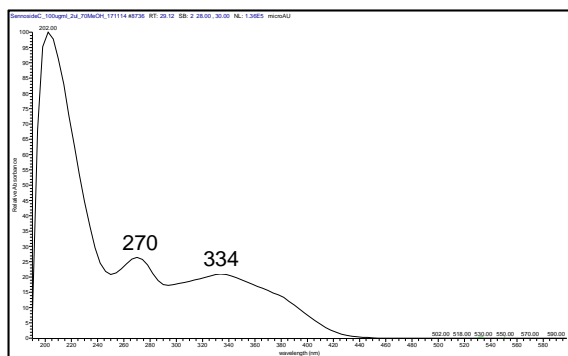
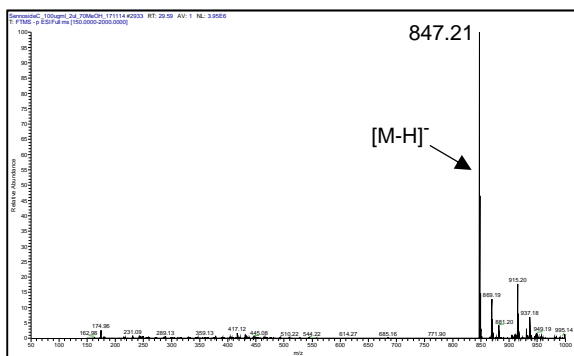
### Sennoside A (1)



### Sennoside B (2)



### Sennoside C (3)



### Sennoside D (4)

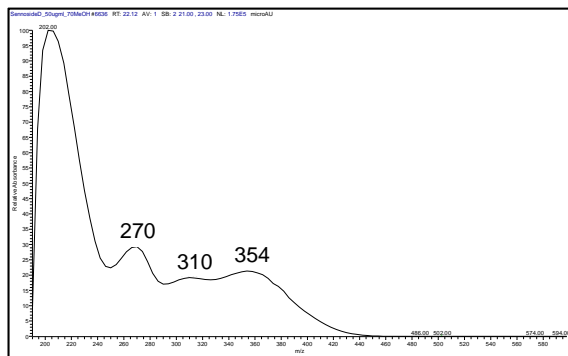
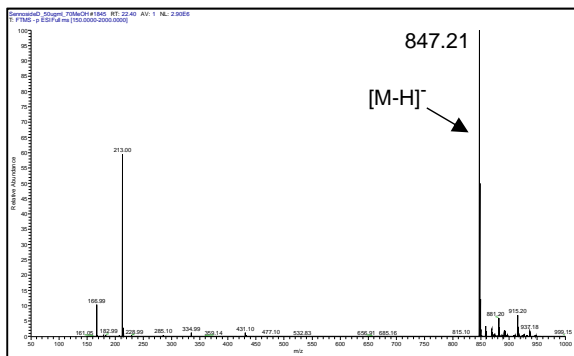
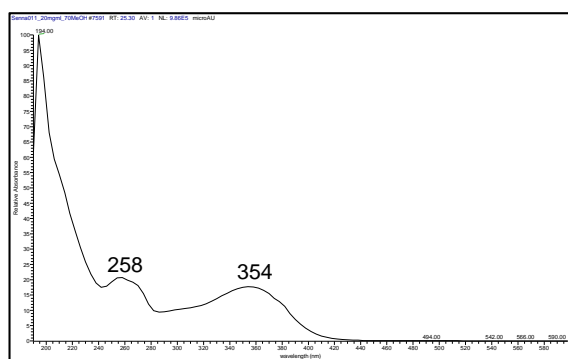
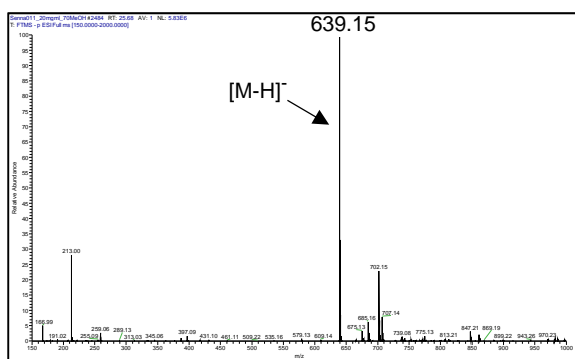


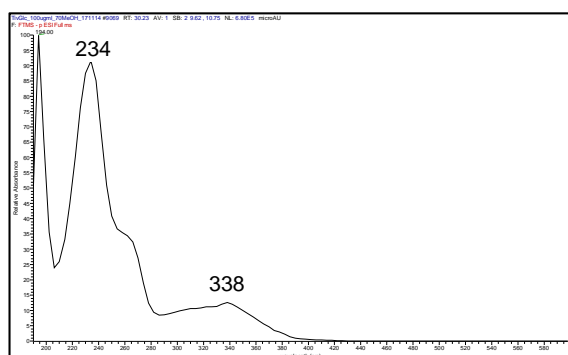
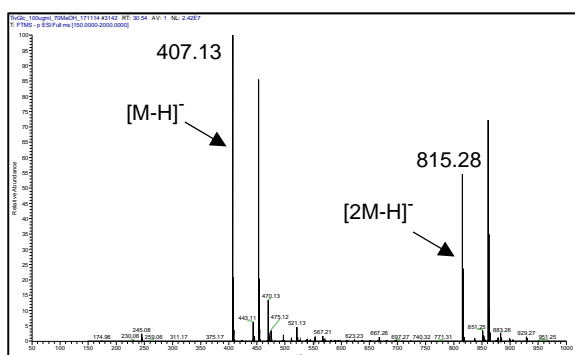
Fig. 22-1. 同定もしくは推定された成分(1~10)のESI(-)-MSスペクトルおよびUVスペクトル

Isorhamnetin-3-O-gentiobioside (5)

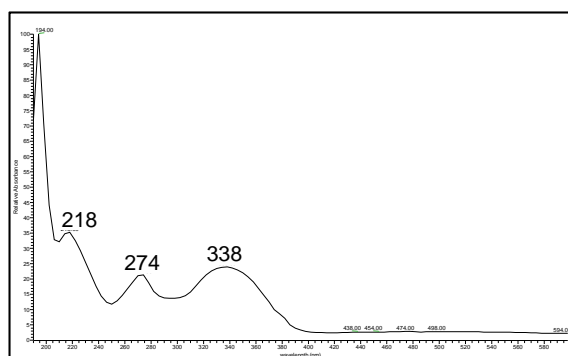
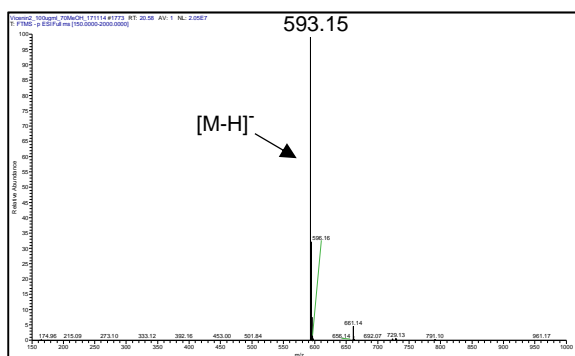


Tinnevellin glucoside (6)

847.21



Vicenin II (7)



Cassiaphenone B 2-glucoside (8): C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>13</sub> 480

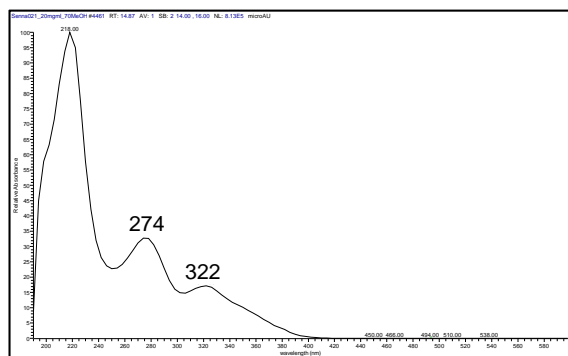
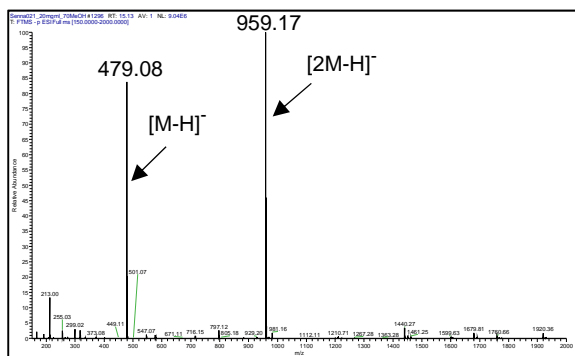
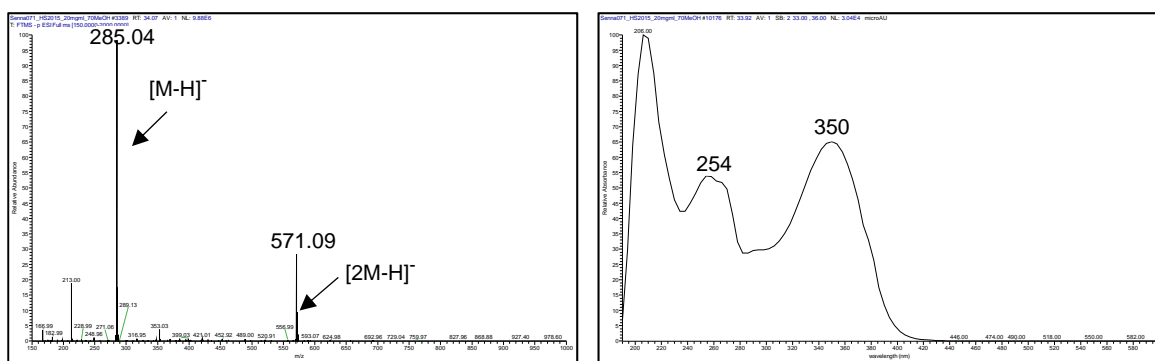


Fig. 22-2. 同定もしくは推定された成分(1~10)のESI(-)-MSスペクトルおよびUVスペクトル

### Kaempferol (9)



### Kaempferol diglucoside (10)

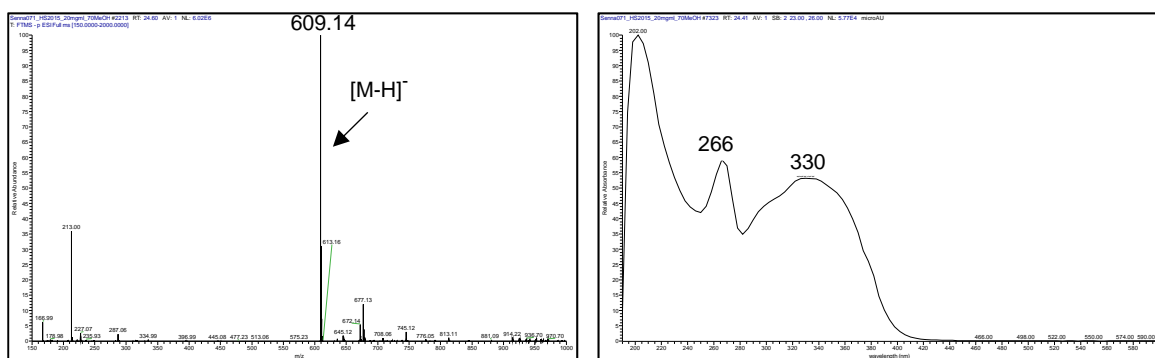


Fig. 22-3. 同定もしくは推定された成分(1-10)の ESI(-)-MS スペクトルおよび UV スペクトル